
OPTIMALISATIE EN TOEPASSING VAN CYTOGENETISCHE "STATE OF THE ART" TECHNIEKEN VOOR DE BEPALING VAN DE GENETISCHE SCHADE IN PERIFERE BLOED LYMFOCYTEN VAN INDIVIDUËN EN POPULATIES, BEROEPSHALVE OF ACCIDENTEEL BLOOTGESTELD AAN STRALING.

1. Prof. H. Thierens – Coordinator
2. Prof. L. De Ridder
2. A. Vral
3. Prof. M. Kirsch-Volders
3. N. Touil
4. Dr. C. Laurent
4. V. Lambert

1. Laboratorium voor Standard Dosimetrie -RUG-
 2. Laboratorium voor histologie -RUG-
 3. Laboratorium voor Cellulaire Genetica -RUG-
 4. Laboratoire ORME -Ulg-
-

INHOUDSTAFEL

I. INLEIDING.....	
I.1 Algemene context van het onderzoek	
I.2 Doelstellingen	
II. THEORISCHE CONTEXT.....	
II.1 Optimalisatie van de toegepaste cytogenetische technieken.	
II.1.1. De in vitro micronucleus techniek	
II.1.2. Analyse van aneuploidie in cytokinesis-geblokkeerde lymfocyten	
II.1.3. Scoring van chromosoomaberraties via "multicolour FISH"	
II.2 Vergelijkende studie tussen verschillende cytogenetische eindpunten voor de biomonitoring van werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling	
II.3 Validatie van de cytogenetische eindpunten via bloedstalen van patiënten medisch blootgesteld aan straling	
III. DE BESTUDEERDE STEEKPROEFPOPULATIES	
III.1 Populatie van werknemers uit de medische sector blootgesteld aan straling	
III.2 Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Doel	
III.3 Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Tihange	
IV. RESULTATEN	
IV.1. Populatie van werknemers uit de medische sector blootgesteld aan straling	
IV. 2. Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Doel	
IV. 3. Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Tihange	
V. BESPREKING	
VI. BIBLIOGRAFISCHE VERWIJZINGEN	

Bijhorende studie

I. INLEIDING.....	
I.1 Algemene context van het onderzoek	
I.2 Doelstellingen	
II. METHODOLOGIE.....	
II.1. Materiaal	

II.2. Methoden

III. RESULTATEN EN DISCUSSIE

III.1. Genetische stralingsgevoeligheid van lymfocyttaire subpopulaties.

III.1.a. Inductie van micronuclei in NK cellen en T lymfocyten na in vitro γ bestraling (Louagie et al. 1998a)

III.1.b. Inductie van MN in B lymfocyten na lage dosis γ stralen (Vral et al. 1998a)

III.2. Stralingsgevoeligheid van lymfocyten en lymfocyttaire subsets met als eindpunt apoptosis (Hertveldt et al. 1997, Philippé et al. 1998, Vral et al. 1998b, Louagie et al. 1998a & b, Cornelissen et al. 1998).

III.3. Correlatie tussen micronucleus frekwentie en apoptose (Phillipé et al. 1997, Louagie et al. 1998a en Vral et al. 1998a en b).

III.4. Correlatie tussen de in vitro en in vivo stralingsgevoeligheid van lymfocyten subpopulaties (Phillipé et al. 1997, Louagie et al. 1998c).

III.5. Mechanisme van stralingsgeïnduceerde apoptose (Louagie et al. submitted to Cell Biology: International Reports).

IV. ALGEMENE BESLUITEN

V. REFERENTIE

I. INLEIDING

I.1. Algemene context van het onderzoek

Epidemiologische studies hebben aangetoond dat blootstelling aan ioniserende straling een risico voor het optreden van maligne aandoeningen met zich meebrengt. Bij de bestudeerde populaties opgenomen in de recente UNSCEAR rapporten van de Verenigde Naties van 1994 (UNSCEAR 1994) behoren groepen van werknemers tewerkgesteld in de nucleaire industrie, beroepshalve blootgesteld aan straling. Deze epidemiologische gegevens in het lage dosisgebied zijn niet in tegenspraak met de risicoschattingen voorgesteld in 1991 door de internationale commissie voor stralingsbescherming, de ICRP in haar publicatie 60 (ICRP 60 1991). Deze laatste risicoschattingen op leukemie en vaste tumoren zijn vooral gebaseerd op de "lifespan" studie van de overlevenden van de atoombom op Hiroshima en Nagasaki in het hoge dosisgebied. Als richtwaarde voor het totale risico op een fatale maligne aandoening, werd door de ICRP een waarde van 5 op 100 per Sievert (Sv) aangenomen. In het licht van deze risicoschatting werd door de ICRP de aanbeveling geformuleerd om de dosislimieten voor ambtshalve blootgestelde personen te reduceren van 50 mSv tot 20 mSv per jaar. Een werknemer die jaarlijks de maximaal toelaatbare dosis oploopt gedurende een veertigjarige loopbaan loopt dus een risico van 4 op 100 om te overlijden tengevolge van een maligne aandoening, veroorzaakt door de blootstelling. Een systematische opvolging van de dosis en onderzoek naar de opgelopen genetische stralingsschade is dan ook van groot belang bij de risicogroep van werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling in de nucleaire industrie en de medische sector. Stralingsongevallen in het buitenland hebben aangetoond dat er een grote nood is aan een betrouwbare methodologie, die een snelle meting van de opgelopen stralingsdosis toelaat en dit niet enkel voor individuele gevallen van beroepshalve blootgestelde werknemers maar eveneens op grotere schaal bv. voor een beduidend deel van de bevolking.

Tot nog toe is de risicoevaluatie voor de werknemer compleet gebaseerd op fysische dosimetrietechnieken zoals de "filmbadge" of thermoluminescentie dosimetrie. De dosiswaarden, periodiek bekomen met deze technieken, worden geregistreerd in het medisch dossier van de werknemer. Elk jaar dienen de werkgevers de bestralingstabellen van de werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling op te sturen aan de Minister van Arbeid en Tewerkstelling. Deze tabellen geven een overzicht van de individueel opgelopen dosissen tijdens het voorgaande jaar. De fysische dosimetrie technieken, momenteel in gebruik voor de dosisbepaling, vertonen in de praktijk enkele specifieke nadelen. Een eerste nadeel vormt de discipline vereist van de drager. De dosimeter dient bij alle handelingen in de gecontroleerde zone gedragen te worden ter hoogte van de borst. Niet zelden wordt bij kritische handelingen met belangrijke blootstelling de dosimeter door nalatigheid of zelfs met opzet achterwege gelaten. Dit laatste bv. om eventuele maatregelen volgend op een overbestraling te vermijden. Een tweede belangrijk nadeel is zijn onbruikbaarheid bij partiële lichaamsbestralingen. Bevindt de dosimeter zijn buiten het veld van de blootstelling dan wordt geen dosis geregistreerd. De stralingsaccidenten, die tot nog toe opraden, waren nagenoeg allemaal het gevolg van een partiële lichaamsblootstelling. Door de werknemers werkzaam in de medische sector, waar gebruik wordt gemaakt van X-stralen voor medisch diagnostische doeleinden, wordt afschermd kledij als een loodschort gedragen. Het dragen van de dosimeter onder de afschermd kledij geeft hier een belangrijke onderschatting van de dosis gezien niet het ganse lichaam is afgeschermd. Het dragen van de dosimeter boven de loodschort geeft een grove overschatting zodat de afgelezen dosiswaarde eveneens niet representatief is voor het risico. Combinatie van de uitlezing van twee dosimeters, één onder en één boven de afschermd kledij, laat een betere inschatting van de opgelopen dosis toe maar is in de praktijk moeilijk haalbaar.

Niettegenstaande men van een biologische indicator van genetische stralingsschade niet dezelfde gevoeligheid mag verwachten als van een fysische dosimeter zoals de "filmbadge" komt een dergelijke indicator toch tegemoet aan de vermelde specifieke nadelen van de fysische dosimetrie. Biologische dosimetrie is van bijzonder nut bij stralingsongevallen. Gezien het hier meestal gaat om een partiële lichaamsblootstelling schiet de fysische dosimetrie hier meestal tekort voor de evaluatie van de risico's verbonden aan de accidentele blootstelling. Verder laat de bepaling van de genetische schade rechtstreeks een evaluatie toe van het kankerrisico op basis van de relatie tussen mutageniciteit en kanker, waarbij intrinsiek eveneens rekening wordt gehouden met de individuele radiosensitiviteit. Een biologische indicator van stralingsschade is dus een zeer interessante aanvulling voor de fysische dosimetrie.

In de eerste fase van het onderzoek werden door de betrokken onderzoekseenheden in een gecoördineerde actie een aantal "State of the Art" cytogenetische technieken geoptimaliseerd en gevalideerd als biologische indicator van stralingsschade. In de tweede fase, werd de ontwikkelde methodologie toegepast voor de bepaling van de genetische schade bij populaties beroepshalve blootgesteld aan straling. Als gevoelige methoden voor de detectie van de genetische schade, werden door de respectievelijke partners van het

netwerk uitgewerkt: de in vitro micronucleus-centromeer techniek (RUG-VUB), de opsporing van chromosoomverlies versus non-disjunctie via de FISH techniek met pericentromerische en chromosoom specifieke probes (VUB) en de scoring van translocaties via multicolour FISH (CHU Liège). Deze technieken worden toegepast op perifere bloed lymfocyten, bekomen via een eenvoudige bloedafname.

I.2. Doelstellingen

De doelstellingen van het project kunnen als volgt worden samengevat:

- De optimalisatie van bestaande cytogenetische technieken naar een verhoogde gevoeligheid toe ten einde detectie van genetische schade opgelopen op de werkplaats mogelijk te maken.
- De evaluatie met de op punt gestelde technieken van het risico voor late maligne effecten bij werknemers uit de nucleaire en de medische sector. De resultaten van dit onderzoek zullen aanleiding geven tot een betere inschatting van de risico's verbonden aan de beroepshalve blootstelling aan straling en als dusdanig een evaluatie van de huidig gehanteerde dosislimieten.
- De ontwikkelde methodologie met databank, die de gegevens van de studie bevat, zal van groot nut zijn bij accidentele overbestraling van individuen en populaties.
- De periodieke opvolging van de stralingsschade bij werknemers uit de nucleaire en de medische sector behorend tot kritische populaties die regelmatig een beduidende stralingsbelasting oplopen.

II. METHODOLOGIE

II.1. Optimalisatie van de toegepaste cytogenetische technieken.

II.1.1. De in vitro micronucleus techniek

De micronucleus-centromeer techniek

De interindividuele verschillen in de spontane incidentie van micronuclei is bij de klassieke micronucleus techniek de beperkende factor voor de verhoging van de gevoeligheid in het lage dosisgebied. Gezien ioniserende straling voornamelijk een clastogene werking heeft, zijn micronuclei door straling geïnduceerd meestal afkomstig van acentrische fragmenten en bevatten bijgevolg geen centromeer. Spontane micronuclei daarentegen zullen in een groot aantal gevallen wel een centromeer bevatten doordat chromosomen, die zich niet vasthechten aan het spoelfiguur tijdens metafase, achterblijven tijdens anafase en eventueel aanleiding geven tot micronuclei. Selectie van micronuclei zonder centromeer maakt bijgevolg een belangrijke verhoging van de gevoeligheid van de techniek mogelijk.

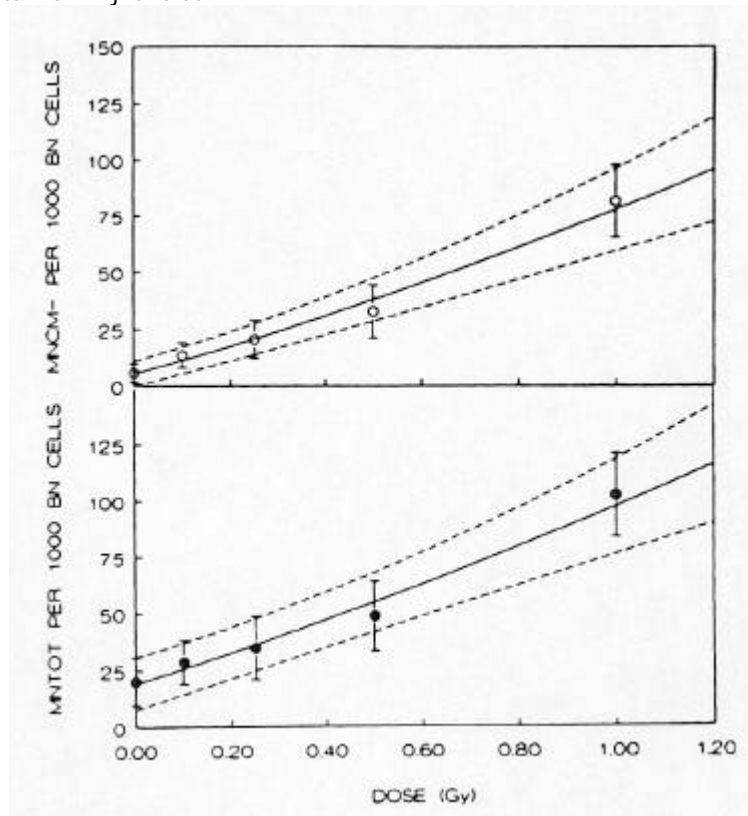
In dit kader werd de detectie van centromeren in micronuclei door middel van in situ hybridisatie (ISH) met de centromeer specifieke DNA probe p82H op punt gesteld en werd een studie uitgevoerd naar de aanwezigheid van een centromeer in spontane en stralingsgeïnduceerde micronuclei. Naast fluorescentie werd voor de visualisatie van de centromeren werd eveneens gebruik gemaakt van antilichamen gemerkt met peroxidase, gevolgd door een reactie met diaminobenzidine (DAB). Door deze laatste procedure worden permanent gekleurde preparaten bekomen.

In een eerste studie (Vral et al. 1997) werd met de op punt gestelde micronucleus-centromeer techniek bij veertien gezonde donoren de aanwezigheid van centromeren in de spontane micronuclei onderzocht. Deze resultaten toonden aan dat spontane micronuclei overwegend (gemiddeld in 73 % van de gevallen) een centromeer bevatten. Verder konden we concluderen dat de toename van het aantal micronuclei met de leeftijd (0.28 MN/jaar per 1000 binucleaire cellen) nagenoeg compleet kan worden toegeschreven aan de toename van het aantal centromeer positieve micronuclei (0.27 MN/jaar per 1000 binucleaire cellen) terwijl het aantal centromeer negatieve micronuclei constant blijft (gemiddelde 5.3 MN per 1000 binucleaire cellen, standaarddeviatie 1.9 per 1000). Er werd ook nagegaan in hoeverre de toediening van cytochalasin B en de cultuurtijd een effect zou hebben op de resultaten van de micronucleus-centromeer analyse. Er werd geen enkel effect waargenomen. Een studie van de grootte (oppervlakte) van de micronuclei toonde aan dat er geen correlatie van deze parameter is met het al dan niet aanwezig zijn van een centromeer.

In een tweede studie (Vral et al. 1997) uitgevoerd door de onderzoeksgroep van de RUG werd de verhoging van de gevoeligheid van de micronucleus techniek door de scoring van micronuclei voor de aanwezigheid

van een centromeer nagegaan. Hiervoor werden bloedstalen van zeven donoren in vitro bestraald met doses gaande van 0.1 tot 2 Gy ^{60}Co - γ -stralen. De micronucleus-centromeer analyse van deze bloedstalen toonde aan dat in het lage dosisgebied tot 2 Gy ioniserende straling slechts een gering aantal bijkomende centromeer-positieve micronuclei induceert terwijl het aantal centromeer-negatieve micronuclei lineair-kwadratisch toeneemt met de dosis. In figuur 1 wordt het dosis-respons verloop vergeleken van het aantal micronuclei (onderaan) en het aantal micronuclei zonder centromeer (bovenaan). De streeplijn geeft de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen op basis van de interindividuele verschillen. Deze figuur toont aan dat de scoring van enkel de centromeer negatieve micronuclei een belangrijke verhoging van de gevoeligheid in het lage dosisgebied tot gevolg heeft in vergelijking met de klassieke micronucleus techniek.

