



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

**VERIFIZIERUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN BIOLOGISCHEN
WIRKSAMKEIT VON PHOTONEN IM ENERGIEBEREICH VON
10 KEV - 6 MEV MITTELS ONKOGENER TRANSFORMATIONS-RATEN
AN MAUS-EMBRYOFIBROBLASTEN UND IN DER MENSCHLICHEN
CGL 1 - HYBRIDZELLINIE**

BMU - 2005-657



WIR STEuern UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN.

BMU – 2005-657

**„Verifizierung der unterschiedlichen biologischen
Wirksamkeit von Photonen im Energiebereich von 10
keV – 6 MeV mittels onkogener Transformationsraten
an Maus-Embryofibroblasten und in der menschlichen
CGL 1 - Hybridzelllinie“**

Prof. Dr. Ernst Schmid

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Institut für Strahlenbiologie

Ingolstädter Landstraße 1

85764 Neuherberg

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Referat RS I 2

Postfach 12 06 29

53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2005

Kurzfassung

Frankenberg und Mitarbeiter (Radiat. Res. 157, 99-105, 2002) publizierten Befunde, wonach sie für die neoplastische Transformation einer menschlichen Hybrid-Zelllinie (CGL1) eine relative biologische Wirksamkeit im niederen Dosisbereich (RBW_M) von 4,3 zwischen Mammographie-Röntgenstrahlung (29 kV) und konventioneller 200 kV Röntgenstrahlung beobachtet haben. Unter Verwendung von Daten aus der Literatur berichteten sie zudem von einer RBW_M von ungefähr 8 gegenüber ^{60}Co Gamma-Strahlung und von einer Relevanz ihrer Befunde für die Risikoabschätzung. Diese Schlussfolgerung erscheint aber nicht gerechtfertigt. Die Ergebnisse ihrer Transformationsstudie weisen so starke statistische Schwankungen auf, dass sich eine Generalisierung der erhobenen RBW_M Werte nicht vertreten lässt. Dazu kommt, dass die Selektion der zitierten Daten aus der Literatur sehr einseitig erfolgte und die daraus gezogenen Schlüsse unzureichend erscheinen, um die angegebenen RBW_M -Werte zu unterstützen.

Deshalb haben wir unter optimalen Bestrahlungs- und Kulturbedingungen diese Experimente wiederholt, um die Gültigkeit der hohen RBW_M Werte für die 29 kV Röntgenstrahlung relativ zur konventionellen Röntgenstrahlung bzw. zur Gamma-Strahlung überprüfen zu können. Dazu wurde die neoplastische Transformation der CGL1 Zellen durch 29 kV Röntgenstrahlung relativ zu den Referenzstrahlungen analysiert. Die Studien mit den beiden Röntgenstrahlenenergien wurden simultan durchgeführt, so dass die Kontrollwerte dieselben waren. Die beobachteten Transformationsdaten wurden mit dem linear-quadratischen Modell beschrieben. Eine entsprechende Anpassung erfolgte auch mit den früheren Ergebnissen aus der Arbeit von Frankenberg und Mitarbeitern. Wir fanden eine wesentlich höhere Häufigkeit an neoplastischen Translokationen für die Test- und Referenzstrahlungen als sie früher beobachtet wurden. Dieser Unterschied lässt sich wahrscheinlich mit den nicht optimalen Kulturbedingungen der früheren Studie erklären. Die Standardfehlerbänder der entsprechenden Dosiswirkungskurven der beiden Studien zeigen zudem auch, dass in unserem Experiment weit geringere Unsicherheiten in der Anpassung der experimentellen Werte vorliegen. Die niedrigste analysierte Dosis für die Mammographie-Röntgenstrahlung war in beiden Studien 1 Gy. Die RBW für diese Dosis ist in unserem Experiment relativ zur konventionellen Röntgenstrahlung bei etwa 2 mit einem 95 % Vertrauensintervall zwischen 1,4 und 2,6. Sie ist damit niedriger als die frühere RBW von 3,2, für die der 95 % Vertrauensbereich weit

größer war. Die RBW_M für Mammographie-Röntgenstrahlung beträgt jetzt 3,4 mit einem Vertrauensintervall von weniger als 2 bis zu weit höheren Werten.

Die unterschiedliche Wirksamkeit von Photonen im Energiebereich zwischen 5,4 keV und 1,25 MeV für die Erzeugung von dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten ist in unserem Labor bestimmt und auch in die kürzlich publizierte Empfehlung der ICRP (Publikation 92) übernommen worden. Überraschend ist aber, dass bereits innerhalb des relativ engen Energiebereiches von 29 bis 200 kV Röntgenstrahlung beträchtliche RBW -Unterschiede auftreten sollen. All diese Daten für die Induktion von dizentrischen Chromosomen wurden in umfangreichen Analysen nur in Blutproben eines einzigen Spenders erhoben, um Variationen in der interindividuellen Strahlenempfindlichkeit zu vermeiden, aber auch um Unterschiede in der Methode oder Analyse zu minimieren, die durch Vergleiche von Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien auftreten können. Unsere für dizentrische Chromosomen beobachteten RBW_M Werte der 29 kV Röntgenstrahlung sind $1,64 \pm 0,27$ relativ zu weich gefilterter 220 kV Röntgenstrahlung und $6,12 \pm 2,51$ relativ zur ^{60}Co Gamma-Strahlung. Ein Vergleich dieser RBW_M Werte mit jenen aus der Literatur zeigt, dass die hohen RBW_M Werte, wie sie von Frankenberg und Mitarbeiter publiziert wurden, weder für die Induktion von dizentrischen Chromosomen noch für andere biologische Targets bisher beobachtet werden konnten.

Um zusätzliche Informationen zur RBW der Mammographie-Röntgenstrahlung zu bekommen, haben wir Experimente mit monochromatischer Synchrotron-Strahlung durchgeführt. Dazu wurde 17,4 keV Röntgenstrahlung gewählt, da diese Energie der mittleren Energie der spektralen Fluenz der diagnostischen Mammographie-Röntgenstrahlung entspricht. Zusätzlich wurde auch die biologische Wirkung von 40 keV Röntgenstrahlung analysiert, um eine höher-energetische Referenzstrahlung innerhalb eines Experimentes zu haben. Die berechneten α -Koeffizienten der linear-quadratischen Dosiswirkungskurven waren für die 17,4 keV und 40 keV Röntgenstrahlung $(3,44 \pm 0,87) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ und $(2,37 \pm 0,93) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$. Diese Befunde waren aber jeweils nur halb so groß wie die entsprechenden Daten für das breite Spektrum der 29 kV Röntgenstrahlung (mittlere Energie von 17,4 keV) und für das breite Spektrum der diagnostischen 60 kV Röntgenstrahlung (mittlere Energie von 48 keV). Da aber das Verhältnis der α -Koeffizienten von $1,45 \pm 0,68$ für die 17,4 keV und die 40 keV Röntgenstrahlung sowie das entsprechende Verhältnis der α

Koeffizienten von $1,49 \pm 0,32$ für 29 kV und 60 kV Röntgenstrahlung identisch sind, bestätigt dieser Befund die frühere Beobachtung einer Zunahme des α -Koeffizienten mit abnehmender Photonenenergie. Dagegen ist die RBE_M für 17,4 keV und 40 keV monochromatischer Röntgenstrahlung relativ zur weich gefilterten Röntgenstrahlung kleiner als 1. Es kann daher angenommen werden, dass für Röntgenstrahlung mit einem breiten Energiespektrum ein großer Anteil der biologischen Wirkung vor allem durch Photonen verursacht werden, deren Energien kleiner als die mittlere Energie des Spektrums ist.

Um diese Schlussfolgerung zu überprüfen, haben wir in weiteren Experimenten die Induktion von dizentrischen Chromosomen mit monoenergetischer Synchrotron-Strahlung im Photonenenergiebereich von 1,83 bis 17,4 keV untersucht. Da bei diesen niedrigen Photonenenergien die lokale Energieverteilung sehr kritisch wird, haben wir statt Vollblut nun Monolayer von Lymphozyten desselben Blutspenders verwendet. Diese spezielle Methode ist in unserem Labor vor acht Jahren entwickelt und weiter optimiert worden. Wir fanden einen klaren Hinweis für eine systematische Änderung des α -Koeffizienten der linear-quadratischen Dosiswirkungsbeziehung, d. h. einer Zunahme von 1,83 keV ($\alpha = 1,26 \pm 0,28$) bei steigender Photonenenergie bis zu 6,9 keV ($\alpha = 8,24 \pm 0,41$) und einer anschließenden Abnahme bei weiter steigender Photonenenergie bis zu 17,4 keV ($\alpha = 3,83 \pm 1,72$). Zusätzlich zeichnete sich eine systematische Abhängigkeit auch des β -Koeffizienten ab und zwar mit deutlich höheren Werten bei 4,8 und 6,9 keV Photonenstrahlung. Diese Befunde für sehr niedrige monoenergetische Photonen stimmen im Wesentlichen auch mit früheren Erkenntnissen des Labors von Sasaki in Tokio überein.

Abstract

Frankenberg et al. (Radiat. Res. 157, 99-105, 2002) recently reported, on the basis of observations of neoplastic transformation in human hybrid CGL1 cells, a low-dose relative biological effectiveness (RBE_M) of 4.3 for mammography X-rays (29 kV) relative to 200 kV X-rays. With reference to data in the literature, they inferred a factor of about 8 relative to ^{60}Co γ -rays and concluded that this result is relevant to risk estimation. However, the conclusions do not appear to be valid. The data from the transformation study exhibit uncertainties in the statistical analysis that preclude any generalization of the inferred RBE_M . The data selected or inferred from the literature are likewise insufficient to support the stated RBEs.

Therefore we designed a study to repeat, under well-defined irradiation and culture conditions, this earlier investigation, and to assess the validity of the high RBE values of 29 kV X-rays that had been reported. Neoplastic transformation of human CGL1-hybrid cells was examined after exposure to 29 kV X-rays (mammography X-rays) and conventional 220 kV X-rays. The experiments with the two types of X-rays were performed simultaneously and shared the same controls. The transformation yields with both radiation qualities were fitted to the linear-quadratic dependence on absorbed dose, and a corresponding analysis was performed for the data earlier obtained by Frankenberg et al. The transformation yields in the present study exceed those in the earlier investigation substantially, and it appears that the difference reflects inadequate feeding conditions of the cell cultures in the early experiments. The standard error bands of the dose response curves are derived and are seen to be considerably more narrow in the present results. The lowest dose of the 29 kV X-rays was 1 Gy in both studies, and at this dose the RBE vs. the conventional x-rays has now been found to be 2 with 95 % confidence interval 1.4 to 2.6. The early result was about 3.2, but the 95 % confidence is very broad for these data. The estimated limit at low doses is 3.4 in the present experiments with a confidence interval that extends from less than 2 to large values.

Using the radiation-induced frequency of dicentrics in human lymphocytes as the biological target, considerable RBE variations among photons with energies between 5.4 keV and 1.25 MeV have been observed in our laboratory. However, it was surprising that within the narrow energy range from 29 to 200 kV X-rays substantial differences have been reported. Our own uniform data set for the yields of dicentrics was obtained with blood samples from the same donor, and it avoids interindividual variations in sensitivity as well as the differences in methodology that are associated with interlaboratory comparisons. Our data provide RBE_M values for 29 kV X-rays of 1.64 ± 0.27 relative to weakly filtered 220 kV X-rays and 4.75 ± 1.67 and 6.12 ± 2.51 relative to ^{60}Co γ -rays. Relating this factors to previously published findings for the induction of further biological endpoints, it can be concluded, that an RBE_M of the magnitude which has been reported by Frankenberg et al. has never been observed. In order to obtain additional information on the RBE for the mammography X-rays, experiments with monochromatized synchrotron radiation were performed. Monochromatic 17.4 keV X-rays were chosen for comparison with the diagnostic mammography X-ray spectrum to evaluate the spectral influence, while

monochromatic 40 keV represent a higher-energy reference radiation, within the experiment. The induction of dicentric chromosomes in human lymphocytes from one blood donor irradiated in vitro by 17.4 keV and 40 keV monochromatic X-rays resulted in α coefficients of $(3.44 \pm 0.87) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ and $(2.37 \pm 0.93) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$, respectively. These biological effects are only about half of the α values reported earlier for exposure of blood from the same donor with the broad energy spectra of 29 kV X-rays (mean energy of 17.4 keV) and 60 kV X-rays (mean energy of 48 keV). However, since the ratio of 1.45 ± 0.68 for the α values determined for 17.4 and 40 keV monochromatic X-rays is consistent with the ratio of 1.49 ± 0.32 for the α values determined for 29 kV X-rays and 60 kV X-rays, the present result confirms our earlier observation of a strong increase of the coefficient α with decreasing photon energy. Relative to weakly filtered 220 kV X-rays ($\alpha = (4.00 \pm 0.30) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$), the RBE_M for 17.4 keV and 40 keV monochromatic X-rays is below 1. Therefore, it can be assumed, that for X-ray qualities with broad energy spectra a large fraction of the effects should be attributed predominately to photons with energies well below the mean energy.

Therefore a systematic approach was used to examine the induction of dicentric chromosomes in human lymphocytes irradiated in vitro with monochromatized synchrotron radiation produced with photon energies in the range of 1.83 to 17.4 keV. To avoid potential confounding factors that would influence the outcome of the experiments, only blood from one individual was used. Since for the irradiation experiments with these low photon energies the local dose variations would become unacceptable, monolayers of lymphocytes attached within 3 h PHA-stimulation have been used. The culture conditions ensured that the chromosome analysis could be performed exclusively in metaphases of the first cell cycle in vitro. There is a strong indication for a systematic change of the α coefficient of the linear quadratic dose response relationship from 1.83 keV ($\alpha = 1.26 \pm 0.28$) with increasing energy up to 6.9 keV ($\alpha = 8.24 \pm 0.41$) and a decrease with further increase of energy up to 17.4 keV ($\alpha = 3.83 \pm 1.72$). A tendency for a systematic change of the β coefficient seems to be present at energies of 6.9 keV ($\beta = 8.04 \pm 0.40$) and 4.8 keV ($\beta = 9.48 \pm 1.57$) as well as at energies of 3.10 keV ($\beta = 2.99 \pm 0.51$) and 1.83 keV ($\beta = 0.40 \pm 0.25$). These results agree – in essence – with the previously published large data set of Sasaki's laboratory.

1. Einleitung und Zielsetzung

Stellt die Mammographie ein unverzichtbares Diagnoseverfahren für die Erkennung von Brustkrebs dar, oder sollte sie nur in Ausnahmefällen eingesetzt werden, weil die dabei verwendeten weichen Röntgenstrahlen unter Umständen diese Krankheit sogar verursachen können? Die Antwort auf diese Frage hängt nicht zuletzt davon ab, wie groß die biologische Wirksamkeit der Mammographiestrahlung verglichen mit der konventionellen Röntgenstrahlung ist. Die Diskussion über Nutzen und mögliche Nachteile regelmäßiger Mammographie-Röntgenuntersuchungen basiert hauptsächlich auf epidemiologischen Erkenntnissen zum strahleninduzierten Mammakarzinom. Dabei geht man davon aus, dass ein qualitätsgesichertes Mamma-Screening die frühzeitige Diagnosestellung einer Brustkrebserkrankung ermöglicht und somit den Erfolg einer Therapie erhöht. Bei der Bewertung des Strahlenrisikos von Mammographie-Untersuchungen muss aber auch eine mögliche Erhöhung der Krebsrate durch geringe Dosen ionisierender Strahlung berücksichtigt werden. Risikoabschätzungen im Strahlenschutz sind Extrapolationen in den Dosisbereich, in dem die vermuteten Gesundheitsschäden nicht mehr sichtbar werden. Hauptquellen unseres derzeitigen Wissens über Strahlenrisiken sind die epidemiologischen Daten der japanischen Atombombenüberlebenden sowie Befunde zur Brustkrebsinduktion bei ehemaligen Tuberkulose-Patientinnen aus den USA und Kanada, die im Rahmen einer Pneumothorax-Therapie Vielfach-Röntgenaufnahmen erhalten hatten.

Diese Personengruppen waren aber unterschiedlichen Strahlenqualitäten ausgesetzt. Während die Überlebenden von Hiroshima und Nagasaki im Wesentlichen einer der ^{60}Co -Gammastrahlung vergleichbaren energiereichen Strahlung ausgesetzt waren, wurden die Tuberkulose-Patientinnen mit Röntgenstrahlung von 70 - 85 kVp (Boice et al. 1978) und 60 - 80 kVp (Sherman et al. 1978) Erzeugungsspannung behandelt. Aus Gründen der Vereinfachung und Praktikabilität wurde von der internationalen Strahlenschutzkommission, ICRP, im gesamten Bereich der locker ionisierenden Strahlungen ein gemeinsamer Strahlenwichtungsfaktor von 1 (ICRP-Empfehlung 60 von 1991) festgelegt, wobei auch die weiche Röntgenstrahlung der Mammographie-Röntgenstrahlen (25 - 30 kV) eingeschlossen ist. Auch wenn in strahlenbiologischen Experimenten in vitro deutliche Unterschiede in der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) zwischen den locker ionisierenden Strahlen gefunden worden sind, bleibt diese Vereinfachung

auch nach einer kritischen Überprüfung in der ICRP Publikation 92 (2003) zweckmäßig. Damit erleichtert sie auch weiterhin im Bereich des Strahlenschutzes etwa die Messtechnik und die praktische Umsetzung der Grenzwerte (Harder et al. 2001, 2002).

Die RBW weicher im Vergleich zu harter Röntgenstrahlung oder Gammastrahlung ist speziell für die Risikodiskussion bei der Mammographie von praktischem Interesse, da ein Experiment von Frankenberg und Mitarbeiter (Universität Göttingen) sehr kritisch beurteilt wurde. Für die Entstehung neoplastischer Transformationen in menschlichen Hybridzellen vom Typ CGL1 (Hela x Hautfibroblast) beobachteten die Autoren bei 29 kV Röntgenstrahlung im Vergleich zu 200 kV Röntgenstrahlung eine RBW von 3,4 (Frankenberg et al. 2000) bzw. 4,3 im Dosisbereich $\leq 0,5$ Gy (Frankenberg et al. 2002 a). Gegenüber ^{60}Co Gammastrahlung wurde von einer um den Faktor 7 (2000) bzw. 8,6 (2002 a) höheren Effektivität der 29 kV Röntgenstrahlung berichtet. Die Autoren folgerten daraus, dass das Brustkrebsrisiko durch Röntgenstrahlung bei der Mammographie um einen Faktor von mindestens 7 unterschätzt wird. Diese Ansicht fand eine breite öffentliche und politische Beachtung. Daten aus der Literatur, die solche großen RBW-Unterschiede für in vitro- und in vivo-Untersuchungen mit Hilfe anderer biologischer Objekte belegen sollten, wurden als zusätzliche Stütze der Behauptung herangezogen. In einem ERRATUM (2002 b) wurden später die einzelnen Koeffizienten der beiden Dosis-Wirkungskurven korrigiert und es wurde eine RBW von 3,4 bei einer Transformationsrate von 0,5 pro 10000 überlebende Zellen angegeben.

Ein Grundsatz jeder Diskussion des Strahlenrisikos ist, dass die Zahlenwerte solcher Risiko-Faktoren möglichst aus epidemiologischen Erhebungen am Menschen, ersatzweise aus den mit ausreichender Genauigkeit möglichen Beobachtungen am Versuchstier, ermittelt werden müssen, damit die systemischen Einflüsse auf die Karzinogenese, z. B. die Immunabwehr und der Promotionsmechanismus, mit erfasst werden. Experimentelle Untersuchungen in vitro sind zwar nicht unmittelbar auf die Karzinogenese beim Menschen übertragbar, sie können aber relevante biologische Zusammenhänge aufzeigen. Für Strahlenschutz Zwecke wird für die Übertragung von RBW-Werten auf den Menschen üblicherweise die lineare Anfangssteigung (α - Koeffizient) einer in der Regel nichtlinearen Dosis-Wirkungs-Beziehung verwendet. Als quantitatives Maß von Wirksamkeitsunterschieden im Grenzfall niedriger Dosen wird die sogenannte maximale RBW oder RBW_M

bestimmt, die als Quotient der α -Koeffizienten von Test- und Referenzstrahlung berechnet wird.

Auf solche experimentell ermittelten Unterschiede der RBW wird im vorliegenden Bericht zur Verifizierung der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit von Photonen im Energiebereich von 10 keV – 6 MeV genauer eingegangen, wobei auch die von Frankenberg et al. (2000, 2002 a) zitierten Literaturdaten überprüft werden sowie eigene Daten zur neoplastischen Transformation von CGL1-Zellen und vor allem entsprechende in vitro-Ergebnisse von Chromosomenanalysen in menschlichen Lymphozyten vorgestellt und diskutiert werden.

2. Literaturübersicht von Frankenberg et al. (2002 a)

Die Abschätzung der RBW_M der Mammographie-Röntgenstrahlung gegenüber harter Röntgenstrahlung bzw. ^{60}Co Gammastrahlung basiert in der Arbeit von Frankenberg et al. (2002) nicht nur auf eigenen Experimenten, sondern auch auf ausgewählten Daten aus der Literatur. Dazu wurde von uns ausführlich Stellung genommen (Schmid 2002). Experimente aus drei Bereichen der strahlenbiologischen Forschung sollten die Ergebnisse von Frankenberg et al. (2000, 2002 a,b) stützen, nämlich Tierversuche, Induktion von neoplastischer Transformation in Zelllinien verschiedener Säuger und in vitro-Analysen von Chromosomenveränderungen in menschlichen Lymphozyten.

2.1. Tierexperimente

Nur in wenigen Tierversuchen sind bisher Unterschiede der strahleninduzierten Krebserzeugung zwischen den locker ionisierenden Strahlungen erfasst worden. Es werden RBW-Werte von 2 - 3 gegenüber der Referenz-Strahlung ^{60}Co Gammastrahlung genannt, die entweder für 250 kVp Röntgenstrahlen aus Experimenten mit Neutronen und Photonen an Nagern abgeleitet worden sind (ICRP 1991) oder für ein Experiment mit 600 kVp Röntgenstrahlung an Ratten gelten (Wolf et al. 2000). Letzteres basiert auf einem einzelnen Dosispunkt, der mit Röntgenstrahlen des Elektronenbeschleunigers Thalie in Valduc erhalten wurde. Da diese Dosis bei einer Puls-Bestrahlung (70 Nanosekunden) mit einem sehr breiten hochenergetischen Photonenspektrum erhalten wurde, ist es abgesehen von der großen statistischen Ungenauigkeit des Ergebnisses nicht auszuschließen, dass der beobachtete RBW-

Wert von 2,5 entgegen der Annahme von Frankenberg et al. (2002 a) auf einem Dosisleistungseffekt beruht.

