

Strukturelle Chromosomenaberrationen in den Lymphozyten gesunder Probanden unter dem Einfluss verschiedener Kulturbedingungen

Hannes Meist

SUMMARY

The frequency of structural chromosomal aberrations has been examined in peripheral blood lymphocyte cultures from 18 normal individuals. A mean rate of aberrations was observed of 7.38%, and a mean breakage/metaphase index of 0.036. Individual values ranged, for the aberration index, from 4% to 15%; and, for the breakage/metaphase index, from 0.00 to 0.08. Only gaps and breakage were observed. The translocation cross and chromatid-ring observed derive from a series of experiments on homologous plasma cultures. As for the influence of different cultural environments, it has been observed that the rate of spontaneous aberrations behaved independently from the age of the blood sample, from the addition of penicillin in the culture, and from the concentration of phytohemagglutinin. Using veal's fetal serum, the rate of aberrations failed to show any variation, even with a time of culture prolonged up to 96 hours; while, using homologous plasma, the time of culture having been prolonged, structural aberrations have shown a considerable increase. The study of the mitotic index in the different cultural conditions has indicated the possibility of favoring the growth of leucocyte cultures.

Die ständig zunehmende Entwicklung neuer Pharmaka macht es notwendig, in gleicher Weise neue umfassende und verlässliche Testsysteme zu entwickeln, um eine mögliche toxische, teratogene, cancerogene und mutagene Nebenwirkung zu erkennen.

Zur Untersuchung mutagener Wirkung von Pharmaka wurden von Barthelmeß (1963) und von Vogel et al (1967) verschiedene Testsysteme vorgeschlagen.

Im Bereich der experimentellen Cytogenetik ist die Leukozytenkultur aus dem peripheren Blut nach Moorhead et al (1960) zum gebräuchlichsten Testsystem geworden. Diese Methode erlaubt gute qualitative und quantitative Aussagen über die chromosomenschädigende (und damit erbgutschädigende) Wirkung von bestimmten Chemikalien, verschiedenen Arten von Strahlung, sowie von bestimmten Virusformen an menschlichem Zellmaterial. Aber gerade die Wirkung auf menschliche Zellen und menschliches Erbgut, bzw. Chromosomen interessieren ja bei einer Prüfung auf mutagene Wirkungen vorrangig. Für alle Aussagen über mutagene Nebenwirkungen, die durch in-vitro-Untersuchungen an Leukozytenkulturen gewonnen werden, sind aber gut fundierte Kontrollwerte als Ausgangsbasis für einen Vergleich unerlässlich. Erst an Hand dieser Kontrollwerte ist nämlich wirklich zu beurteilen,

welche Aberrationsraten von vornherein in den Kulturen auftreten, d.h. als normal zu betrachten, welche Raten noch tolerierbar und welche als pathologisch anzusehen sind.

Verschiedene Autoren (Court Brown et al, 1966; Lubs und Samuelson, 1967; Bochkov et al, 1968; Makino et al, 1968) haben bereits Untersuchungen über Chromosomenanomalien bei gesunden Probanden durchgeführt. Probandenauswahl und Fragestellungen dieser Arbeiten stehen jedoch nicht in direkter Beziehung zu den Fragen der chemischen Mutagenese, für die ja besonders die Häufigkeit spontaner struktureller Chromosomenaberrationen als Vergleichsbasis von besonderer Bedeutung wäre. Aus diesem Grunde wurde mit der vorliegenden Arbeit versucht, durch die ausschließliche Erfassung gerade dieses Aberrationstyps, diese Lücke zu schließen.

Die vorliegenden Tests zeigten, daß verschiedene Ergebnisse Abweichungen vom Mittelwert aufweisen, die kulturbedingt sein konnten. Aus diesem Grunde wurde eine Untersuchung angeschlossen, die Auskunft geben sollte, inwieweit verschiedene Kulturbedingungen die spontane Aberrationsrate beeinflussen. Die von uns benutzte Modifikation der Lymphozytenkultur ließ folgende Möglichkeiten in Betracht kommen.

Die Unterschiede waren verursacht durch:

- 1) verschiedenes Serum, bzw. Plasma;
- 2) verschiedene Kulturzeiten;
- 3) unterschiedliche Zeiträume zwischen Blutentnahme und Ansetzen der Kulturen.

Die Mengen an Phytohämagglutinin (PHA) sowie an Penicillin G, die den Kulturen zugesetzt waren, waren bei der Untersuchung der strukturellen Spontanaberrationsraten bei gesunden Personen der Durchschnittsbevölkerung konstant.

Um aber eine eventuelle Erhöhung der Aberrationsraten durch diese Kulturbestandteile sicher auszuschließen, wurde auch die Möglichkeit der Beeinflussung durch wechselnde Penicillin- und PHA-Mengen überprüft.

Probandenauswahl und Methodik

PROBANDEN

Bei den untersuchten Probanden handelt es sich um Blutspender, Institutsangehörige und um gesunde Personen der Durchschnittsbevölkerung, die im Institut für Humangenetik und Anthropologie in Erlangen untersucht wurden. Das Alter lag zwischen 1 und 65 Lebensjahren. Insgesamt erstreckte sich die Untersuchung auf 6 weibliche und 15 männliche Personen.

Drei Probanden wurden aus der Wertung eliminiert, da der begründete Verdacht auf erhebliche Strahlenbelastung bestand. Da Klinikpersonal in höherem Maße mutagenen Einflüssen ausgesetzt sein dürfte, als Personen der Durchschnittsbevölkerung, wurde auf eine Einbeziehung dieses Personenkreises verzichtet.

ANSATZ UND AUFBEREITUNG DER KULTUREN

Bei der Untersuchung wurde mit einer Modifikation der von Moorhead et al (1960) angegebenen Methode der Lymphozytenkultur aus dem peripheren menschlichen Blut gearbeitet. Eine Kultur bestand aus 2 ml foetalem Kälberserum, bzw. aus 2 ml Eigenplasma des Probanden, 6 ml Medium (Difco TC 199), und 0.2 ml einer definierten PHA-Lösung (Wellcome). Bei einigen 48-Stunden-Kulturen wurden auch 0.4 ml PHA-Lösung zugegeben.

Die Kulturdauer betrug zwischen 48 und 96 Stunden. Zwei Stunden vor dem Aufbereiten der Kulturen wurde als Mitoseblocker Colcemid zugesetzt. Gefärbt wurde mit Orcein-Eisessig.