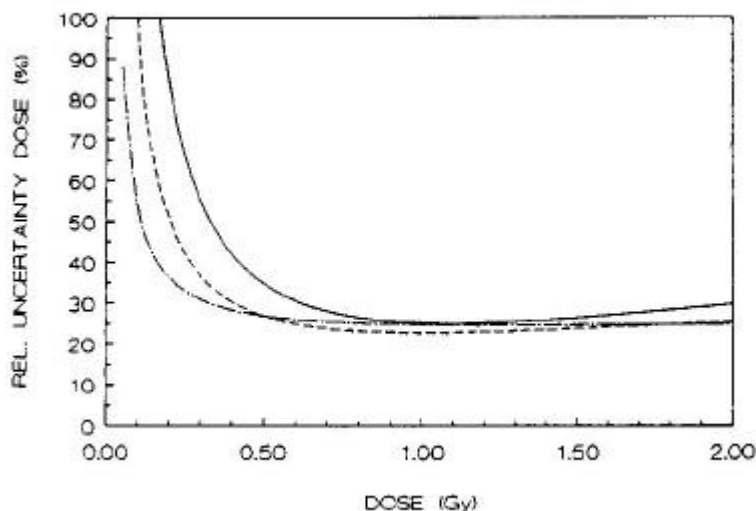
Uit de verwerking van de resultaten samengevat in figuur 1 volgt dat de drempeldosis van 0.25 Gy detecteerbaar met een waarschijnlijkheid van 95 % via de conventionele micronucleus test kan verlaagd worden tot 0.1 Gy bij de gecombineerde centromeer-micronucleus test. Deze dosisdrempels gelden voor biologische dosimetrie in het geval van individuele stralingsaccidenten zonder voorkennis van de individuele controle waarde vóór de blootstelling. Indien dit laatste wel het geval is daalt deze drempel verder tot 0,05 Gy. Hiermee wordt dan het gebied bereikt van de wettelijk vastgestelde dosislimieten toegelaten voor werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling. In dit kader werd eveneens de variatie op het spontaan aantal optredende micronuclei nagegaan bij zeven donoren over een periode van twee jaar: de gemiddelde variatie bedraagt 3,3 micronuclei, wat binnen de statistische onzekerheid valt op basis van de Poisson statistiek. Deze laatste werkwijze leidt



Figuur 1. Dosis-respons verloop van het totaal aantal micronuclei (●)(onderaan) en het aantal centromeer-negatieve micronuclei (○)(bovenaan) per 1000 binucleaire cellen na in vitro bestraling van bloedstalen met ^{60}Co - γ -stralen. De volle lijnen zijn het resultaat van een lineair-kwadratische aanpassing. De streeplijnen stellen de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen voor.

dus tot een betrouwbare en praktisch bruikbare inschatting van de onzekerheid op het aantal micronuclei. Het verloop van de relatieve onzekerheid op een dosisbepaling gebaseerd op het totaal aantal micronuclei, het aantal micronuclei zonder centromeer en het aantal stralingsgeïnduceerde micronuclei via figuur 1 is weergegeven in figuur 2. Hieruit volgt dat de scoring van de aanwezigheid van een centromeer in de micronuclei vooral interessant is bij dosissen beneden 0.5 Gy. Boven 1 Gy heeft de detectie van de centromeren geen zin meer.

Ten einde de bruikbaarheid en de gevoeligheid van de centromeer-micronucleus techniek na te gaan bij blootstelling aan neutronenstraling werden aan de RUG bloedstalen van zes donoren in vitro bestraald met doses gaande van 0.05 tot 2 Gy snelle neutronen. Een voorlopige analyse van de preparaten bevestigt de hoge RBE waarde van dit type straling.

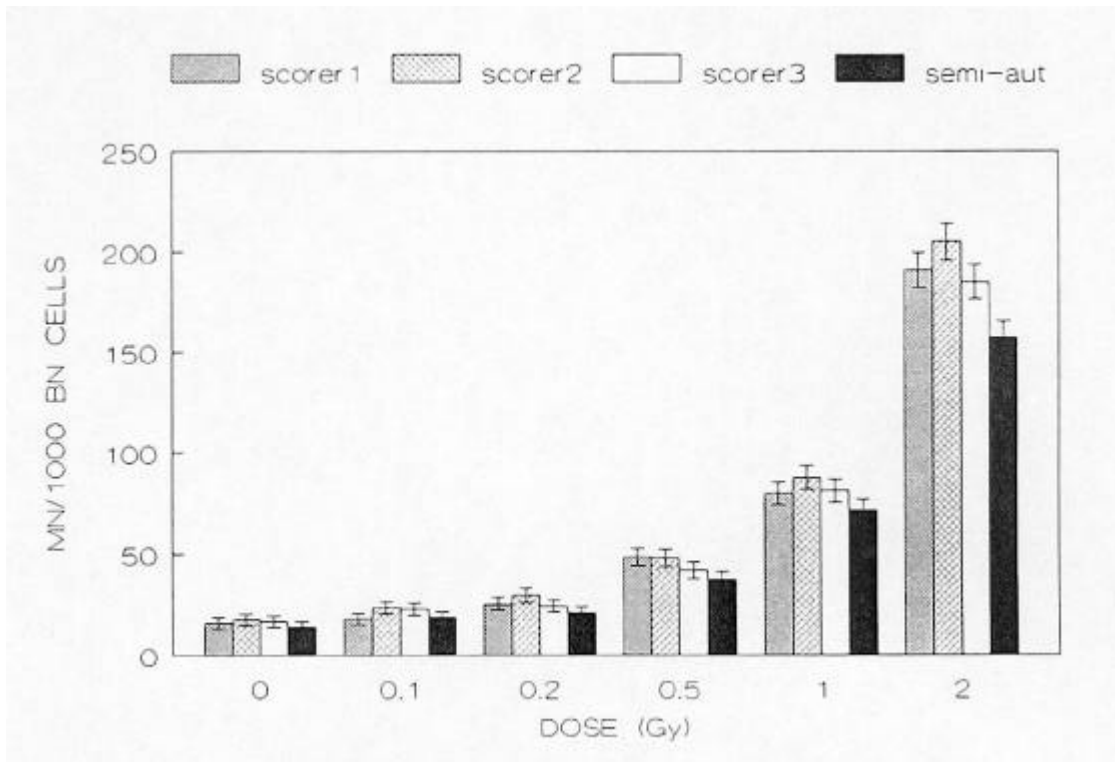


Figuur 2 Het verloop van de relatieve onzekerheid op een dosisbepaling gebaseerd op het totaal aantal micronuclei (volle lijn), het aantal micronuclei zonder centromeer (streeplijn) en het aantal stralingsgeïnduceerde micronuclei (streep-puntlijn) (na aftrekking van het aantal spontane micronuclei).

De resultaten tonen verder aan dat voor dit type hoge LET straling zowel het aantal centromeer-negatieve als het aantal centromeer positieve micronuclei lineair toeneemt met de dosis. Het aantal centromeer-positieve micronuclei, wijzend op chromosoomverlies veroorzaakt door straling bedraagt echter slechts ongeveer 10 % van het aantal centromeer-negatieve. Deze resultaten tonen verder aan dat de micronucleus-centromeer analyse detectie toelaat van neutronenblootstellingen vanaf 0.05 Gy.

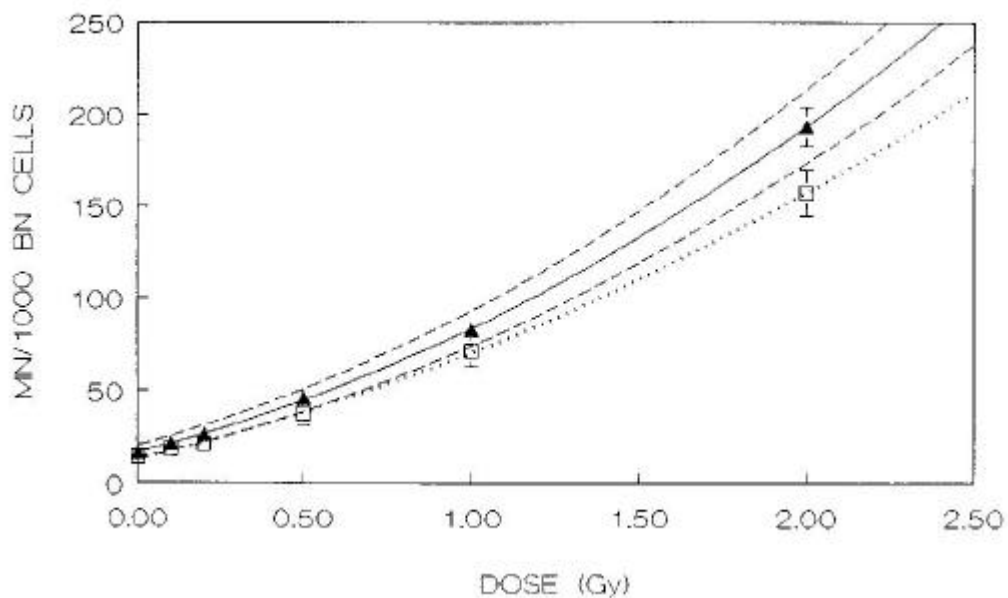
Validatie van de semi-automatische scoring van micronuclei via gecomputeriseerde beeldanalyse

Voor de validatie van de semi-automatische scoringsprocedure uitgewerkt door de onderzoeksgroep van de RUG in het kader van het impulsprogramma "Gezondheidsrisico's" werden de micronucleus opbrengsten bekomen via gecomputeriseerde beeldanalyse vergeleken met de resultaten van een manuele microscopische scoring door drie ervaren scorers. Deze studie gebeurde op plaatjes afkomstig van controle bloedstalen en bloedstalen bestraald in vitro met doses gaande van 0.1 tot 2 Gy met ^{60}Co - γ -stralen. Voor deze studie werden vijf donoren beschouwd. De resultaten van deze vergelijkende studie zijn voorgesteld in figuur 3. Deze figuur geeft de waarden van het aantal micronuclei per 1000 binucleaire cellen, uitgemiddeld over de vijf donoren waarbij telkens 2000 cellen werden gescoord. Uit deze figuur blijkt dat voor dosiswaarden tot 1 Gy de waarden voor de micronucleusopbrengst bekomen met de automatische scoring in goede overeenkomst zijn met de resultaten bekomen door manuele microscopische scoring, rekening houdend met de spreiding op de waarden tussen de verschillende scorers. Voor 2 Gy geeft de gecomputeriseerde beeldanalyse een geringe doch systematische onderschatting van het aantal micronuclei. Visuele inspectie na relocatie van elk object geselecteerd door het computersysteem toont aan dat deze onderschatting dient te worden toegeschreven aan een beperkt aantal (3 %) vals-negatieven, afkomstig van micronuclei, die zeer sterk overlappen met de kern.



Figuur 3. Vergelijking tussen de resultaten van de manuele scoring door drie ervaren scorers (gearceerde en open balken in het histogram) en de data bekomen via geautomatiseerde scoring met gecomputeriseerde beeldanalyse (volle balken in het histogram). Deze figuur geeft de waarden van het aantal micronuclei per 1000 binucleaire cellen, uitgemiddeld over de vijf donoren waarbij telkens 2000 cellen werden gescoord. De aangegeven onzekerheden stellen 95 % betrouwbaarheidsgrenzen voor gebaseerd op Poisson statistiek.

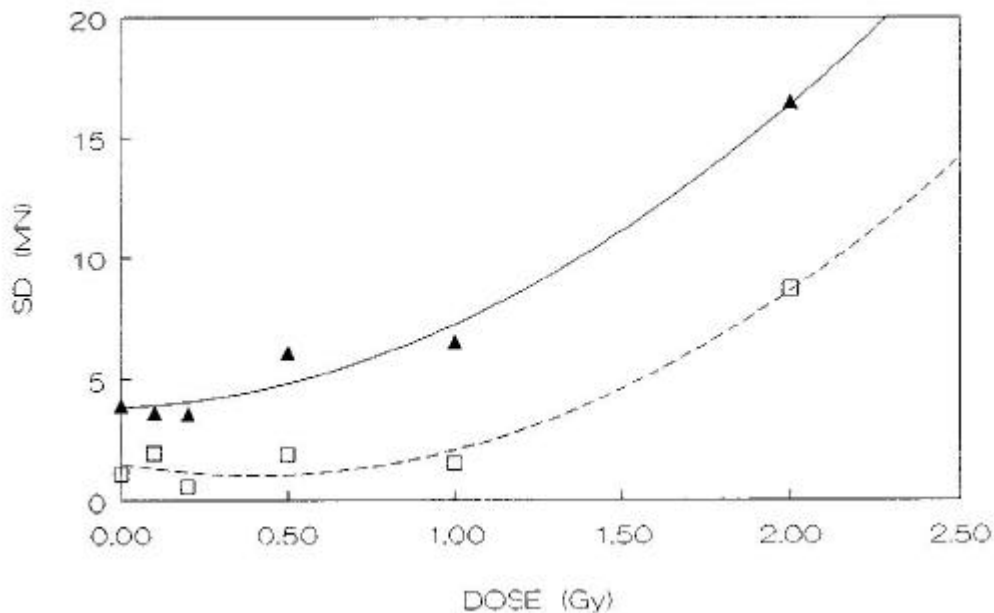
Als conclusie kunnen we hier stellen dat de automatische scoring betrouwbare resultaten oplevert voor biologische dosimetrie in het geval van stralingsaccidenten en werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling wanneer als referentiecurve de in-vitro dosis-respons wordt genomen bekomen via dezelfde scoringsprocedure (figuur 4).



Figuur 4. Vergelijking tussen de dosis-respons curven bekomen via semi-automatische (puntlijn) en manuele scoring (volle lijn). De streeplijnen geven de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen aan afgeleid uit de onderlinge verschillen tussen de scorers.

In figuur 5 wordt het verloop van de standaard deviatie op de micronucleus opbrengsten manueel bekomen door de drie scorers (driehoekjes) vergeleken met de standaard deviaties van de resultaten bekomen door drie opeenvolgende semi-automatische screenings van de preparaten (vierkantjes). Uit deze figuur blijkt dat de reproduceerbaarheid van de resultaten bij gecomputerizeerde beeldanalyse groter is dan bij manuele scoring.

De resultaten van dit werk werden gepubliceerd in "The International Journal of Radiation Biology" (Thierens et al.1997).



Figuur 5. Verloop van de standaard deviatie op de micronucleus opbrengsten, manueel bekomen door de drie scorers (driehoekjes) vergeleken met de standaard deviaties van de resultaten bekomen door drie opeenvolgende semi-automatische screenings van de preparaten (vierkantjes). De volle en de streeplijn stellen een lineair-kwadratische aanpassing voor door de data.