2.2. Neoplastische Transformation in Zelllinien verschiedener Säuger

Die Feststellung von Frankenberg et al. (2002 a) ist richtig, dass es in der Literatur nur eine einzige Arbeit gibt (Borek et al. 1983), in der die RBW_M von sehr harten Röntgenstrahlen (300 kVp) im Vergleich zu ^{60}Co Gammastrahlung für neoplastische Transformation bestimmt wurde (Tabelle 1).

Tab. 1: Dosiswirkungskoeffizienten $\alpha \pm \text{SEM}$ und $\beta \pm \text{SEM}$ für die Häufigkeit neoplastischer Transformationen pro 10^4 überlebende Zellen nach Bestrahlung mit Photonen

Zelllinie	Strahlung	Dosisbereich (Gy)	$\alpha \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-1} \text{ Gy}^{-1}$	$\beta \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-1} \text{ Gy}^{-2}$	Ref.
CGL 1	29 kV X-rays	1,0 - 5,0	$5,76 \pm 9,35$	$0,42 \pm 2,91$	Frankenberg et al. (2002a)
	200 kV X-rays	1,0 - 5,0	$0,55 \pm 2,68$	$0,38 \pm 0,83$	
CGL 1	29 kV X-rays	1,0 - 5,0	$5,18 \pm 2,54$	$0,71 \pm 0,60$	Frankenberg et al. (2002b)
	200 kV X-rays	1,0 - 5,0	$1,11 \pm 0,76$	$0,26 \pm 0,18$	
Embryonal (Hamster)	300 kV X-rays	0,03 - 1,5	$0,045 \pm 0,004$	-	Borek et al. (1983)
	^{60}Co γ -rays	0,03 - 1,5	$0,024 \pm 0,005$	$0,013 \pm 0,007$	

Zwar wurde für die Transformationsrate in embryonalen Hamsterzellen eine RBW_M von 2 im Dosisbereich zwischen 0,03 und 1,5 Gy beobachtet, aber die Autoren weisen darauf hin, dass dieser Faktor nur für die Dosis 0,03 Gy gilt. Für Dosen ≥ 1 Gy konnten aber keine signifikant unterschiedlichen Transformationsraten beobachtet werden. Somit ist es nicht gerechtfertigt, dass Frankenberg et al. (2002 a) für ihren analysierten Dosisbereich von 1 bis 5 Gy den Faktor 2 zur Multiplikation der RBW_M von 4,3 benutzen, um eine RBW_M von 8,6 für 29 kV Röntgenstrahlen relativ zu ^{60}Co Gammastrahlung angeben zu können. Wie Tabelle 1 zeigt, könnte aus den beiden α -Koeffizienten von Test- und Referenzstrahlung [$0,576 \pm 0,935 \text{ Gy}^{-1}$ und $0,055 \pm 0,268 \text{ Gy}^{-1}$ (2002a) bzw. $0,518 \pm 0,254 \text{ Gy}^{-1}$ und $0,111 \pm 0,076 \text{ Gy}^{-1}$] eine RBW_M von etwa 10 oder 5 sowie nach Multiplikation mit dem Faktor 2 eine

RBW_M von 20 oder 10 gegenüber ^{60}Co Gammastrahlung abgeleitet werden. Solche RBW_M -Werte wären natürlich völlig unrealistisch.

Für die Transformationsrate in embryonalen Mauszellen (C3H 10T1/2) wurde von Frankenberg et al. (2002a) eine RBW von 4 für 50 kV Röntgenstrahlung relativ zu ^{60}Co Gammastrahlung abgeleitet. Dieser Befund wurde anhand von zwei Vergleichen gegenüber derselben Referenzstrahlung, nämlich mit Spaltneutronen, erreicht. Tatsächlich wurde zwar in dem einen Labor (Han und Elkind 1979) die 50 kV Röntgenstrahlung mit dem breiten Spaltneutronenspektrum des JANUS-Reaktors vom Argonne National Laboratory verglichen, im anderen Labor aber die 250 kV Röntgenstrahlung mit monoenergetischen Neutronen, die mit dem Beschleuniger der Columbia University in New York erzeugt worden waren (Miller et al. 1989). Das bedeutet, dass die erzielten RBW -Werte von 10 bzw. 20 für die beiden Neutronenfelder nicht sinnvoll miteinander verglichen werden können und damit durch einen Kreuzvergleich der beiden Experimente eine RBW von 2 zwischen 50 kV und 250 kV Röntgenstrahlung mehr als sehr zweifelhaft erscheint. Die folgende Multiplikation dieses Wertes mit dem Faktor 2 aus der Arbeit von Borek et al. (1983) zu einer RBW von 4 gegenüber ^{60}Co Gammastrahlung ist daher ohne Bedeutung.

2.3. Chromosomenveränderungen in menschlichen Lymphozyten

In zahlreichen und teilweise umfangreichen Untersuchungen sind für Photonen unterschiedlicher Energien die linear-quadratischen Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Erzeugung von Chromosomenaberrationen in menschlichen Zellen ermittelt worden. Es ist richtig, dass bei den von Frankenberg et al. (2002a) zitierten Experimenten zur Induktion von dizentrischen Chromosomen oder reziproken Translokationen (einschließlich der zitierten Befunde aus unserem Labor) eine RBW_M zwischen 2 und 3 für 180-250 kV Röntgenstrahlen relativ zur ^{60}Co Gammastrahlung beobachtet werden konnte. Es ist aber auffällig, dass für die Induktion von dizentrischen Chromosomen kein Zitat der umfangreichen Literatur der letzten zwölf Jahre angegeben wurde. Was die Literaturangaben zu den Befunden mit reziproken Translokationen, die mit Hilfe von FISH-Methoden beobachtet wurden, betrifft, erweist es sich als problematisch, dass in keiner der erwähnten Publikationen mehr als eine Dosiswirkungskurve erstellt worden ist. Ein Vergleich all dieser Ergebnisse ist daher schwierig, da in den verschiedenen Labors unterschiedliche FISH-Methoden verwendet worden sind.

Dass weiche Röntgenstrahlung eine höhere RBW als harte Röntgenstrahlung besitzt, ist für dizentrische Chromosomen in menschlichen Lymphozyten schon vor mehr als 20 Jahren nachgewiesen worden (Virsik et al. 1977). Frankenberg et al. (2002 a) zitieren diesbezügliche Experimente von zwei Arbeitsgruppen (Sasaki, Harder) zur biologischen Wirksamkeit von Photonenstrahlungen unterschiedlicher Energien als Beweis für ähnlich hohe RBW_M Werte wie für die von ihnen analysierte 30 kV Röntgenstrahlung.

Tab. 2: Dosiswirkungskoeffizienten $\alpha \pm \text{SEM}$ und $\beta \pm \text{SEM}$ und RBW_M für die Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit Photonen (Sasaki et al. 1989)

Strahlung	$\alpha \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-1} \text{ Gy}^{-1}$	$\beta \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-1} \text{ Gy}^{-2}$	RBW_M relativ zu 200 kV X-rays
Monochromatische X-rays			
13,8 keV	$0,432 \pm 0,119$	$0,872 \pm 0,122$	0,8
14,6 keV	$0,766 \pm 0,390$	$1,173 \pm 0,259$	1,5
50 kV X-rays			
(mittlere Energie: 8,4 keV)	$1,533 \pm 0,244$	$1,745 \pm 0,170$	3,0
200 kV X-rays	$0,519 \pm 0,271$	$0,805 \pm 0,136$	-
^{60}Co γ -rays	$0,177 \pm 0,113$	$0,537 \pm 0,052$	

Wie in Tabelle 2 dargestellt (Sasaki et al. 1989), ergibt sich zwar aus dem Verhältnis der α -Werte von 50 kV Röntgenstrahlung und 200 kV Röntgenstrahlung eine RBW_M von 3,0 und gegenüber ^{60}Co Gammastrahlung eine RBW_M von 8,6. Nicht erwähnt wurde aber, dass die 50 kV Röntgenstrahlung wegen der geringen Filterung nur eine mittlere Energie von 8,4 keV aufwies und somit nicht repräsentativ für die Mammographie-Röntgenstrahlung mit einer mittleren Photonenenergie von 17,4 keV sein kann. In derselben Publikation (Sasaki et al. 1989)] wurden auch entsprechende α -Koeffizienten für monochromatische Röntgenstrahlung von 13,8 und 14,6 keV

angegeben. Für diese Strahlenenergien, die der mittleren Photonenenergie der Mammographie-Röntgenstrahlung sehr nahe kommen, ergibt sich eine RBW_M von nur 2,7 gegenüber ^{60}Co Gammastrahlung. Dieser Befund wurde in der Arbeit von Frankenberg et al. (2002 a) nicht erwähnt.

Der zweite zitierte hohe RBW_M -Wert von 8,1 wurde aus den Daten für niedere Dosen einer 30 kV Röntgenstrahlung gegenüber einer 150 kV Röntgenstrahlung abgeleitet (Virsik et al. 1977). Tatsächlich wurde aber in diesem Experiment für die Referenzstrahlung 150 kV Röntgenstrahlung nur ein Dosispunkt unter 1,94 Gy analysiert, nämlich 153 Lymphozyten-Metaphasen nach Bestrahlung mit 0,65 Gy. Auf Grund der wenigen Zellen ist es erklärbar, dass der α - Koeffizient einen negativen Wert hat. Nicht nachvollziehbar ist deshalb, dass bei dieser großen statistischen Unsicherheit des α - Koeffizienten von Frankenberg et al. (2002 a) eine RBW_M von 3,0 für niedere Dosen angegeben wird. Anhand späterer ausführlicher Befunde für 150 kV Röntgenstrahlung aus derselben Arbeitsgruppe (Virsik und Harder 1980, Gumrich et al. 1986) lassen sich dagegen signifikante RBW_M Werte um die 1,0 (Tabelle 3) für die 30 kV Röntgenstrahlung berechnen. Allerdings eignen sich diese Resultate dann nicht als Beweis für hohe RBW_M -Werte der Mammographie-Röntgenstrahlung.

Tab. 3: Dosiswirkungskoeffizienten $\alpha \pm \text{SEM}$ und $\beta \pm \text{SEM}$ und $RBW_M \pm \text{SD}$ für die Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung

Strahlung	$\alpha \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-1} \text{Gy}^{-1}$	$\beta \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-1} \text{Gy}^{-2}$	RBW_M	Ref.
30 kV	$1,11 \pm 0,26$	$0,87 \pm 0,13$		Virsik et al. (1977)
150 kV	$-0,02 \pm 0,12$	$0,73 \pm 0,04$	-	
150 kV	$1,27 \pm 0,28$	$0,54 \pm 0,08$	$0,9 \pm 0,3$	Virsik und Harder (1980)
150 kV	$1,13 \pm 0,09$	$0,54 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,2$	Gumrich et al. (1986)

3. Wiederholung der Experimente von Frankenberg et al. (2000,2002a)

Aufgrund ihrer experimentellen Daten und ihrer zitierten Literatur gehen Frankenberg und Mitarbeiter davon aus, dass für harte Röntgenstrahlung im Vergleich zu ^{60}Co Gammastrahlung mindestens ein RBW-Wert von 2 auch für die neoplastische Transformation von CGL1-Zellen zu erwarten ist. Nach ihrer Ansicht würde dies aber bedeuten, dass relativ zu ^{60}Co Gammastrahlung, welche eigentlich die richtige Bezugsstrahlung für die wichtigsten epidemiologischen Daten für die Strahlenrisiko-Abschätzungen darstellt, die RBW von Mammographie-Röntgenstrahlen mindestens 7 (Frankenberg et al. (2000) bzw. 8 (Frankenberg et al. 2002 a) betragen würde. Aufgrund dieser Vermutung glauben sie, dass „ das Strahlenrisiko bei der Mammographie mit Röntgenstrahlen um den Faktor von mindestens 7 unterschätzt wird“ (Frankenberg et al. 2000).

Da mit Ausnahme der neoplastischen Transformation in CGL1-Zellen (Frankenberg et al. (2000, 2002) für keines der weiteren analysierten biologischen Targets ein derartig überraschend hoher RBW-Wert für Mammographie-Röntgenstrahlung relativ zu ^{60}Co Gammastrahlung beobachtet oder abgeleitet werden konnte, wurde das fragliche Experiment in unserem Labor unter optimalen Bestrahlungs- und Kulturbedingungen wiederholt und die Ergebnisse wurden publiziert (Göggelmann et al. 2003).

3.1. Material und Methoden

3.1.1. CGL1-Zelllinie

Die Experimente zur neoplastischen Transformation wurden mit einer CGL1-Linie durchgeführt, die sowohl Frankenberg et al. als auch uns freundlicherweise von Dr. L. B. Hieber aus der GSF zur Verfügung gestellt worden war und die ursprünglich im Labor von Dr. Leslie Redpath entwickelt worden war. Es handelt sich um eine Hybridzelllinie, die durch eine Fusion einer Tumorzelle vom HeLa-Stamm, D98/AH-2, mit einem menschlichen Hautfibroblasten isoliert wurde. Sie enthält damit im Normalfall vier Kopien von jedem Chromosom (Stanbridge et al. 1981). Die CGL1-Zelle ist negativ für das tumor-assoziierte Antigen im HeLa-Anteil, das Oberflächenprotein intestinale alkalische Phosphatase p75-IAP, und löst damit keine Tumore in der Nacktmaus aus (Der und Stanbridge 1981, Mendonca et al. 1991). Die

Fibroblasten-Chromosomen 11 und 14 tragen jeweils Tumorsuppressorgene. Die CGL1-Zelle wird neoplastisch transformiert, wenn Tumorsuppressorallele auf jeweils einem der beiden Fibroblasten-Chromosomen 11 und 14 durch Deletion der entsprechenden Bereiche oder der ganzen Chromosomen verloren gegangen sind (Mendonca et al. 1998). Die transformierte Zelle re-exprimiert das IAP, das mit Western Blue eindeutig nachweisbar ist. Dieses Vorgehen erlaubte es, das CGL1-Hybridsystem als quantitatives in vitro-Modell zur strahleninduzierten Transformation menschlicher Zellen zu entwickeln (Mendonca et al. 1995).

3.1.2. Zellkultur und Chromosomenanalyse

Die CGL1-Zellen wurden in 75-cm²-Kulturflaschen zusammen mit Auto Pow Essential Medium (Eagle modified, ICN) gezüchtet. Das Medium enthielt 5% Kälberserum (ICN), 2 mM Glutamax (Gibco), Non-essential Aminosäuren (Gibco), 100 U/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin (Gibco). 20 mM Natriumbikarbonat (Sigma) sorgten für einen konstanten pH-Wert von 7,2. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° inkubiert, wobei die Atmosphäre 5% CO₂ enthielt. Sämtliche Experimente wurden mit derselben Serumcharge durchgeführt. Unter diesen Bedingungen hatten die CGL1-Zellen eine Verdopplungszeit von 22 ± 2 Stunden.

Vor und nach den gesamten Experimenten wurde der zytogenetische Status der CGL1-Zellen analysiert. Dazu wurden Zellen auf Objektträgern (2 x 10⁵ Zellen pro Träger) in Quadriperm-Schalen (Heraeus) für 24 Stunden inkubiert, wobei während der letzten drei Stunden Colcemid (0.5 µg/ml) vorhanden war. Die Präparation der Zellen und die FISH-Färbung mit spezifischen DNS-Proben für die Zielchromosomen 11 und 14 erfolgte nach unserem Standardverfahren (Schmid et al. 1992).

3.1.3. Bestrahlung und Dosimetrie

Die Kulturflaschen wurden horizontal in aufrechter Position mit den CGL1-Monolayern an der Vorderseite mit Luft-Kerma Raten von ungefähr 0,42 Gy/min bestrahlt. Da während der Bestrahlung die Kulturflaschen mit weniger als 5 mm Nährmedium gefüllt waren, konnte dessen Einfluss vernachlässigt werden.

3.1.3.1 Mammographie-Röntgenstrahlung (29 kV)

Als Strahlenquelle für die Mammographie-Röntgenstrahlung diente eine Weichstrahl-Röntgenanlage der Firma Siemens (Dermopan, 29 kV, 20 mA, AEW50/25ö

Röntgenröhre, Wolfram-Anode, Anoden-Winkel 45°). Das Röhrenspektrum der Wolfram-Anode wurde mit 1 mm Beryllium und 0,05 mm Rhodium (Rh) (RH000210, Goodfellow) gefiltert. Das entsprechende Röntgenspektrum mit der charakteristischen Rh-K-Kante bei 23,2 keV ist in Figur 1 dargestellt. Die mittlere Photonenenergie beträgt 19,4 keV und die Halbwertschichtdicke 0,51 mm Al, wobei sich beide Werte auf das Photonenspektrum beziehen. In Aluminium reichen die Halbwertschichtdicken der Mammographie-Röntgenstrahlung typischerweise von 0,34 bis 0,56 mm (EUR 1996).

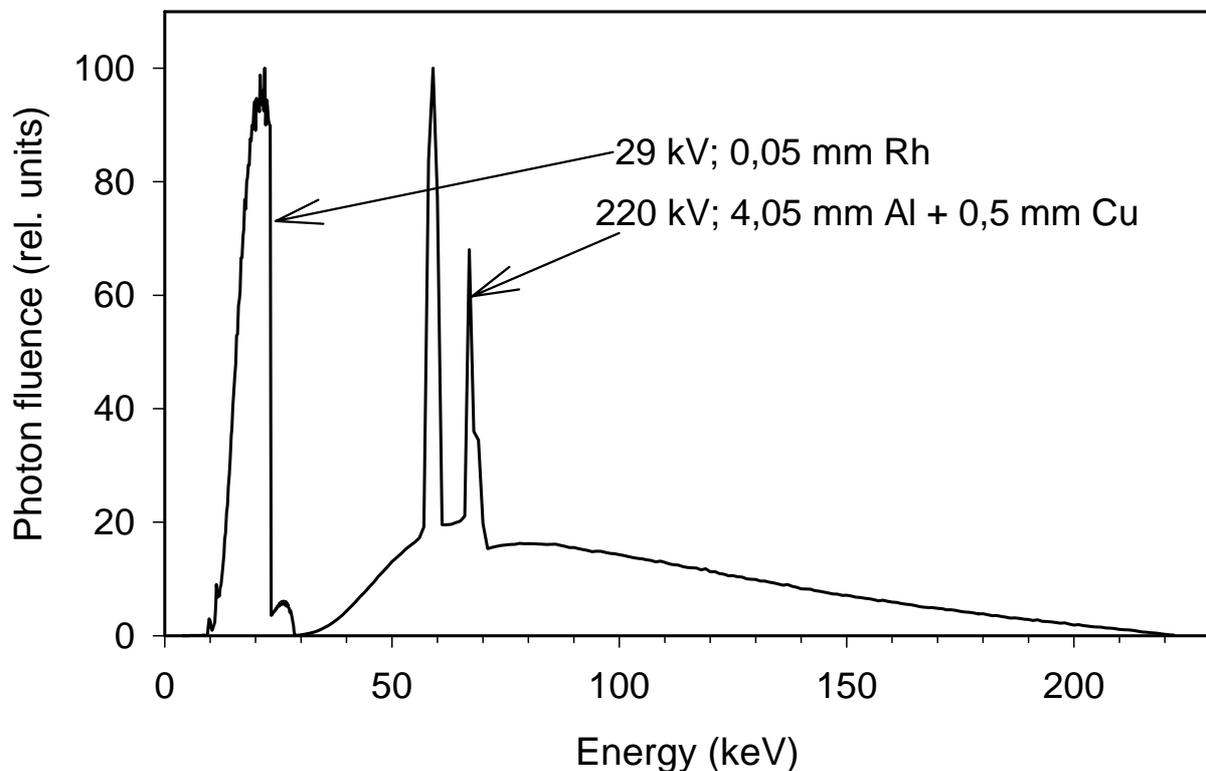


Fig. 1: Das durch 0,05 mm Rhodium (Rh) gefilterte Röntgenspektrum der Wolfram-Anode ist mit dem Röntgenspektrum der Mammographie-Röntgenröhre praktisch identisch. Das Röntgenspektrum der 220 kV Röntgenanlage ist mit 4,05 mm Al und 0,5 mm Cu relativ weich gefiltert.

Die Dosimetrie wurde mit zwei geeichten Ionisationskammern (Typ M 23342, PTW) durchgeführt. Um die Absorption der Röntgenstrahlen durch die vordere Wand der Bestrahlungsflasche zu berücksichtigen, erfolgte die Kalibrierung hinter dieser

vorderen Seite. Um die Luft-Kerma Rate von 0,42 Gy/min zu erreichen, musste eine Distanz zum Fokus von nur 15 cm eingehalten werden, die zu einer gewissen Feldinhomogenität führte. Messungen vor den einzelnen Experimenten ergaben, dass die durchschnittliche Luft-Kerma über die gesamte Fläche der Bestrahlungsflasche etwa 97 % betrug, wobei sie von 100 % in der Mitte bis zu 91 % an den Ecken der Vierkantflaschen abnahm. Wegen den somit relativ geringen Unterschieden wurde die Dosis im Zentrum des Bestrahlungsfeldes gemessen.