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Kulturbedingungen erstreckte sich auf Kulturzeit, Plasma bzw. Serum, variierende Zeiträume zwischen Blutentnahme und Ansetzen der Kulturen, sowie verschiedene Konzentrationen von Penicillin G und PHA.

AUSWERTUNG

Pro Kultur wurden grundsätzlich jeweils 100 Metaphasen bei 1250-facher Vergrößerung ausgewertet. Metaphasen mit Aberrationen wurden zur weiteren Beurteilung fotografiert.

Bei der Auswertung wurden folgende Aberrationstypen unterschieden (Rieger und Michaelis, 1967):

1) Lokale Achromasien [achromatische Läsionen (Gaps)] auf chromatidaler (G') und isochromatidaler (G'') Basis;

2) Fragmentationen: Chromatid- (B') und Isochromatidbrüche (B''), sowie azentrische Fragmente, dazu noch *minutes* und *double minutes* — sehr kleine Bruchstücke, deren Durchmesser geringer als der einer Chromatide ist;

3) Austauschfolgen auf chromatidaler (Translokationsfiguren) und chromosomaler Basis (atypische und dizentrische Chromosomen).

Abb. 1 gibt einen Überblick über die tatsächlich beobachteten Aberrationstypen.

Ergebnisse

A. CHROMOSOMENUNTERSUCHUNGEN BEI GESUNDEN PERSONEN DER DURCHSCHNITTSBEVÖLKERUNG

Einen Überblick über alle Befunde, die aus Lymphozytenkulturen der zur Verfügung stehenden Probanden erhoben wurden, gibt Tab. I.

Der durchschnittliche Anteil von Metaphasen mit strukturellen Chromosomenaberrationen lag bei 7.38%, bei einer mittleren Abweichung von 2.62%. Eine genauere Analyse der in Tab. I zusammengestellten Werte zeigt jedoch, daß in allen Kulturen, die in Eigenplasma des betreffenden Probanden angesetzt wurden, eine deutliche Erhöhung der Aberrationsraten gegenüber den in foetalem Kälberserum angesetzten Kulturen zu beobachten ist (Eigenplasma: 12.25%; Kälberserum: 6.0%).

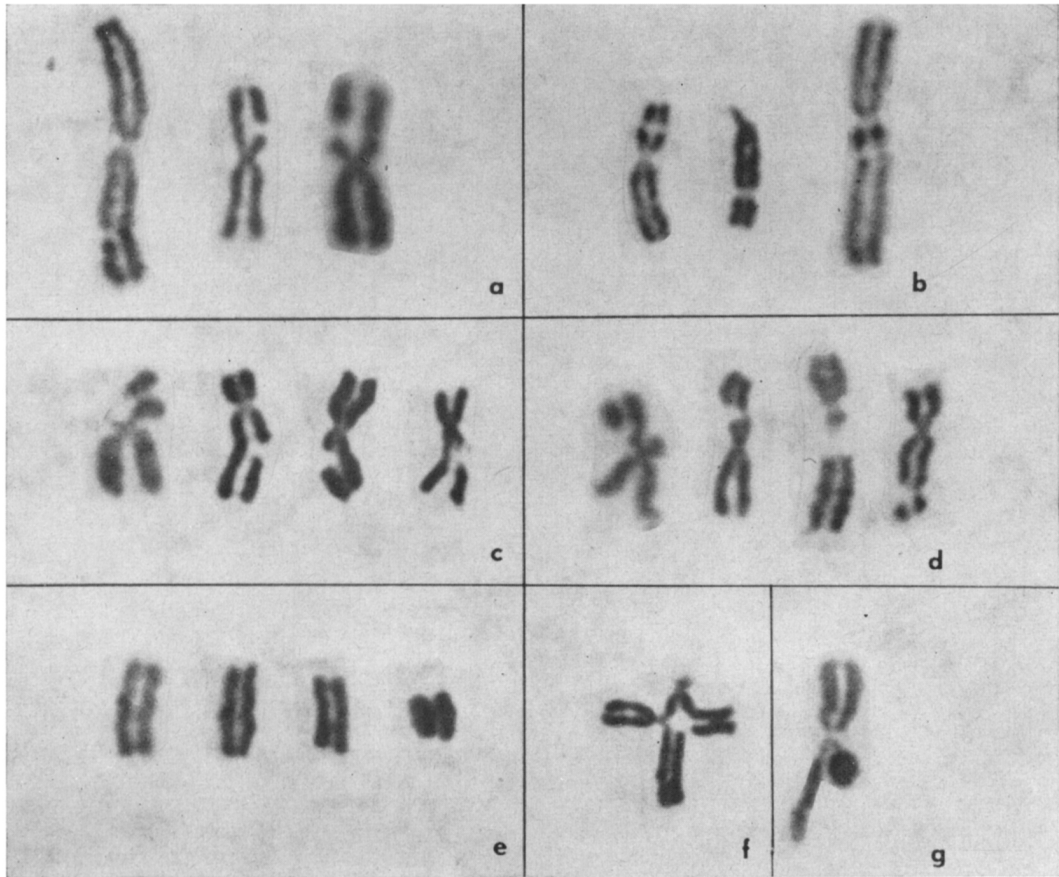


Abb. 1. Strukturelle Chromosomenaberrationen, wie sie im Verlauf der Untersuchungen auftraten: a) Chromatidgaps; b) Isochromatidgaps; c) Chromatidbrüche; d) Isochromatidbrüche; e) azentrische Fragmente; f) Translokationskreuz; g) Chromatidring.

Da ein Kulturansatz im Eigenplasma nur bei 4 Probanden vorlag, wird das Gesamtergebnis dadurch nicht wesentlich beeinflusst. Zieht man die Zahl der Gaps/Metaphase und der Brüche/Metaphase als Vergleichspunkte mit heran, so ergibt sich in etwa das gleiche Bild.