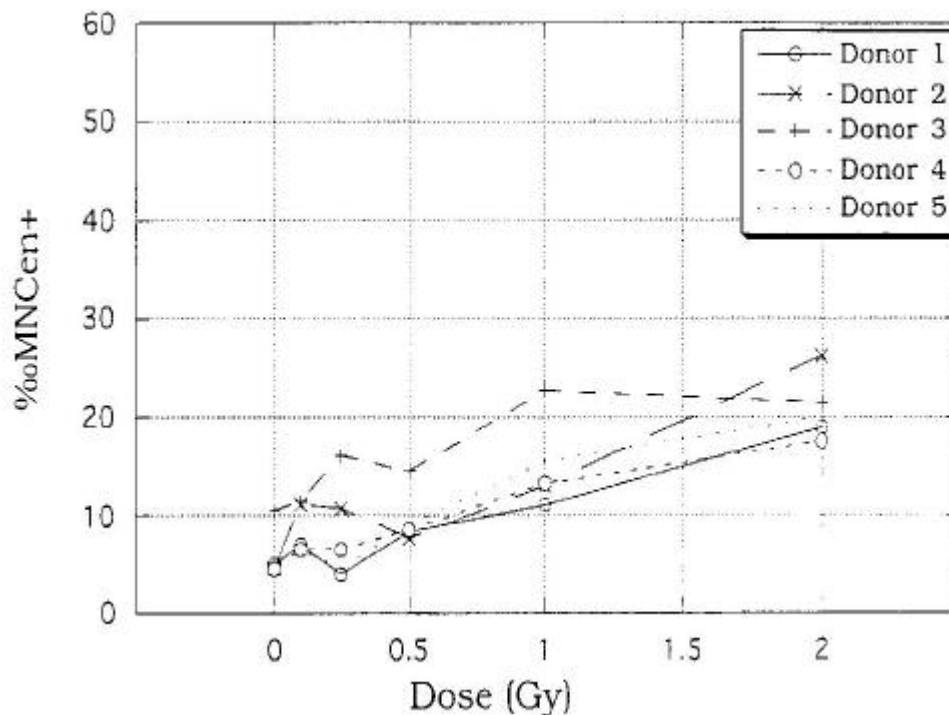
II.1.2. Analyse van aneuploidie in cytokinesis-geblokkeerde lymfocyten

Wat betreft de evaluatie van stralingsgeïnduceerde non-disjunctie, vermelden Uchida en medewerkers (1975) dat non-disjunctie van chromosomen kan optreden bij lymfocyten na een lage dosis ^{137}Cs γ -stralen. Deze conclusie wordt ondersteund door Natarajan en medewerkers (1991), die aneuploï die rapporteerden in lymfocyten van de slachtoffers van het nucleair ongeval in Goiana. Kirsch-Volders en medewerkers (1996) suggereren dat non-disjunctie een mechanisme is verantwoordelijk voor mitotische fouten bij lymfocyten na in vitro blootstelling.

De productie van aneuploïde cellen bij mitose gebeurt via chromatiden non-disjunctie of chromosoom verlies. Wanneer de zuster-chromatiden zich niet naar behoren van elkaar scheiden en naar de tegenovergestelde polen migreren bij de celdeling ontstaat een celkern waar één chromosoom ontbreekt en een celkern met een extra chromosoom, wat non-disjunctie wordt genoemd. Wanneer echter een chromosoom achterblijft tijdens de mitose door defecten bij de vasthechting aan het spoelfiguur, wordt dit chromosoomverlies genoemd. Deze chromosomen manifesteren zich dan na de celdeling als micronuclei in het cytoplasma.

Door het Laboratorium voor Cellulaire Genetica van de VUB werd de inductie van aneuploï die in vitro door ioniserende stralen in menselijke lymfocyten in het lage dosis gebied onderzocht. Hierbij werd ingegaan op de inductie van non-disjunctie versus chromosoom verlies door ^{60}Co γ stralen. Hiervoor werden bloedstalen van vijf donoren in vitro bestraald bij 37 °C met de volgende dosissen: 0.1, 0.25, 0.5, 1 en 2 Gy.

Bij dit onderzoek werden de volgende methodes toegepast voor analyse van de aneuploidie. Via fluorescente in situ hybridisatie (FISH) met een pancentromerische probe SO- α -AllCen op cytochalasine-B geblokkeerde lymfocyten wordt chromosoomverlies tijdens de eerste in vitro celdeling opgespoord via de detectie van centromeren in micronuclei. Na dubbele merking met centromeersequenties specifiek voor de chromosomen 1 en 17 via FISH, toegepast op cytochalasine-B geblokkeerde lymfocyten, laat de detectie van de signalen in de twee macronuclei detectie toe van de non-disjunctie, waarbij de chromosomen 1 en 17 betrokken zijn.



Figuur 6. De frequenties van centromeer positieve micronuclei (% MNCen+) in binucleaire lymfocyten voor de verschillende donoren als functie van de dosis na in vitro bestraling met ^{60}Co - γ -stralen.

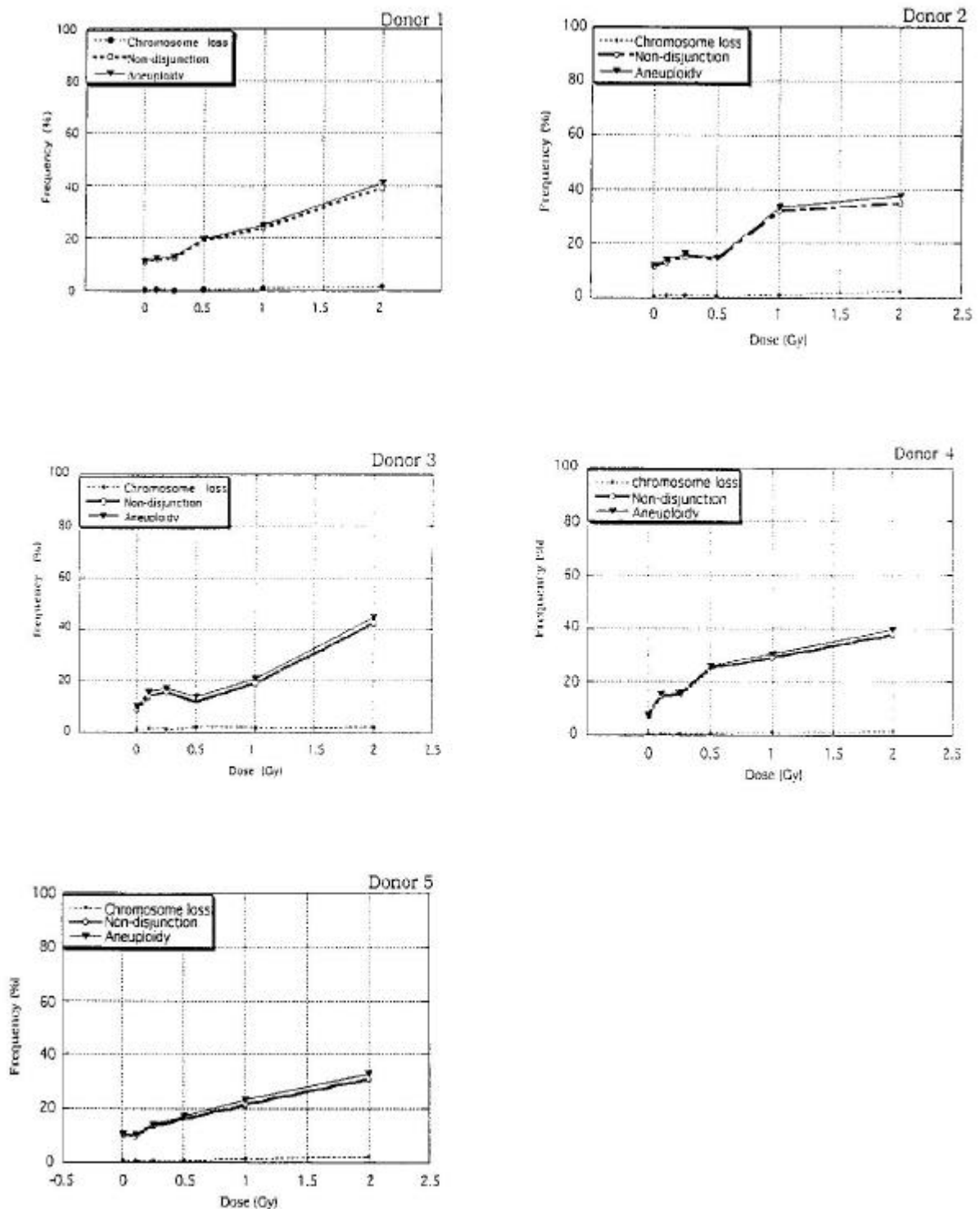
De resultaten van deze studie tonen geen statistisch significante verhoging van chromosoomverlies en non-disjunctie door straling voor dosissen onder de 1 Gy. Voor 1 Gy en hogere dosiswaarden wordt voor alle donoren een dosis afhankelijke toename van beide processen waargenomen. Ter illustratie wordt in figuur 6 de resultaten van deze studie voor de frequentie van centromeer-positieve micronuclei, representatief voor chromosoomverlies, weergegeven.

Na correctie van de non-disjunctie data voor het totaal genoom komt uit de studie komt naar voor dat non-disjunctie verreweg het belangrijkste proces is bij stralingsgeïnduceerde aneuploidie die wat geïllustreerd wordt in figuur 7. De resultaten wijzen er ook op dat de aneugene effecten van straling duidelijk minder dosisafhankelijk zijn dan de clastogene effecten in het lage dosis gebied, wat wijst op het bestaan van een dosis drempel. Ten slotte toont deze studie het belang aan van biomonitoring van individuen blootgesteld aan straling voor aneugene effecten. Aneuploidie speelt een belangrijke rol in de cancerogenese (Oshimura and Barret 1986).

II.1.3. Scoring van chromosoomaberraties via "multicolour FISH".

Literatuurgegevens hebben aangetoond dat ioniserende stralingen naast instabiele chromosoomaberraties als dicentrische chromosomen, ringen en acentrische fragmenten eveneens stabiele aberraties als translocaties induceren. Observatie van deze aberraties gebeurt in metafase preparaten van lymfocyten. De scoring van dicentrische chromosomen is de referentie cytogenetische methode van de biologische dosimetrie. De incidentie frequentie van dicentrische vermindert echter met de tijd na een blootstelling aan ioniserende stralingen. Deze daling is veel minder uitgesproken bij de stabiele aberraties, de translocaties. Meer nog, translocaties kunnen aan de basis liggen van de activatie van oncogenen en inhibitie van anti-oncogenen.

Deze eigenschappen tonen het grote belang aan van de scoring van translocaties voor biomonitoring van populaties beroepshalve blootgesteld aan straling. Van translocaties is aangetoond dat ze bruikbaar zijn als indicator van genetische schade bij chronische of repetitieve blootstellingen.

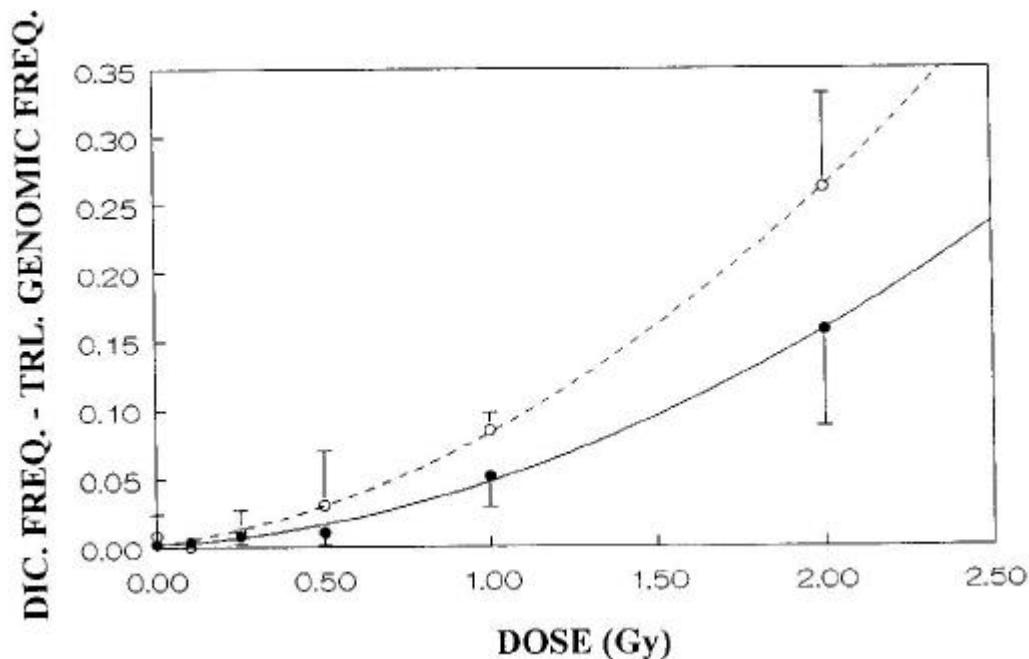


Figuur 7. De frequenties van non-disjunctie voor het totale genoom, chromosoomverlies en aneuploidie (spontane en *g*geïnduceerd) voor de verschillende donoren als functie van de dosis na *in vitro* bestraling met ⁶⁰Co *g*stralen.

De huidige toegepaste methode voor detectie van chromosoomaberraties is multicolour FISH. Deze methode werd in het kader van het netwerk op punt gesteld door de onderzoeksgroep ORME van de CHU Liège. Hiervoor wordt een bloedcultuur gestart en geïncubeerd voor 52 uur bij 37°C. Eén uur en een kwart vóór

collectie van de cellen wordt colcemid toegevoegd. Op de bekomen preparaten wordt een fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) toegepast. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een cocktail van chromosoom-specifieke proben: WCP 2 spectrum groen, WCP 2 spectrum oranje, WCP 4 spectrum groen en WCP spectrum oranje. Dit laat detectie toe van de translocaties waarbij de chromosomen 2, 4 of 8 zijn betrokken. Deze chromosomen bevatten ongeveer 19 % van het chromosomaal materiaal van het genoom.

De op punt gestelde techniek werd gevalideerd op bloedstalen van zes donoren in vitro bestraald met ^{60}Co γ stralen met de volgende dosissen: 0.1, 0.25, 0.5, 1 en 2 Gy. In figuur 8 wordt het dosis-repons verloop voor de dicentrische chromosomen vergeleken met het verloop voor de genoom translocatie frequentie. Hiervoor werden de gegevens van alle donoren, bekomen door scoring van 200 metafasen per donor uitgemiddeld.



Figuur 8. De frequentie van dicentrische chromosomen (volle punten) en de genoom translocatie frequentie (open cirkels) uitgemiddeld over alle donoren als functie van de dosis na in vitro bestraling met ^{60}Co - γ stralen. De foutenvlaggen stellen de standaarddeviatie over de donoren voor.