Damit ergab sich für die absorbierte Dosis die Gleichung:

$$D_{cell} = K_{air} \times \overline{(\mu_{en} / \rho)_{cell}} / \overline{(\mu_{en} / \rho)_{air}} \quad (1)$$

wobei $\overline{(\mu_{en} / \rho)_M}$ die spektralen Mittelwerte der Energieabsorptions-Koeffizienten für das Material M bedeutet und zwar gemäß der Gleichung:

$$\overline{(\mu_{en} / \rho)_M} = \int_0^{E_{max}} \Phi(E) \times E \times (\mu_{en}(E) / \rho)_M \times dE / \int_0^{E_{max}} \Phi(E) \times E \times dE \quad (2)$$

für die spektrale Photonverteilung $\Phi(E)$. Die Werte für $(\mu(E) / \rho)_M$ sind aus Hubbell and Seltzer (1996) entnommen.

$$D_{cell} = K_{air} \times 1.02 \quad (3)$$

3.1.3.2. Referenzstrahlung: 220 kV Röntgenstrahlung

Als Strahlenquelle diente eine Anlage der Firma Philips mit einer MCN 323-Röntgenröhre (220 kV, 15 mA, Wolfram-Anode, Anodenwinkel 22°). Das Röhrenspektrum wurde mit 3 mm Beryllium und 4.05 mm Al + 0.5 mm Cu gefiltert. Das entsprechende Röntgenspektrum ist in Figur 1 dargestellt. Die mittlere Photonenenergie betrug 95,6 keV und die Halbwertschichtdicke 1,39 mm Cu, wobei sich beide Werte auf das Photonenspektrum beziehen. Die Dosimetrie wurde mit einer geeichten Ionisationskammer (Typ 24366, PTW) durchgeführt, wobei ein Luft-Kerma-Faktor der PTB für T 200 (200 kV; 4 mm Al + 1 mm Cu; Halbwertschichtdicke = 1.6 mm Cu) verwendet wurde. Der Abstand der Bestrahlungsflasche vom Fokus betrug 70 cm. Die Feldinhomogenität und die Absorption durch die vordere Wand der Flasche war vernachlässigbar.

Die absorbierte Dosis in den Zellen wurde in gleicher Weise berechnet, wie sie bereits mit den Gleichungen (1) bis (3) beschrieben wurde:

$$D_{cell} = K_{air} \times 1.087 \quad (4)$$

3.1.4. *Überlebens- und Transformationstest*

In Vorversuchen wurde der Einfluss der Wachsfaktoren in verschiedenen Kälberseren bei unterschiedlichen Konzentrationen analysiert und die optimale Methode ermittelt. Für die einzelnen Experimente wurden jeweils CGL1-Zellen aus derselben Stammkultur in 75 cm²-Kulturflaschen überführt, mit 15 ml Medium aufgefüllt und für drei Tage inkubiert. Davon wurden jeweils 1 x 10⁵ Zellen und 5 ml Medium in 25 cm²-Kulturflaschen für weitere 3 Tage inkubiert. Diese Kulturflaschen mit jeweils nun logarithmisch wachsenden 0.9 – 1.7 x 10⁶ CGL1-Zellen wurden dann entweder als Kontrollen verwendet oder bei Raumtemperatur (20° C) mit 29 bzw. 220 kV Röntgenstrahlen bestrahlt.

Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurde der Zellrasen abtrypsiniert und es wurden je 2500 – 10000 Zellen pro 75 cm²-Kulturflasche für den Transformationstest bzw. 250 – 1000 Zellen pro 58 cm²-Kulturschalen für den Überlebenstest verteilt. Für die Überlebensexperimente wurden die Zellen für 11 Tage bei 37° C inkubiert, mit 70 % Ethanol für 10 Minuten fixiert und für 15 Minuten mit GiemsaLösung gefärbt. Für die Transformationsexperimente wurden Zellen in einer Dichte von etwa 30 überlebenden Zellen pro cm² in Kulturflaschen angesetzt. Während der Inkubationszeit von 21 Tagen nach Bestrahlung wurde das Kulturmedium am 11., 14. und 18. Tag erneuert, unter Zugabe von Patricin beim letzten Mediumwechsel (0,5 µg/ml Medium). Danach wurden die Zellen 20 Minuten mit 2% Paraformaldehyd/PBS fixiert und zum Nachweis transformierter Klone mit Western Blue 19 Minuten lang nach der Methode von Mendonca et al. (1992) gefärbt. Parallel zu allen Transformationsversuchen wurde das Überleben der Zellen bestimmt und die Transformationshäufigkeit pro 10000 überlebende Zellen ermittelt. Die Angehrate (plating efficiency, PE) wurde aus dem Quotienten der durchschnittlichen Anzahl von Kolonien in 10 Kulturschalen und der Anzahl der ursprünglich vorhandenen Zellen berechnet.

Mit einem Stereomikroskop wurden die blau gefärbten Foci in den einzelnen Kulturflaschen gegen einen weißen Hintergrund ausgezählt. Dabei wurden nur Foci nach der Definition von Mendonca et al. (1992) berücksichtigt.

Die Transformationsfrequenz (TF) ist durch folgende Gleichung wiedergegeben:

$$TF = - \frac{\ln(N_0 / N)}{n_{\text{surv}}} \quad (5)$$

N ist die Anzahl der Kulturflaschen, N_0 ist die Anzahl der Kulturflaschen ohne Foci und n_{surv} ist die Anzahl der überlebenden Zellen pro Kulturflasche (d.h. die Gesamtzahl der ausgesäten Zellen korrigiert durch Angehrate und Inaktivierung). Da die Transformationsfrequenz von der Zelldichte abhängig ist, wurden die beobachteten Dichten von 21 bis 42 überlebende Zellen pro cm^2 auf einen Standardwert von 30 Zellen pro cm^2 entsprechend der Formel von Sun et al. (1988) und Bettega et al. (1997) korrigiert. Diese korregierte Transformationsfrequenz ist im folgenden Abschnitt als T angegeben.

3.1.5. Bestimmung der neoplastischen Transformationsfrequenz

Für jede Dosis wurden zwei oder drei Experimente durchgeführt. Da die empirischen Standardfehler (SD) mit einer Binominal-Verteilung vereinbar waren, wurden die entsprechenden Daten für N und N_0 addiert, bevor die Transformationsfrequenzen berechnet wurden. Es gab tatsächlich nur zwei Möglichkeiten (entweder enthielt eine Kulturflasche transformierte Zellen oder nicht). Damit waren bei allen Experimenten unabhängige Ereignisse anzunehmen, d. h. die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von transformierten Klonen war für jede analysierte Dosis gleich. Somit konnte die Binominal Statistik angewendet werden und die Standardfehler (SE) konnten entsprechend berechnet werden.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Zytogenetische Analyse

Der zytogenetische Status der CGL1-Zelllinie wurde in insgesamt 200 Zellen anhand der FISH-Methode für die Targetchromosomen 11 und 14 überprüft. Eine dieser Zellen ist in der Figur 2 dargestellt. Sie zeigt die vier grün gefärbten Chromosomen 11 plus ein grün gefärbtes HeLa-Markerchromosom (Mendonca et al. 1995) zusammen mit den vier rot gefärbten Chromosomen 14 plus ein rot gefärbtes HeLa-Markerchromosom (Mendonca et al. 1998).

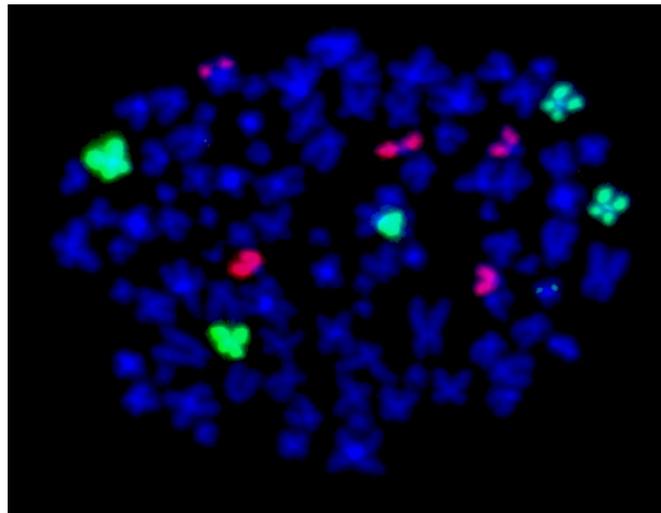


Fig. 2: Karyogramm einer CGL1-Zelle. Vier grün gefärbte Chromosomen 11 plus Markerchromosom 11 (in der Mitte) und vier rot gefärbte Chromosomen 14 plus Markerchromosom 14 (oben)

Die Daten in der Tabelle 4 zeigen die relativ große Variabilität in der Anzahl der Chromosomen 11 und 14. Ohne die HeLa-Markerchromosomen 11 und 14 zeigen nur knapp 80 % der analysierten Zellen vier Kopien eines jeden Targetchromosoms. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da - wie bereits erwähnt – der komplette Verlust eines der beiden Fibroblasten-Targetchromosomen eine neoplastische Transformation auslösen kann.

Tab. 4: Interzelluläre Verteilung der Targetchromosomen 11 und 14 von CGL1-Zellen nach FISH-Färbung

Zeitpunkt der Analyse	Analysierte Zellen	Interzelluläre Verteilung der Targetchromosomen		
		< 8	8	> 8
Vor den Experimenten	100	23	73	4
Nach den Experimenten	100	18	80	2

3.2.2. Neoplastische Transformation

Die einzelnen Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente des Transformationstests sind in den Tabellen 5 (29 kV Röntgenstrahlung) und 6 (220 kV Röntgenstrahlung) wiedergegeben.

Tab. 5: Neoplastische Transformation der CGL1-Zellen durch 29 kV Röntgenstrahlung

* korrigiert auf 30 überlebende Zellen/cm² (nach Sun et al. 1988)

Dose (Gy)	PE of control	Surv. rate	Cells seeded	Surv. per flask	Surv. per cm ²	Total number of flasks (N)	Number of flasks with foci	Number of flasks without foci (N ₀)	Transf. freq. /10000 cells	Transf. freq.* /10 000 cells
0	0.924	1.000	2500	2310	31	110	4	106	0.16	0.16
1.02	0.824	0.907	3000	2241	30	60	17	43	1.5	1.5
1.02	0.860	0.787	3000	2031	21	60	19	41	1.9	1.8
2.04	0.969	0.475	4000	1840	25	50	22	28	3.2	2.9
2.04	0.950	0.521	4000	1980	26	50	24	26	3.3	3.1
3.06	0.906	0.423	6000	2298	31	40	24	16	4.0	4.0
3.06	0.846	0.547	6000	2778	37	40	27	13	4.0	4.4
3.57	0.956	0.334	7000	2230	30	40	26	14	4.7	4.7
3.57	0.900	0.356	7000	2240	30	40	28	12	5.4	5.4
4.08	0.924	0.411	8000	3040	41	30	24	6	5.3	5.9
4.08	0.957	0.277	8000	2120	28	40	28	12	5.7	5.6
4.08	0.956	0.301	8000	2300	31	30	23	7	6.3	6.4
5.10	0.846	0.226	10000	1910	26	30	22	8	6.9	6.5
5.10	0.900	0.246	10000	2210	29	30	25	5	8.1	8.0

Tab. 6: Neoplastische Transformation der CGL1-Zellen durch 220 kV Röntgenstrahlung

* korrigiert auf 30 überlebende Zellen/cm² (nach Sun et al. 1988)

Dose (Gy)	PE of control	Surv. rate	Cells seeded	Surv. per flask	Surv. per cm ²	Total number of flasks (N)	Number of flasks with foci	Number of flasks without foci (N ₀)	Transf. freq. /10000 cells	Transf. freq.* /10 000 cells
0	0.924	1.000	2500	2310	31	110	4	106	0.16	0.16
1.09	0.824	0.962	3000	2379	32	60	8	52	0.6	0.6
1.09	0.860	0.814	3000	2100	28	60	9	51	0.8	0.8
2.17	0.969	0.527	4000	2044	27	50	16	34	1.9	1.8
2.17	0.950	0.624	4000	2372	32	50	20	30	2.1	2.1
3.26	0.906	0.483	6000	2510	35	40	19	21	2.6	2.7
3.26	0.846	0.591	6000	3000	42	40	20	20	2.3	2.6
3.81	0.956	0.387	7000	2590	35	40	27	13	4.3	4.6
3.81	0.900	0.384	7000	2420	32	40	23	17	3.5	3.6
4.35	0.924	0.421	8000	3112	41	30	24	6	5.2	5.9
4.35	0.957	0.329	8000	2520	34	40	28	12	4.8	5.0
4.35	0.956	0.310	8000	2370	32	30	19	11	4.2	4.3
5.44	0.846	0.257	10000	2170	29	28	20	8	5.8	5.7
5.44	0.900	0.274	10000	2470	33	30	24	6	6.5	6.8

T wurde in Abhängigkeit von der Dosis mit dem linear-quadratischen Modell gefittet:

$$T = c + a D + b D^2 \quad (6)$$

Für die 29 kV Röntgenstrahlung und die Einheit Gy für die absorbierte Dosis D ergab sich folgende Anpassung (mit SE):

$$T = (0.164 \pm 0.080) + (1.41 \pm 0.266)D + (-0.012 \pm 0.074)D^2 \quad (7)$$

Für 220 kV Röntgenstrahlung ergab sich die entsprechende Anpassung (mit SE):

$$T = (0.155 \pm 0.080) + (0.394 \pm 0.180)D + (0.151 \pm 0.049)D^2 \quad (8)$$

Die Dosiswirkungskurven für beide Strahlenqualitäten, die mit einer gewichteten Methode der kleinsten Quadrate nach den Gleichungen (7) und (8) errechnet wurden, sind in der Figur 3 als durchgezogene Linien dargestellt. Da die Experimente mit beiden Röntgenstrahlenqualitäten simultan und unter Verwendung derselben Kontrollen durchgeführt wurden, musste eine gemeinsame Anpassung an die Gleichungen (7) und (8) durchgeführt werden. Es zeigte sich glücklicherweise, dass sich für beide unabhängigen Anpassungen zufällig fast identische Punktschätzungen (mit SE) mit dem Parameter $c = 0.161 \pm 0.080$ ergaben. Daher konnte dieser Schätzwert als gemeinsamer Wert verwendet werden.

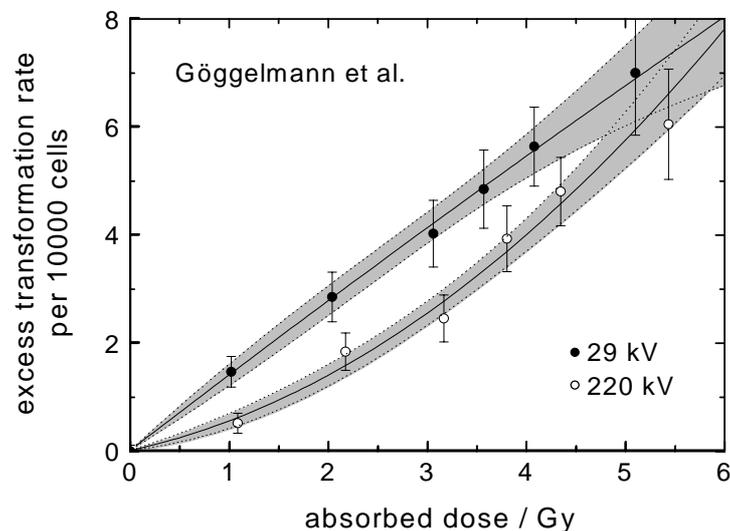


Fig. 3. Korrigierte Transformationshäufigkeit als Funktion der Dosis für 29 und 220-kV Röntgenstrahlung. Die Messpunkte und deren Binominal Standardfehler (SE) entsprechen den Daten der Tabellen 5 und 6. Die durchgezogenen Linien sind die linear-quadratischen Fits, während die unterbrochenen Linien den Grenzen der Standardfehlerbänder entsprechen, die aufgrund orthogonaler Parameter berechnet wurden (Kellerer 2003 a,b)

Dagegen konnten die Standardfehlerbänder der beiden Dosiswirkungskurven nicht aus den Standardfehlern der Parameter der Gleichungen (7) und (8) abgeleitet werden. Der Grund dafür war, dass die Parameter miteinander korreliert und somit deren Fehler nicht unabhängig waren. Somit konnten die Fehler nicht in beliebiger Weise kombiniert werden, d. h. sie konnten nicht einfach addiert werden, um die

Unsicherheit der Größe T zu quantifizieren. Die Fehlerbänder der beiden Dosiswirkungskurven mussten daher mit einer speziellen Methode bestimmt werden. Die entsprechenden Methoden reichten von Monte Carlo Simulationen bis zu numerischen Prozessen, also entweder anhand der *Co-Varianzen* der Modell-Parameter oder mittels der *orthogonalen Parameter*, d. h. die Parameter mussten so transformiert werden, dass sie keine Korrelation mehr aufwiesen. Da eine kürzlich publizierte Methode (Kellerer 2003 a,b) die Anwendung der orthogonalen Methode beträchtlich vereinfacht, wurde diese benutzt, um die Standardfehlerbänder der Dosiswirkungskurven zu bestimmen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Figuren 3 bis 6 verwendet worden.

3.2.3. RBW der Mammographie-Röntgenstrahlung

Die RBW der 29 kV Röntgenstrahlung relativ zur 220 kV Röntgenstrahlung konnte aus den Koeffizienten der Dosiswirkungskurven der Gleichungen (7) und (8) und der Methode der orthogonalen Parameter abgeleitet werden, d. h. von diesen Kurven und den Standardfehlerbändern, die in Figur 3 angegeben sind, konnte die RBW und ihre Abhängigkeit von der Dosis ermittelt werden. Dabei wurde das Fehlerband der RBW aus den unabhängigen Standardfehlern berechnet, die in Figur 3 angegeben sind. Dazu war es nötig (Kellerer 2003 a,b), zunächst von der Unsicherheit der Transformationsrate bei einer bestimmten Dosis (vertikale Breite des Fehlerbands) zur Unsicherheit bei der Dosis zu wechseln (horizontale Breite der Fehlerbänder) und anschließend zur Kombination der Unsicherheiten durch Addition der Quadrate der relativen Fehler. In einigen früheren Analysen waren stattdessen unterschiedliche und teilweise nicht informative Fehlerschätzungen angegeben worden. Das jetzige Verfahren erlaubt dagegen aussagekräftige Standardfehlerbänder. Wie in Figur 4 dargestellt, ist dieser Fehlerbereich für die RBW relativ breit.

Die durchgezogene Linie stellt den Teil der RBW dar, der denjenigen Dosen entspricht, die in dem jetzigen Experiment für die Test- und Referenzstrahlung tatsächlich analysiert worden ist. Der übrige Kurvenverlauf im niedrigeren Dosisbereich ist dagegen eine Extrapolation anhand des linear-quadratischen Modells. Die niedrigste analysierte Dosis von 1 Gy der 29 kV Röntgenstrahlung entspricht nach dem Kurvenverlauf einer Dosis von 2 Gy der Referenzstrahlung, d. h. 220 kV Röntgenstrahlung. Die Punktschätzung der RBW und deren Standardfehler ist bei dieser Dosis 2 ± 0.3 , der 95% Vertrauensbereich etwa 1,4 bis 2,6. Eine

Extrapolation gegen Null würde eine Punktschätzung von 3,4 ergeben, aber der Vertrauensbereich würde dann von 2 bis zu sehr hohen Werten reichen.

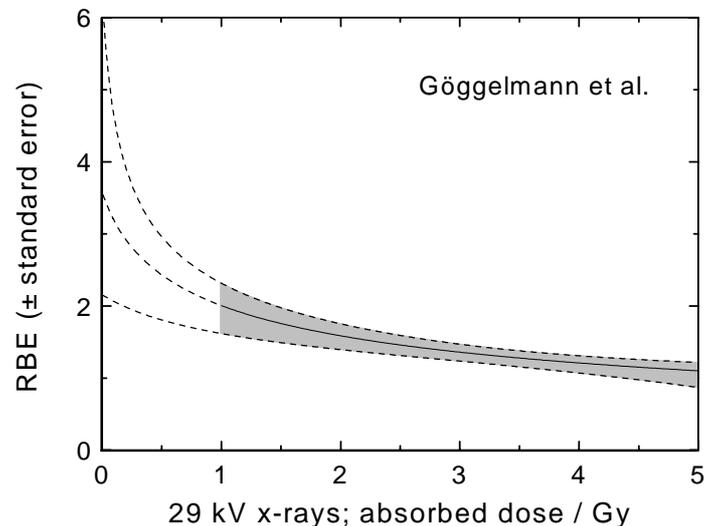


Fig. 4: Die RBW plus Standardfehlerband der Mammographie-Röntgenstrahlung (29 kV) relativ zur Referenzstrahlung 220 kV Röntgenstrahlung als Funktion der Dosis der 29 kV Röntgenstrahlung

3.2.4. Vergleich der neuen Ergebnisse mit jenen von Frankenberg et al. (2002 a)

Figur 5 erlaubt einen Vergleich der jetzigen Ergebnisse mit den früher von Frankenberg et al. (2002a,b) publizierten Befunden. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich beide experimentellen Untersuchungen trotz eines vergleichbaren Designs stark unterscheiden.

Obwohl die Fehlerbänder im früheren Experiment relativ breit sind, ist es offensichtlich, dass – auch ohne einen statistischen Test – die Transformationsraten damals wesentlich geringer waren als sie jetzt beobachtet werden konnten. Eigentlich wäre nur ein kleiner Unterschied zu erwarten gewesen, da Frankenberg et al. (2002 a) ihre Ergebnisse auf 50 überlebende Zellen pro cm^2 korrigiert haben, während in der neuen Studie die Ergebnisse auf 30 überlebende Zellen pro cm^2 bezogen wurden. Nach den Erkenntnissen von Sun et al. (1988) sollte dieses Verfahren aber nur zu einer Differenz von 20 % geführt haben, und nicht, wie in Figur

5 für die Bestrahlung mit 220 kV Röntgenstrahlung erkennbar, zu einem Faktor zwischen 3 und 5. Abgesehen von dieser Diskrepanz ist es jedoch von großer Bedeutung, dass die Diskrepanz zwischen den Dosiswirkungskurven für die beiden unterschiedlichen Strahlenqualitäten im jetzigen Experiment weitaus kleiner ist als dies früher der Fall war.