Eigenplasma: Gaps/Metaphase = 0.06; Brüche/Metaphase = 0.065

Kälberserum: Gaps/Metaphase = 0.035; Brüche/Metaphase = 0.028

Tab. I zeigt, daß es sich bei den Chromosomenaberrationen, die in den Lymphozytenkulturen von gesunden Personen der Durchschnittsbevölkerung gefunden

Tab. I. Strukturelle Chromosomenaberrationen bei gesunden Personen der Durchschnittsbevölkerung

| Nr. | Proband | | Metaph. m. Aberrationen | | Anzahl d. beob. Aberrationen | | | G/M | B/M |
|-------------|---------------|---------|-------------------------|------|------------------------------|------|------|-------|-------|
| | Alter (Jahre) | Geschl. | (%) | G' | G'' | B' | B'' | | |
| 1 | 1 | ♂ | 6 | 3 | 0 | 1 | 2 | 0.03 | 0.03 |
| 2* | 2 | ♂ | 10 | 5 | 2 | 1 | 3 | 0.07 | 0.04 |
| 3 | 19 | ♂ | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0.03 | 0.02 |
| 4 | 22 | ♂ | 5 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0.03 | 0.02 |
| 5 | 24 | ♂ | 6 | 2 | 0 | 1 | 3 | 0.02 | 0.04 |
| 6 | 25 | ♂ | 5 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0.05 | 0.00 |
| 7 | 28 | ♂ | 5 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0.01 | 0.04 |
| 8 | 31 | ♂ | 5 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0.02 | 0.03 |
| 9 | 31 | ♂ | 7 | 3 | 1 | 1 | 2 | 0.04 | 0.03 |
| 10 | 33 | ♂ | 6 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0.03 | 0.03 |
| 11 | 34 | ♂ | 8 | 2 | 1 | 1 | 4 | 0.03 | 0.05 |
| 12 | 40 | ♂ | 5 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0.04 | 0.02 |
| 13 | 40 | ♂ | 5 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0.04 | 0.01 |
| 14* | 45 | ♂ | 11 | 4 | 0 | 4 | 3 | 0.04 | 0.07 |
| 15* | 56 | ♂ | 15 | 5 | 3 | 1 | 6 | 0.08 | 0.07 |
| 16 | 58 | ♂ | 6 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0.04 | 0.02 |
| 17 | 61 | ♂ | 11 | 5 | 1 | 3 | 2 | 0.06 | 0.05 |
| 18* | 65 | ♂ | 13 | 4 | 1 | 1 | 7 | 0.05 | 0.08 |
| Mittelwerte | | | 7.38 | 2.77 | 1.16 | 1.27 | 2.33 | 0.041 | 0.036 |

* Kulturen mit Eigenplasma und einer Kulturdauer von 72 Stunden.

G' = Chromatidgap; B' = Chromatidbruch; G/M = Gaps/Metaphase

G'' = Isochromatidgap; B'' = Isochromatidbruch; B/M = Brüche/Metaphase

wurden (Kulturzeit 48 oder 72 h, Eigenplasma oder Kälberserum), ausschließlich um achromatische Läsionen (Gaps) oder um Brüche (vgl. Abb. 1) handelt.

Das Verhältnis Gaps/Brüche beträgt 1.09 : 1.

In keiner dieser Kulturen wurden Austauschfolgen, wie Translokationskreuze oder atypische Chromosomen, beobachtet.

Wie aus Tab. II hervorgeht, ergibt ein Vergleich der Durchschnittswerte von männlichen und weiblichen Probanden keinen geschlechtsspezifischen Unterschied.

Teilt man die in Tab. I angeführten Probanden in verschiedene Altersgruppen ein, so ergeben sich die in Tab. III dargestellten Durchschnittswerte. Zieht man in

Tab. II. Vergleich der Durchschnittswerte für die beiden Geschlechter

| | Metaphasen mit Aberrationen (%) | G/M | B/M |
|---|---------------------------------|-----------------|-------|
| ♂ | 7.53 (+ 0.15) | 0.040 (— 0.001) | 0.036 |
| ♀ | 7.00 (— 0.38) | 0.042 (+ 0.001) | 0.036 |

Tab. III. Altersabhängigkeit der Spontanaberrationsrate

| Altersgruppe (Jahren) | Zahl d. erf. Probanden | Metaph. m. Aberr. (%) | G/M | B/M |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------|-------|
| 1-19 | 3 | 6.66 | 0.053 | 0.030 |
| 20-29 | 4 | 5.25 | 0.027 | 0.025 |
| 30-39 | 4 | 6.50 | 0.030 | 0.035 |
| 40-49 | 3 | 7.00 | 0.040 | 0.033 |
| 50-... | 4 | 11.25 | 0.057 | 0.055 |

Betracht, daß die Gruppe der über 50-jährigen 2 der insgesamt 4 überhöhten Werte aus Eigenplasmakulturen enthält, so muß auch eine Abhängigkeit der Spontanaberrationshäufigkeit vom Alter der Probanden — jedenfalls in den hier untersuchten Altersgruppen — ausgeschlossen werden.

B. ANALYSE DES EINFLUSSES VERSCHIEDENER KULTURBEDINGUNGEN

1) Beeinflussung durch foetales Kälberserum oder Eigenplasma

Wie die erwähnte Analyse der in Tab. I aufgeführten Ergebnisse zeigt, scheint ein Einfluß des zum Kulturansatz verwendeten Serums nicht ausgeschlossen zu sein.

Für Chromosomenuntersuchungen werden üblicherweise 10 ml Venenblut entnommen. Die dabei erhaltenen Mengen an Plasma sind nur für wenige Kulturen ausreichend. Darum wird bei größeren Reihen zumeist mit foetalem Kälberserum gearbeitet. Es war daher von Bedeutung, festzustellen, inwieweit die Ergebnisse von Mutagenitätsuntersuchungen durch die wechselweise Verwendung von Foetalserum oder Eigenplasma beeinflusst werden.

Um für die Auswertung der 48-Stunden-Kulturen ausreichend Metaphasen zu erhalten, wurde die PHA-Menge pro Kultur von 0.2 ml auf 0.4 ml erhöht. Dies war vor allem bei den mit eigenem Plasma angesetzten Kulturen nötig, während für Kulturen mit foetalem Kälberserum 0.2 ml pro Kultur ausreichten. Möglicherweise ist dies auf einen zusätzlich stimulierenden Effekt artfremden Serums zurückzuführen.