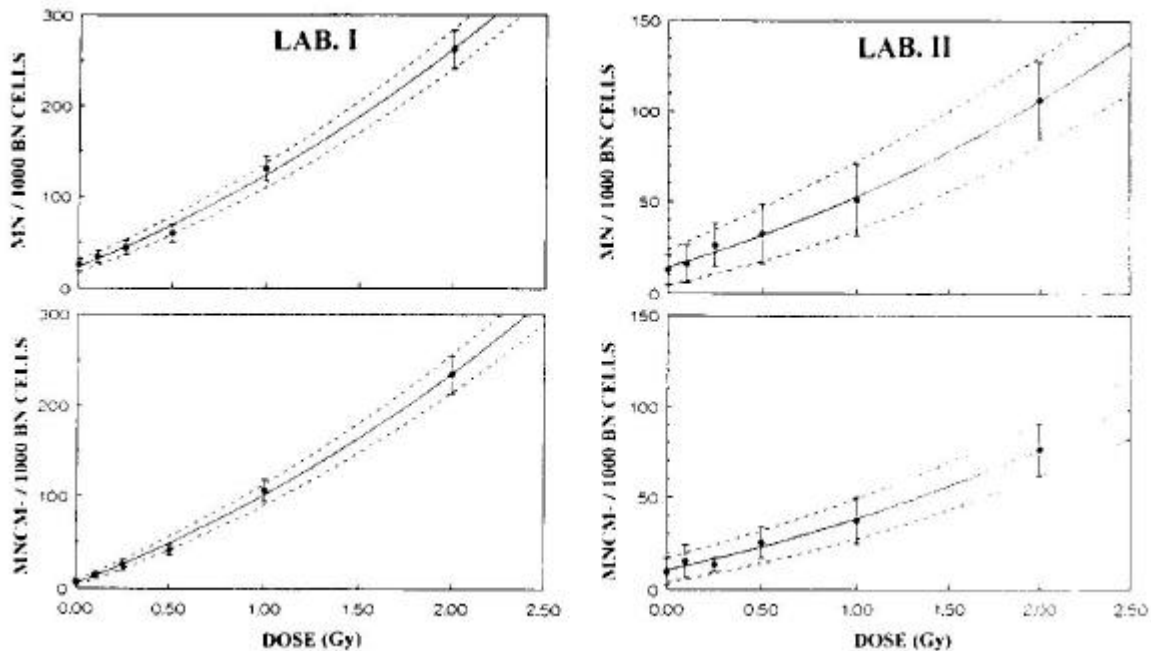
De frequentie van de dicentrische chromosomen werd bepaald op conventionele Giemsa preparaten. De genoom translocatie frequentie werd afgeleid uit de translocatie frequenties voor de chromosomen 2, 4 en 8 bekomen via multicolour FISH. Hiervoor werd gebruik gemaakt methode van Lucas et al. (1992), waarbij wordt ondersteld dat de geobserveerde translocatiefrequentie evenredig is met de chromosoomlengte. Zowel met betrekking tot de dicentrische als tot de translocaties zijn de resultaten voorgesteld in figuur 8 in overeenstemming met de referentie literatuur (Lucas et al. 1995). Hieruit volgt dat we met de op punt gestelde multicolor FISH techniek in staat zijn de translocatie frequentie te bepalen op een betrouwbare wijze voor populaties beroepshalve blootgesteld aan straling.

II.2. Vergelijkende studie tussen verschillende cytogenetische eindpunten voor de biomonitoring van werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling

In een collaboratieve studie hebben de partners van het netwerk een onderzoek uitgevoerd naar het optreden van verschillende cytogenetische eindpunten van stralingsschade op bloedstalen van zes donoren bestraald in vitro met doses gaande van 0.1 tot 2 Gy γ -stralen. Gezien voor de scoring hetzelfde uitgangsmateriaal werd gebruikt laat dit onderzoek een vergelijkende studie toe van de gevoeligheid en toepasbaarheid van de beschouwde cytogenetische eindpunten voor de detectie van stralingsschade in het lage dosisgebied.

Als eerste techniek, werd de micronucleus-centromeer methode toegepast door de onderzoeksgroepen van de RUG en de VUB. Hierbij werd de methodologie, in de eerste fase van het project in deze laboratoria geoptimaliseerd, toegepast. Voor de detectie van centromeren in micronuclei via fluorescentie in situ

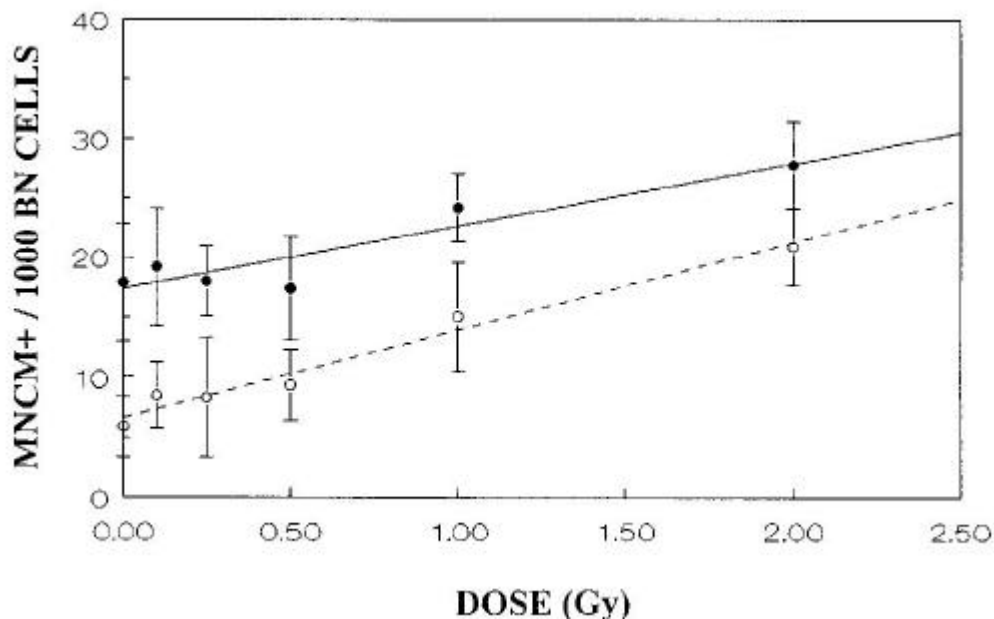
hybridisatie werden twee verschillende pancentromerische DNA proben, nl. de p82H en de SO α IIICen proben gebruikt. Daarnaast werd door de onderzoeksgroep RUG alle dus eveneens gedeeltelijk met de kernen overlappende micronuclei geteld terwijl de onderzoeksgroep VUB enkel niet overlappende micronuclei in rekening bracht. In figuur 9 worden de dosis-antwoord curven met betrekking tot het totaal aantal micronuclei en tot de centromeer-negatieve micronuclei weergegeven. De foutenvlaggen geven de standaarddeviaties op het dosis-antwoord verloop te wijten aan de interindividuele verschillen.



Figuur 9. Het dosis-respons verloop bekomen met de conventionele micronucleus test (bovenaan) en de micronucleus-centromeer test met score van enkel de centromeer-negatieve micronuclei (onderaan) na *in vitro* bestraling met ^{60}Co γ stralen. Links zijn de resultaten van de RUG voorgesteld, rechts de resultaten van de VUB. De volle lijn is een lineair-kwadratische fit door het gemiddelde gedrag. De streeplijnen stellen functionele fits voor door de standaarddeviaties.

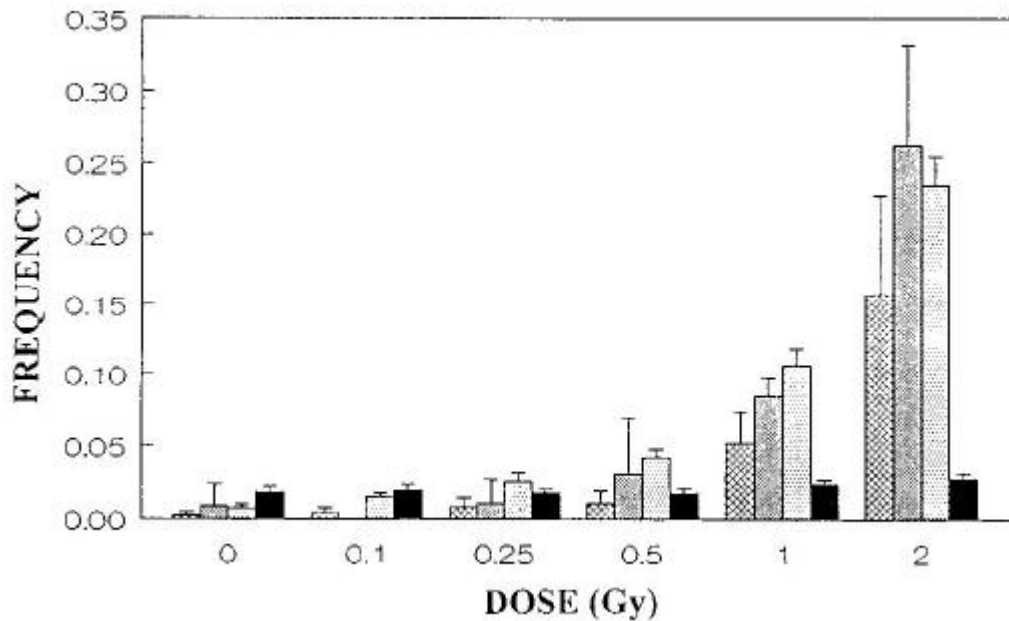
Deze figuur toont aan dat deze interindividuele verschillen in het lage dosis gebied geringer zijn wanneer enkel de centromeer-negatieve micronuclei worden geteld. Verder zijn de variaties in de gegevens van de VUB groter door geringere statistische nauwkeurigheid gezien enkel niet-overlappende micronuclei worden geteld. Wanneer 2000 binucleaire cellen worden gescoord, wat slechts enkele uren in beslag neemt, ligt de dosislimiet voor individuele detectie van stralingsschade met 95 % statistische betrouwbaarheid bij 0.2 en 0.5 Gy bij toepassing van respectievelijk de methoden van de RUG en VUB. Toepassing van de FISH procedure met een pancentromerische probe en score van enkel de centromeer-negatieve micronuclei verlaagt deze grenzen tot respectievelijk 0.1 en 0.3 Gy.

De gegevens, bekomen door beide laboratoria met betrekking tot centromeer-positieve micronuclei als functie van de dosis, zijn voorgesteld in figuur 10. Deze figuur toont een geringe doch systematische toename van het aantal centromeer-positieve micronuclei met de dosis. Deze toename wordt waargenomen met beide pancentromerische proben niettegenstaande verschillen voor de controlestralen. Deze observatie bevestigt dat ioniserende stralen naast clastogene eveneens aneugene eigenschappen vertoont.



Figuur 10. De frequenties van centromeer positieve micronuclei bekomen met de p82H (volle punten, RUG) en de SO aAllCen (open cirkels, VUB) proben in binucleaire lymfocyten. Deze figuur geeft de waarden van het aantal micronuclei per 1000 binucleaire cellen na in vitro blootstelling met ^{60}Co - γ -stralen.

Ter vergelijking met de resultaten bekomen met de micronucleus-centromeer techniek werd een studie uitgevoerd naar het aantal translocaties en dicentrische chromosoomafwijkingen in de in vitro bestraalde bloedstalen. Dit onderzoek werd uitgevoerd in het Laboratorium ORME van de Universit  de Liège. Voor de scoring van translocaties wordt gebruik gemaakt van multicolor in situ hybridisatie met proben specifiek voor de chromosomen 2, 4 en 8. Uit de geobserveerde translocatie frequenties werd de genoom translocatie frequentie F_3 afgeleid zoals beschreven onder II.1.3. Voor de spontane F_3 frequentie werd een gemiddelde waarde van 0,0086 per metafase bekomen. Vergelijking van het geobserveerd aantal translocaties, waarbij chromosoom 2, 4 en 8 betrokken is, met de relatieve DNA inhoud van deze chromosomen toont dat chromosoom 2 enigzins ondervertegenwoordigd is in het geobserveerd aantal translocaties terwijl chromosoom 4 oververtegenwoordigd is. Voor de studie werden per donor en dosiswaarde 200 tot 300 metafasen geanalyseerd voor dicentrische afwijkingen en 100 tot 400 metafasen voor translocaties. Deze analyse nam per donor en dosiswaarde nagenoeg  en dag in beslag. Uit de bekomen resultaten kan worden afgeleid dat bij score van een paar honderd metafasen de dosislimiet ongeveer bij 1 Gy ligt voor individuele detectie van stralingschade met 95 % statistische betrouwbaarheid via analyse van translocaties. Voor dicentrische bedraagt de dosislimiet onder identieke voorwaarden 0.5 Gy. Score van een groter aantal metafasen kan deze limiet naar beneden brengen doch dit vergt dan analysetijden van verschillende dagen, niet toepasselijk bij biomonitoring van populaties van minstens een paar honderd werknemers. Een directe vergelijking van de frequentie van de verschillende cytogenetische eindpunten per cel, beschouwd in de studie, als functie van de dosis is weergegeven in figuur 11.

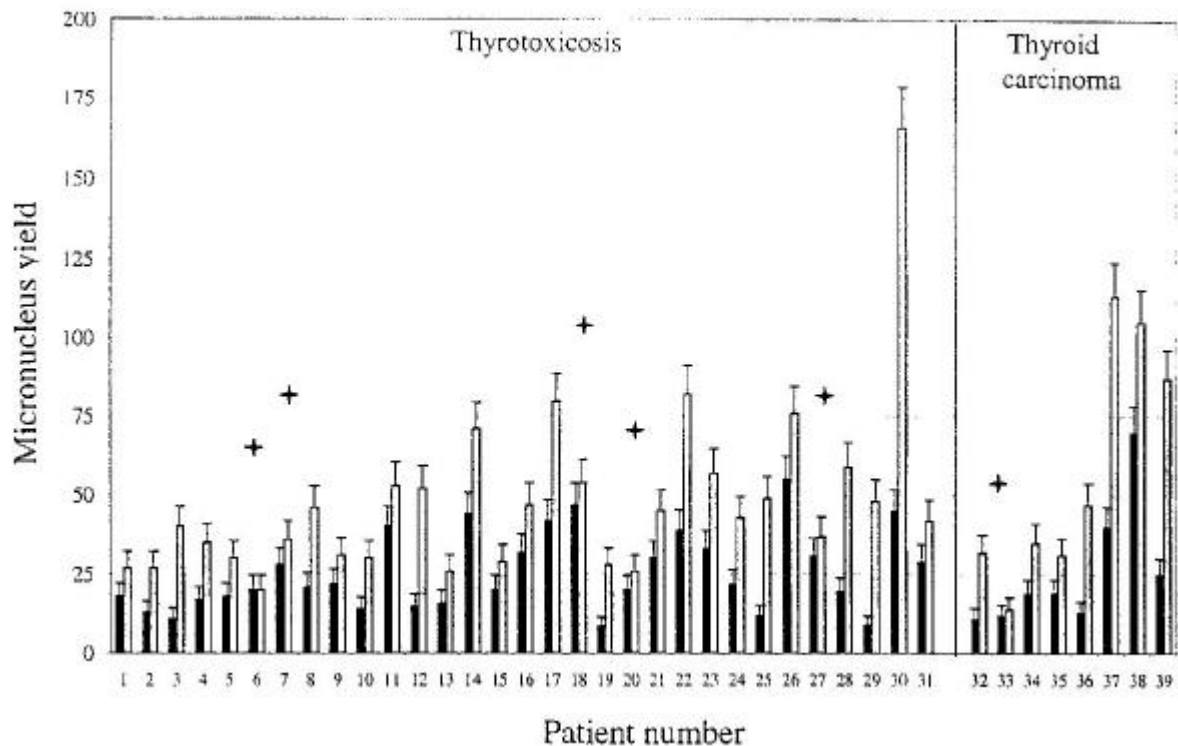


Figuur 11. Dosis-antwoord verloop voor het aantal dicentrische chromosoomafwijkingen, de genoom translocatie frequentie F_G , het aantal centromeer-negatieve micronuclei en het aantal centromeer-positieve micronuclei per cel. De foutenvlaggen zijn de standaarddeviaties te wijten aan interindividuele verschillen tussen de donoren.

Uit de doorgevoerde vergelijkende studie kunnen we besluiten dat momenteel enkel de micronucleus-centromeer techniek een hoge gevoeligheid kan combineren met een aanvaardbare analysetijd voor de biomonitoring van een relatieve grote populatie zoals werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling. In gevallen van hoge blootstelling en bij individuele stralingsongevallen is eveneens de scoring van translocaties aangewezen in het licht van de directe link met carcinogenese. De resultaten van deze studie werden gepubliceerd in "The International Journal of Radiation Biology" (Thierens et al. 1999).