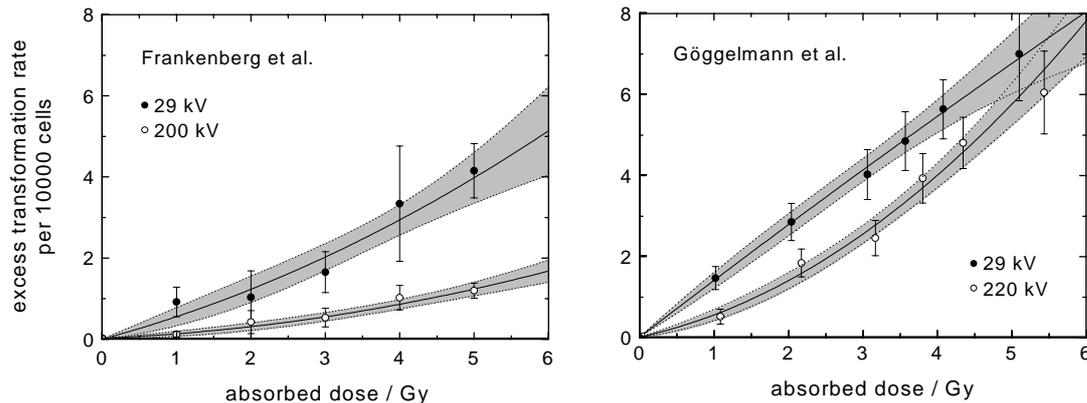


Fig. 5: Transformationshäufigkeiten pro 10000 CGL1 Zellen als Funktion der Dosis für 29 kV und 200 kV Röntgenstrahlung von Frankenberg et al. (2002a,b) und in analoger Darstellung die entsprechenden Daten des neuen Experiments als Funktion der Dosis für 29 kV und 220 kV Röntgenstrahlung. Die Messpunkte und die zugehörigen Standardfehlerbalken (Binominal Korrektur der gesamten empirischen Standardfehler) entsprechen den Daten der Tabelle 7. Die durchgezogenen Linien sind die Anpassungen an die analysierten Daten. Die unterbrochenen Linien entsprechen den Grenzen der Standardfehlerbänder, die anhand von orthogonalen Parametern berechnet worden sind (Kellerer 2003 a,b).

Um die alten und neuen Ergebnisse und deren Unsicherheiten quantifizieren zu können, wurde dieselbe statistische Behandlung, wie für die neuen Daten, auch für die früheren Daten durchgeführt. Die Analyse für die Daten von Frankenberg et al. (2002a) ergab folgendes Ergebnis:

Für 29 kV Röntgenstrahlung

$$T = (0.161 \pm 0.0366) + (0.493 \pm 0.291) D + (0.0605 \pm 0.072) D^2 \quad (9)$$

Für 220 kV Röntgenstrahlung:

$$T = (0.1575 \pm 0.036) + (0.0754 \pm 0.080) D + (0.0334 \pm 0.0182) D^2 \quad (10)$$

Um die Ergebnisse der alten und der neuen Studien besser vergleichen zu können, sind die einzelnen Koeffizienten und deren Standardfehler in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 7. Koeffizienten (Parameter Schätzung) mit Standardfehler für die linear-quadratische Dosiswirkungsbeziehung der neoplastischen Transformation von CGL1 Zellen, die durch parallele Analyse der neuen und früheren Daten erhalten wurden

Parameter	Göggelmann et al. (2003)		Frankenberg et al. (2002)	
	29 kV x-rays	220 kV x-rays	29 kV x-rays	200 kV x-rays
<i>c</i>	0.164 ± 0.080	0.155 ± 0.080	0.161 ± 0.0366	0.1575 ± 0.036
<i>a</i> / Gy	1.410 ± 0.266	0.394 ± 0.180	0.493 ± 0.291	0.0754 ± 0.080
<i>b</i> / Gy ²	-0.012 ± 0.074	0.151 ± 0.049	0.0605 ± 0.072	0.0334 ± 0.0182

Die weit geringeren neoplastischen Transformationsraten in der alten Arbeit könnten durch die unterschiedlichen und vielleicht nicht optimalen Kulturbedingungen verursacht worden sein. Während in den Experimenten von Frankenberg et al. (2002a) nur ein Mediumwechsel nach 10 Tagen innerhalb der gesamten 21 Tage Inkubationszeit nach Bestrahlung erfolgte, wurde ein Mediumwechsel bei den neuen Experimenten am 11., 14. und 18. Tag durchgeführt. Die neuesten Experimente von Redpath et al. (2001, 2003) wurden sogar mit zweimaligem Mediumwechsel pro Woche nach der ersten Woche durchgeführt. Dies zeigt, dass ein mehrmaliger Mediumwechsel einen kritischen Punkt bei den Kulturbedingungen der CGL1 Zellen darstellt. Um den Einfluss solcher Mediumwechsel quantifizieren zu können, wurde in der neuen Arbeit ein zusätzliches Bestrahlungsexperiment mit 4,35 Gy von 220 kV Röntgenstrahlung durchgeführt, wobei in paralleler Anordnung die entsprechenden

Bedingungen der alten und neuen Studie verwendet wurden. In Tabelle 8 lässt sich erkennen, dass die neoplastischen Transformationsraten in CGL1-Zellen bei optimalen Kulturbedingungen (neuere Arbeit) nicht allzu stark variieren, während Unterschiede bis zum Faktor 10 bei den Bedingungen zu beobachten sind, die denen in der Arbeit von Frankenberg et al. (2002 a) entsprechen.

Tab. 8: Neoplastische Transformation von CGL1 Zellen durch Bestrahlung mit 4,35 Gy Röntgenstrahlung (220 kV). Kulturbedingungen während der Inkubationszeit nach Bestrahlung: Mediumwechsel nur einmal am 11. Tag (nach Frankenberg et al. 2000a); Mediumwechsel am 11., 14. und 18. Tag entsprechend den Bedingungen der neuen Ergebnisse
* korrigiert auf 30 überlebende Zellen/cm² (nach Sun et al. 1988)

Dose (Gy)	PE of control	Surv. rate	Cells seeded	Culture condition	Surv. per flask	Surv. per cm ²	Total number of flasks (N)	Number of flasks with foci	Number of flasks without foci (N ₀)	Transf. freq. /10 000 cells	Transf. freq.* /10 000 cells
0	0.924	1.000	2500		2310	31	110	4	106	0.16	0.16
4.35	0.880	0.372	8000	(2002a)	2620	35	30	5	25	0.7	0.7
			8000	neu	2620	35	30	22	8	5.0	5.3
			40000	(2002a)	13100	175	30	1	29	0.03	0.053
			40000	neu	13100	175	30	28	2	2.1	4.3
4.35	0.912	0.332	8000	(2002a)	2420	32	33	2	31	0.26	0.27
			8000	neu	2420	32	30	22	8	5.5	5.7
			40000	(2002a)	12100	161	27	5	22	0.18	0.36
			40000	neu	12100	161	30	29	1	2.8	5.6

In Figur 6 ist die RBW der Mammographie-Röntgenstrahlung (29 kV) relativ zur Referenzstrahlung als Funktion der Dosis der 29 kV Röntgenstrahlung für die Befunde von Frankenberg et al. (2002a) in derselben Weise wie in Figur 4 für jene der neuen Experimente angegeben. Der Vergleich mit der entsprechenden RBW der neuen Experimente zeigt, dass die RBW in der alten Studie – vor allem bei hohen Dosen – deutlich über der RBW der neuen Studie liegt. Dieser Unterschied kann

aber, wie in Tabelle 8 dargestellt, durchaus als Artefakt aufgrund der nicht optimalen Kulturbedingungen erklärt werden.

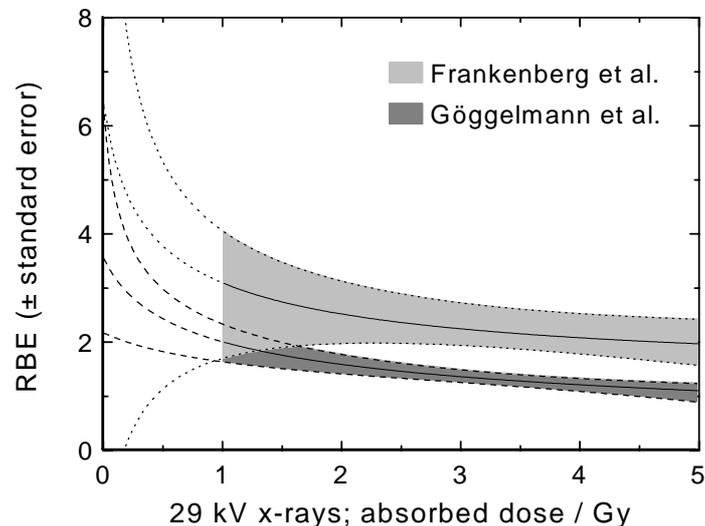


Fig. 6: RBW der 29 kV Röntgenstrahlung relativ zur Referenzstrahlung 200 bzw. 220 kV Röntgenstrahlung. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien zeigt den Standardfehler an, der aufgrund von Monte Carlo Simulation von 1000 RBW- Werten an jedem der 18 Dosispunkte erhalten worden ist. Die Daten von Frankenberg et al. (2002a) sind in derselben Weise angegeben wie die entsprechenden neuen Daten in der Figur 4.

3.2.5. Neoplastische Transformation von CGL1 Zellen durch ^{137}Cs γ -Strahlung

Frankenberg et al. (2002 a) benutzten Daten von Borek et al. (1983), die in der Tabelle 1 angegeben sind, um die RBW für ihre Befunde zur Bestrahlung von CGL1 Zellen mit der Mammographie-Röntgenstrahlung relativ zur Gamma-Strahlung berechnen zu können, d. h. einen RBW-Wert von 2, der für die Transformationsrate in embryonalen Hamsterzellen für harte Röntgenstrahlung (300 kV) relativ zu ^{60}Co Gammastrahlung beobachtet werden konnte. Da dieses zweifelhafte Verfahren bereits im Abschnitt 2.2. sehr kritisch diskutiert wurde, wurde neben der Wiederholung der damaligen Experimente von Frankenberg et al. (2000, 2002) auch ein zusätzliches Experiment mit Gamma-Strahlung unter gleichen optimalen Kulturbedingungen, aber zeitlich versetzt, durchgeführt. Als Strahlenquelle wurde ein

Buchler-Calibrator OB20 mit einer nominellen Aktivität von 48,1 TBq benutzt. Der Bestrahlungabstand von der Cs γ -Quelle bis zu 4 mm Plexiglas, das sich als Aufbauschicht direkt vor der Kulturflasche befand, betrug 50 cm. Die Dosisleistung war 0.18 Gy/min.

Das Ergebnis für die Experimente zur neoplastischen Transformation von CGL1 Zellen durch ^{137}Cs γ -Strahlung ist in der Tabelle 9 angegeben.

Tab. 9: Neoplastische Transformation von CGL1 Zellen durch Bestrahlung mit ^{137}Cs γ -Strahlung.

* korrigiert auf 30 überlebende Zellen/cm² (nach Sun et al. 1988)

Dose (Gy)	PE of control	Surv. rate	Cells seeded	Surv. per flask	Surv. per cm ²	Total number of flasks (N)	Number of flasks without foci (N ₀)	Transf. freq. /10000 cells	Transf. freq.* /10 000 cells
0	0.885	1.000	2500	2213	30	100	97	0.14	0.14
1.167	0.910	0.894	2000	1610	22	40	27	2.4	2.1
	0.924	0.954	2000	1690	23	40	34	0,9	0.8
	0.890	0.965	2000	1715	24	40	31	1.5	1.4
2.334	0.860	0.764	3000	1995	27	37	24	2.2	2.1
	0.917	0.756	3000	2010	27	40	30	1.4	1.4
	0.956	0.738	3000	1965	26	40	27	1.9	1.8
3.501	0.900	0.384	3800	1269	17	40	20	5.3	4.2
	0.894	0.413	3800	1390	19	40	23	3.9	3.3
	0.906	0.503	4000	1784	24	40	20	3.8	3.5
4.668	0.957	0.292	4500	1143	15	40	13	8.9	8.7
	0.920	0.334	5000	1479	20	40	16	6.0	6.1
	0.950	0.277	5000	1230	17	40	8	12.2	9.7
5.835	0.864	0.274	4000	1016	14	40	23	5.8	4.3
	0.937	0.274	8000	2032	27	40	8	7.8	7.5
	0.924	0.260	6000	1404	19	40	8	11.2	9.3
	0.886	0.244	6000	1320	18	40	11	10.0	8.1

Für die korrigierten neoplastischen Transformationsdaten ergab sich folgende linear-quadratische Anpassung (mit SE):

$$T = (0.149 \pm 0.079) + (0.611 \pm 0.178)D + (0.104 \pm 0.041)D^2 \quad (11)$$

Der lineare Anteil der Dosiswirkungskurve, der α -Koeffizient (0.611 ± 0.178)D⁻¹, ist um mehr als einen Faktor 2 geringer als der entsprechende α -Koeffizient (1.41 ± 0.266)D⁻¹ für 29 kV Röntgenstrahlung (Gleichung (7)), aber nicht signifikant (Gleichung (8)). Diese Befunde stützen damit keinesfalls die Annahme von Frankenberg et al. (2002a), wonach für die neoplastische Transformation von CGL1-Zellen eine RBW von 2 für 200 kV Röntgenstrahlung relativ zu Gamma-Strahlung gerechtfertigt wäre.

Die entsprechende Dosiswirkungskurve für ¹³⁷Cs γ -Strahlung ist in Figur 7 dargestellt.

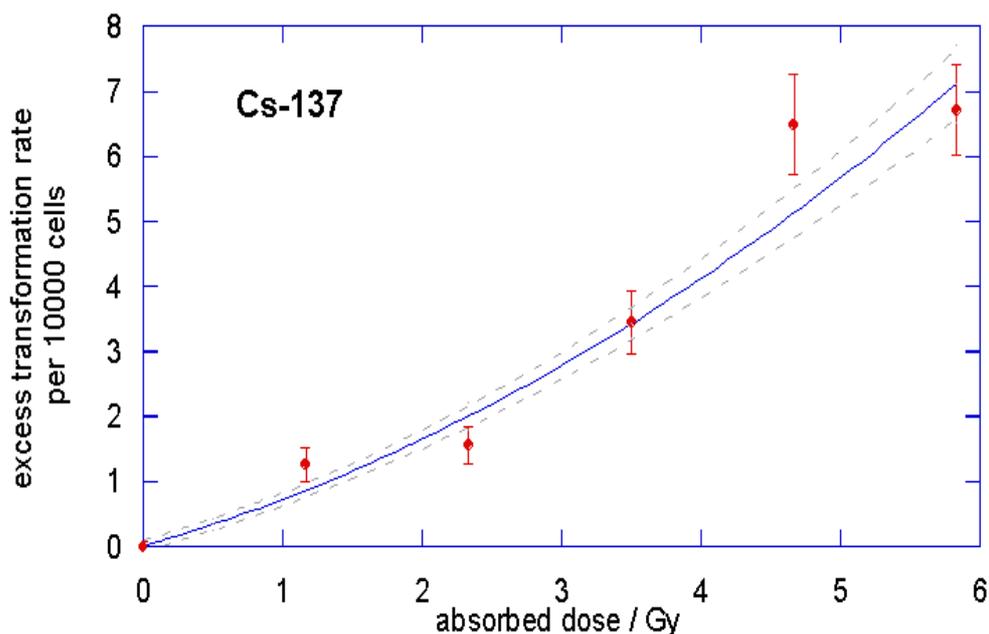


Fig. 7. Dosiswirkungsbeziehung der neoplastischen Transformation in CGL1 Zellen durch ¹³⁷Cs γ -Strahlung. Die Fehlerbalken sind Binominal Standardfehler

3.3. Diskussion der Transformationsexperimente

Die meisten publizierten Informationen über die strahleninduzierte neoplastische Transformation von Zellen stammen aus Experimenten, die in Fibroblasten von

Nagern erhoben wurden (ICRP 1991). Der größte Teil der quantitativen Studien wurde dabei mit dem Klon 8 von C3H/10T1/2 Zelllinie durchgeführt, der von Reznikoff et al. (1973) entwickelt wurde. Deshalb war es ein wesentlicher Fortschritt, als es möglich wurde, ähnliche Forschungen mit menschlichen Hybrid-Zelllinien durchzuführen (Stanbridge et al. 1981, 1982; Redpath et al. 1987). Besonderes Interesse kam aber erst auf, als Frankenberg et al. (2000, 2002 a,b) nach Verwendung dieser Methode über relativ hohe RBW-Werte für die 29 kV Röntgenstrahlung berichtete. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe lagen wesentlich über der RBW von 2 für Mammographie-Röntgenstrahlung [15 keV ; $(\alpha = 0.90 \pm 0,15)D^{-1}$], die von Brenner et al. (2002) für die Transformation von C3H/10T1/2 Zellen relativ zur ^{137}Cs γ -Strahlung ($\alpha = 0.46 \pm 0,11)D^{-1}$ beobachtet wurde. Die Befunde von Frankenberg et al. (2002) waren auch nicht mit biophysikalischen und mikrodosimetrischen Überlegungen vereinbar, nach denen ein RBW-Wert für die Mammographie-Röntgenstrahlung relativ zur konventionellen Röntgenstrahlung von höchstens 2 vorausgesagt wurde (Brenner und Amols 1989; Kellerer 2002; Kellerer und Chen 2003).

In der neuen Studie haben wir ebenfalls die neoplastische Transformation in menschlichen CGL1 Zellen benutzt, um unter optimalen experimentellen Bedingungen die RBW der Mammographie-Röntgenstrahlung (29 kV) relativ zur harten Röntgenstrahlung (200 kV) zu bestimmen und damit das Ergebnis von Frankenberg et al. (2000, 2002 a,b) überprüfen zu können. Der Vorteil des CGL1 Zellsystems gegenüber den C3H/10T1/2 Zellen liegt in der Tatsache, dass beim Wachstum der CGL1-Zellen keine Konfluenz erreicht werden muss, um neoplastisch transformierte Kolonien beobachten zu können. Vielmehr können solche Kolonien relativ einfach als Transformationen pro überlebende Zelle bestimmt werden (Redpath et al 1987). Wie die neue Studie aber eindeutig zeigt, muss einschränkend beachtet werden, dass die Kulturbedingungen während der Inkubationszeit nach Bestrahlung sehr kritisch sein können. Zu geringe Mediumwechsel, wie sie in den Experimenten von Frankenberg et al. (2002a) durchgeführt wurden, können extreme Fluktuationen der Rate von neoplastischen Transformationen verursachen.

Während in unserer neuen Studie die RBW-Werte der Mammographie-Röntgenstrahlung deutlich geringer sind als in der früheren Arbeit von Frankenberg et al. (2002), sind sie aber immer noch höher als die Ergebnisse von Brenner et al. (2002) für neoplastische Transformation in C3H/10T1/2 Zellen (Brenner et al. 2002)

und mikrodosimetrische Analysen (Kellerer 2002, Kellerer und Chen 2003) vermuten ließen. Angesichts der weit engeren Fehlerbänder in der neuen Studie gibt es aber trotzdem keinen signifikanten Unterschied zu dem RBW-Wert von 2, der für sehr kleine Dosen der Mammographie-Röntgenstrahlung zu erwarten war.

Da das Design der neuen Studie so parallel wie möglich zur früheren Studie mit den hohen RBW-Werten durchgeführt wurde, war auch die relative hohe Dosis von 1 Gy die niedrigste analysierte Dosis für die Mammographie-Röntgenstrahlung. Zusammen mit dem damaligen Problem der nicht optimalen Kulturbedingungen während der Inkubationszeit nach Bestrahlung konnte aber dennoch gezeigt werden, dass die früheren Schlussfolgerungen über eine Unterschätzung der biologischen Wirksamkeit der Mammographie-Röntgenstrahlung nicht haltbar sind. Es sollten daher weitere Experimente mit Dosen <1 Gy durchgeführt werden, um eine genauere Abschätzung der RBW_M der Mammographie-Röntgenstrahlung relativ zur konventionellen Röntgenstrahlung (150 bis 250 kV) zu erreichen.

4. Chromosomenanalysen in menschlichen Lymphozyten

Zahlreiche Experimente wurden mit locker ionisierender Strahlung mit Startenergien von größer 150 kV unternommen, um die Induktion von Chromosomenaberrationen in menschlichen peripheren Lymphozyten bestimmen zu können. Dagegen gibt es nur relativ wenige entsprechende Ergebnisse für niedrigere Energien.

In Untersuchungen, die den Energiebereich von 0,3 keV Kohlenstoff-K Strahlung bis zu 13 MeV Elektronen (Virsik et al. 1980), von 4,8 keV Röntgenstrahlen bis zu ^{60}Co γ -Strahlung (Sasaki et al. 1989), von Tritium β -Strahlung (mittlere Energie von 5,7 keV) bis zu 16 MeV Elektronen (Übersicht von Straume 1995, der Daten aus dem NRPB in England benutzte) und von 5,4 keV Chrom-K Strahlung bis zu 3 MeV Elektronen aus unserem Labor (Schmid und Bauchinger 1998) umfassen, wurden signifikante Unterschiede des α -Koeffizienten der Dosiswirkungskurven für die Erzeugung von dizentrischen Chromosomen beobachtet. Unsere weiteren aktuellen Daten stellen einen Teil eines umfangreichen Datensatzes für verschiedene Energien und Spektren dar, für den immer das Blut eines einzigen Spenders verwendet wurde, um den Einfluss einer potentiellen interindividuellen Strahlenempfindlichkeit zu eliminieren. Dazu zählt auch die Untersuchung der Mammographie-Röntgenstrahlung, bei der eine Erzeugerspannung von 29 kV verwendet wurde.

4.1. Blutkultur und Chromosomenanalyse

Unmittelbar nach Bestrahlung von Vollblut wurden pro Dosis jeweils zwei Kulturen angesetzt. Sie enthielten 0,5 ml Blut, 4,5 ml RPMI 1649 Medium mit 15% fötalem Kälberserum, 2,5% Phytohemagglutinin (PHA), 2,9 $\mu\text{g/ml}$ Bromdeoxyuridin (BrdU) und Antibiotika. Während der 6-stündigen Transitzeit von der PTB zum GSF-Labor befanden sich die Kulturen bei 37° C in einem tragbaren Brutschrank. Danach wurden die Kulturen für weitere 41 Stunden bei 37° C in einen CO₂ –Brutschrank überführt. Drei Stunden vor Kulturrende wurde den Kulturen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Colcemid zugegeben.