Bei der Verwendung von foetalem Kälberserum war die Aberrationszahl, wie aus Tab. IV ersichtlich, unabhängig von der Kulturdauer. Die Verwendung von eigenem Plasma ließ mit längerer Kulturzeit die strukturellen Aberrationen deutlich

Tab. IV. Abhängigkeit der Aberrationshäufigkeit von der Art des im Kulturansatz verwendeten Serums

| Serum | Metaph. m. Aberr. (%) | Anzahl d. beob. Aberrationen | | | | G/M | B/M |
|------------------|--------------------------|---------------------------------|-----|----|-----|------|------|
| | | G' | G'' | B' | B'' | | |
| Foet. Klb. Serum | | | | | | | |
| 48 h | 6 | 1 | 2 | — | 3 | 0.03 | 0.03 |
| 72 h | 5 | 4 | — | — | 1 | 0.04 | 0.01 |
| 96 h | 7 | 3 | — | 2 | 2 | 0.03 | 0.04 |
| Eigenplasma | | | | | | | |
| 48 h | 6 | 4 | — | 1 | 1 | 0.04 | 0.02 |
| 72 h* | 12 | 9 | — | 2 | 3 | 0.09 | 0.07 |
| 96 h | 22 | 7 | 3 | 1 | 14 | 0.10 | 0.15 |

* In dieser Kultur trat ein Chromatidring auf.

ansteigen. Um die Zunahme in « Eigenplasmakulturen » zu sichern, wurden in die Untersuchung weitere Personen einbezogen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. V aufgeführt. Sie gestatten zweifellos den Schluß, daß die Verwendung von Eigenplasma mit zunehmender Kulturzeit zu einer Erhöhung der Aberrationsraten führt. Die Korrelation der einzelnen Werte ist dabei zwar nicht ausreichend, um eine genau definierte mathematische Funktion ableiten zu können; doch läßt sich die Zunahme in etwa als geometrische Reihe darstellen. Ein Vergleich der Mittelwerte der Aberrationsraten bei den verschiedenen Kulturzeiten macht das besonders deutlich.

Diese betragen bei: 48 h 5.25%; 72 h 10.5%; 96 h 18.75%.

In Mittel erhöht sich also die Aberrationsrate jeweils etwa um den Faktor 2.

2) Auswirkung der PHA-Konzentration auf Aberrationsraten und Mitoseindices

Die PHA-Konzentration ist von allen Variablen diejenige, die bei den verschiedenen Modifikationen der Lymphozytenkultur am stärksten verändert wird. Vor allem geht es darum, auch unter erschwerten Versuchsbedingungen (hemmende Testsubstanzen) ausreichend auswertbare Metaphasenplatten zu erhalten. Inwieweit eine Veränderung der PHA-Konzentration darauf Einfluß nimmt, sollte dieser Versuch klären. Dazu wurden zwei Reihen von Konzentrationen untersucht. Die erste umfaßt den Bereich 0.05 ml PHA/Kultur bis zu 0.2 ml PHA/Kultur, die zweite den Bereich 0.2 ml PHA/Kultur bis 0.8 ml PHA/Kultur. Da die erste Reihe zwischen niedrigster und höchster Konzentration keinen signifikanten Unterschied in den Aberrationsraten zeigt, wurden nur die beiden Grenzkonzentrationen ausgewertet. Im Bereich 0.2 ml bis 0.8 ml wurden drei Konzentrationsstufen untersucht. Gleichzeitig wurde der Mitoseindex für diese Kulturen erstellt (Tab. VI).

Tab. V. Zunahme der Aberrationshäufigkeit in Abhängigkeit von der Kulturdauer in Eigenplasma

| Proband | Kulturdauer (h) | Metaph. m. Aberr. (%) | Anzahl d. beob. Aberrationen | | | | | G/M | B/M |
|---------|-----------------|-----------------------|------------------------------|-----|----|-----|------|------|------|
| | | | G' | G'' | B' | B'' | A* | | |
| I | 48 | 6 | 3 | 1 | 1 | 3 | 0.04 | 0.04 | |
| II | | 5 | 2 | 2 | — | 1 | 0.04 | 0.01 | |
| III | | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0.03 | 0.02 | |
| IV** | | 6 | 4 | — | 1 | 1 | 0.04 | 0.02 | |
| II | 72 | 9 | 4 | — | 4 | 2 | 0.04 | 0.06 | |
| IV** | | 12 | 9 | — | 2 | 3 | 1 | 0.09 | 0.07 |
| I | 96 | 26 | 9 | 7 | 4 | 10 | 1 | 0.16 | 0.16 |
| II | | 13 | 3 | 5 | 2 | 6 | | 0.08 | 0.08 |
| III | | 14 | 4 | 8 | 1 | 3 | 1 | 0.12 | 0.06 |
| IV** | | 22 | 7 | 3 | 1 | 14 | | 0.10 | 0.15 |

* Austauschfolgen.

** Aus Tab. IV übernommen.

Tab. VI. Einfluß von PHA auf die Spontanaberrationshäufigkeit und den Mitoseindex

| PHA-Konz. (ml/Kult.) | Metaph. m. Aberr. (%) | Anzahl d. beob. Aberrationen | | | | G/M | B/M | M.I. (‰) |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|-----|----|-----|------|------|----------|
| | | G' | G'' | B' | B'' | | | |
| 0.05 | 4 | — | — | — | 6 | — | 0.06 | 20 |
| 0.2 | 6 | 2 | — | 1 | 3 | 0.02 | 0.04 | 17 |
| 0.2 | 6 | 4 | — | 1 | 1 | 0.04 | 0.02 | 22 |
| 0.4 | 6 | 5 | — | — | 1 | 0.05 | 0.01 | 29 |
| 0.8 | 2 | — | 1 | — | 1 | 0.01 | 0.01 | 31 |

Aus Tab. VI geht auch hervor, daß eine Erhöhung der PHA-Menge sicher nicht zu einer Steigerung der Aberrationsraten führt. Alle Werte liegen innerhalb der Toleranzgrenze, die man für individuelle Schwankungen anzusetzen hat.

Die Mitoseindices, die in Tab. VI aufgeführt sind, lassen erkennen, daß eine drastische Erhöhung der PHA-Menge die Mitosezahlen keineswegs in gleichem Maße steigert. Die Wirkung einer höheren PHA-Konzentration scheint eher darin zu liegen, daß sie die Kulturzeit, die benötigt wird, um gut auswertbare Präparate zu erhalten, verkürzt. Dies zeigt eine vergleichende Aufstellung deutlich. Während die Tab. VI, die an Hand von 72-Stunden-Kulturen erstellt wurde, für die Konzen-

trationsstufe 0.2 ml PHA auf 0.4 ml PHA nur eine Steigerung des Mitoseindex um ein Drittel aufweist, erhöht dieser sich bei den 48-Stunden-Kulturen (Eigenplasma) im Mittel um das Vierfache (Tab. VII).