II.3. Validatie van de cytogenetische eindpunten via bloedstalen van patiënten medisch blootgesteld aan straling

Voor de in vivo validatie van de micronucleus-centromeer techniek werd een studie gestart naar de stralingsschade in de perifere bloed lymfocyten bij patiënten die een therapie ondergaan met radioactief jodium (^{131}I) voor de behandeling van hyperthyroïdie en schildkliercarcinoom. Van elke patiënt werd een bloedstaal afgenomen vóór therapie en één week na toediening van het jodium. Van elke patiënt werd de radiosensitiviteit bepaald via in vitro bestraling van fracties van het bloedstaal afgenomen vóór therapie. De bestudeerde populatie bestaat uit 8 carcinoompatiënten en 31 patiënten behandeld voor goedaardige schildklierandoeningen. Een overzicht van de toename van het aantal micronuclei één week na de toediening voor een aantal van de patiënten is weergegeven in figuur 12.



Figuur 12. Toename van het aantal micronuclei bij een aantal patiënten door de toediening van het radioactief jodium.

Dit onderzoek toonde aan dat de toegepaste cytogenetische techniek een individuele bepaling toelaat van de totale lichaamsdosis bij deze patiënten. Naast de activiteit aanwezig in de thyroïd blijkt eveneens de activiteit aanwezig in de circulatie een belangrijke bijdrage te leveren tot de totale lichaamsdosis. Als belangrijke conclusie komt naar voor dat bij een belangrijke besmetting met radioactief jodium (meer dan 200 MBq) de micronucleus techniek bruikbaar is voor de bepaling van de genetische stralings schade in de perifere bloed lymfocyten en de equivalente totale lichaamsdosis.

Bij negen patiënten van de studie werden eveneens bloedstalen afgenomen zes maand na de therapie en werd een analyse uitgevoerd van het aantal translocaties veroorzaakt door de therapie met behulp van de op punt gestelde multicolor FISH methode. De resultaten van deze analyse uitgevoerd door het Laboratorium ORME van de CHU Liège zijn weergegeven in onderstaande tabel. Voor elke patiënt zijn opgegeven: het aantal metafasen geanalyseerd, het aantal geobserveerde "one way" en "two way" translocaties en het aantal genoom translocaties per cel afgeleid met de methode van Lucas (1992).

Tabel: overzicht van de resultaten van de multicolour FISH methode voor de detectie van translocaties bij een aantal patiënten behandeld met radioactief jodium.

Patiënt	Cellen geobs.	One way translocaties	Two way translocaties.	Totaal aantal translocaties.	Gen.transl. per cel
1	559	6	8	14	0.187
2	523	3	8	11	0.157
3	501	0	6	6	0.089
4	532	3	4	7	0.098
5	520	2	6	8	0.110
6	558	5	7	12	0.161
7	520	7	7	14	0.201
8	543	6	13	19	0.262
9	608	5	5	10	0.123

Deze resultaten tonen aan dat zes maand na een blootstelling evaluatie van de genetische schade via de scoring van translocaties met de op punt gestelde methodologie mogelijk is. Deze studie ondersteunt de bruikbaarheid van translocaties als cumulatieve biologische indicator van stralingschade bij chronische blootstellingen. Observatie van de metafasepreparaten voor elke patiënt nam echter twee dagen in beslag zodat deze methode voor toepassingen op de werkplaats beperkt is tot een aantal individuele gevallen met hoge blootstelling.

III. DE BESTUDEERDE STEEKPROEFPOPULATIES

III.1. Populatie van werknemers uit de medische sector blootgesteld aan straling

Met de micronucleus-centromeer techniek werd een screening naar opgelopen stralingschade uitgevoerd bij personeelsleden van het Universitair Ziekenhuis Gent in samenwerking met de lokale arbeidsgeneeskundige dienst IDEWE. Voor de studie werden 120 personeelsleden werkzaam in veertien verschillende diensten van het ziekenhuis beschouwd. De studiepopulatie werd ingedeeld in twee grote groepen. De eerste groep, de studiegroep, bestond uit 71 werknemers, die een beduidende stralingsbelasting oplopen (meer dan 1 mSv/jaar), afkomstig uit tien diensten van het ziekenhuis (cardiologie, hartbewaking-pacemaker, hartrevalidatie, kerngeneeskunde, pijnkliniek, gastro-enterologie, PET-centrum, urologie, radiologie en radiotherapie). De tweede groep, de controlegroep, bestond uit 49 personen, die een verwaarloosbare stralingsbelasting oplopen, werkzaam in de volgende diensten: neonatologie, hartbewaking, spoedopname en brandwondencentrum. Alle betrokken personen gaven hun schriftelijke toestemming nadat ze uitvoerig waren ingelicht over de studie. Ze vulden tevens een formulier in met de voor de studie noodzakelijke informatie (geslacht, leeftijd, rookgedrag, dienst, medische blootstellingen). Het rookgedrag werd uitgedrukt in sigaretjaren met één sigaretjaar gedefinieerd als gedurende één jaar één sigaret per dag roken. De bloedafnames werden zoveel mogelijk verricht tijdens het periodiek geneeskundig onderzoek door de arbeidsgeneeskundige dienst. Op het betrokken formulier werd door deze dienst de gecumuleerde uitwendige blootstelling over het laatste jaar en de laatste tien jaar volgens de fysische dosimetrie ingevuld. Het formulier was naamloos: door de arbeidsgeneeskundige dienst werd aan elk personeelslid een code toegekend. Deze code werd eveneens vermeld op het bloedstaal voor de analyse.

De studiegroep bestond uit 36 mannen en 35 vrouwen, de controlegroep uit 12 mannen en 37 vrouwen. Ongeveer de helft van de werknemers waren niet-rokers. In onderstaande tabel zijn de gegevens aangaande de gemiddelde waarden van de leeftijd, aantal sigaretjaren, stralingsbelasting over het laatste jaar en de voorbije 10 jaar van studie- en controle groep weergegeven. De waarden tussen haakjes stellen de waarden van de standaarddeviatie binnen de populaties voor.

Tabel: gegevens met betrekking tot de studie- en controlegroep

	Leeftijd	Sigaret jaren	H (mSv) Laatste Jaar	H (mSv) Laatste 10 jaar	M	F
Studie Groep	41.6 (8.3)	102 (256)	1.79 (2.55)	11.25 (18.02)	35	36
Controle Groep	39.9 (6.4)	79 (145)	0.12 (0.18)	0.96 (0.86)	12	37

III. 2. Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Doel

Na voorstelling werd het akkoord voor de studie bekomen van de directie en het Comité voor Veiligheid, Gezondheid en Verfraaiing van de Werkplaatsen van het kernpark van Doel (Electrabel). De studie verliep in een nauwe samenwerking met de arbeidsgeneeskundige dienst CBMT ter plaatse. Alle werknemers, die deel namen aan de studie werden zowel mondeling als schriftelijk geïnformeerd over de studie. Voor de screening van de werknemers van het kernpark Doel naar genetische schade werd de micronucleus-centromeer techniek toegepast op een bloedstaal van 215 werknemers. Alle deelnemers waren van het mannelijk geslacht.

Voor de studie werd het volgende protocol gevolgd. Na schriftelijk akkoord vulden de werknemers een vragenlijst in zoals bij de studie van de werknemers uit de medische sector en een bloedstaal werd afgenomen ter gelegenheid van het wettelijk verplicht medisch onderzoek. Elk deelnemer aan de studie werd gecodeerd en deze code werd eveneens aangebracht op het bloedstaal. Voor de analyse van de resultaten

werden twee procedures gevolgd. Bij de eerste procedure werden de werknemers onderverdeeld in groepen volgens leeftijd (3 groepen: 30-39, 40-49, 50-59 jaar), de stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste 10 jaar (4 groepen: $H < 10$ mSv, $10 \text{ mSv} < H < 20$ mSv, $20 \text{ mSv} < H < 50$ mSv, $50 \text{ mSv} < H$) en rookgewoonten (2 groepen: rokers en niet-rokers). De tweede procedure was analoog doch nu werd bij de invloed van de stralingsbelasting rekening gehouden met het halfleven van perifere bloed lymfocyten in de bloedbaan nl. 3 jaar. De stralingsbelasting van de werknemers werd dan gecorrigeerd voor dit halfleven. Met betrekking tot de stralingsbelasting na correctie voor de lymfocyt turn-over werden dan voor de tweede analysemethode de werknemers onderverdeeld in vier klassen ($H_{\text{corr}} < 1$ mSv, $1 \text{ mSv} < H_{\text{corr}} < 5$ mSv, $5 \text{ mSv} < H_{\text{corr}} < 10$ mSv, $10 \text{ mSv} < H_{\text{corr}}$).

In onderstaande tabel zijn de gegevens aangaande leeftijd, gemiddelde stralingsbelasting en aantal werknemers van de verschillende klassen gedefinieerd door de stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste tien jaar en het rookgedrag weergegeven.

Tabel: gegevens aangaande de gemiddelde stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste tien jaar en de gemiddelde leeftijd van de verschillende klassen beschouwd voor de analyse van de werknemers van het kernpark van Doel. De waarden tussen haakjes stellen de waarden voor van de standaarddeviatie op de stralingsbelasting over de beschouwde klasse.

	Niet rokers A	Rokers B	A + B
Laag expositie Niveau I $H_{\text{cum}} < 10$ mSv	H 3.01 (3.52) n = 91 Lft 45.9	H 3.55 (3.54) n = 13 Lft 43.5	H 3.08 (3.52) n = 104 Lft 45.6
Expositie Niveau II $10 \text{ mSv} < H_{\text{cum}} < 20$ mSv	H 14.16 (2.48) n = 31 Lft 41.9	H 13.92 (2.85) n = 16 Lft 43.1	H 14.08 (2.59) n = 47 Lft 42.8
Expositie Niveau III $20 \text{ mSv} < H_{\text{cum}} < 50$ mSv	H 29.26 (5.80) n = 31 Lft 42.4	H 29.81 (8.49) n = 16 Lft 44.2	H 29.42 (6.61) n = 44 Lft 42.9
Expositie Niveau IV $50 \text{ mSv} < H_{\text{cum}}$	H 71.25 (16.14) n = 13 Lft 43.5	H 67.82 (12.07) n = 7 Lft 40.7	H 70.51 (14.65) n = 20 Lft 42.5
I + II + III + IV	H 15.39 (20.15) n = 166 Lft 44.3	H 23.08 (21.85) n = 49 Lft 43.2	H 17.14 (20.75) n = 215 Lft 44.0

In de volgende tabel zijn de gegevens aangaande leeftijd, gemiddelde stralingsbelasting en aantal werknemers van de verschillende klassen gedefinieerd door rookgedrag en de stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste tien jaar en gecorrigeerd voor de lymfocyt turn-over weergegeven.

Tabel: gegevens aangaande de gemiddelde stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste tien jaar en gecorrigeerd voor de lymfocyt turn-over en de gemiddelde leeftijd van de verschillende klassen beschouwd voor de analyse van de werknemers van het kernpark van Doel. De waarden tussen haakjes stellen de waarden voor van de standaarddeviatie op de gecorrigeerde stralingsbelasting over de beschouwde klasse.

	Niet rokers A	Rokers B	A + B
Laag expositie Niveau I $H_{\text{cum,corr}} < 1$ mSv	H 0.00 (0.00) N = 48 Lft 48.9	H 0.00 (0.00) n = 6 Lft 43.3	H 0.00 (0.00) n = 54 Lft 48.3
Expositie Niveau II $1 \text{ mSv} < H_{\text{cum,corr}} < 5$ mSv	H 2.58 (1.01) N = 67 Lft 42.0	H 3.14 (1.17) n = 26 Lft 42.7	H 2.74 (1.08) n = 93 Lft 42.2

Expositie Niveau III 5 mSv < H _{cum,corr} < 10mSv	H 6.89(1.29) N = 33 Lft 42.9	H 7.17 (1.78) n = 9 Lft 45.0	H 6.96 (1.39) n = 42 Lft 43.3
Expositie Niveau IV 10 mSv < H _{cum,corr}	H 16.89 (5.50) N = 18 Lft 43.8	H 14.86 (4.14) n = 8 Lft 40.0	H 16.27 (5.12) n = 26 Lft 43.1
I + II + III + IV	H 15.39 (20.15) N = 166 Lft 44.3	H 23.08 (21.85) n = 49 Lft 43.2	H 17.14 (20.75) n = 215 Lft 44.0

III. 3. Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Tihange

In tegenstelling tot de grote studie van de werknemers van het kernpark Doel met de micronucleus-centromeer techniek was de doelstelling van deze studie op kleinere schaal een onderzoek naar de invloed van leeftijd, stralingsbelasting en rookgewoonten op het optreden van chromosoomtranslocaties en aneuploidie (numerieke chromosoomafwijkingen). Na voorstelling werd het akkoord voor de studie bekomen van de directie en het Comité voor Veiligheid, Gezondheid en Verfraaiing van de Werkplaatsen van het kernpark van Tihange (Electrabel). Zoals bij het kernpark van Doel verliep de studie in een nauwe samenwerking met de arbeidsgeneeskundige dienst CBMT ter plaatse. Aan de studie werkten 46 werknemers mee, onder te verdelen in twee groepen: een studiegroep van 28 werknemers met de hoogste stralingsbelasting volgens de fysische dosimetrie in de afgelopen jaren en een controlegroep van 18 werknemers met administratieve taak met verwaarloosbare dosis. Alle werknemers, die deel namen aan de studie werden zowel mondeling als schriftelijk geïnformeerd over de studie. Na schriftelijk akkoord vulden de werknemers een vragenlijst in zoals bij de studie van de werknemers uit de medische sector en een bloedstaal werd afgenomen ter gelegenheid van het wettelijk verplicht medisch onderzoek. Elk deelnemer aan de studie werd gecodeerd en deze code werd eveneens aangebracht op het bloedstaal. Alle deelnemers aan de studie waren mannen. Van alle deelnemers werd de stralingsbelasting gecumuleerd over het leven, over de laatste drie jaar en over het laatste jaar vóór de bloedafname geïnventariseerd. De gegevens met betrekking tot de leeftijd, rookgedrag en stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste drie jaar zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel: gegevens aangaande de studie- en controlegroep van de werknemers van Tihange. De waarden tussen haakjes stellen de waarden voor van de standaarddeviatie.