Die Chromosomenpräparation und die Fluoreszenz-plus-Giemsa Färbung erfolgte nach unserem Standardprotokoll (Wagner et al. 1983). Alle Präparate wurden kodiert. Die Chromosomenanalyse wurde ausschließlich in kompletten ersten Zellteilungen (M₁-Zellen, Figur 8 rechts) durchgeführt, die gegenüber den schwarz-weiß gefärbten zweiten Zellteilungen (M₂-Zellen, Figur 8 links) homogen schwarz gefärbt und damit leicht unterscheidbar waren. Dizentrische Chromosomen (Dic) und zentrische Ringe (R_c) wurden gezählt und bei der Annahme eines kompletten Austauschprozesses nur jeweils ein azentrisches Fragment einer solchen Austauschfigur zugeordnet. Die überzähligen Fragmente wurden als azentrische Fragmente (Ace) gewertet.



Fig. 8: Links: Menschlicher Lymphozyt im ersten Zellteilungszyklus in vitro (Pfeil zeigt auf ein dizentrisches Chromosom). Rechts: Menschlicher Lymphozyt im zweiten Zellteilungszyklus (Harlekin-Färbung)

4.2. RBW der Mammographie-Röntgenstrahlung (29 kV)

Vollblut wurde in flachen Ringkammern (Polyvinylcarbazol) bestrahlt, die mit 20 μm dicken Hostaphanfolien von beiden Seiten verschlossen waren. Die Blutprobe innerhalb dieser Kammern war damit scheibenförmig und hatte einen Durchmesser von 23,9 mm und eine Höhe von 2 mm. Die Bestrahlungen fanden im Röntgenlabor R127 der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig statt. Die Mammographie-Röntgenstrahlung wurde mit einer Philips-Röhre (PW 2185/00) bei einer Röhrenspannung von 29 kV erzeugt (Mo-Anode, Anodenwinkel 26° , Filterung 30 μm Mo). Die spektrale Fluenz der Strahlenqualität wurde mit Hilfe eines Reinstgermanium-Spektrometers gemessen. Das Röntgenspektrum ist in Figur 9 angegeben.

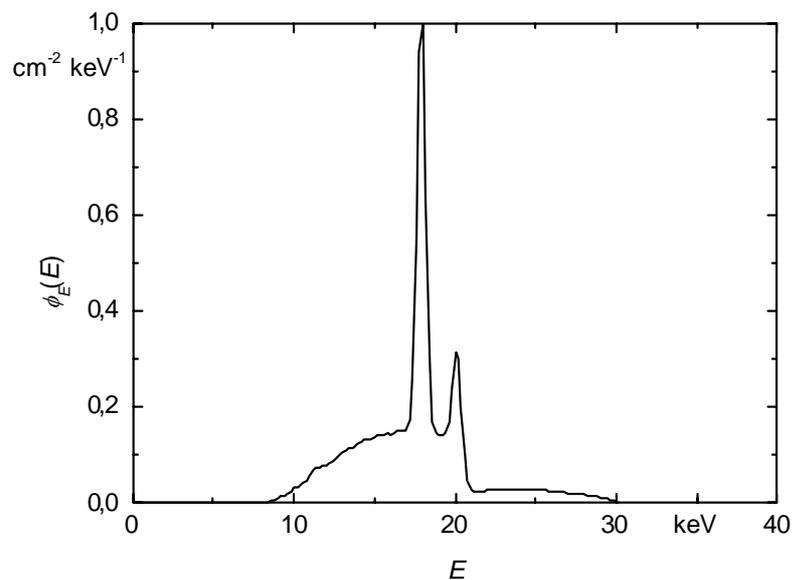


Fig. 9: Spektrum der Photonenfluenz der 29 kV Röntgenstrahlung

Die Fluenz-gewichtete mittlere Energie der gemessenen Strahlenqualität frei in Luft betrug 17,4 keV. Die entsprechende Halbwertschichtdicke betrug 0,337 mm Al. Die Blutproben wurden in 100 cm Abstand vom Fokus in der Referenzebene bestrahlt. Um die gewünschten absorbierten Dosen innerhalb von 15 Minuten in den

Blutproben zu erreichen, wurden Dosisleistungen von 0,009 bis 0,140 Gy min⁻¹ verwendet. Die exakte Dosimetrie ist sehr umfangreich in unserer Publikation von Schmid et al. (2002 a) dargestellt.

Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse für 29 kV Röntgenstrahlung sowie Kontrollwerte sind in Tabelle 10 angegeben. Die Häufigkeit der Aberrationen in der unbestrahlten Kontrolle des Blutspenders (9200 analysierte Zellen) unterscheidet sich nicht signifikant vom entsprechenden Kontrollwert für 141 Personen, der in unserem Labor (92550 analysierte Zellen, Bauchinger und Schmid 1998) bestimmt wurde. Mit zunehmender Dosis steigt die Rate der Aberrationen der drei Schadenstypen. Das Verhältnis der Anzahl von dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringen ist unabhängig von der Dosis etwa 10.

Tab. 10: Häufigkeit der Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung mit 29 kV Röntgenstrahlung

(Gy)	Analysierte Zellen	Chromosomenaberrationen pro Zelle		
		Dic	R _c	Ace
0	92550	0.00041	0.0001	0.0025
0	9200	0.00033	0	0.0025
0.115	2000	0.008	0.001	0.008
0.240	1200	0.018	0.003	0.018
0.509	1000	0.046	0.004	0.056
0.763	700	0.057	0.011	0.057
1.017	500	0.112	0.014	0.094
1.642	400	0.225	0.025	0.143
2.194	300	0.290	0.030	0.230

In Tabelle 11 ist die interzelluläre Verteilung der dizentrischen Chromosomen pro Dosis und in Tabelle 12 jene für die azentrischen Fragmente zusammen mit den Ergebnissen des μ -Tests für eine Poissonverteilung angegeben. Die relative Varianz, σ^2 / y , ist dabei 1, wenn die interzelluläre Verteilung der Aberrationen einer Poissonverteilung entspricht. Wenn die relative Varianz signifikant größer als 1 ist (Überdispersion), wird die Annahme der Poissonverteilung verworfen. Dazu bedient man sich der Testgröße u (Rao und Chakravarti 1956), die unter der Null-Hypothese

normal verteilt ist, d. h. bei $u > 1.96$ ist die Überdispersion signifikant. Für die Daten der dizentrischen Chromosomen liegt jeweils eine reguläre Verteilung vor (Tabelle 11), während für die Daten der azentrischen Fragmente nur bei 5 der 7 Dosispunkte eine Poisson-Verteilung beobachtbar war (Tabelle 12). Bei Dosispunkten (1.017 und 1.642 Gy) wurde eine signifikante Überdispersion gefunden.

Tab. 11: Interzelluläre Verteilung von dizentrischen Chromosomen (Dic) in menschlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit 29 kV Röntgenstrahlen

Dosis [Gy]	Zellzahl	Dic / Zelle	Interzelluläre Verteilung von Dic					σ^2 / y	u Wert
			0	1	2	3	4		
0	9200	0.00033	9197	3	-	-	-	1.00	-0.02
0.115	2000	0.008	1984	16	-	-	-	0.99	-0.26
0.240	1200	0.018	1178	22	-	-	-	0.98	-0.40
0.509	1000	0.046	957	40	3	-	-	1.09	1.94
0.763	700	0.057	662	36	2	-	-	1.05	0.89
1.017	500	0.112	447	51	1	1	-	1.03	0.53
1.642	400	0.225	324	63	12	1	-	1.11	1.56
2.194	300	0.290	226	64	8	1	1	1.10	1.23

Tab. 12: Interzelluläre Verteilung von azentrischen Fragmenten (Ace) in menschlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit 29 kV Röntgenstrahlen

Dosis [Gy]	Analysierte Zellen	Ace/Zelle	Interzelluläre Verteilung von Ace				σ^2 / y	u Wert
			0	1	2	3		
0	9200	0.0025	9177	23	-	-	1.00	-0.17
0.115	2000	0.008	1984	16	-	-	0.99	-0.26
0.240	1200	0.018	1178	22	-	-	0.98	-0.40
0.509	1000	0.056	947	50	3	-	1.05	1.17
0.763	700	0.057	662	36	2	-	1.05	0.89
1.017	500	0.094	458	38	3	1	1.16	2.62
1.642	400	0.143	352	40	7	1	1.21	3.01
2.194	300	0.230	240	51	9	-	1.03	0.42

Wie für die Daten der neoplastischen Transformation in CGL1 Zellen wurde auch für die Daten der Chromosomenanalyse das linear-quadratische Modell $y = c + \alpha D + \beta D^2$ verwendet, um Dosiswirkungskurven zu berechnen. Die Koeffizienten c , α und β wurden durch Regressionsrechnung nach der Methode der kleinsten gewichteten Quadrate berechnet. Bei dieser Methode sind die Kurvenkoeffizienten dadurch bestimmt, dass die gewichtete Fehlerquadratsumme minimal wird. Dabei ergaben sich folgende Gleichungen (mit Standardfehler des Mittelwertes):

für dizentrische Chromosomen

$$y = (0.0655 \pm 0.0097) \text{ Gy}^{-1} + (0.0351 \pm 0.0082) \text{ Gy}^{-2} \quad (12)$$

sowie für azentrische Fragmente

$$y = (0.0721 \pm 0.0099) \text{ Gy}^{-1} + (0.0130 \pm 0.0077) \text{ Gy}^{-2} \quad (13)$$

In Figur 10 ist die Dosis-Wirkungs-Kurve der dizentrischen Chromosomen für 29 kV Röntgenstrahlung dargestellt. Sie liegt zwischen unseren früher berechneten Kurven für 10 kV Röntgenstrahlung (Roos und Schmid 1997) und 60 kV Röntgenstrahlung (Regulla et al. 2001).

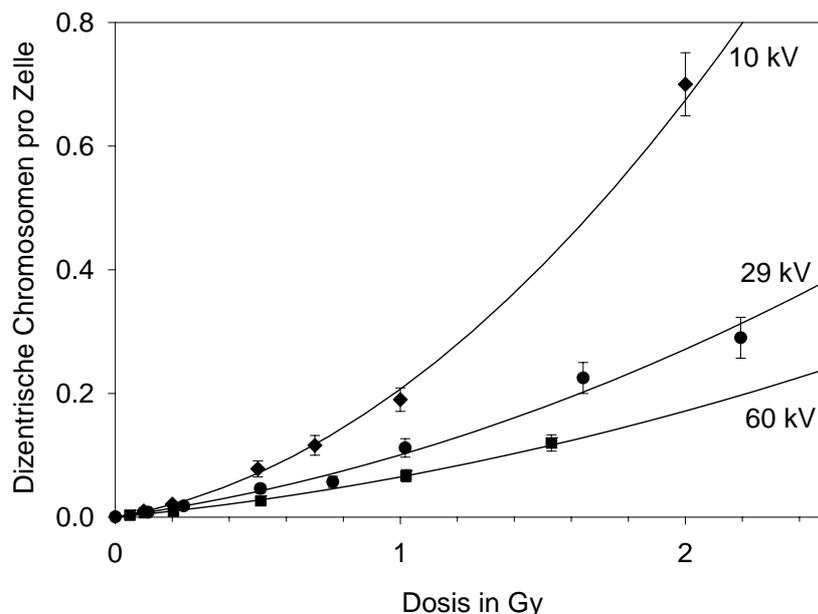


Fig. 10: Linear-quadratische Dosiswirkungskurven für dizentrische Chromosomen nach Bestrahlung von menschlichen Lymphozyten mit Röntgenstrahlen

Die Dosiswirkungskoeffizienten für die Häufigkeit der dizentrischen Chromosomen sind in Tabelle 13 angegeben, gemeinsam mit den entsprechenden Koeffizienten für die Referenzstrahlungen. Bei den Experimenten mit 220 kV Röntgenstrahlung erfolgten die Bestrahlungen von Blut bei gleicher Dosisleistung ($0,5 \text{ Gy min}^{-1}$), aber mit unterschiedlicher Filterung. Bei harter Filterung mit 3,35 mm Cu und 2,0 mm Al und damit einer mittleren Photonenenergie von 135 keV ist eine deutlich niedrigere Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen zu beobachten als bei moderater Filterung mit 0,5 mm Cu und 4,05 mm Al und damit einer Photonenenergie von 96 keV (Schmid et al. 1984).

Tab. 13: Dosiswirkungskoeffizienten $\alpha \pm \text{SEM}$ und $\beta \pm \text{SEM}$ für die Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit Photonen im Energiebereich zwischen 17,4 und 1250 keV
¹Filterung: 0,5 mm Cu + 4,05 mm Al; ²Filterung: 3,35 mm Cu + 2,0 mm Al

Strahlung	Mittlere Energie (keV)	$\alpha \pm \text{SEM}$	$\beta \pm \text{SEM}$
29 kV X-rays	17,4	$0,066 \pm 0,010$	$0,061 \pm 0,025$
220 kV X-rays ¹	96	$0,040 \pm 0,003$	$0,060 \pm 0,002$
220 kV X-rays ²	135	$0,022 \pm 0,004$	$0,044 \pm 0,002$
⁶⁰ Co γ -rays	1250	$0,011 \pm 0,004$	$0,055 \pm 0,003$

Das Photonenspektrum von 220 kV Röntgenstrahlung mit moderater Filterung entspricht in etwa dem Photonenspektrum der von Frankenberg et al. (2002a) verwendeten Referenzstrahlung (200 kV, gefiltert mit 0,6 mm Cu). Basierend auf der Analyse von dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten ergibt sich aber im Vergleich zur neoplastischen Transformation in CGL1 Zellen bei gleicher Referenzstrahlung eine weit geringere RBW_M , nämlich 1,6. Auch gegenüber der Referenzstrahlung ⁶⁰Co Gammastrahlung ist für die Bildung von dizentrischen

Chromosomen eine niedrigere RBW_M von etwa 6 zu beobachten. Dabei muss aber beachtet werden, dass der α - Koeffizient für die ^{60}Co Gammastrahlung offenbar von der Form des verwendeten Phantoms und damit von der unterschiedlichen Streustrahlung beeinflusst sein kann (Schmid et al. 2002b).

Tabelle 14 zeigt, dass der Wert des α - Koeffizienten bei Bestrahlung in einem größeren Phantom (30 cm x 30 cm x 30 cm) gegenüber einer Bestrahlung in einem kleinen Phantom (7 cm x 11,5 cm x 2,3 cm) ansteigt. Dies macht deutlich, dass bei einem Vergleich von Literaturdaten zur Abschätzung der RBW_M , wie von Frankenberg et al. (2000, 2002) vorgenommen, die Filterungen oder Phantomgrößen für die Referenzstrahlungen unbedingt berücksichtigt werden sollten.

Tab. 14: Dosiswirkungskoeffizienten $\alpha \pm \text{SEM}$ und $\beta \pm \text{SEM}$ für die Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit ^{60}Co γ -rays (*Bestrahlung in 5 cm Tiefe)

Dosisleistung (Gy min ⁻¹)	Phantom (cm)	Temperatur (°C)	$\alpha \pm \text{SEM}$	$\beta \pm \text{SEM}$
0,5	7 x 11,5 x 2,3	37	0,011 \pm 0,004	0,055 \pm 0,003
0,017	7 x 11,5 x 2,3	37	0,009 \pm 0,004	0,042 \pm 0,003
0,033	7 x 11,5 x 2,3	21	0,010 \pm 0,004	0,030 \pm 0,002
0,033	30 x 30 x 30*	21	0,014 \pm 0,004	0,030 \pm 0,002
0,033	30 x 30 x 30*	21	0,016 \pm 0,006	0,031 \pm 0,004

Die Koeffizienten der Dosiswirkungsbeziehungen von dizentrischen Chromosomen und azentrischen Fragmenten für 29 kV Röntgenstrahlung sind in Tabelle 15 angegeben, zusammen mit den entsprechenden Ergebnissen aus unseren früheren Analysen mit unterschiedlichen Energien von Röntgenstrahlung, 10 kV (Roos und Schmid 1997), 60 kV (Regulla et al. 2001), weich und hart gefilterten 220 kV (Schmid

et al. 1984) sowie mit ^{137}Cs γ -rays (Schmid et al. 1995) und ^{60}Co γ -rays (Bauchinger et al. 1983). Zusätzlich ist die RBW_M für die Produktion der jeweiligen Aberrationen relativ zu ^{60}Co γ -rays aufgeführt. Für die Mammographie-Röntgenstrahlung ergibt sich eine RBW_M von 6.12 ± 2.51 für dizentrische Chromosomen und von 2.98 ± 0.56 für azentrische Fragmente. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Energie der Photonenstrahlung die RBW_M zunimmt.

Tab. 15: Dosiswirkungskoeffizienten α und β sowie die maximale RBW (RBW_M) für dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente in Lymphozyten eines Blutspenders nach Exposition mit Röntgen- oder Gammastrahlung unterschiedlicher Energien

Radiation quality	Mean energy (keV)	Aberration type	Linear Coefficient $\alpha \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$	Quadratic Coefficient $\beta \pm \text{SEM}$ $\times 10^{-2} \text{ Gy}^{-2}$	$\text{RBE}_M \pm \text{SEM}$ relative to ^{60}Co γ -rays	References
10 kV X-rays	5.4	Dicentrics	7.70 ± 1.20	13.0 ± 1.50	7.20 ± 2.98	Roos und Schmid 1997
		Acentrics	7.40 ± 1.60	12.1 ± 1.60	3.06 ± 0.77	
29 kV X-rays	17.4	Dicentrics	6.55 ± 0.97	3.51 ± 0.82	6.12 ± 2.51	Schmid et al. 2002a
		Acentrics	7.21 ± 0.99	1.30 ± 0.77	2.98 ± 0.56	
60 kV X-rays	48	Dicentrics	4.44 ± 0.68	2.07 ± 0.76	4.15 ± 1.71	Regulla et al. 2001
		Acentrics	4.50 ± 1.30	3.40 ± 1.40	1.86 ± 0.59	
220 kV X-rays	96	Dicentrics	4.00 ± 0.30	5.98 ± 0.17	3.74 ± 1.46	Schmid et al. 1984
		Acentrics	5.30 ± 0.60	5.15 ± 0.28	2.19 ± 0.37	
220 kV X-rays	135	Dicentrics	2.20 ± 0.40	4.36 ± 0.24	2.06 ± 0.87	Schmid et al. 1984
		Acentrics	6.40 ± 0.60	2.99 ± 0.27	2.64 ± 0.42	
^{137}Cs γ -rays	662	Dicentrics	1.50 ± 0.50	4.70 ± 0.30	1.40 ± 0.71	Schmid et al. 1995
		Acentrics	2.88 ± 0.58	3.31 ± 0.20	1.19 ± 0.37	
^{60}Co γ -rays	1250	Dicentrics	1.07 ± 0.41	5.50 ± 0.28	-	Bauchinger et al. 1983
		Acentrics	2.42 ± 0.31	4.46 ± 0.18	-	

Da alle diese Befunde mit Blut desselben Spenders und derselben Methode der Anpassung an das linear-quadratische Modell erhoben worden waren, wurden sie in

die ICRP Empfehlung 92 von 2003 übernommen. Diese Darstellung der Ausbeute dizen-trischer Chromosomen und azen-trischer Fragmente ist in Figur 11 wiedergegeben.

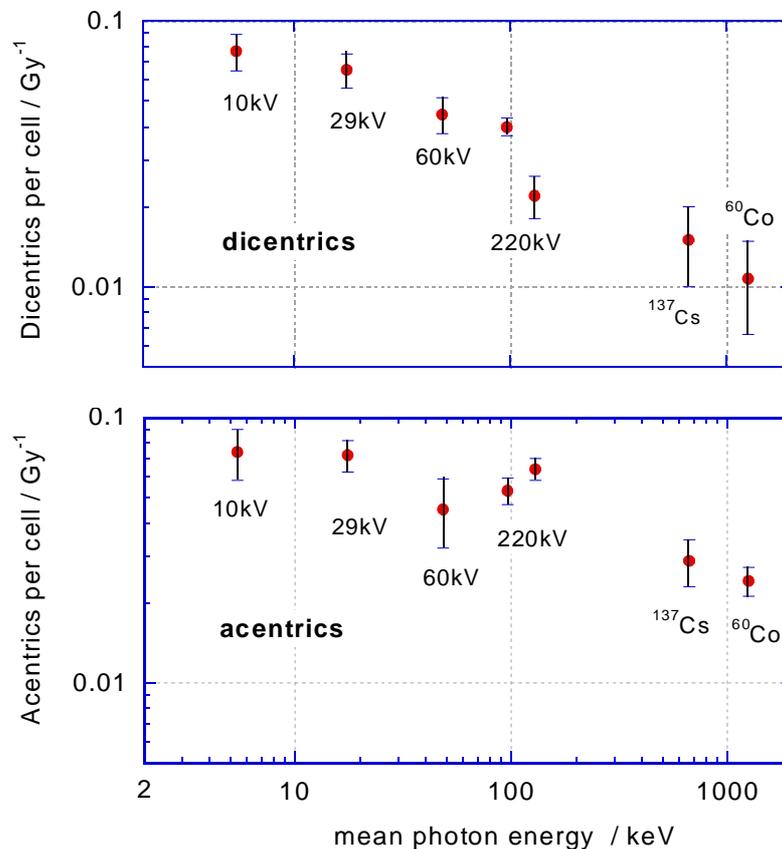


Fig. 11: α -Koeffizienten mit Standardfehler für die Induktion von dizen-trischen Chromosomen und azen-trischen Fragmenten in menschlichen Lymphozyten eines Spenders nach Exposition mit verschiedenen Energien von Röntgen- und Gammastrahlung

Diese klare Zunahme des α -Koeffizienten für die Induktion von dizen-trischen Chromosomen mit abnehmender Photonenenergie bestätigt ähnliche Befunde für einzelne dieser Photonenenergien und daraus abgeleitete Schlussfolgerungen von verschiedenen Arbeitsgruppen (Virsik und Harder 1978; Virsik et al. 1980 a; Lloyd und Edwards 1983; Sasaki et al. 1989; Straume 1995; Roos und Schmid 1997). In Tabelle 16 sind unsere RBW_M Werte für die 29 kV Röntgenstrahlung relativ zur 220 kV Röntgenstrahlung und zur ⁶⁰Co γ -Strahlung im Vergleich zu früheren Befunden für

die Induktion von dizentrischen Chromosomen bzw. Kleinkernen in menschlichen Lymphozyten zusammengestellt.