3) *Einfluß der Zeit zwischen Blutentnahme und Ansetzen der Kulturen auf Aberrationsraten und Mitoseindices*

Diese Versuchsreihe wurde unter zwei Aspekten angelegt. Es ist von großem praktischen Interesse, wie sich längere Lagerung des Blutes auf die Kultivierbarkeit und die Spontanaberrationsrate auswirkt. Zudem ist es von Bedeutung, zu wissen, welcher Zeitpunkt nach der Blutentnahme die günstigsten Bedingungen für das Wachstum der Kulturen bietet. Dazu wurde das Blut nach der Entnahme im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und in den angegebenen Abständen wie üblich angesetzt und aufbereitet.

Ein Vergleich der Aberrationsraten ergibt, daß bei Lagerung des Venenblutes bis zu zehn Tagen nach der Entnahme keine wesentliche Erhöhung der Gesamtaberrationszahlen eintritt (Tab. VIII).

Verfolgt man das Verhalten der Mitoseindices, so ist mit Verlängerung der Stehzeit bis zu 48 Stunden ein Anstieg zu verzeichnen, der dann jedoch stagniert.

Die Mitoseindices, wie sie in dieser Untersuchung angegeben werden, liegen we-

Tab. VII. Einfluß der PHA-Konzentration auf den Mitoseindex von 48-Stunden-Kulturen

| PHA-Konzentration (ml/Kultur) | Mitoseindex | | |
|----------------------------------|-------------|----|----|
| | 1. | 2. | 3. |
| 0.2 | 3 | 9 | 3 |
| 0.4 | 18 | 24 | 21 |

Tab. VIII. Einfluß der Lagerungsdauer des Blutes nach der Entnahme auf Aberrationsraten und Mitoseindex

| Lagerdauer (h) | Metaph. m. Aberr. (%) | Anzahl d. beob. Aberrationen | | | | G/M | B/M | M.I. (‰) |
|-------------------|--------------------------|--|-----|----|-----|------|------|-------------|
| | | G' | G'' | B' | B'' | | | |
| 0 | | Die ersten drei Kulturen waren nicht auswertbar, | | | | | | 6 |
| 3 | | jedoch zunehmende Transformierung der Kerne | | | | | | 8 |
| 24 | | | | | | | | 12 |
| 48 | 6 | 4 | — | 1 | 1 | 0.04 | 0.02 | 22 |
| 96 | 5 | 4 | — | — | 1 | 0.04 | 0.01 | 22 |
| 240 | 5 | — | 1 | 2 | 2 | 0.01 | 0.04 | 24 |

sentlich unter den Angaben anderer Autoren. Dies mag, zumindest teilweise, darin begründet sein, daß bei der Auszählung nur Metaphasen erfaßt wurden, diese Zahlen also de facto Metaphaseindices darstellen.

4) *Wirkung verschiedener Konzentrationen von Penicillin*

Der Zusatz von Penicillin zu den Kulturen ist allgemein üblich, um kleinere Infektionen der Kulturen auszuschließen, die durch eine Lücke in der Kette der steril durchzuführenden Arbeitsgänge entstehen könnten. Bei den Kulturen dieser Untersuchung war eine Penicillinkonzentration von 500 E/ml Medium die Norm. Ein störender Einfluß von Penicillin auf die Ergebnisse cyto genetischer Untersuchungen sollte wegen der häufigen Anwendung weitgehend auszuschließen sein. Aus diesem Grunde wurden auch extrem hohe Penicillinkonzentrationen auf einen eventuellen derartigen Einfluß geprüft.

Tab. IX weist für den Probanden 17 eine schwache Steigerung der Aberrationsraten auf, die in Beziehung zur Erhöhung der Penicillinkonzentration gesehen werden könnte. Die Ausgangszahl ohne Penicillin liegt jedoch mit 11% so hoch, daß eine so wenig signifikante Zunahme der aberrierenden Metaphasen als Zufallsbefund innerhalb der individuellen Schwankungsbreite angesehen werden muß.

Die Werte für Proband 7 zeigen denn auch, daß hier keinesfalls ein mutagener Effekt auf Grund des Penicillinzusatzes aufgetreten ist. Aus Tab. IX ergibt sich demnach, daß die Penicillinkonzentration im Nährmedium in den üblicherweise verwendeten Bereichen keinen fördernden Einfluß auf die Spontanaberrationsrate hat.

Diskussion

Vergleicht man die durchschnittlichen Spontanaberrationswerte der vorliegenden Untersuchung mit den von anderen Autoren angegebenen Resultaten (Tab. X), so fällt auf, daß sehr häufig die in der Literatur angegebenen Zahlen niedriger sind, als die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten. Dafür lassen sich verschiedene Gründe angeben.

Wohl der wichtigste ist darin zu sehen, daß viele Autoren nur Brüche und Austauschfolgen als « echte » Aberrationen werten, achromatische Läsionen (Gaps) jedoch vernachlässigen. Verschiedene Untersuchungen (Kurita et al, 1965; Gebhart, 1968, 1969, und unveröffentlichte Ergebnisse) haben jedoch gezeigt, daß eine Ausklammerung dieser Gaps als unspezifische oder nicht zu bewertende Defekte nicht mehr haltbar ist. Zweifellos ist die Unterscheidung von Gaps und Brüchen in gewissen Grenzfällen nicht ganz einfach. Diese Unsicherheit kann unter Umständen ein weiterer Grund für die Abweichung zwischen den von verschiedenen Autoren gefundenen Spontanaberrationsraten sein. Die Subjektivität des Beobachters läßt sich durch entsprechende Modifizierung der Auswertungstechnik auf ein Minimum reduzieren. Dagegen könnten unterschiedliche Kulturbedingungen, wie die vorliegenden Unter-