	Controle groep	Studie groep
Aantal individuen	18	28
Leeftijd (jaar)	41.7 (7.4)	49.8 (6.3)
Aantal rokers	9	17
Aantal niet-rokers	9	11
H_{cum,corr} (mSv)	0	2.5 (2.4)

IV. RESULTATEN

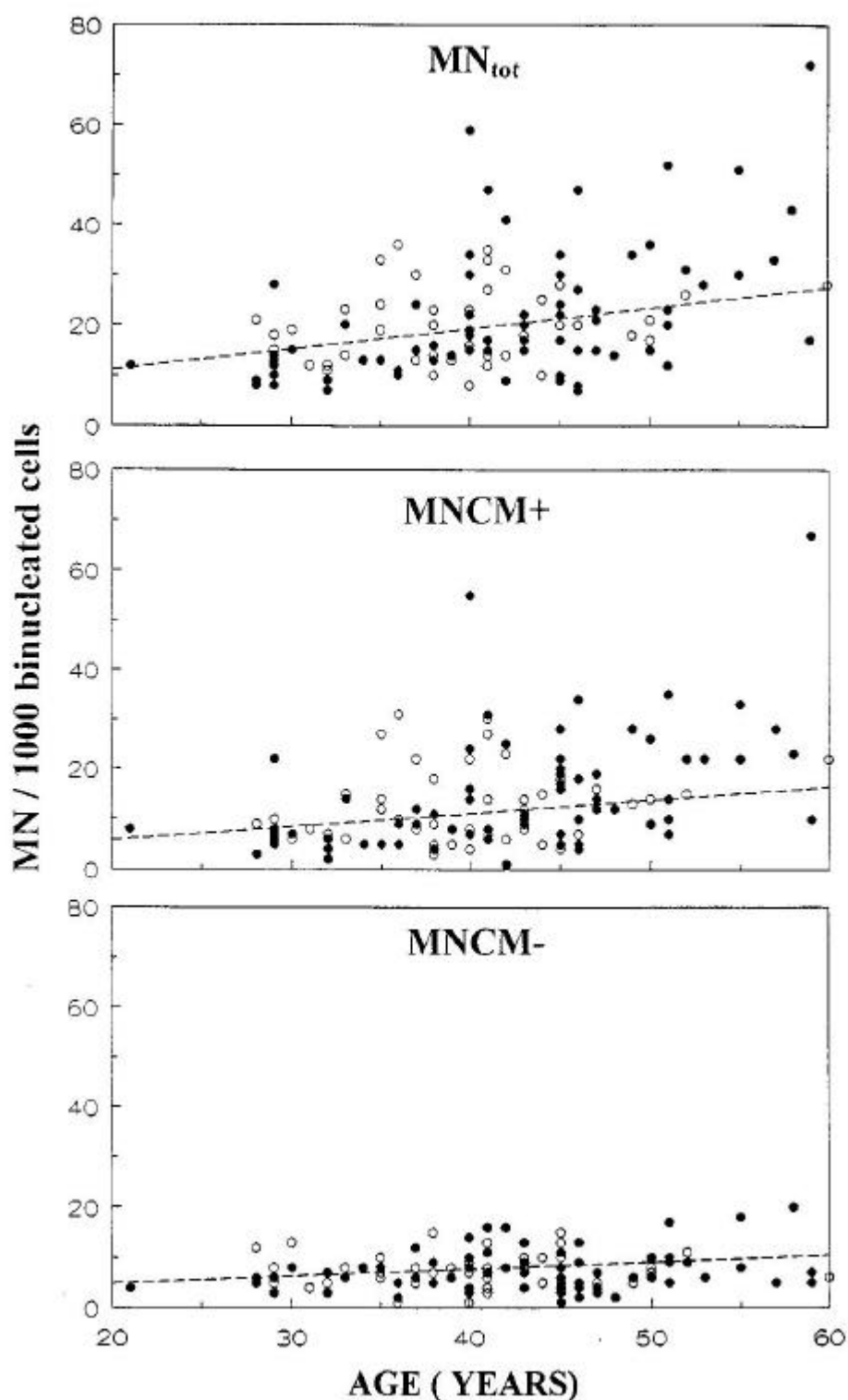
IV.1. Populatie van werknemers uit de medische sector blootgesteld aan straling

Inleiding

Voor de studie van de genetische effecten bij een populatie van werknemers uit de medische sector beroepshalve blootgesteld aan straling werd de micronucleus-centromeer techniek toegepast op 120 werknemers. Hiervan werkten er 71 in een stralenbelastende omgeving en 49 in diensten waar geen blootstelling aanwezig is. Bij de analyse van de gegevens zullen we achtereenvolgens de invloed van de leeftijd, het geslacht van de werknemer, het rookgedrag en ten slotte van de stralingsbelasting op het totaal aantal micronuclei (MN), het aantal micronuclei, die geen centromeer bevatten (MN_{CM-}) en het aantal micronuclei, die een centromeer bevatten (MN_{CM+}) nagaan. Zoals reeds vermeld wijzen MN_{CM-} op clastogene effecten en MN_{CM+} op chromosoomverlies. Gezien de fysische dosimetriegegevens voor werknemers uit de diensten, waar gebruik wordt gemaakt van X-stralen, dikwijls een onderschatting weergeven van de werkelijke stralingsbelasting gezien de filmdosimeter onder de loodschoot wordt gedragen, wordt om mogelijke effecten van de blootstelling na te gaan eerst een directe vergelijking gemaakt tussen de controle- en de studiegroep na correctie voor het effect van leeftijd en geslacht. Daarnaast zal eveneens een evaluatie worden uitgevoerd naar de afhankelijkheid van de beschouwde cytogenetische eindpunten van de stralingsbelasting geregistreerd over het laatste jaar en over de laatste tien jaar.

Leeftijdsafhankelijkheid

Een overzicht van de individuele gegevens, het aantal MN, MN_{CM+} en MN_{CM-} per 1000 binucleaire cellen, als functie van de leeftijd is weergegeven in figuur 13. De volle punten geven de resultaten voor werknemers blootgesteld aan straling, de open cirkels betreffen de personen uit de controlegroep. De streeplijnen geven de resultaten van een lineaire regressie aan de gegevens voor wat betreft de niet-rokers bij de controlepopulatie. We bekomen als leeftijdsafhankelijkheid van MN, MN_{CM+} en MN_{CM-} een toename per jaar van respectievelijk 0.404 , 0.267 en 0.137 . De centromeer-positieve MN zijn verantwoordelijk



Figuur 13. Het totaal aantal micronuclei (MN_{tot}), het aantal centromeer-positieve micronuclei (MN_{CM+}) en het aantal centromeer negatieve micronuclei (MN_{CM-}) per 1000 binucleaire cellen als functie van de leeftijd van de werknemers. De volle punten geven de resultaten voor werknemers blootgesteld aan straling, de open cirkels betreffen de controlegroep. De streeplijnen geven de resultaten van een lineaire regressie aan de gegevens.

voor twee derde van de toename van het totaal aantal micronuclei met de leeftijd, terwijl de centromeer-negatieve MN slechts verantwoordelijk zijn voor één derde. Vergeleken met de leeftijdsafhankelijkheid van de controlepopulatie, aangegeven door de streeplijnen, vertonen twee vrouwelijke werknemers een

uitzonderlijk hoog aantal micronuclei, voor meer dan 90 % toe te schrijven aan centromeer-positieve micronuclei. Er dient hier opgemerkt dat een aantal cellen van deze individuen twee of meer micronuclei bevatten, wat resulteert in een lichte overdispersie vergeleken met de Poisson distributie zoals gewoonlijk wordt waargenomen.

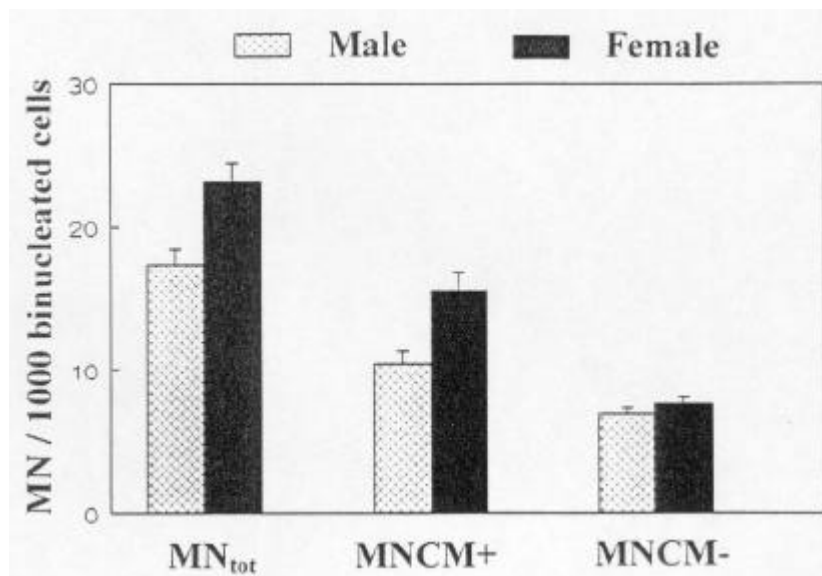
Afhankelijkheid van het geslacht van de werknemer

Een directe vergelijking tussen de gemiddelde waarden van het aantal micronuclei (MN), van het aantal micronuclei met een centromeer (MNCM+) en van het aantal micronuclei zonder centromeer voor de mannelijke en vrouwelijke deelnemers van de studie is weergegeven in onderstaande tabel. De gemiddelde leeftijd voor beide sexen alsook het aantal beschouwde individuen n is eveneens gegeven.

Tabel: Vergelijking van de beschouwde cytogenetische eindpunten tussen de mannelijke en vrouwelijke deelnemers van de studie. De waarden tussen haakjes refereren naar de standaarddeviatie over de beschouwde populatie. De p-waarden van de Wilcoxon analyse, die de probabiliteit voor gelijkheid tussen beide populaties aangeeft, zijn eveneens vermeld.

	MN	MNCM+	MNCM-	Leef-tijd	n
Man	16.81 (8.82) p=0.002 1	10.05 (6.96) p=0.006 5	6.75 (3.02) p=0.13	39.5 (8.3)	47
Vrouw	23.54 (12.07)	15.80 (11.34)	7.74 (4.07)	41.8 (7.1)	73

Deze tabel toont aan dat het totaal aantal MN en het aantal MNCM+ statistisch significant ($p < 0.01$) hoger is voor vrouwen vergeleken met de mannelijke deelnemers. Alhoewel het aantal MNCM- eveneens hoger is, is dit verschil niet statistisch significant. Deze conclusies veranderen niet wanneer de twee vrouwen met een uitzonderlijk hoog aantal micronuclei bij de analyse buiten beschouwing worden gelaten. De MN, MNCM+ en MNCM- opbrengsten voor vrouwen zijn respectievelijk 1.40, 1.57 en 1.15 maal groter dan voor mannen. Na correctie voor de leeftijdsafhankelijkheid waarbij alle MN gegevens worden teruggebracht tot de gemiddelde leeftijd van de bestudeerde populatie, 40.9 jaren, worden de vrouw op man verhoudingen respectievelijk 1.33 (0.12), 1.49 (0.17) en 1.10 (0.10). De waarden tussen haakjes stellen de standaarddeviatie op deze verhoudingen voor. In figuur 14 zijn de resultaten met betrekking tot de geslachtsafhankelijkheid van de MN, MNCM+ en MNCM- opbrengsten na correctie voor de leeftijd voorgesteld onder histogramvorm.



Figuur 14. Vergelijking van de gemiddelde waarden van de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten tussen de mannelijke en de vrouwelijke deelnemers aan de studie na correctie voor de leeftijd. De foutenvlaggen stellen de standaarddeviaties op het gemiddelde voor.

Invloed van het rookgedrag van de werknemer

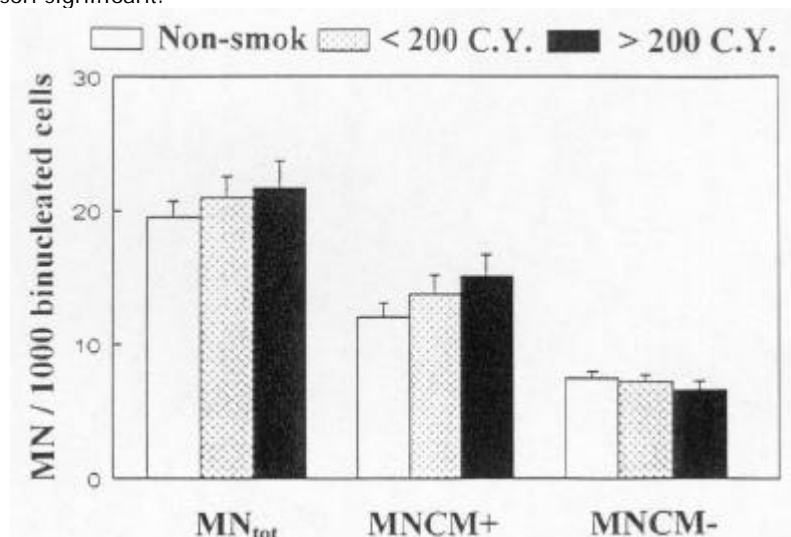
De resultaten van de invloed van het rookgedrag van de werknemers op de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten binnen de bestudeerde populatie zijn voorgesteld in onderstaande tabel.

Voor deze studie werden de werknemers geklasseerd in een groep van niet-rokers, een groep van lichte en gemiddelde rokers (0-200 sigarettjaren) en een groep van zware rokers (meer dan 200 sigarettjaren).

Tabel: Overzicht van de resultaten geklasseerd volgens rookgewoonten. De waarden tussen haakjes refereren naar de standaarddeviatie over de beschouwde populatie. De p-waarden van de Wilcoxon analyse zijn eveneens vermeld.

	MN	MNCM+	MNCM-	Leef-tijd	M	V
Niet-rokers	20.71 (11.58)	13.02 (10.31)	7.70 (4.33)	41.6 (7.6)	20	46
Minder dan 200 S.J.	19.79 (11.41) p=0.70	13.00 (10.87) p=0.99	6.79 (2.73) p=0.21	37.6 (7.4)	18	18
Meer dan 200 S.J.	23.83 (10.57) p=0.28	16.61 (8.41) p=0.13	7.22 (2.88) p=0.58	45.0 (5.2)	9	9

Uit deze studie volgt geen enkel effect van licht en gemiddeld roken op de micronucleus incidentie. Voor de zware rokers observeren we een stijging van het totaal aantal micronuclei en het aantal MNCM+ doch de toename is statistisch niet significant. Na correctie van de micronucleus gegevens voor de leeftijd zoals hoger vermeld en voor de geslachtsafhankelijkheid, waarbij een half vrouwelijke-half mannelijke populatie wordt beschouwd, vinden we voor de drie rokersklassen gemiddelde waarden voor de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten, weergegeven in figuur 15 onder histogramvorm. De verschillen tussen de drie klassen zijn in geen geval statistisch significant.



Figuur 15: Vergelijking van de gemiddelde MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten tussen drie rokersklassen. De foutenvlaggen stellen de standaarddeviaties op het gemiddelde voor.

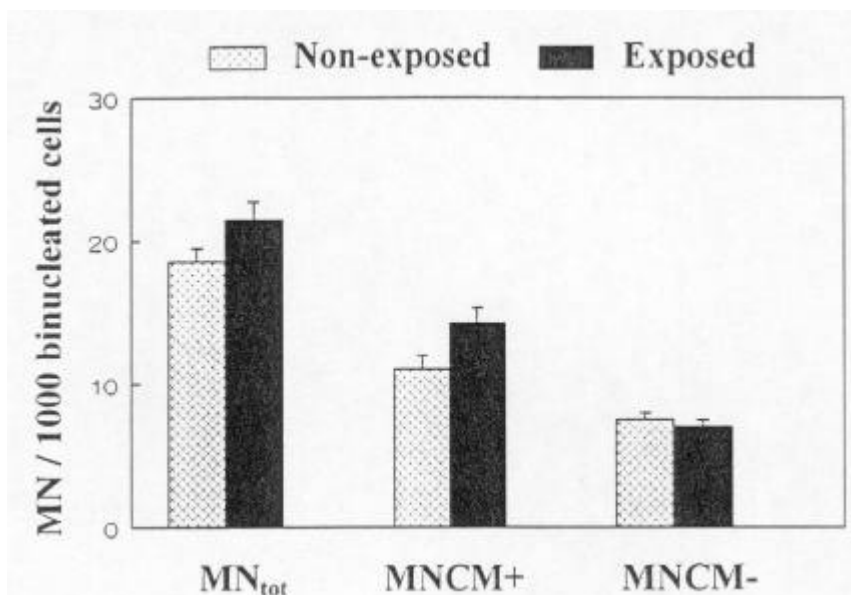
Invloed van de stralingsbelasting van de werknemer

Een directe vergelijking van de gemiddelde waarden van de MN, MNCM+ en MNCM- opbrengsten en de andere variabelen van de studie tussen de controle- en de studiegroep is weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel: Directe vergelijking tussen de studie- en de controlepopulatie van de gemiddelde waarde van het totaal aantal MN, het aantal MNCM+ en het aantal MNCM-. De gemiddelde leeftijd, het aantal sigaretjaren (S.J.), de stralingsbelasting over het laatste jaar en over de laatste tien jaar is eveneens aangegeven samen met het aantal vrouwen en mannen binnen de populatie. De waarden tussen haakjes refereren naar de standaarddeviatie over de beschouwde populatie. De p-waarden van de Wilcoxon analyse zijn eveneens vermeld.