Tab. 16: Linearer Dosiswirkungskoeffizient α und RBW_M relativ zur konventionellen Röntgenstrahlung für verschiedene zelluläre Wirkungen

Biologisches Target	Röntgenstrahlung (mittlere Photonenenergie)	Linearer Koeffizient $\alpha \pm SEM \times Gy^{-1}$	$RBW_M \pm SEM$ relativ zu konventioneller Röntgenstrahlung	Ref.
Dizentrische Chromosomen in menschlichen Lymphozyten	30 kV	0.154 ± 0.053	1.2 ± 0.5	Virsik et al. (1977)
	150 kV	0.127 ± 0.028		
Dizentrische Chromosomen in menschlichen Lymphozyten	14.6 keV	0.043 ± 0.012	0.8 ± 0.5	Sasaki et al. (1989)
	200 kV	0.052 ± 0.027		
	50 kV (8.4 keV)	0.153 ± 0.024	2.9 ± 1.6	
	200 kV	0.052 ± 0.027		
Dizentrische Chromosomen in menschlichen Lymphozyten	29 kV (17.4 keV)	0.066 ± 0.010	1.6 ± 0.3	Schmid et al. (2002a)
	220 kV (96 keV)	0.040 ± 0.003		
	29 kV (17.4 keV)	0.066 ± 0.010	3.0 ± 0.7	
	220 kV (135 keV)	0.022 ± 0.004		
Kleinkerne in menschlichen Lymphozyten	14 kV (10 keV)	0.103 ± 0.024	1.6 ± 0.6	Verhaegen und Vral (1994)
	350 kV (135 keV)	0.064 ± 0.018		
	50 kV (29.6 keV)	0.087 ± 0.024	1.4 ± 0.5	
	350 kV (135 keV)	0.064 ± 0.018		

Die Abhängigkeit von α von der mittleren Photonenenergie, die in Figur 11 dargestellt ist, sollte nur als Beschreibung der Variation von α in Abhängigkeit von der Strahlenqualität verstanden werden, nicht aber als tatsächliche Abhängigkeit von α von der mittleren Energie der speziellen Photonenstrahlung. Es ist nämlich bekannt, dass die exakte Form des Photonenspektrums, einschließlich des Anteils durch die charakteristische Röntgenstrahlung (in unserer Studie, bei der eine Röntgenröhre mit einer Mo-Anode benutzt wurde, die Spektrallinien K_α bei 17,4 keV und K_β bei 19,5

keV) wesentlich zur mittleren Energie beiträgt. Zusätzlich wird auch die Energiedeposition der Photonen in einer Zelle von Photo- und Comptonelektronen beeinflusst, deren mikrodosimetrische Eigenschaften die tatsächliche Ursache für die Häufigkeit von Aberrationen pro Doseinheit sind. Mikrodosimetrisch gesehen, steigt der dosismittelte begrenzte LET $\bar{L}_{500, D}$ (Energie cutoff $\Delta = 500$ eV) von 2,82 keV/ μm für 13 MeV Elektronen über 3,37 keV/ μm für ^{60}Co -Gammastrahlung und 6,82 keV/ μm für 30 kV Röntgenstrahlung (Mo-Target) bis zu 12,4 keV/ μm für 10 kV Röntgenstrahlung (Cr-Target) und 21.1 keV/ μm für 1,5 keV Röntgenstrahlung (C-Target) (Blohm 1983; Bartels und Harder 1990). Ein weiterer mikrodosimetrischer Gesichtspunkt ist die Reichweite der Elektronen (Harder 1999), der eine besondere Bedeutung für die Induktion von zellulären Wirkungen zukommen kann, wenn geometrische Strukturen, wie etwa Chromosomendomänen, involviert sind.

Eine weitere Besonderheit bei der Häufigkeit der beobachteten Aberrationen war die Tendenz, dass die relative Varianz mit zunehmender Dosis leicht anstieg, wobei sie für die Induktion von azentrischen Fragmenten bei den zwei höchsten Dosen sogar zu einer signifikanten Überdispersion führte (Tabelle 12). Die relative Varianz steigt normalerweise nur als Folge einer Dosisinhomogenität innerhalb einer bestrahlten Blutprobe an. Im speziellen Bestrahlungsfall mit 29 kV Röntgenstrahlung ist der Schwächungsfaktor für z. B. 15 keV Photonen in einer 2 mm dicken Blutprobe circa 0,73. Das bedeutet, dass die resultierende interzelluläre Verteilung der Aberrationen das Ergebnis einer Faltung von Poisson-Verteilungen darstellt, mit Erwartungswerten, die mit der Dicke der Blutprobe abnehmen. Das Ausmass der Überdispersion kann für die linear-quadratische Dosiswirkungsbeziehung relativ leicht bestimmt werden. Es kann angenommen werden, dass der Erwartungswert m der Anzahl n der Aberrationen pro Zelle mit der Dicke x nach der Gleichung

$$m = \alpha D_0 \exp(-\mu x) \quad (14)$$

abnimmt, wobei D_0 die gemessene Dosis an der Oberfläche der Blutprobe und μ der Schwächungskoeffizient ist. Wenn der Erwartungswert $\bar{n} = m$ und das zweite Moment $\overline{n^2} = m^2 + m$ über die Dicke d der Blutprobe gemittelt wird, kann der Wert der relativen Varianz in erster Näherung mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\sigma^2/n = (\overline{n^2} - \bar{n}^2)/\bar{n} = 1 + \mu^2 d^2 \alpha D_0 / 12 \quad (15)$$

Damit müsste eine relative Varianz erwartet werden, die mit der Dosis D_0 linear zunehmen sollte. Eine weitere Ursache für die Entstehung einer Überdispersion könnte die Induktion von komplexen Aberrationen entlang der Bahnspur eines Elektrons beim Durchgang durch den Zellkern sein, z. B. deponiert ein 15 keV Elektron ungefähr 10 lokale Energiedepositionen von ungefähr 200 eV entlang seiner 4 μm langen Bahnspur (Blohm 1983). Dieses Erscheinungsbild der Überdispersion sollte jedoch im Wesentlichen dosisunabhängig sein, da die Überdispersion nur von der Eigenschaft eines einzelnen Partikeldurchgangs abhängig ist (Virsik und Harder 1981). Ein Vergleich der beobachteten Häufigkeit der Aberrationen mit der berechneten Anzahl der Elektronenbahnen pro Zellkern (1 Gy entspricht einer absorbierten Energie von ungefähr 6 keV per μm^3) zeigt, dass die Wirkung pro Bahnspur etwa 10^{-3} sein muss, um eine Aberration induzieren zu können. Aufgrund dieser Überlegungen glauben wir, dass der dosisabhängige Anstieg der relativen Varianz (Tabelle 12) durch die Inhomogenität der Dosis in der Blutprobe bedingt ist.

Die Bestrahlung von einzelnen Zellen („Microbeam“-Bestrahlung) mit α -Teilchen hat zudem gezeigt, dass nicht getroffene Zellen innerhalb einer Gesamtpopulation trotzdem signifikant zur Häufigkeit von Mutationen und chromosomalen Schäden beitragen (Zhou et al. 2001). Wenn dies ebenfalls für Vollblutkulturen und locker ionisierende Strahlen zutrifft, müsste es sich bei den Befunden der vorliegenden Arbeit ausgewirkt haben. Dieser Effekt lässt sich durch Behinderung der interzellulären Kommunikation signifikant ausschalten (Zhou et al. 2001). Es ist daher von entscheidender Bedeutung, dass während der Erstellung unseres kompletten Datensatzes in Tabelle 15 immer konstante Kulturbedingungen eingehalten worden sind. Daher gilt für alle unsere RBW-Werte, dass ein möglicher Bystander Effekt voll mitberücksichtigt wurde. Somit wäre es interessant zu analysieren, inwieweit der Bystander-Effekt zusammen mit der variablen Zelldichte und den Kulturbedingungen für die immer wieder dokumentierten Unterschiede der Aberrationsraten von verschiedenen Labors verantwortlich ist. Solche Differenzen für die RBW im Energiebereich von 30 bis 350 kV Röntgenstrahlung sind in Tabelle 16 zusammengestellt. So wurde für die Induktion der dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten von Virsik und Harder (1978) eine RBW von $1,2 \pm 0,5$ für 30 kV Röntgenstrahlung relativ zu 150 kV Röntgenstrahlung beobachtet, während Sasaki et al. (1989) in einem ähnlichen Energiebereich eine RBW von $2,9 \pm 1,6$

zwischen ungefilterten 50 kV und 200 kV Röntgenstrahlung publizierten. In unseren Untersuchungen an dizentrischen Chromosomen wurden für 29 kV Röntgenstrahlung RBW-Werte von $1,6 \pm 0,3$ relativ zu weich gefilterter 220 kV Röntgenstrahlung und $3,0 \pm 0,7$ relativ zu hart gefilterter 220 kV Röntgenstrahlung (Schmid et al., 1984) beobachtet. Für die Induktion von Kleinkernen in menschlichen Lymphozyten (Verhaegen und Vral, 1994) wurden RBW-Werte von $1,4 \pm 0,5$ für 50 kV (29,6 keV) Röntgenstrahlung und $1,6 \pm 0,6$ von 14 kV (10 keV) Röntgenstrahlung relativ zu 350 kV Röntgenstrahlen gefunden.

4.3. *Monochromatische Synchrotron-Strahlung*

4.3.1. *Vollblutbestrahlung*

Da wir bereits früher den Einfluss eines unterschiedlich breiten Energiespektrums von Röntgenstrahlen auf die Bestimmung der RBW_M feststellen konnten (Schmid et al., 1984), haben wir die monochromatische Synchrotron-Strahlung mit Energien von 17,4 und 40 keV benutzt, um auch für die Mammographie-Röntgenstrahlung weitere Informationen über die Beziehung zwischen der Photonenenergie und der RBW_M zu bekommen. 17,4 keV Photonen wurden gewählt, da sie der mittleren Energie des Photonenspektrums der Mammographie-Röntgenstrahlung entsprechen, während die biologische Wirkung von 40 keV als Beispiel für eine höhere Photonenenergie analysiert wurde.

Das Blut wurde in flachen ringförmigen Plastikkammern, die an beiden Seiten durch straff gespannte 20 μm dicke Hostaphan-Folien verschlossen waren, bestrahlt. Die Blutprobe in der Kammer hatte damit die Form eines flachen Zylinders mit einem Durchmesser von 23,9 mm und einer Höhe von 2mm. Die Bestrahlung erfolgte am BAM-Strahl (Görner et al., 2001), der in Zusammenarbeit zwischen der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) und der (PTB) am Elektronenspeicherring BESSY II in Berlin betrieben wird. Die komplizierte Bestrahlungstechnik sowie die notwendige Dosimetrie ist ausführlich in unserer Publikation von 2003 beschrieben (Schmid et al., 2003). Unmittelbar nach Bestrahlung wurden Zellkulturen angelegt, die Colcemid (0.03 $\mu\text{g/ml}$) während der gesamten Kulturzeit von 48 Stunden enthielten. Diese Kulturbedingungen machten es möglich, dass – auch ohne FPG-Färbung – die Chromosomenanalyse ausschließlich in Metaphasen der ersten Zellteilung *in vitro* erfolgen konnte (Kanda et al., 1994).

Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse für die beiden monochromatischen Photonenenergien sind in den Tabellen 17 und 18 angegeben. Für beide Energien wurde eine dosisabhängige Zunahme der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen beobachtet, mit erhöhten Raten für dizentrische Chromosomen, zentrischen Ringen und azentrischen Fragmenten. Dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente kamen gleich häufig vor, während die Rate der zentrischen Ringe etwa 8 % der Rate der dizentrischen Chromosomen betrug, unabhängig von der absorbierten Dosis in den Lymphozyten. Mit einer Ausnahme – 0,9 Gy der 17,4 keV Röntgenstrahlung – zeigte die interzelluläre Verteilung der dizentrischen Chromosomen keine Abweichung von einer Poisson-Verteilung.

Tab. 17: Häufigkeit der Chromosomenaberrationen und die interzelluläre Verteilung der dizentrischen Chromosomen in Lymphozyten nach Bestrahlung mit monochromatischen 17,4 keV Röntgenstrahlen.

Dosis (Gy)	Zellen	Ace / Zelle	R _c / Zelle	Dic / Zelle	Interzelluläre Verteilung der Dic				
					0	1	2	σ^2 / y	μ -Wert
0	9200	0.0025	0	0.003	9197	3	-	1.00	-0.02
0.23	2000	0.008	0	0.011	1978	22	-	0.99	-0.36
0.45	1500	0.028	0.002	0.026	1462	37	1	1.03	0.83
0.68	500	0.072	0.004	0.052	475	24	1	1.03	0.48
0.90	500	0.052	0.012	0.072	469	26	5	1.21	3.36
1.35	400	0.108	0.020	0.140	348	48	4	1.01	0.14
1.77	400	0.280	0.053	0.228	315	79	6	0.91	-1.28

Tab. 18: Häufigkeit der Chromosomenaberrationen und die interzelluläre Verteilung der dizentrischen Chromosomen in Lmphozyten nach Bestrahlung mit monochromatischen 40 keV Röntgenstrahlen

Dosis (Gy)	Zellen	Ace / Zelle	R _c / Zelle	Dic / Zelle	Interzelluläre Verteilung der Dic				
					0	1	2	σ^2 / y	u -Wert
0	9200	0.0025	0	0.0003	9197	3	-	1.00	-0.02
0.24	2000	0.008	0	0.008	1984	16	-	0.99	-0.26
0.47	1500	0.030	0.002	0.020	1471	28	1	1.05	1.39
0.70	500	0.048	0.008	0.044	479	20	1	1.05	0.81
0.91	400	0.073	0.013	0.065	374	26	-	0.94	-0.86
1.31	400	0.098	0.013	0.095	363	36	1	0.96	-0.57

Die Beschreibung der Ergebnisse für die dizentrischen Chromosomen mit dem linear-quadratischen Model ergab folgende Koeffizienten (\pm Standardfehler):

$\alpha = (3.44 \pm 0.87) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = (5.25 \pm 0.94) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-2}$ für monochromatische 17.4 keV Röntgenstrahlen sowie $\alpha = (2.37 \pm 0.93) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = (4.27 \pm 1.34) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-2}$ für monochromatische 40 keV Röntgenstrahlen. Dabei waren α und β bemerkenswert unabhängig von den entsprechenden Kontrollwerten. So zeigte sich z. B. für die 17,4 keV Röntgenstrahlung, dass der α -Koeffizient um 3,5 % erhöht und der β -Koeffizient um 1,9 % verringert wird, wenn die Kontrollwerte gleich Null gesetzt wurden.

4.3.2. Bestrahlung von Lymphozyten-Monolayer

Diese Befunde mit monochromatischer Synchrotron-Strahlung mit 17,4 und 40 keV Photonenenergien zeigen, dass ein großer Anteil der dizentrischen Chromosomen, die wir für das breite Spektrum der diagnostischen Mammographie-Röntgenstrahlung finden konnten (Schmid et al., 2002 a), vermutlich vorwiegend durch Photonen mit Energien <17,4 keV erzeugt wurde. Dies ergibt sich daraus, dass die α -Koeffizienten der linear-quadratischen Dosiswirkungskurven für 17,4 keV ($\alpha = 0.0344 \pm 0.0087$) sowie 40 keV ($\alpha = 0.0237 \pm 0.0093$) monochromatischen Röntgenstrahlen nur etwa 53 % der entsprechenden α -Werte betragen, die wir für die mittleren Energien von 17,4 keV ($\alpha = 0.0344 \pm 0.0087$) und 48 keV ($\alpha = 0.0440 \pm 0.0068$) des breiten LET-

Spektrum von 29 kV (Schmid et al., 2002 a) bzw. 60 kV Röntgenstrahlen (Regulla et al., 2001) erhalten hatten. Insgesamt sind aber alle diese Befunde mit den früheren Beobachtungen vereinbar, wonach die α -Werte mit abnehmender Photonenenergie zunehmen (Schmid und Bauchinger, 1998; Schmid et al., 2002 a). Die α -Werte werden benutzt, um die RBW_M für niederenergetische Röntgenstrahlen relativ zu Referenzstrahlungen, wie hochenergetische Röntgen- oder γ -Strahlung, zu bestimmen. Besonders für die gegenwärtige Debatte um die biologische Wirkung der Mammographie-Röntgenstrahlung, ist es wichtig, zusätzliche Informationen über die RBW_M -Werte für die Induktion der dizentrischen Chromosomen im peripheren Blut zu bekommen. Wir haben deshalb weitere Experimente mit monochromatischer Synchrotron-Strahlung mit noch niedrigeren Photonenenergien von 17,4 bis zu 1,83 keV durchgeführt.

Wegen der geringeren Reichweite dieser Photonenenergien mussten wir dazu unsere schon früher entwickelte Technik für die Bestrahlung von Monolayern von Lymphozyten verwenden (Schmid et al., 1996; Regulla et al., 2002). Die Variation der deponierten Dosis in der Blutprobe betrug nämlich schon bei der monoenergetischen 17,4 keV Röntgenstrahlung etwa 11 %. Bei noch geringerer Energie der Photonen würde die lokale Energiedeposition beim Durchgang durch die 2 mm dicke Blutprobe von 78 % bei 17,4 keV auf nur noch 0,004 % bei 4,8 keV abnehmen.

4.3.2.1. *Bestrahlungs- und Kulturmethode*

Da wir die Zellpräparation und Kulturtechnik früher ausführlich beschrieben haben (Schmid et al., 1996; Regulla et al., 2002), wird hier nur kurz darauf eingegangen. Lymphozyten einer frischen Blutprobe wurden mit dem Trennmedium Lymphoprep isoliert. In speziellen Bestrahlungskammern (PetriPerm 35, VIVASCIENCE), die auf der Bodenseite mit einer 25 μ m dicken Hostaphan-Folie bespannt waren, wurden Zellkulturen angelegt, die jeweils 0,5 ml Lymphozytensuspension zusammen mit 4,5 ml RPMI-1640 Medium plus 16 % fötales Kälberserum enthielten.

Während einer dreistündigen Inkubationsdauer in Gegenwart von 2,5 % Phytohaemagglutinin (PHA) heften sich die Lymphozyten auf der Hostaphanfolie bei 37°C im CO₂-Brutschrank an. Danach wurden die Zellen gewaschen, um die nicht angewachsenen Zellen zu entfernen. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde das restliche Medium von der Folie entfernt. Die Bestrahlung mit den monochromatischen

Photonen des Elektronenspeicherring Bessy II erfolgte direkt durch die Bodenfolie der Kammern. Da somit der Monolayer von Lymphozyten auf der Rückseite der Biofolie war, musste der Energieverlust durch die Folie für die niederenergetischen Photonen beachtet werden. So wurden z. B. Transmissionwerte von 73 % für 4,8 keV, 90 % für 6,9 keV, 97 % für 10 keV und fast 100 % für 17,4 keV monochromatische Photonen beobachtet. Die sehr aufwendige Berechnung der Dosis, die in den bestrahlten Lymphozyten tatsächlich deponiert wurde, ist in einer gemeinsamen Publikation der PTB und GSF ausführlich wiedergegeben (Krumrey et al., 2004). Bei allen Experimenten wurden Bestrahlungsdosen zwischen 0,25 und 2 Gy gewählt. Die Deposition dieser Dosen innerhalb der Bestrahlungskammern schwankte zwischen 30 und 600 Sekunden pro Gray. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit einem speziellen Zellschaber von der Folie abgetrennt und in normalen Kulturflaschen zusammen mit Medium plus PHA inkubiert. Die Chromosomenanalyse erfolgte wie bei allen anderen Experimenten der vorliegenden Studie ausschließlich in Metaphasen der ersten Zellteilung *in vitro*.

4.3.2.2. Ergebnisse

Die Häufigkeit der dizentrischen Chromosomen und deren interzelluläre Verteilung nach der Bestrahlung mit 6 Photonenenergien zwischen 17,4 und 1,83 keV ist in Tabelle 19 dargestellt, zusammen mit dem μ -Test für die Poisson-Verteilung der dizentrischen Chromosomen. Bei 32 der 36 analysierten Dosispunkte war keine Abweichung von einer Poisson-Verteilung zu erkennen. Nur bei den niedrigsten Photonenenergien, bei 0,488 und 1,39 Gy für 3,10 keV sowie bei 1,41 und 2,02 Gy für 1,83 keV, wurde eine Überdispersion der dizentrischen Chromosomen beobachtet.