Tab. IX. Einfluß verschiedener Penicillinkonzentrationen auf die Aberrationsraten

| | Penic. (E/ml) | Metaph. m. Aberr. (%) | Anzahl d. beob. Aberrationen | | | | G/M | B/M |
|------------------|------------------|--------------------------|---------------------------------|-----|----|-----|------|------|
| | | | G' | G'' | B' | B'' | | |
| Versuch <i>a</i> | 0 | 11 | 5 | 1 | 3 | 2 | 0.06 | 0.05 |
| Proband 17 | 1000 | 13 | 6 | 2 | 2 | 6 | 0.08 | 0.08 |
| | 2000 | 15 | 9 | 1 | 2 | 10 | 0.10 | 0.12 |
| Versuch <i>b</i> | 0 | 6 | 4 | — | 1 | 1 | 0.04 | 0.02 |
| Proband 7 | 500 | 5 | 4 | — | — | 1 | 0.04 | 0.01 |
| | 2000 | 5 | 3 | — | 1 | 1 | 0.03 | 0.02 |

Tab. X. Befunde anderer Autoren über die Aberrationsraten in unbehandelten Kontrollen

| Autor | Ausgew. Metaph. | Gesamt- aberrationen | B/M |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------------|-------|
| Bender und Gooch, 1962 | 401 | — | 0.025 |
| Bochkov et al, 1968 | 8 000 | — | 0.016 |
| Cohen, 1963 | 150 | — | 0.027 |
| Cohen und Shaw, 1964 | 626 | — | 0.030 |
| Gebhart, 1970 (pers. Mitlg.) | 1 800 | 4.3 | 0.015 |
| Hampel, 1968 | 5 600 | 6.2 | 0.068 |
| Honda et al, 1969 | 1 000 | 3.6 | — |
| Jackson, 1964 | 100 | 8.0 | — |
| Kihlman et al, 1963 | 300 | 6.3 | — |
| Lubs und Samuelson, 1967 | 3 720 | 11.95 | 0.075 |
| Moore et al, 1964 | 250 | 0.0 | 0.00 |
| Neu et al, 1965 | — | 3.5 | — |
| Nichols et al, 1962 | 163 | 3.3 | — |
| Nichols, 1964 | 100 | — | 0.050 |
| Summe der untersuchten Metaphasen | 22 210 | | |
| Mittelwerte | | 7.1 | 0.042 |

suchungen zeigen, durchaus zu einer Beeinflussung der Spontanaberrationsrate führen (z.B. Kulturansatz in Spenderplasma).

Alle diese Unsicherheiten in den Angaben zeigen, daß eine Normierung dringend erforderlich ist. Nicht so sehr für experimentelle Untersuchungen, da für deren Beurteilung die angegebenen Kontrollwerte maßgebend sind. Außerdem werden gewöhnlich Testuntersuchungen auf Mutagenität nur mit Probanden durchgeführt, die auf Grund ihrer niedrigen Aberrationsraten ausgewählt wurden. Von wesentlich größerer Bedeutung ist ein Orientierungswert für die allgemeine Beurteilung geneti-

scher Belastung. Dieser soll eine Aussage erlauben, in welchem Bereich eine Aberrationsrate noch als tolerierbar anzusehen ist, und von welcher Grenze ab ein Wert als pathologisch betrachtet werden muß.

Unter Berücksichtigung der bei dieser Untersuchung erstellten Mittelwerte wäre dann die obere Toleranzgrenze etwa bei 12 bis 14% Aberrationen anzusetzen. Höhere Raten sollten zumindest eine Untersuchung der Ursachen auslösen.

Eine dieser Ursachen könnte ein kulturbedingter Faktor sein. Lubs und Samuelson (1967) geben eine Untersuchung an, bei der verschiedene Familien zu einer Versuchsserie herangezogen wurden, die gleichzeitig und unter Benutzung identischer Medien, sowie unter Übereinstimmung der anderen Versuchsbedingungen, angesetzt wurde. Nur eine Person wies eine erhöhte Bruchfrequenz auf. Die Autoren finden darin ihre Vorstellung unterstützt, daß kein *in vitro* Faktor existiert, der die Bruchfrequenz allgemein beeinflußt, und daß die Aberrationen in erster Linie auf einer *in vivo* Schädigung beruhen. Sie suchen die Begründung für die Schwankung von Aberrationshäufigkeiten in geringfügigen Virusinfektionen (vgl. auch Nichols et al, 1967). Diese Möglichkeit ist nicht auszuschließen. Soweit es die Verwendung von foetalem Kälberserum angeht, ergibt die vorliegende Untersuchung auch keine gegenteiligen Anhaltspunkte. Ein Vergleich von Bishun (1967), unter Verwendung von menschlichem Serum und eines Extrakts aus Hühnerembryonen, befaßt sich leider nur mit dem Wachstumseinfluß der verschiedenen Medien, ohne auf mögliche Wirkungen auf die Spontanaberrationsraten einzugehen.

Die hier geschilderten Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf die Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen haben jedoch, entgegen den Angaben von Lubs und Samuelson gezeigt, daß zumindest ein kulturbedingter Faktor die Spontanaberrationsrate zu steigern vermag. Es ist dies die Verwendung von Eigenplasma bei längerer Kulturdauer. Die diesem Eigenplasma-Effekt zu Grunde liegenden Reaktionsmechanismen sind noch unklar.

Allison und Paton (1965) berichten über lysosomale Enzyme, die Chromosomenaberrationen verursachen. Es wäre durchaus möglich, daß bei längerer Kulturdauer etwa Desoxyribonuclease oder andere Enzyme eine dementsprechende Aktivität entfalten. Eine vergleichende Untersuchung über Enzymaktivitäten in diesem Bereich liegt nicht vor, doch wäre einleuchtend, wenn die Aktivität des foetalen Serums geringer wäre, oder auf Grund der verschiedenen Proteinstrukturen von kultivierten Zellen und Medium keine direkte Einwirkung erfolgen könnte. Eine mutagene Wirksamkeit von Zersetzungsprodukten einzelner Serumbestandteile, die bei längerer Kulturdauer auftreten könnten, ist in diesem Zusammenhang ebenfalls nicht auszuschließen. Voraussetzung wäre allerdings, daß ähnliche Zersetzungsprodukte bei gleicher Kulturdauer im foetalen Kälberserum nicht entstehen.