	MN	MNCM+	MNCM-	Leef tijd	S.J.	H 1 jaar (mSv)	H 10 jaar (mSv)	M	V
Stralings werkers	21.88 (13.46) p=0.21	14.74 (11.71) p=0.10	7.15 (4.01) p=0.47	41.6 (8.3)	102 (256)	1.79 (2.55)	11.25 (18.02)	35	36
Controle groep	19.48 (7.24)	11.84 (7.34)	7.64 (3.26)	39.9 (6.4)	79 (145)	0.12 (0.18)	0.96 (0.86)	12	37

De hogere MN frequentie in de studiegroep vergeleken met de controlegroep is klaarblijkelijk te wijten aan een hoger aantal MNCM+. Deze verschillen zijn echter niet statistisch significant binnen 95 % betrouwbaarheids grenzen. Gezien de gemiddelde leeftijd weinig verschilt tussen beide populaties, verandert het beeld wat betreft de micronucleus opbrengsten niet fundamenteel wanneer deze gecorrigeerd worden voor het leeftijdseffect. Een vergelijking tussen de studie- en de controlegroep na deze correctie en na de correctie voor het verschil tussen mannelijke en vrouwelijke werknemers is weergegeven in figuur 16. In dit geval wordt het verschil tussen de controle- en studiegroep voor het totaal aantal MN en het aantal MNCM+ statistisch bijna significant ($0.05 < p < 0.1$). Dit is echter deels te wijten aan de twee vrouwelijke werknemers met een uitzonderlijk hoog aantal MN. Wanneer deze gevallen worden uitgesloten zijn de beschouwde gevallen niet meer significant.



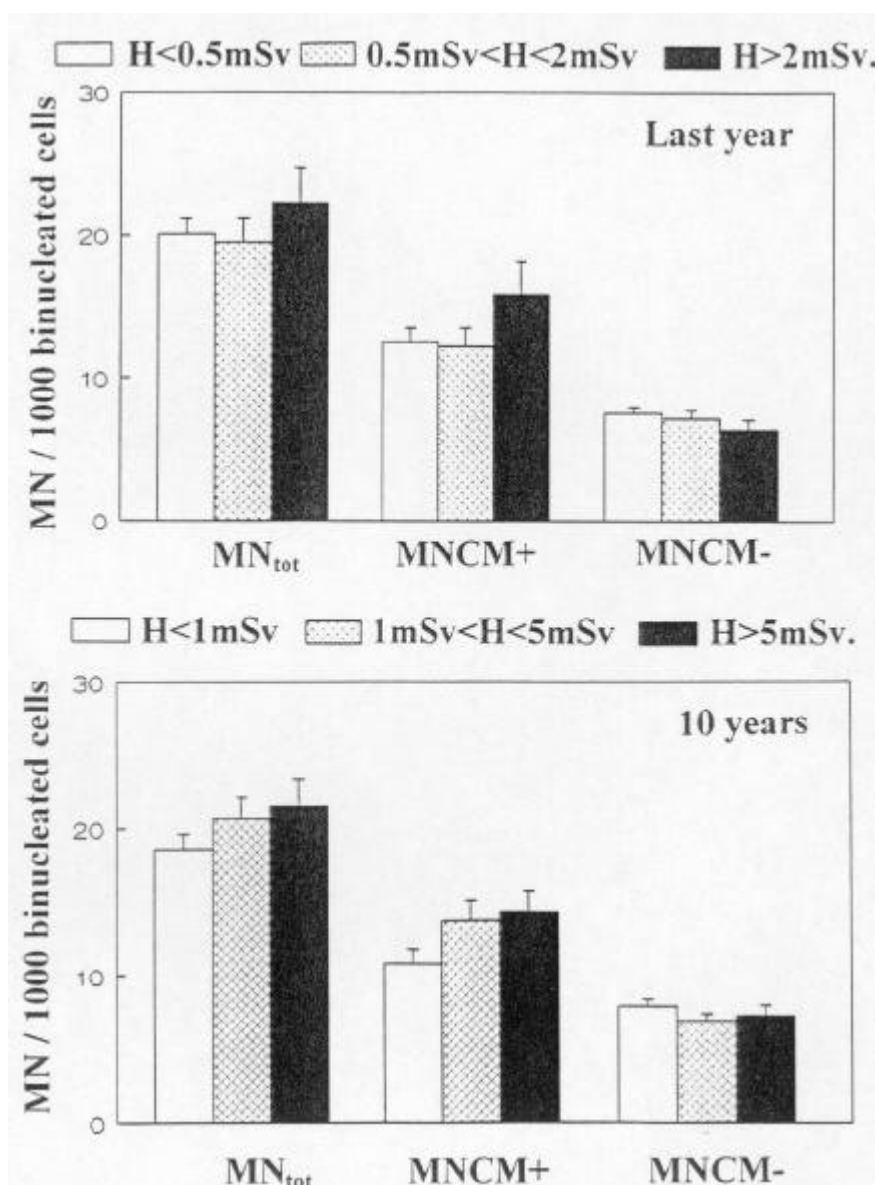
Figuur16. Vergelijking van de gemiddelde waarden van de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten tussen de controle- en de studiegroep. De gegevens werden gecorrigeerd voor leeftijd en geslacht. De foutenvlaggen stellen de standaarddeviaties op het gemiddelde voor.

Onderstaande tabel geeft een overzicht van de MN analyse in subpopulaties van werknemers uit de medische sector, geklasseerd in drie kategoriën volgens de stralingsbelasting, afgeleid uit de fysieke dosimetrie gegevens. Een eerste data analyse werd uitgevoerd op basis van de dosisgegevens van het jaar vóór de bloedafname. Op die manier kan men het effect bestuderen van meer recente blootstellingen. In dit geval werden de expositieklassen gedefinieerd via de grenzen 0.5 mSv en 2 mSv. Bij de tweede data analyse werden de data gesorteerd volgens de stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste tien jaar. Deze analyse laat de effecten zien van de chronische blootstelling. Klassificatie gebeurde hier volgens de grenzen 1 mSv en 5 mSv.

Tabel. Resultaten van de micronucleus-centromeer analyse bij classificatie volgens de stralingsbelasting over het laatste jaar en over de laatste tien jaar vóór de bloedafname. De waarden tussen haakjes refereren naar de standaarddeviatie over de beschouwde populatie. De p-waarden zijn het resultaat van de Wilcoxon analyse van de vergelijking tussen de beschouwde subpopulatie en de laagst-blootgestelde populatie.

H Laatste jaar	MN	MNCM+	MNCM-	Leef tijd	M	V
H < 0.5mSv	21.53 (10.78)	13.80 (10.26)	7.73 (3.79)	40.6 (7.3)	15	53
H > 0.5mSv H < 2 mSv	17.98 (11.38) p=0.18	11.37 (8.31) p=0.32	6.92 (3.87) p=0.33	39.8 (8.0)	23	10
H > 2 mSv	23.74 (12.89) p=0.50	16.97 (12.36) p=0.32	6.76 (3.11) p=0.26	44.0 (7.8)	9	10
H Laatste 10 jaar	MN	MNCM+	MNCM-	Leef tijd	M	V
H < 1mSv	18.97 (7.42)	11.22 (7.02)	7.75 (3.30)	38.7 (8.1)	9	27
H > 1mSv H < 5 mSv	20.28 (12.73) p=0.55	13.59 (12.29) p=0.26	6.69 (3.24) p=0.24	39.3 (6.5)	24	26
H > 5 mSv	23.87 (12.37) p=0.08	15.96 (9.42) p=0.02	7.91 (4.62) p=0.81	45.7 (6.7)	14	20

Figuur 17 stelt de analyse voor van de MN data volgens de stralingsbelasting gecumuleerd over het laatste jaar en over de laatste 10 jaar na correctie van de MN opbrengsten voor leeftijd en geslacht. Na deze correctie is het verschil in MNCM+ opbrengsten tussen de laagste en hoogste dosisklassen statistisch bijna significant ($0.05 < p < 0.10$). Wat betreft de MNCM- opbrengst wordt geen enkel effect van de stralingsbelasting waargenomen.



Figuur17. Vergelijking van de gemiddelde waarden van de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten tussen de werknemers geklasseerd in drie categorieën volgens de stralingsbelasting. De analyse op basis van de dosis van het laatste jaar bevindt zich bovenaan, die op basis van de gecumuleerde dosis over de laatste tien jaar onderaan. De gegevens werden gecorrigeerd voor leeftijd en geslacht. De foutenvlaggen stellen de standaarddeviaties op het gemiddelde voor.

IV. 2. Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Doel

Inleiding

Bij de analyse van de gegevens, bekomen met de micronucleus-centromeer techniek bij de 217 werknemers van het kernpark van Doel zullen we achtereenvolgens leeftijdsafhankelijkheid, afhankelijkheid van rookgedrag en de invloed van de stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste 10 jaar, al dan niet gecorrigeerd voor de turn-over van de lymfocyten nagaan op het totaal aantal micronuclei (MN), het aantal micronuclei, die geen centromeer bevatten (MN_{CM-}) en het aantal micronuclei, die een centromeer bevatten (MN_{CM+}). Zoals reeds vermeld wijzen MN_{CM-} op clastogene effecten en MN_{CM+} op chromosoomverlies.

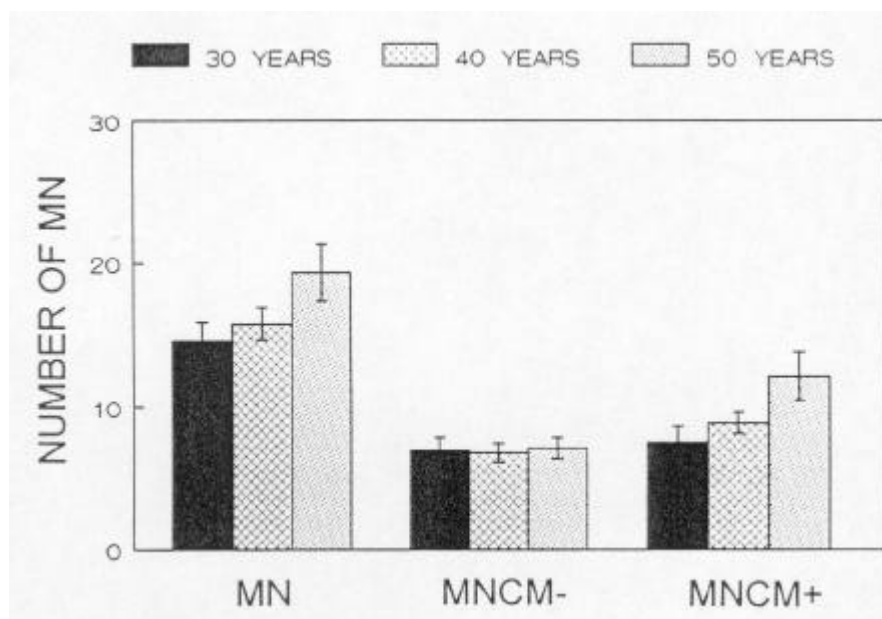
Leeftijdsafhankelijkheid

Hieronder vindt men de resultaten van de studie voor de werknemers, niet-rokers en nagenoeg niet blootgesteld aan straling (< 10 mSv over 10 jaar), ingedeeld volgens leeftijdscategorie (30-39, 40-49 en 50-59 jaar) onder tabelvorm.

Tabel : Aantal micronuclei (MN), centromeer-negatieve micronuclei (MNCM-) en centromeer-positieve micronuclei (MNCM+) per 1000 binucleaire cellen voor de verschillende leeftijdsgroepen van de nagenoeg niet blootgestelde populatie van werknemers, niet-rokers. De waarden tussen haakjes refereren naar de standaarddeviatie over de beschouwde populatie. De andere gegevens relevant voor de studie zijn eveneens getabelleerd.

Leeftijdsgroep	MN	MNCM-	MNCM+	H _{cum} (mSv)	n
30	14.59 (6.45)	7.00 (4.34)	7.59 (5.18)	4.79 (3.46)	22
40	15.80 (6.95)	6.85 (4.15)	8.95 (4.69)	3.29 (3.60)	39
50	19.37 (10.67)	7.17 (4.17)	12.20 (9.40)	1.34 (2.72)	30

Deze gegevens tonen een toename van het aantal MN met de leeftijd pro rata van 0.24 MN per jaar, een toename van het aantal MNCM+ met de leeftijd van 0.23 MN per jaar en nagenoeg geen toename van het aantal MNCM- , 0.01 MN per jaar. Figuur 18 geeft een grafische voorstelling van deze resultaten onder histogramvorm.



Figuur 18 . Vergelijking van de gemiddelde waarden van de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten tussen de werknemers met lage blootstelling en niet-rokers geklasseerd in drie categorieën volgens de leeftijd. De foutenvlaggen stellen de standaarddeviaties op het gemiddelde voor.

Invloed van de stralingsbelasting en het rookgedrag van de werknemer

Wat betreft het effect van de stralingsbelasting op het aantal MN, het aantal MNCM+ en het aantal MNCM- werd een analyse uitgevoerd volgens de gecumuleerde stralingsbelasting over de laatste 10 jaar en een analyse waarbij deze stralingsbelasting werd gecorrigeerd voor de turn-over van lymfocyten (halfwaardetijd 3 jaar). Op deze wijze kunnen we rekening houden met het verdwijnen uit de bloedbaan van de lymfocyten aanwezig tijdens de blootstelling .

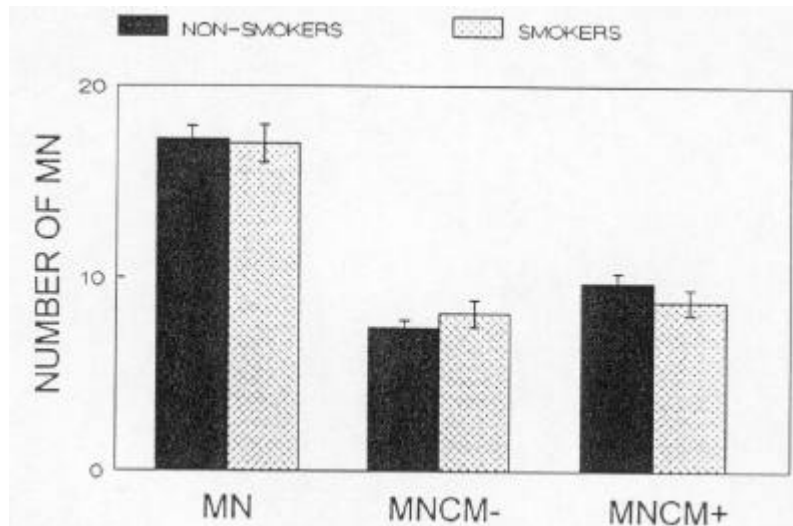
Groepering van de werknemers in groepen volgens hun gecumuleerde stralingsbelasting over de laatste 10 jaar (Niveau I H < 10 mSv ; Niveau II 10 mSv < H < 20 mSv ; Niveau III 20 mSv < H < 50 mSv en Niveau

IV 50 mSv < H) en klassificatie in niet-rokers en rokers geeft de volgende resultaten, overzichtelijk samengevat in volgende tabel .