Tab. 19: Interzelluläre Verteilung der dizentrischen Chromosomen (Dic) in Monolayers von menschlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit verschiedenen Energien von monochromatischen Röntgenstrahlen

Energie (keV)	Dosis (Gy)	Zahl der Zellen	Dic pro Zelle	Interzelluläre Verteilung der Dic							
				0	1	2	3	4	σ^2 / y	u -Wert	
-	0	10000	0.0003	9997	3					1.00	-0.02
17.4	0.25	2000	0.012	1977	23					0.99	-0.36
17.4	0.50	1500	0.026	1462	37	1				1.03	0.72
17.4	0.74	300	0.053	285	14	1				1.08	1.01
17.4	1.00	300	0.127	264	34	2				0.98	-0.25
17.4	1.97	200	0.195	163	35	2				0.91	-0.89
10.0	0.25	2000	0.021	857	42					0.98	-0.67
10.0	0.50	1000	0.046	416	44	1				1.00	-0.05
10.0	0.90	500	0.088	458	40	2				1.01	0.16
10.0	0.99	400	0.138	347	51	2				0.94	-0.88
10.0	1.49	300	0.210	242	54	3	1			0.98	-0.20
10.0	2.01	300	0.357	208	79	11	2			0.96	-0.45
6.9	0.24	2000	0.026	1949	50	1				1.01	0.42
6.9	0.46	1000	0.054	948	50	2				1.02	0.47
6.9	0.72	600	0.098	545	51	4				1.04	0.75
6.9	0.94	400	0.145	347	48	5				1.03	0.43
6.9	1.44	400	0.280	302	84	14				0.97	-0.40
6.9	1.84	400	0.435	262	108	25	4	1		1.06	0.88
4.8	0.29	1000	0.024	977	22	1				1.06	1.37
4.8	0.48	500	0.046	477	23					0.96	-0.65
4.8	0.59	500	0.064	468	32					0.94	-0.96
4.8	0.88	400	0.120	353	46	1				0.92	-1.14
4.8	1.25	400	0.243	317	69	14				1.05	0.71
3.1	0.249	2000	0.0085	1983	17					0.99	-0.33
3.1	0.488	1200	0.0150	1182	16	1				1.10	2.44
3.1	0.720	600	0.0283	584	15	1				1.09	1.61
3.1	0.945	500	0.0540	475	23	2				1.10	1.54
3.1	1.39	400	0.0775	372	26	1	1			1.18	2.58
3.1	1.82	400	0.145	350	42	8				1.13	1.90

Energie (keV)	Dosis (Gy)	Zahl der Zellen	Dic pro Zelle	Interzelluläre Verteilung der Dic						
				0	1	2	3	4	σ^2 / y	u -Wert
1.83	0.477	1500	0.0067	1490	10				0.99	-0.32
1.83	0.722	1200	0.0092	1189	11				0.99	-0.21
1.83	0.994	800	0.0136	789	11				0.98	-0.34
1.83	1.41	600	0.0317	583	15	2			1.18	4.53
1.83	1.88	300	0.0368	290	9	1			1.15	1.90
1.83	2.02	300	0.0433	289	9	2			1.27	3.44

Da wegen des Schwächungskoeffizienten der Photonen in biologischem Material innerhalb des Energiebereiches von 10,0 keV bis 1,83 keV die Lymphozyten als Monolayer bestrahlt werden mussten, wurde auch das schon beschriebene Bestrahlungsexperiment von Vollblut mit 17,4 keV Photonen wiederholt, um einen Vergleich der beiden Bestrahlungsmethoden zu bekommen. Dabei wurde für die Monolayer-Bestrahlung mit 17,4 keV Photonen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von $\alpha = (3,83 \pm 1,72) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = (4,05 \pm 2,04) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-2}$ ermittelt. Dieses Ergebnis unterscheidet sich nicht vom entsprechenden Befund für die Vollblutbestrahlung ($\alpha = (3,44 \pm 0,87) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = (5,25 \pm 0,94) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-2}$). In Tabelle 20 sind diese Koeffizienten der Dosis-Wirkungs-Beziehungen zusammen mit den entsprechenden Koeffizienten für die Bestrahlung mit 29 kV Mammographie-Röntgenstrahlung (mittlere Energie von 17,4 keV) (Schmid et al., 2002 a), ^{60}Co γ -Strahlung (Bauchinger et al., 1983), ^{137}Cs - γ -Strahlung (Schmid et al., 1995) sowie Cr-K Röntgenstrahlung (Roos und Schmid, 1997) angegeben.

Tab. 20: Übersicht über unsere Koeffizienten α und β der Dosis-Wirkungs-Kurven sowie die RBW_M für dizentrische Chromosomen in menschlichen Lymphozyten eines Blutspenders nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Photonenenergien.

*Bestrahlung der Lymphozyten im Vollblut (wb) oder als Monolayer (m). **>17.4<, mittlere Energie der 29 kV Röntgenstrahlung

		Energie (keV)	Linearer Koeffizient $\alpha \pm SE$ $\times 10^{-2} Gy^{-1}$	Quadratischer Koeffizient $\beta \pm SE$ $\times 10^{-2} Gy^{-2}$	$RBW_M \pm SE$ relativ zu $^{60}Co \gamma$ - Strahlen
Synchrotron Strahlung	wb	40,0	$2,37 \pm 0,93$	$4,27 \pm 1,34$	$2,21 \pm 1,21$
Synchrotron Strahlung	wb	25,0	$4,95 \pm 1,10$	$4,05 \pm 0,98$	$4,63 \pm 2,05$
Synchrotron Strahlung	wb	17,4	$3,44 \pm 0,87$	$5,25 \pm 0,94$	$3,21 \pm 1,48$
Synchrotron Strahlung	m	17,4	$3,83 \pm 1,72$	$4,05 \pm 2,04$	$3,58 \pm 2,11$
Synchrotron Strahlung	m	10,0	$6,65 \pm 0,92$	$5,36 \pm 0,85$	$6,21 \pm 2,53$
Synchrotron Strahlung	m	6,9	$8,24 \pm 0,41$	$8,04 \pm 0,40$	$7,70 \pm 2,98$
Synchrotron Strahlung	m	4,8	$6,15 \pm 1,06$	$9,48 \pm 1,57$	$5,75 \pm 2,41$
Synchrotron Strahlung	m	3,10	$2,12 \pm 0,49$	$2,99 \pm 0,51$	$1,98 \pm 0,89$
Synchrotron Strahlung	m	1,83	$1,26 \pm 0,28$	$0,40 \pm 0,25$	$1,18 \pm 0,52$
$^{60}Co \gamma$ -Strahlen	wb	1250	$1,07 \pm 0,41$	$5,50 \pm 0,26$	-
$^{137}Cs \gamma$ -Strahlen	wb	662	$1,50 \pm 0,50$	$4,70 \pm 0,30$	$1,40 \pm 0,71$
$^{137}Cs \gamma$ -Strahlen	m	662	$1,80 \pm 0,70$	$4,60 \pm 0,40$	$1,68 \pm 0,84$
29 kV Röntgenstrahlen	wb	>17,4< [*]	$6,55 \pm 0,97$	$3,51 \pm 0,82$	$6,12 \pm 2,51$
Cr-K Röntgenstrahlen	m	5,4	$7,70 \pm 1,20$	$13,0 \pm 1,50$	$7,20 \pm 2,98$

Wie in Tabelle 20 angegeben, ist tatsächlich der α -Wert für 17,4 keV niedriger als der entsprechende α -Wert für die 29 kV Mammographie-Röntgenstrahlung (mittlere Energie von 17,4 keV). Die entsprechenden Koeffizienten ($\pm SE$) für die Experimente mit den noch niedrigeren Photonenenergien sind $\alpha = (6,65 \pm 0,92) \times 10^{-2} Gy^{-1}$ und $\beta = (5,36 \pm 0,85) \times 10^{-2} Gy^{-2}$ für monochromatische 10 keV, $\alpha = (8,24 \pm 0,41) \times 10^{-2} Gy^{-1}$ und $\beta = (8,04 \pm 0,40) \times 10^{-2} Gy^{-2}$ für monochromatische 6,9 keV, $\alpha = (6,15 \pm 1,06) \times 10^{-2} Gy^{-1}$ und $\beta = (9,48 \pm 1,57) \times 10^{-2} Gy^{-2}$ für monochromatische 4,8 keV, $\alpha = (2,12 \pm$

$0,49) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = (2,99 \pm 0,51) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-2}$ für monochromatische 3,10 keV sowie $\alpha = (1,26 \pm 0,28) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = (0,40 \pm 0,25) \times 10^{-2} \text{ Gy}^{-2}$ für monochromatische 1,83 keV. In der Tabelle 20 sind auch die RBW_M -Werte für die Induktion der dizentrischen Chromosomen durch monochromatische Photonen mit unterschiedlichen Energien von 40 bis 1,83 keV relativ zu ^{60}Co γ -Strahlung angegeben. Mit abnehmender Photonenenergie steigen die Werte für die RBW_M von 17,4 keV bis zu einem Maximum bei 6,9 keV an, gefolgt von einer Abnahme bis zu 1,83 keV.

4.3.2.3. Diskussion

Für diese systematische Studie der biologischen Wirkung von monochromatischer Synchrotron-Strahlung mit Photonenenergien zwischen 17,4 und 1,83 keV wurden ebenfalls Lymphozyten des Blutspenders benutzt, mit dessen Vollblut bereits die Bestrahlungen mit den monochromatischen Photonenenergien 17,4 und 40 keV durchgeführt worden waren. In Tabelle 20 ist deutlich zu erkennen, dass sich trotz unterschiedlicher Bestrahlungsbedingungen die beobachtete Häufigkeit der dizentrischen Chromosomen zumindest für 17,4 keV Photonen nicht verändert hat. Damit bestätigte sich unser früherer Befund, wonach die Bestrahlung von Vollblut (Schmid et al., 1995) oder daraus isolierter Lymphozyten (Schmid et al., 1996) mit ^{137}Cs γ -Strahlung zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Es ist daher sicherlich gerechtfertigt anzunehmen, dass die Strahlenantwort nur durch die Photonenenergie innerhalb des analysierten Energiebereiches von 40 bis 1.83 keV bedingt wird.

Die Beziehung zwischen der Photonenenergie und der RBW_M für die Induktion von dizentrischen Chromosomen relativ zu ^{60}Co γ -Strahlung (Tabelle 20) zeigt deutlich, dass die höchste biologische Wirkung durch Photonenenergien zwischen 10 und 4,8 keV verursacht wird. Die offensichtlich wirksamste Energie, 6,9 keV, besitzt eine RBW_M von $7,70 \pm 2,98$. Dieser RBW -Wert unterscheidet sich aber nicht signifikant von denen für 4,8 und 10 keV Photonen mit Werten von $5,75 \pm 2,41$ bzw. $6,21 \pm 2,53$.

Mit gewissen Einschränkungen stimmen diese Befunde mit früheren Ergebnissen von Sasaki et al. (1989) und Sasaki (1991) überein, die sie für die Bestrahlung von Lymphozyten mit monochromatischen Röntgenstrahlen bei einer Quantenenergie von 14,6 bis 1,91 keV beobachtet hatten. Auch diese niederenergetischen Photonenenergien waren biologisch weniger wirksam als die Referenzstrahlung ^{60}Co

γ -Strahlung. Wie in Figur 12 dargestellt ist, steigen deren α -Werte mit abnehmender Energie an, erreichen ein Maximum bei 6,9 keV und vermindern sich dann mit weiter abnehmender Photonenenergie.

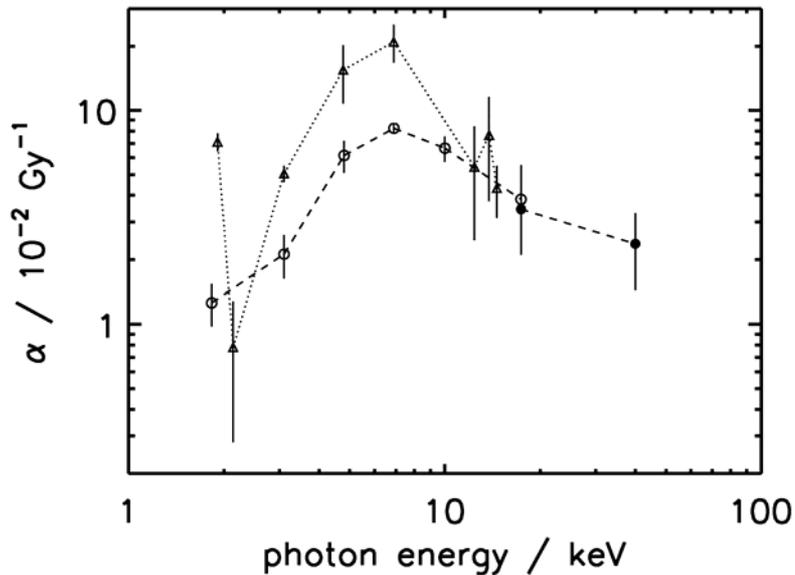


Fig. 12: Lineare α -Koeffizienten von monochromatischen Photonen für die Induktion von dizentrischen Chromosomen in menschlichen Lymphozyten. Die Ergebnisse unserer Monolayer-Bestrahlung (o) sowie Vollblutbestrahlung (•) sind gemeinsam mit den Befunden (Δ) von Sasaki et al. (1989) und Sasaki (1991) zusammengestellt.

Obwohl unsere Ergebnisse im Wesentlichen mit den Befunden von Sasaki (1991) und Sasaki et al. (1989) vergleichbar sind, sollten trotzdem die unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen der Lymphozyten beachtet werden. Um die komplexen Probleme im Zusammenhang mit den Schwächungskoeffizienten dieser niederen Photonenenergien zu berücksichtigen, wurden bei den früheren Experimenten sedimentierte Lymphozyten benutzt, die zwischen 5 μm dicken Polycarbonat-Folien oder 1.5 μm dicken Hostaphan-Folien als mehr oder weniger ‚Monolayer‘-Lymphozyten vorlagen (Sandwich-Methode). Diese unterschiedlichen Techniken könnten für die drastische Variation innerhalb eines sehr engen Energiebereiches verantwortlich gewesen sein (Sasaki, 1991). Wie Figur 12 erkennen lässt, induzierten

monochromatische 2,1 keV Röntgenstrahlen den niedrigsten α -Wert, während sich die α -Werte für 1,91 keV und 3,1 keV Röntgenstrahlen nicht unterscheiden. Zusätzlich wurde in diesem engen Energiebereich zwischen 3,1 und 1,91 keV ein sehr unterschiedliches Muster der interzellulären Verteilung der dizentrischen Chromosomen festgestellt. Da nur für 1,9 keV Röntgenstrahlen eine Überdispersion dizentrischer Chromosomen vorhanden war, nahm Sasaki (1991) an, dass dies die Konsequenz einer ungleichen Dosisverteilung innerhalb einzelner Zellen oder auch innerhalb von Zellpopulationen sein könnte. Unsere jetzigen Ergebnisse unterstützen diese Annahme (Tabelle 17), da die interzelluläre Verteilung der dizentrischen Chromosomen im Energiebereich von 4,8 bis 17,4 keV nicht von einer Poisson-Verteilung abweicht. Dagegen konnten wir aber auch für den Energiebereich von 3,1 bis 1,83 keV eine Überdispersion feststellen. In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, dass schon Virsik et al. (1980 b) mit der Sandwich-Methode von Lymphozyten eine Überdispersion bei fast allen analysierten Dosen der C_K -Strahlung (0,28 keV) beobachten konnten, mit Ausnahme der höchsten Dosen bei der Al_K -Strahlung (1,49 keV).

Die β -Koeffizienten der analysierten Dosiswirkungskurven für monochromatische Photonenenergien $> 6,9$ keV der Synchrotron-Strahlung (Tabelle 20) sind ziemlich ähnlich (Schwankungsbreite von $4,05 \pm 2,04$ bis $5,36 \pm 0,5$). Dasselbe gilt auch für die Befunde unserer früheren Bestrahlungsexperimente mit Cs γ -Strahlung (Schmid et al., 1995, 1996) und Co γ -Strahlung (Bauchinger et al., 1983). Dagegen scheint es eine systematische Änderung des β -Koeffizienten für Photonenenergien $\leq 6,9$ keV zu geben. Während die entsprechenden Werte für 6,9 keV ($\beta = 8,04 \pm 0,40$) und 4,8 keV ($\beta = 9,48 \pm 1,57$) relativ zu hoch sind, sind sie für 3,10 keV ($\beta = 2,99 \pm 0,51$) und für 1,83 keV ($\beta = 0,40 \pm 0,25$) relativ zu niedrig (Tabelle 18). In früheren Monolayer-Bestrahlungen von Lymphozyten konnten wir bereits einen höheren β -Wert für 5,4 keV quasi-monochromatische Cr_K -Strahlung ($\beta = 13,0 \pm 1,5$) beobachten (Roos und Schmid, 1997). Deshalb ergibt sich für die Photonenenergien 4,8 keV, 5,4 keV sowie 6,9 keV eine ziemlich konstante Erhöhung des β -Koeffizienten, und damit ein Unterschied zu den entsprechenden Werten für höhere Photonenenergien. Trotz deutlicher Unterschiede in der absoluten Höhe des β -Koeffizienten, zeigt sich ein ähnlicher Effekt bei den Ergebnissen von Sasaki (1991) und Sasaki et al. (1989) für den breiten Energiebereich von 1,91 bis 13,8 keV im Gegensatz zu deren

Ergebnissen bezüglich der Photonenenergien von 14,6 keV bis 1,25 MeV (^{60}Co γ -Strahlung). Die Gründe für die offensichtlichen Änderungen der β -Koeffizienten sind noch unklar. Die Folgen dieser Befunde können aber eine gewisse Bedeutung bekommen, im Hinblick darauf, dass Sasaki et al. (1998) in einer Publikation zur Gültigkeit des „biologischen Fingerprints F-Faktor“ (Quotient der Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringen) den β -Koeffizienten als konstanten Faktor für unterschiedliche Strahlenqualitäten benutzten. Für unsere Befunde mit ähnlichen Strahlenqualitäten (Photonen, Protonen, Neutronen, α -Teilchen) konnten wir dieses Konzept aber nicht bestätigen (Schmid et al., 1999).

4.4.: Bestrahlung von Lymphozyten mit 29 kV Photonen im Plexiglasphantom

Alle bisherigen Experimente für Chromosomenanalysen in Lymphozyten sind entsprechend den Vorgaben aus den Frankenberg'schen Versuchen mit Freiluft-Bestrahlung durchgeführt worden. Um aber möglichst realistische Aussagen über die biologische Wirkung der Mammographie-Röntgenstrahlung treffen zu können, wurde zusätzlich eine Bestrahlung im Phantom durchgeführt. Das verwendete Phantom entspricht dabei dem Standard Phantom, welches in dem "European Protocol on Dosimetry in Mammography" empfohlen wird.

4.4.1. Aufbau und Strahlenqualität

Den bei der Bestrahlung verwendeten Aufbau zeigt die Skizze in der Figur 13. Die Blutprobe wurde in 13,5 mm Tiefe eines Plexiglasphantoms (H x B x T: 150 mm x 150 mm x 48 mm) in 1 m Abstand vom Fokus bei der Strahlungsqualität MV 29 (Mo-Anode, 29 kV) und einem Strahldurchmesser von 15 cm in der Referenzebene bestrahlt.

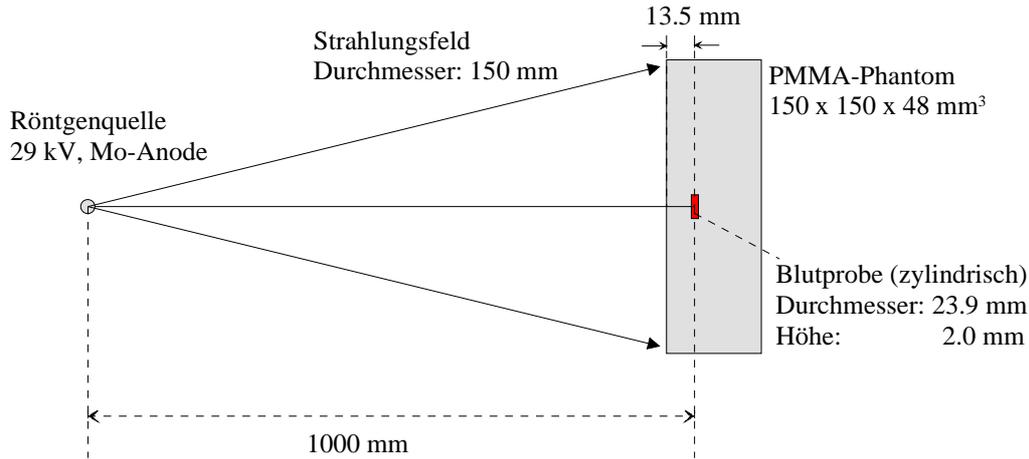


Fig. 13: Skizze des Aufbaus für Bestrahlung von Blutproben im Plexiglasphantom (Röntgenröhre: Philips PW 2185/00, Mo-Anode, Anodenwinkel 26°, Filterung 30 μm Mo)

Die spektrale Fluenz der Strahlungsqualität wurde mit Hilfe eines Reinstgermanium-Spektrometers gemessen. Das spektrale Fluenzspektrum in 12.5 mm Tiefe des Phantoms wurde mit der Version 3 des EGSnrc-Monte Carlo Programms FLURZnrc berechnet (Kawrakow und Rogers, 2000; Rogers et al, 2002). Die Fluenz-gewichtete mittlere Energie der Strahlungsqualität frei in Luft betrug 17.1 keV. In 12.5 mm Tiefe des Plexiglasphantoms härtete die Strahlung auf und die mittlere Energie betrug 18.6 keV. Die spektralen Fluenzen sind in der Figur 14 angegeben.

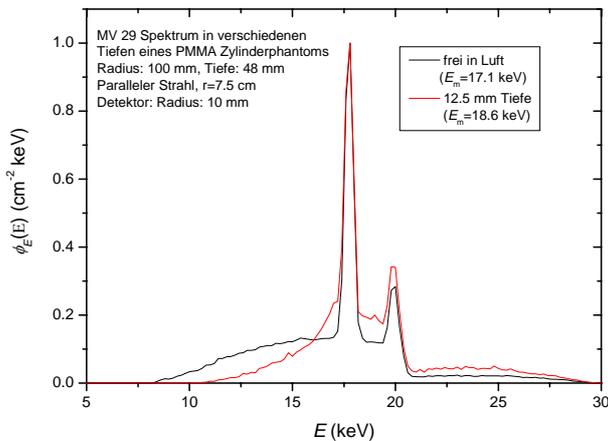


Fig. 14: Spektrale Fluenz der Strahlungsqualität MV 29 frei in Luft in 1 m Abstand vom Fokus (schwarze Kurve) und in 12.5 mm Tiefe eines Plexiglasphantoms. Die Kurven wurden auf den Kanalinhalt bei 17.4 keV normiert.

4.4.2. Bestimmung der Blutenergiedosis am Referenzpunkt in der Tiefe des Phantoms

Die Bestimmung der mittleren Blutenergiedosis der Blutprobe am Referenzpunkt der Blutprobe in 13.5 mm Tiefe des Phantoms wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde die Luftkermaleistung am Referenzpunkt in 1000 mm Abstand vom Fokus der Röhre frei in Luft mit Hilfe der Primärnormal-Freiluft-Ionisationskammer PK100 der PTB gemessen. Die gemessene Luftkermaleistung wurde dann mit Hilfe eines berechneten Konversionsfaktors in Blutenergiedosisleistung in 13.5 mm Tiefe des Phantoms umgerechnet. Der Konversionsfaktor wurde mit dem Anwendercode FLURZnrc der Version 3 des EGSnrc Monte Carlo Programm Paketes berechnet (Kawrakow und Rogers, 2000; Rogers et al, 2002). Dabei wurde das in der Abbildung 2 gezeigte Spektrum MV29 verwendet. Die relative erweiterte Messunsicherheit ($k=2$) der so bestimmten Blutenergiedosis beträgt 4.2 %. Die Daten für die einzelnen Bestrahlungen sind in der Tabelle 21 zusammengefasst.