Eine erhöhte Aberrationsrate der 72-Stunden-Kulturen gegenüber den 48-Stunden-Kulturen wurde auch von anderen Autoren schon beobachtet (Honda et al, 1969) und als kulturbedingt erkannt. Die Autoren waren allerdings nur an Aberrationen interessiert, die über das Niveau von Isochromatidbrüchen hinausgingen, also an dizentrischen Chromosomen, Translokationen, etc. Bei einer Gegenüberstellung

aller Aberrationen findet sich jedoch ein Verhältnis der Aberrationsraten in 48-Stunden-Kulturen zu den Raten in 72-Stunden-Kulturen von 1 : 1.7. Dieser Befund deckt sich zwar nicht genau mit dem Ergebnis dieser Untersuchung, das ein Verhältnis von 1 : 2 ergab, ist aber in diesem Sinne zu interpretieren.

Bei der Untersuchung über die Wirkung des Phytohämagglutinins stand die Auswirkung auf den Mitoseindex im Vordergrund. Die Konzentrationserhöhungen führten zu keiner Steigerung der Chromosomenaberrationen.

Die Erhöhung der Mitoseindices korrespondierte nur in geringem Maß mit der Erhöhung der PHA-Mengen. Bei den 72-Stunden-Kulturen erreichte eine Vervielfachung der PHA-Konzentration lediglich eine Steigerung um 50%. Bei den 48-Stunden-Kulturen zeigte es sich, daß eine Erhöhung der PHA-Menge durchaus sinnvoll sein kann, da durch die Verwendung einer Konzentration von 0.4 ml PHA-Lösung/Kultur eine Auswertung erst ermöglicht wurde. In diesem Zusammenhang darf jedoch nicht unberücksichtigt bleiben, daß mit foetalem Kälberserum angesetzte Kulturen bei geringeren PHA-Konzentrationen auswertbar waren, als solche in eigenem Plasma. Dies entspricht den allgemeinen Erfahrungen des Erlanger Instituts für Humangenetik (Schwanitz, mdl. Mtlg.), daß selbst Blutproben, die in eigenem Plasma angesetzt, völlig unbrauchbare Präparate ergaben, d.h., keine auswertbare Mitose enthielten, nach Ansatz in foetalem Kälberserum hinreichend auswertbare Metaphasenplatten lieferten.

Von gewissem Einfluß auf das Wachstum der Kulturen war auch die Stehzeit der Blutproben, die jedoch unter zwei Aspekten zu betrachten ist. Da die Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C erfolgt, muß die Wirkung des Temperatursturzes mit einbezogen werden. Honda et al (1969) geben an, daß die Blutproben vor dem Ansetzen der Kulturen eine gewisse Zeit auf Eis gekühlt wurden, führen aber keinen Grund für dieses Vorgehen an. Im vorliegenden Versuch sind Zeit- und Temperaturfaktor nicht zu trennen. Daher ist lediglich zu konstatieren, daß eine Stehzeit bei niedriger Temperatur den Mitoseindex deutlich erhöht. Dies ist entweder als Erfolg einer Anpassungszeit an ein verändertes Milieu oder als ein stimulierender Effekt eben dieser Milieuänderung auszulegen.

Für die Praxis der Leukozytenkultur ergeben sich aus diesen Untersuchungen folgende Hinweise.

Die Verwendung von foetalem Kälberserum ist bei längerer Kulturdauer der Verwendung von Eigenplasma überlegen. Eine PHA-Konzentration von 0.2 ml/Kultur erscheint zur Stimulierung einer brauchbaren Mitoseaktivität in der 72-Stunden-Kultur völlig ausreichend. Bei den 48-Stunden-Kulturen empfiehlt sich eine Erhöhung dieser Dosis. Weder die übliche Penicillinzugabe noch die vierfache Dosis steigern die Spontanaberrationsrate wesentlich. Zwischen Blutentnahme und Kulturansatz sollte das Blut über einen gewissen Zeitraum gekühlt aufbewahrt werden. Blutkulturen, die ohne erkennbare Einwirkung eines mutagenen Agens mehr als 10 bis 12% Metaphasen mit chromosomalen Strukturdefekten enthalten, sollten für cytogenetische Untersuchungen nicht herangezogen oder, je nach Fragestellung, als abnorm bewertet werden.

Literatur

- ALLISON, PATON (1965). Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. *Nature (London)*, **207**: 1170-1173.
- BARTHELMESS A. (1963). Möglichkeit und Gelegenheiten zur Schädigung des Erbgutes beim Menschen durch mutagene Stoffe; ein Vorschlag zur Erforschung. *Proc. 2nd Int. Congr. Hum. Genet.*, **2**: 1251-1258.
- BENDER M. A., GOOCH P. C. (1962). Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro. *Genetics*, **48**: 522-532.
- BISHUN N. P. (1967). Comparison of mitotic growth rates of human capillary whole blood cultured in a variety of media. *J. Med. Genet.*, **4**: 41-43.
- BOCHKOV N. P., KOLZLOV V. M., PILOSOV R. A., SEVANKAEV A. V. (1968). The level of spontaneous chromosome aberrations in cultures of human leukocytes. *Genetika (Leningrad)*, **4**: 93-98.
- COHEN M. M. (1963). The specific effect of streptonigrin activity on human chromosomes in culture. *Cytogenetics (Basel)*, **2**: 271-279.
- COHEN M. M., SHAW M. W. (1964). Effects of mytomycin C on human chromosomes. *J. Cell. Biol.*, **23**: 386-395.
- COURT BROWN W. M., BUCKTON K. E., JACOBS P. A., TOUGH E. M., KUENSSBERG E. V., KNOX J. D. E. (1966). *Chromosome Studies on Adults*. Cambridge University Press, London.
- GEBHART E. (1968). Untersuchungen über die Wirkung von 8-Hydroxychinoliniumsulfat auf menschliche Chromosomen in vitro. *Mutat. Res.*, **6**: 309-318.
- GEBHART E. (1969). Chromosomenaberrationen durch Myleran in menschlichen Leukozyten in vitro. *Humangenetik*, **7**: 126-136.
- HAMPEL K. E. (1968). Über die Wirkung von Cytostatika auf die Chromosomen des Menschen. *Int. J. Clin. Pharm. Tox.*, **14**: 322-371.
- HONDA T., KAMADA N., BLOOM A. D. (1969). Chromosome aberrations and culture time. *Cytogenetics (Basel)*, **8**: 117-124.
- JACKSON J. F. (1964). Chromosome aberrations in cultured human leukocytes treated with 8-ethoxycaffeine. *J. Cell. Biol.*, **22**: 291-293.
- KIHLMAN B. A., NICHOLS W., LEVAN A. (1963). The effect of desoxyadenosine and cytosinearaboside on the chromosomes of human leukocytes in vitro. *Hereditas (Lund)*, **50**: 139-143.
- KURITA Y., YOSIDA T. H., MORIWAKI K. (1965). Nonrandomness in the distribution of chromosome aberrations induced by a radiomimetic chemical, 4-nitroquinoline-1-oxide, in tumor cells. *Jap. J. Genet.*, **40**: 365-376.
- LUBS H. A., SAMUELSON J. (1967). Chromosome abnormalities in lymphocytes from normal human subjects. *Cytogenetics (Basel)*, **6**: 402-411.
- MAKINO S., AWA A. A., SASAKI M. (1968). Chromosome studies in normal human subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **155**: 679-694.
- MOORE J. G., CAMPENHOÛT J. L. van, BRANDKAMP W. M. (1964). Effects of ionizing irradiation and chemotherapeutic agents on human chromosomes. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **88**: 985-1000.
- MOORHEAD P. S., NOWELL P. C., MELLMAN W. J., BATTIPS D. M., HUNGERFORD D. A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, **20**: 613-616.
- NEU R., ASPILLAGA J., GARDENER L. I. (1965). Effects of antibiotics on chromosomes of cultured human leukocytes. *Nature (London)*, **205**: 171-172.
- NICHOLS W. W., LEVAN A., HALL B., ÖSTERGREN G. (1962). Measles-associated chromosome breakage. *Hereditas (Lund)*, **48**: 367-370.
- NICHOLS W. W. (1964). In vitro chromosome breakage induced by arabinosyladenosine in human leukocytes. *Cancer Res.*, **24**: 1502-1505.
- NICHOLS W. W., LEVAN A., HENEEN W. K. (1967). Studies on the role of viruses in somatic mutation. *Hereditas (Lund)*, **57**: 366-368.
- RIEGER R., MICHAELIS A. (1967). *Chromosomenmutationen*. Fischer, Jena.
- VOGEL F., RÖHRBORN G., SCHLEIERMACHER E., SCHRÖDER T. M. (1967). Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch. *Deutsch. Med. Wschr.*, **92**: 2249-2254.
-