Tab. 21: Ergebnisse der mittleren Blutenergiedosen in der Blutprobe in 13.5 mm Tiefe des Phantoms

Luftkermaleistung am Referenzpunkt (1000 mm vom Fokus):	8,158 Gy/h
Relative Standardmessunsicherheit (k=1):	0,005
Konversionsfaktor (Luftkerma in Blutenergiedosis am Ref-Pkt 0,330 im Phantom:	
Relative Standardmessunsicherheit (k=1):	0,015
Blutenergiedosisleistung am Referenzpunkt im Phantom:	2,6921 Gy/h
Relative Standardmessunsicherheit (k=1):	0,021

Die mittlere Blutenergiedosis, \bar{D}_{Blut} , in der Blutprobe in 13.5 mm Tiefe des Phantoms errechnet sich aus der Modellgleichung:

$$\bar{D}_{Blut} = K_a \cdot t \cdot h_{K_a}^{D_{Blut}}$$

Dabei ist

K_a die Luftkermaleistung am Referenzpunkt frei in Luft in Gy/s

t die Bestrahlungszeit in s

$h_{K_a}^{D_{Blut}}$ der Konversionsfaktor von Luftkerma frei in Luft zu mittlerer Blutenergiedosis in der Blutprobe in 13.5 mm Tiefe des Plexiglasphantoms.

Die relative Standardmessunsicherheit von K_a beträgt 0.5 %, von t 0.2 % und von $h_{K_a}^{D_{Blut}}$ 1.9 %. Quadratisch addiert ergibt das eine relative Standardmessunsicherheit für \bar{D}_{Blut} von 2.1 %. Daraus ergibt sich die relative erweiterte Messunsicherheit mit dem Erweiterungsfaktor $k=2$ zu 4.2 %.

Bei der Standardmessunsicherheit des Konversionsfaktors wurden folgende Komponenten berücksichtigt:

1. *Unsicherheit in der Tiefe des zylindrischen Blutprobenbehälters von 0,2 mm:* Berechnungen des Konversionsfaktors für unterschiedliche Tiefen zeigten eine Variation von 0.25 % pro 0.1 mm. Daraus wurde die Unsicherheit 0.5 % abgeschätzt.
2. *Unsicherheit des berechneten Konversionsfaktors aufgrund der Unsicherheit der verwendeten Wechselwirkungskoeffizienten:* 1 % (Literaturwert)
3. *Unsicherheit in der exakten Tiefe der Blutprobe im Phantom:* Rechnungen in unterschiedlichen Tiefen zeigten eine Variation des Konversionskoeffizienten von 7.7 % pro mm. Da eine Unsicherheit in der Tiefe von 0.2 mm angenommen wurde, ergab sich eine Unsicherheit auf den Konversionskoeffizienten von 1.5 %.

Die relative Standardmessunsicherheit des Konversionskoeffizienten ergibt sich durch quadratische Addition dieser Unsicherheitsbeiträge zu 1.87 %.

4.4.3. Chromosomenanalyse

Die Häufigkeit der dizentrischen Chromosomen und deren interzelluläre Verteilung nach Bestrahlung mit Mammographie-Röntgenstrahlung ist in Tabelle 22 angegeben.

Tab. 22: Interzelluläre Verteilung von dizentrischen Chromosomen (Dic) in Lymphozyten nach Bestrahlung mit 29 kV Röntgenstrahlen im Plexiglasphantom

Dosis [Gy]	Dic Zellzahl pro Zelle	Dic	Interzelluläre Verteilung von Dic				σ^2 / y	u-Wert
			0	1	2	3		
0	9200	0.00033	9197	3	-	-	1,00	-0,02
0,112	2000	0.0065	1987	13		-	0,99	-0,32
0,277	1200	0.0192	1178	21	1	-	1,07	1,75
0,542	700	0.047	669	29	2	-	1,08	1,52
0,823	600	0.083	553	44	3	-	1,04	0,70
1,084	500	0.096	455	42	3	-	1,03	0,48
1,627	500	0.182	414	82	3	1	0,95	-0,79
2,169	400	0.310	293	93	11	3	1,02	4,02

Die linear-quadratische Dosiswirkungsbeziehung lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$y = (0.0588 \pm 0.0066) \text{ Gy}^{-1} + (0.0364 \pm 0.0051) \text{ Gy}^{-2} \quad (16)$$

Die entsprechende Dosiswirkungsbeziehung der dizentrischen Chromosomen nach Bestrahlung frei in Luft mit Mammographie-Röntgenstrahlung war:

$$y = (0.0655 \pm 0.0097) \text{ Gy}^{-1} + (0.0351 \pm 0.0082) \text{ Gy}^{-2} \quad (12)$$

Ein Vergleich der beiden Dosiswirkungskurven zeigt, dass trotz der verschiedenen Bestrahlungsmethoden sich keine unterschiedlichen biologischen Wirkungen ergeben haben. Das kann nur bedeuten, dass die etwas geringeren Anteile am Photonenspektrum <17,4 (Figur 14) durch die Streustrahlung im Phantom wieder kompensiert worden sind.

Schlussfolgerung

Die für den Strahlenschutz maßgebliche biologische Wirkung ist die Entstehung von Krebs beim Menschen. Ein gutes Merkmal für durch ionisierende Strahlung verursachte Zellschäden, die im späteren Verlauf zu der Bildung eines malignen Tumors führen können, sind dizentrische Chromosomen in peripheren Lymphozyten. Sie eignen sich daher als Indikator für die RBW verschiedener Strahlenarten. Daher wurde vom Institut für Strahlenbiologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit die RBW von Röntgenstrahlen über deren Wirkung auf menschliche Lymphozyten überprüft. Danach besitzt die weiche Strahlung (29 kV) eine gegenüber konventioneller Strahlung (220 kV) um den Faktor 1,2 bis 1,6 erhöhte RBW. Dieser Wert liegt deutlich unterhalb des Faktors 4, der aufgrund experimenteller Befunde für die neoplastische Transformation in die Diskussion gebrachte wurde. Auch unsere Wiederholung der Experimente zur neoplastischen Transformation bestätigen dies.

Um zu überprüfen, welche Anteile des Spektrums der weichen Röntgenstrahlung die Hauptverantwortung für die zellulären Strahlenschäden tragen, wiederholten wir das Experiment mit monochromatischer Strahlung des Berliner Speicherrings BESSY II bei Photonenenergien von 1,83 keV bis 40 keV. Auch hier hat sich gezeigt, dass mit abnehmender Energie der Photonen die Zellschäden zunahm – mit einer sehr hohen RBW der 6,9 keV Photonen im Vergleich zur konventionellen Röntgenstrahlung. In der Praxis stellen diese Photonen jedoch kaum ein Risiko dar, da sie wegen ihrer geringen Reichweite im Fettgewebe der Brust das strahlenempfindliche Parenchymgewebe nur mit deutlich geschwächter Intensität erreichen.

Literatur

Bartels, E. R., Harder, D., The microdosimetric regularities of nanometre regions.
Radiat. Protect. Dosim. **31**, 211-215 (1990)

Bauchinger, M., Schmid, E., Streng, S., Dresch, J.: Quantitative analysis of the chromosome damage at first division of human lymphocytes after ^{60}Co γ -irradiation. Radiat. Environ. Biophys. **22** (1983) 225-229

Bauchinger, M., Schmid, E.: LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. Int. J. Radiat.

- Biol. 74 (1998) 17-25
- Bettega, D., Calzolari, P., Piazzolla, A., Tallone, L., Redpath, J. L.: Alpha-particle-induced neoplastic transformation in synchronized hybrid cells of HeLa and human skin fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 72 (1997) 523-529
- Blohm, R., The passage of electrons through sensitive regions of the cell nucleus. PhD thesis, University of Göttingen, Germany (1983)
- Boice, J.D., Rosenstein, M., Trout, E.D.: Estimation of breast doses and breast cancer risk associated with repeated fluoroscopic chest examinations of women with tuberculosis. *Radiat. Res.* 73 (1978) 373-390
- Borek, C., Hall, E.J., Zaider, M.: X rays may be twice as potent as γ rays for malignant transformation at low doses. *Nature* 301 (1983) 156-158
- Brenner, D. J., Amols, H. I. Enhanced risk from low-energy screen-film mammography X rays. *Brit. J. Radiol.* 62 (1989) 910-914
- Brenner, D. J., Sawant, S. G., Hande, M.P., Miller, R.C., Elliston, C. D., Fu, Z., Randers-Pehrson, G., Marino, S. A. Routine screening mammography: how important is the radiation-risk side of the benefit-risk equation? *Int. J. Radiat. Biol.* 78 (2002) 1065-1067
- Der, C. J., Stanbridge, E. J.: A tumor-specific membrane phosphoprotein marker in human cell hybrids. *Cell* 26 (1981) 429-438
- EUR 16263: European protocol on dosimetry in mammography, European Commission, Brussels (1996)
- Frankenberg, D., Kelnhöfer, K., Bär, K., Frankenberg-Schwager, M.: Mammographie-Röntgenstrahlen sind für die neoplastische Transformation einer menschlichen Hybridzelllinie um den Faktor 3,4 effektiver als 200 kVp Röntgenstrahlen. In: *Strahlenbiologie und Strahlenschutz. Individuelle Strahlenempfindlichkeit und ihre Bedeutung für den Strahlenschutz. 32. Jahrestagung des Fachverbandes für Strahlenschutz. Band 1* (Hrsg. G. Heinemann, W.-U. Müller). TÜV-Verlag, Köln (2000)
- Frankenberg, D., Kelnhöfer, K., Bär, K., Frankenberg-Schwager, M.: Enhanced neoplastic transformation by mammography X rays relative to 200 kVp of the RBE_M for various end points. *Radiat. Res.* 137 (2002a) 99-105
- Frankenberg, D., Kelnhöfer, K., Bär, K., Frankenberg-Schwager, M.: ERRATUM. *Radiat. Res.* 138 (2002b) 126
- Göggelmann, W., Jacobsen, C., Panzer, W., Walsh, L., Roos, H., Schmid, E.: Re-

- evaluation of the RBE of 29 kV x-rays (mammography x-rays) relative to 220 kV x-rays using neoplastic transformation of human CGL1-hybrid cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 42 (2003) 175-182
- Görner, W., Hentschel, M. P., Müller, B. R., Riesemeier, H., Krumrey, M., Ulm, G., Dietsch, W., Klein, U., Frahm, R.: BAMline: the first hard X ray beamline at Bessy II. *Nucl. Instr. Meth. A* 467-468 (2001) 703-706
- Gumrich, K., Virsik-Peuckert, R. P., Harder, D.: Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. I. The effect of irradiation temperature. *Intern. J. Radiat. Res.* 49 (1986) 665-672
- Han, A., Elkind, M. M.: Transformation of mouse C3H 10 T1/2 cells by single and fractionated doses of X-rays and fission-spectrum neutrons. *Cancer Res.* 39 (1979) 123-130
- Harder, D.: Microdosimetric and radiobiological data of electron radiations, In: *Proceedings of the 11th Int. Congress on Radiat. Res.*, Dublin (1999), pp. 18-23.
- Harder, D., Regulla, D., Schmid, E., Frankenberg, D.: Hat die LET-Abhängigkeit der RBW locker ionisierender Strahlungen Bedeutung für den Strahlenschutz? *Strahlenschutzpraxis* 7 (2001) 23-31
- Harder, D., Regulla, D., Schmid, E., Frankenberg, D., Dietze, G.: Bedeutung der "Relativen Biologischen Wirksamkeit" für den Strahlenschutz. *Strahlenschutz in Forschung und Praxis* 44 (2002) 123-139
- ICRP 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Publication 60, *Annals of the ICRP*, Vol. 21, Pergamon Press, Oxford (1991)
- ICRP Publication 92, Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor (w_R). Pergamon Press, 2003
- Kanda, R., Jiang, T., Hayata, I., Kobayashi, S.: Effects of colcemid concentration on chromosome aberration analysis in human lymphocytes. *J. Radiat. Res.* 35 (1994) 41-47
- Kawrakow, I., Rogers, D. W. O.: The EGSnrc Code System: Monte Carlo simulation of electron and photon transport. Technical Report PIRS-701, National Research Council of Canada, Ottawa, Canada (2000)
- Kellerer, A. M. Electron spectra and the RBE of X rays. *Radiat. Res.* 158 (2002) 13-

- Kellerer, A. M.: Error bands for the linear-quadratic dose-effect relation.
Radiat. Environ. Biophys. 42 (2003 a) 77-85
- Kellerer, A. M.: Error bands for the linear-quadratic dose-effect relation – A simplified use of orthogonal polynomials. Technical Report, University of Munich, SBI 222 (2003 b)
- Kellerer, A. M., Chen, J. Comparative microdosimetry of photoelectrons and Compton electrons: An analysis in terms of generalized proximity functions.
Radiat. Res. 160 (2003) 324-333
- Krumrey, M., Ulm, G., Schmid, E.: Dicentric chromosomes in monolayers of human lymphocytes produced by monochromatized synchrtron radiation with photon energies from 1.83 keV to 17.4 keV. Radiat. Environ. Biophys. 43 (2004) 1-6
- Lloyd, D. C., Edwards, A. A.: Chromosome aberrations in human lymphocytes: Effect of radiation quality, dose, and dose rate. In: Radiation-induced Chromosome Damage in Man (T. Ishihara and M. S. Sasaki, Eds.). pp. 23-49. Alan R. Liss, New York (1983).
- Mendonca, M. S., Antoniono, R. J., Latham, K. M., Stanbridge, E. J., Redpath, J. L.: Characterization of intestinal alkaline phosphatase expression and the tumorigenic potential of gamma-irradiated HeLa x fibroblast cell hybrids.
Cancer Res. 51 (1991) 4455-4462
- Mendonca, M. S., Antoniono, J.R., Sun, C., Redpath, J. L.: A simplified and rapid staining method for the HeLa x skin fibroblast human hybrid cell neoplastic transformation assays. Radiat. Res. 131 (1992) 345-350
- Mendonca, M. S., Howard, K., Fasching, C. L., Farington, D.L., Desmond, L.A., Stanbridge, E. J., Redpath, J. L.: Loss of suppressor loci on chromosomes 11 and 14 may be required for radiation-induced neoplastic transformation of HeLa x skin fibroblasts human cell hybrids. Radiat. Res. 149 (1998) 246-255
- Mendonca, M. S., Fasching, C.L., Srivatsan, E. S., Stanbridge, E. J., Redpath, J.L.: Loss of aputative tumor suppressor locus after gamma-ray-induced neoplastic transformation of HeLa x skin fibroblast human cell hybrids. Radiat. Res. 143 (1995) 34-44
- Miller, R. C., Geard, C. R., Brenner, D. J., Komatsu, K., Marino, S. A., Hall, E. J.: Neutron-energy-dependent oncogenic transformation of C3H 10T1/2 mouse cells. Radiat. Res. 117 (1989) 114-127
- Rao, C. R., Chakravarti, I. M.: Some small sample test of significance for a Poisson distribution. Biometrics 12 (1956) 264-282

- Redpath, J. L., Liang, D., Taylor, T.H., Christie, C., Elmore, E.: The shape of the dose-response curve for radiation-induced neoplastic transformation in vitro: Evidence for an adaptive response against neoplastic transformation at low doses of low-LET radiation. *Radiat. Res.* 156 (2001) 700-707
- Redpath, J. L., Lu, Q., Molloy, S., Elmore, E.: Low doses of diagnostic energy X-rays protect against neoplastic transformation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 79 (2003) 235-240
- Redpath, J. L., Sun, C., Colman, M., Stanbridge, E. J. Neoplastic transformation of human hybrid cells by γ radiation: a quantitative assay. *Radiat. Res.* 110 (1987) 468-472
- Regulla, D., Panzer, W., Schmid, E., Stephan, G., Harder, D.: Detection of elevated RBE in human lymphocytes exposed to secondary electrons released from X-irradiated metal surfaces. *Radiat. Res.* 155 (2001) 744-747
- Regulla, D., Schmid, E., Friedland, W., Panzer, W., Heinzmann U., Harder, D.: Enhanced values of the RBE and H ratio for cytogenetic effects induced by secondary electrons from an X-irradiated gold surface. *Radiat Res* 158 (2002) 505-515
- Reznikoff, C. A., Bronkow, D.W., Heidelberger, C.: Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.* 33 (1973) 3231-3238
- Rogers, D. W. O., Kawrakow, I., Seuntjens, J. P., Walters, B. R. B.: NRC User Codes for EGSnrc. Technical Report PIRS-702 (rev A), National Research Council of Canada, Ottawa, Canada (2002)
- Roos, H., Schmid, E.: Analysis of chromosome aberrations in human lymphocytes induced by 5.4 keV X-rays. *Radiat. Environ. Biophys.* 36 (1997) 251-254
- Sasaki, M. S.: Primary damage and fixation of chromosomal DNA as probed by monochromatic soft X-rays and low-energy neutrons. In: *The early effects of radiation on DNA* (Eds.: E. M. Fielden; P. O'Neill), NATO ASI Series (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg) Vol 54 (1991) pp. 369-384
- Sasaki, M. S., Kobayashi, K., Hieda, K., Yamada, T., Ejima, Y., Maezawa, H., Furusawa, Y., Ito, T., Okada, S.: Induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by monochromatic X-rays of quantum energy between 4.8 and 14.6 keV. *Intern. J. Radiat. Res.* 56 (1989) 975-988
- Sasaki, M. S., Takatsuji, T., Ejima, Y.: Commentary: The F value cannot be

- ruled out as a chromosomal fingerprint of radiation quality. *Radiat. Res.* 150 (1998) 253-258
- Schmid, E., Bauchinger, M.: LET dependence of dicentric yields in human lymphocytes induced by low doses of sparsely ionizing radiations and its implication for risk assessments. *Health Physics* 74 (1998) 719-721
- Schmid, E., Bauchinger, M., Streng, S., Nahrstedt, U.: The effect of 220 kV X-rays with different spectra on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 23 (1984) 305-309
- Schmid, E., Braselmann, H., Bauchinger, M.: Does the limiting F value at very low doses depend systematically on linear energy transfer? *Radiat. Res.* 152 (1999) 563-566
- Schmid, E., Braselmann, H., Nahrstedt, U.: Comparison of γ -ray induced dicentric yields in human lymphocytes measured by conventional analysis and FISH. *Mutat. Res.* 348 (1995) 125-130
- Schmid, E., Hieber, L., Heinzmann, U., Roos, H., Kellerer, A. M.: Analysis of chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes induced by in vitro α -particle irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.* 35 (1996) 179-184
- Schmid, E., Krumrey, M., Ulm, G., Roos, H., Regulla, D.: The maximum low-dose RBE of 17.4 and 40 keV monochromatic X-rays for the induction of dicentric chromosomes in human lymphocytes. *Radiat. Res.* 160 (2003) 499-504
- Schmid, E., Regulla, D., Guldbakke, S., Schlegel, D., Roos, M.: Relative biological effectiveness of 144 keV neutrons in producing dicentric chromosomes in human lymphocytes compared with ^{60}Co gamma rays under head-to-head conditions. *Radiat. Res.* 157 (2002b) 453-460
- Schmid, E., Regulla, D., Kramer, H.-M., Harder, D.: The effect of 29 kV X-rays on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiat. Res.* 158 (2002a) 771-777
- Schmid, E., Zitzelsberger, H., Braselmann, H., Gray, J. W., Bauchinger, M.: Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes. *Int. J. Radiat. Biol.* 62 (1992) 673-678
- Sherman, G. J., Howe, G. R., Miller, A. B.: Organ dose per unit exposure resulting from fluoroscopy for artificial pneumothorax. *Health Phys.* 35 (1978) 259-269
- Stanbridge, E. J., Flandermeyer, R. R., Daniels, D. W., Nelson-Rees, W. A.: Specific

- chromosome loss associated with expression of tumorigenicity in human cell hybrids. *Somat Cell Genet* 7 (1981) 699-712
- Stanbridge, E. J., Der, C. J., Doersen, C. J., Nishime, R. Y., Peehl, D. M., Weissman, B. E., Wilkinson, J. E.: Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 215 (1982) 242-259
- Straume, T.: High-energy gamma rays in Hiroshima and Nagasaki: Implications for risk and w_R . *Health Physics* 69 (1995) 954-956
- Sun, C., Redpath, J. L., Colman, M., Stanbridge, E. J.: Further studies on the radiation-induced expression of a tumorspecific antigen in human cell hybrids. *Radiat. Res.* 114 (1988) 84-93
- Verhaegen, F., Vral, A., Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET. *Radiat. Res.* 139 (1994) 208-213
- Virsik, R. P., Blohm, R., Hermann, K.-P., Harder, D.: Fast, short-ranged and slow, distant-ranged interaction processes involved in chromosome aberration formation. *Proc. 7th Symposium on Microdosimetry* (Eds.: J. Booz, H.G. Ebert, H.D. Hartfiel), EUR 7147, pp. 943-955 (1980 a).
- Virsik, R. P., Harder, D.: Chromosome aberrations in human lymphocytes induced by photon and electron radiations, and the sublesion interaction model. In: *6th Symposium on Microdosimetry* (J. Booz and H. G. Ebert, Eds.) pp. 869-881. Harwood Academic Publishers, London (1978).
- Virsik, R. P., Harder, D.: Recovery kinetics of radiation-induced chromosome aberrations in human G_0 lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 18 (1980) 221-238
- Virsik, R. P., Harder, D.: Statistical interpretation of the overdispersed distribution of radiation-induced dicentric chromosome aberrations at high LET. *Radiat. Res.* 85 (1981) 13-23
- Virsik, R. P., Harder, D., Hansmann, I.: The RBE of 30 kV X-rays for the induction of dicentric chromosomes in human lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 14 (1977) 109-121
- Virsik, R. P., Schäfer, C. H., Harder, D., Goodhead, D. T., Cox, R., Thacker, J.: Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ultrasoft Al_K and C_K X-rays. *Int J Radiat Biol* 38 (1980 b) 545-557
- Wagner, R., Schmid, E., Bauchinger, M.: Application of conventional and FPG-staining for the analysis of chromosome aberrations induced by low levels of

- dose in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 109 (1983) 65-71
- Wolf, C., Lafuma, J., Masse, R., Morin, M., Kellerer, A.M.: Neutron RBE for induction of tumors with high lethality in Sprague-Dawley rats. *Radiat. Res.* 154 (2000) 412-420
- Zhou, H., Suzuki, M., Randers-Pehrson, G., Vannais, D., Chen, G., Trosko, J. E., Waldren, C. A., Hei, T. K.: Radiation risk to low fluences of alpha-particles may be greater than we thought. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001)14410-14415