ZUSAMMENFASSUNG

Bei 18 Personen der Durchschnittsbevölkerung wurde das Vorkommen struktureller Chromosomenaberrationen aus Lymphozytenkulturen aus dem peripheren Blut untersucht. Dabei wurde eine mittlere Aberrationsrate von 7.38% und ein mittlerer Bruch/Metaphase-Index von 0.036 festgestellt. Die Einzelwerte schwankten zwischen 4 und 15% bei den Gesamtaberrationsraten und 0.00 und 0.08 beim Bruch/Metaphasen-Index. Es traten nur Gaps und Brüche auf. Die gefundenen Translokationskreuze und der Chromatidring entstammen einer Versuchsreihe mit einem Kulturansatz in Eigenplasma. Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Kulturbedingungen zeigte, daß im untersuchten Bereich die Spontanaberrationsrate unabhängig vom Alter der Blutprobe, dem Penicillinzusatz zur Kultur und der PHA-Konzentration ist. Die Verwendung von foetalem Kälberserum ließ auch in Langzeitkulturen (96 h) die Aberrationsrate unbeeinflusst, während im Eigenplasma mit der Länge der Kulturzeit die Strukturdefekte stark zunahmen. Die Untersuchung der Mitoseindices unter den verschiedenen Kulturbedingungen ergab Hinweise, wie sich in praxi das Wachstum von Leukozytenkulturen günstig beeinflussen läßt.

RIASSUNTO

È stata esaminata la frequenza delle aberrazioni cromosomiche di struttura in culture linfocitarie di sangue periferico di 18 individui normali. Il tasso medio di aberrazioni è risultato del 7.38%; l'indice medio di rotture/metafase, dello 0.036. I valori individuali oscillano, per il tasso di aberrazioni, tra 4% e 15%; per l'indice di rotture/metafase tra 0.00 e 0.08. Si sono avute soltanto lesioni acromatiche (gaps) e rotture. Le croci di traslocazione e l'anello cromatidico riscontrati derivano da una serie di esperimenti su culture di plasma omologo. Per quanto riguarda l'influsso dei differenti ambienti di cultura, si è rilevato che — nell'ambito della ricerca in oggetto — il tasso di aberrazioni spontanee è indipendente dall'età del test e non varia dopo aggiunta di penicillina in cultura, né modificando la concentrazione di fitoemoagglutinina. Usando siero fetale di vitelli, il tasso di aberrazioni è rimasto invariato anche nelle culture a tempo protratto fino a 96 ore, mentre con l'uso di plasma omologo, aumentato il tempo di cultura, sono aumentate notevolmente anche le alterazioni di struttura. L'esame dell'indice mitotico nelle varie condizioni di cultura ha rivelato la possibilità di favorire la crescita delle culture leucocitarie.

RÉSUMÉ

La fréquence des aberrations chromosomiques de structure a été examinée chez 18 individus normaux, en culture lymphocytaire de sang périphérique. Le taux moyen d'aberrations était de 7.38%; l'index moyen de rupture/métaphase, de 0.036. Les valeurs individuelles oscillaient, pour le taux d'aberrations, entre 4% et 15%; pour l'index de rupture/métaphase, entre 0.00 et 0.08. Seulement des lésions achromatiques (gaps) et des ruptures ont été observées. Les croix de translocation et l'anneau chromatidique observés dérivent d'une série d'expériences sur des cultures de plasma homologue. En ce qui concerne l'influence des différents milieux de culture, il a été observé, dans cette recherche, que le taux d'aberrations spontanées est indépendant de l'âge du test et ne varie pas si l'on ajoute de la pénicilline en culture, ni si l'on modifie la concentration de phytohémoagglutinine. Dans le sérum fétal de veau, le taux d'aberrations reste invarié, même si l'on extend le temps de culture jusqu'à 96 heures; tandis que dans le plasma homologue, le temps de culture augmenté, les altérations de structure augmentent aussi de façon remarquable. L'examen de l'index mitotique dans les différentes conditions de culture a indiqué la possibilité de favoriser l'accroissement des cultures leucocytaires.

Dr. HANNES MEIST, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland.