Tabel : Het aantal micronuclei (MN), het aantal centromeer-negatieve micronuclei (MNCM-) en het aantal centromeer-positieve micronuclei (MNCM+) per 1000 binucleaire cellen voor de vier groepen van werknemers ingedeeld volgens de gecumuleerde dosis over de laatste tien jaar. Naast de globale gegevens worden de data voor de rokers en de niet-rokers afzonderlijk eveneens gegeven. De waarden tussen haakjes refereren naar de standaarddeviatie over de beschouwde populatie.

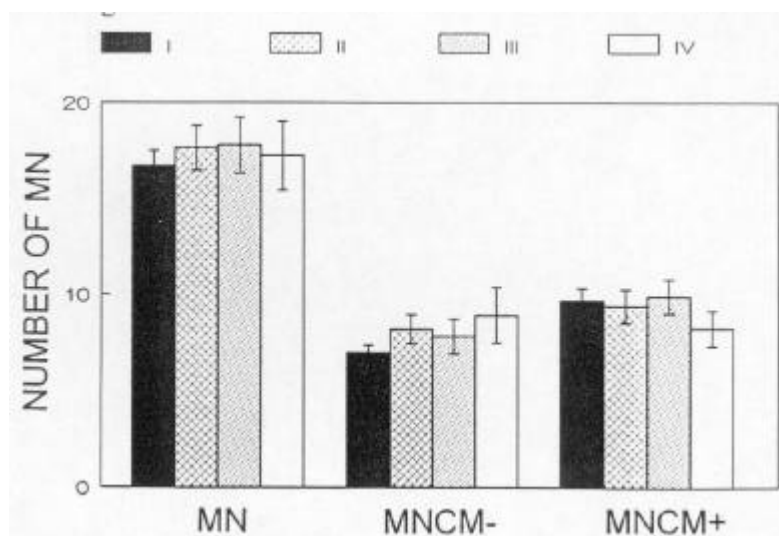
	Niet-rokers A	Rokers B	A + B
Lage expositie Niveau I H_{cum} < 10 mSv	MN 16.68 (8.40) MNCM- 6.99 (4.16) MNCM+ 9.69 (6.88) H 3.01 (3.52) n = 91 Lft 45.9	MN 16.69 (6.49) MNCM- 7.00 (2.80) MNCM+ 9.69 (4.82) H 3.55 (3.54) n = 13 Lft 43.5	MN 16.68 (8.16) MNCM- 6.99 (4.00) MNCM+ 9.69 (6.64) H 3.08 (3.52) n = 104 Lft 45.6
Expositie Niveau II 10 mSv < H_{cum} < 20 mSv	MN 18.42 (8.33) MNCM- 8.55 (6.15) MNCM+ 9.87 (6.65) H 14.16 (2.48) n = 31 Lft 41.9	MN 16.06 (4.54) MNCM- 7.56 (2.85) MNCM+ 8.50 (4.46) H 13.92 (2.85) n = 16 Lft 43.1	MN 17.62 (8.12) MNCM- 8.21 (5.25) MNCM+ 9.41 (5.98) H 14.08 (2.59) n = 47 Lft 42.8
Expositie Niveau III 20 mSv < H_{cum} < 50 mSv	MN 17.58 (8.79) MNCM- 7.39 (5.57) MNCM+ 10.19 (6.45) H 29.26 (5.80) n = 31 Lft 42.4	MN 18.23 (9.04) MNCM- 9.00 (7.15) MNCM+ 9.23 (4.80) H 29.81 (8.49) n = 16 Lft 44.2	MN 17.77 (9.75) MNCM- 7.86 (6.04) MNCM+ 9.91 (5.97) H 29.42 (6.61) n = 44 Lft 42.9
Expositie Niveau IV 50 mSv < H_{cum}	MN 17.23 (9.05) MNCM- 8.23 (6.48) MNCM+ 9.00 (4.39) H 71.25 (16.14) n = 13 Lft 43.5	MN 17.21 (6.89) MNCM- 10.29 (6.65) MNCM+ 6.92 (3.44) H 67.82 (12.07) n = 7 Lft 40.7	MN 17.22 (8.17) MNCM- 8.95 (6.44) MNCM+ 8.27 (4.11) H 70.51 (14.65) n = 20 Lft 42.5
I + II + III + IV	MN 17.22 (8.86) MNCM- 7.46 (5.04) MNCM+ 9.76 (6.55) H 15.39 (20.15) n = 166 Lft 44.3	MN 16.97 (6.99) MNCM- 8.18 (4.91) MNCM+ 8.79 (4.48) H 23.08 (21.85) n = 49 Lft 43.2	MN 17.16 (8.46) MNCM- 7.62 (5.01) MNCM+ 9.54 (6.15) H 17.14 (20.75) n = 215 Lft 44.0

Een vergelijking tussen de rokers en de niet-rokers in de globale populatie en bij de verschillende dosisgroepen geeft aan dat geen effect van roken in het aantal MN, MNCM+ en MNCM- wordt waargenomen. Dit is hieronder grafisch weergegeven in figuur 19 voor de vergelijking van rokers met niet-rokers van de globale populatie, waarbij geen rekening wordt gehouden met de dosis.



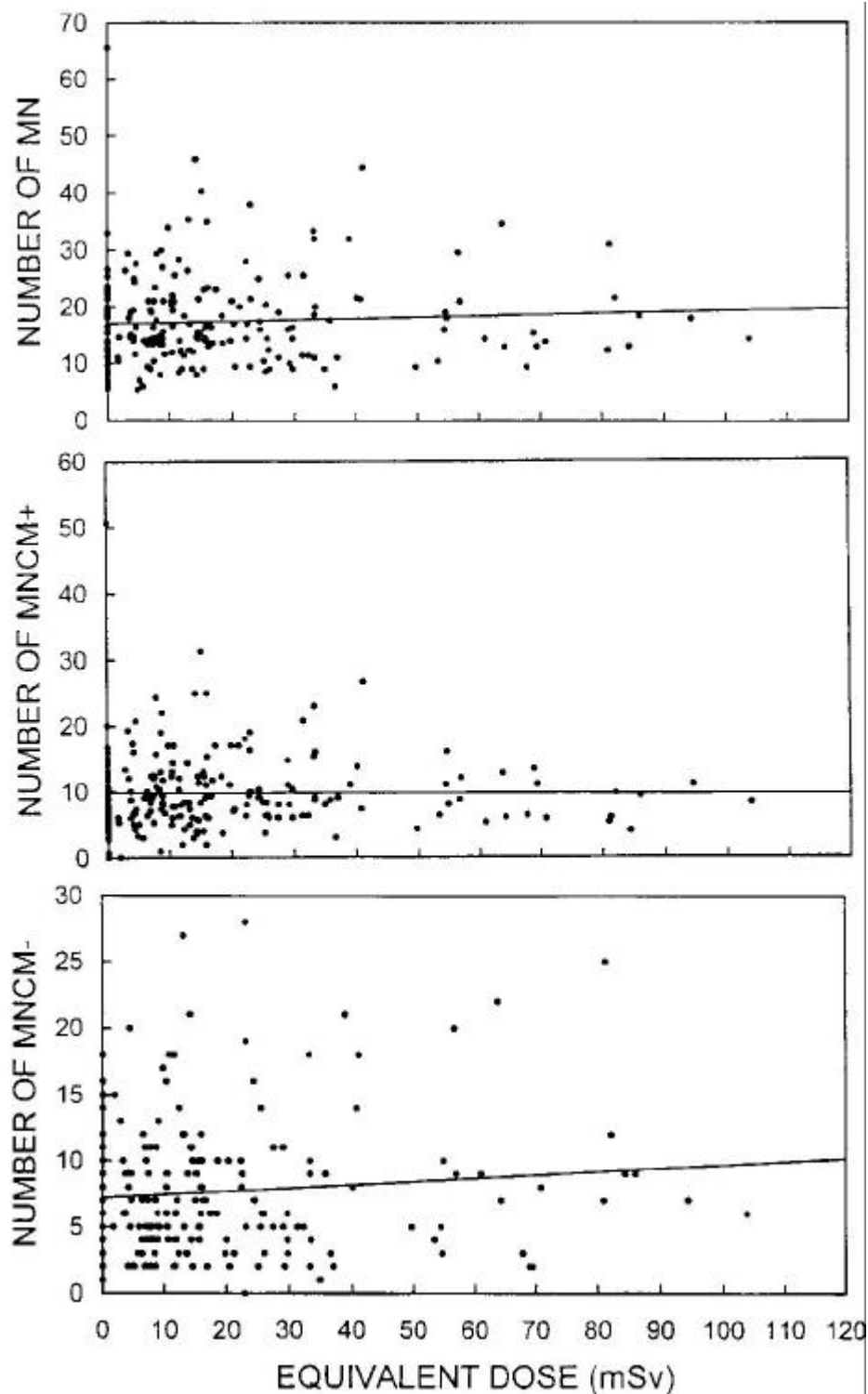
Figuur 19. Vergelijking van de gemiddelde waarden van de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten tussen rokers en de niet-rokers van de bestudeerde populatie van werknemers. De foutenvlaggen stellen de standaarddeviaties op het gemiddelde voor.

Waar het totaal aantal MN en het aantal MNCM+ totaal invariant zijn t.o.v. de stralingsbelastingsgroep vertoont het aantal MNCM- een lichte toename. Statistische evaluatie met de Wilcoxon test toont echter aan dat geen significante verschillen worden waargenomen tussen de vier dosisgroepen wanneer de populaties van rokers en niet-rokers worden samengenomen. Deze procedure is verantwoord gezien geen verschillen worden waargenomen tussen de rokers en de niet-rokers. Een vergelijking tussen de MN data voor de vier dosisgroepen volgens de stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste 10 jaar is weergegeven in figuur 20.



Figuur 20: Vergelijking van de MN, MNCM+ en MNCM-opbrengsten tussen de vier dosisgroepen. Foutenvlaggen zijn de standaarddeviaties op het gemiddelde.

De individuele resultaten voor de werknemers na correctie voor de leeftijdscategorie zijn weergegeven in figuur 21. Hieruit blijkt dat hogere MN waarden (> 30) in het lage dosis gebied te wijten zijn aan hoge MNCM+ waarden, niet door straling geïnduceerd.



Figuur 21. Individuele waarden van de MN, MNCM+ en MNCM- opbrengsten, na correctie voor de leeftijdsafhankelijkheid als functie van de stralingsbelasting over de laatste tien jaar. De volle lijnen zijn het resultaat van een lineaire regressie.

De volle lijnen bekomen door lineaire regressie tonen geen enkele dosisafhankelijkheid van het aantal MNCM+ zoals verwacht, en een zeer lichte toename met de dosis van het aantal MN, te wijten aan een toename van het aantal MNCM- (0.025/mSv). Deze toename is echter statistisch niet significant.

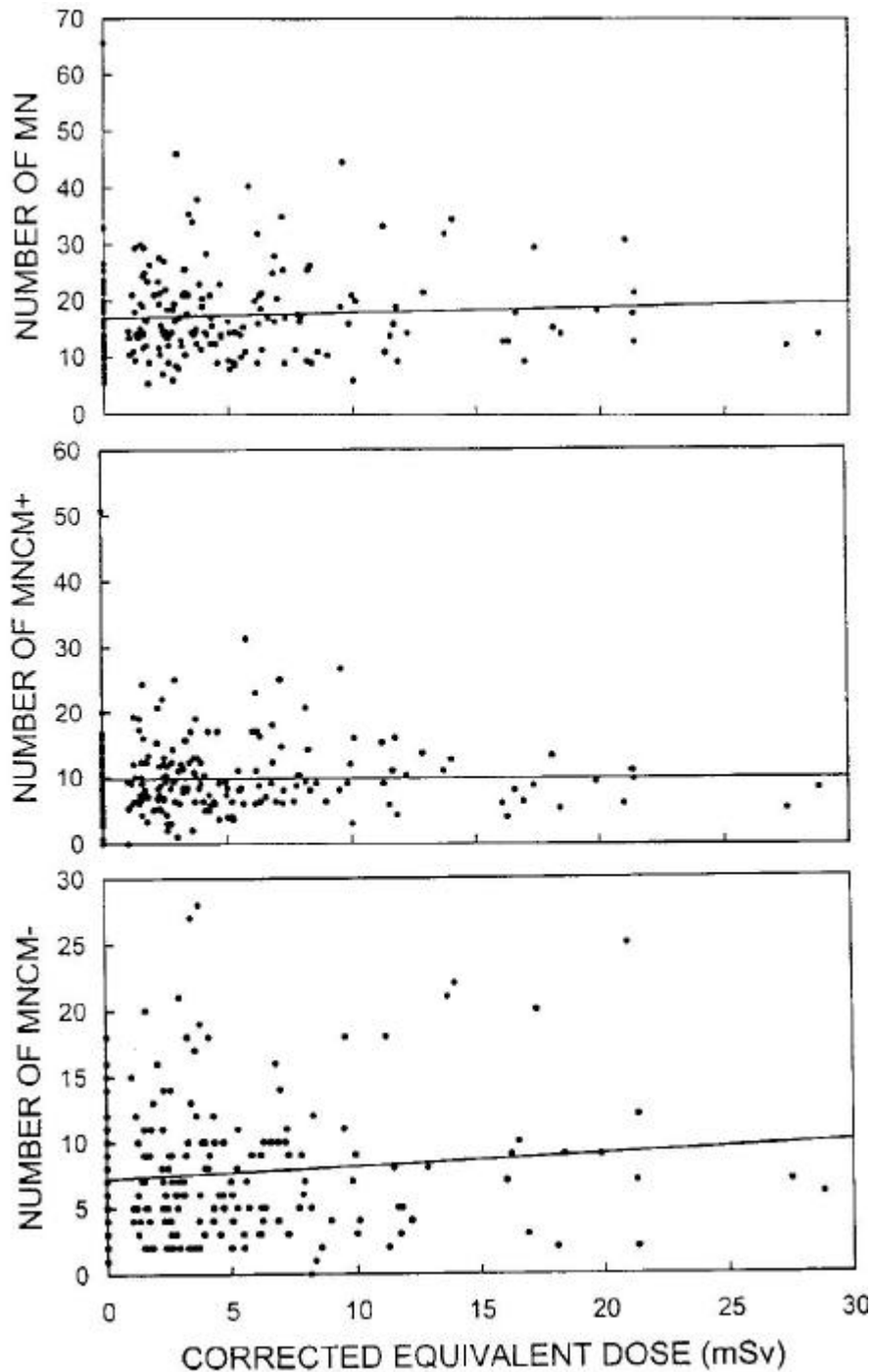
Groepering van de werknemers in groepen volgens hun gecumuleerde stralingsbelasting over de laatste 10 jaar na correctie voor de turn-over van de lymfocyten met halfwaardetijd 3 jaar (Niveau I $H < 1$ mSv ; Niveau II 1

mSv < H < 5 mSv ; Niveau III 5 mSv < H < 10 mSv en Niveau IV 10 mSv < H) en klassificatie in niet-rokers en rokers geeft de volgende resultaten, overzichtelijk samengevat in onderstaande tabel .

Tabel : Het aantal MN, MNCM- en MNCM+ per 1000 binucleaire cellen voor de vier groepen van werknemers ingedeeld volgens de gecumuleerde dosis over de laatste tien jaar na correctie voor de turn-over van de lymfocyten. Naast de globale gegevens worden de data voor de rokers en de niet-rokers afzonderlijk eveneens gegeven. De waarden tussen haakjes refereren naar de standaarddeviatie over de beschouwde populatie.

	Niet-rokers A	Rokers B	A + B
Laag expositie Niveau I H_{cum,corr} < 1 mSv	MN 17.27 (8.81) MNCM- 7.15 (4.03) MNCM+ 10.12 (8.11) H 0.00 (0.00) n = 48 Lft 48.9	MN 17.83 (6.31) MNCM- 6.83 (3.13) MNCM+ 11.00(4.38) H 0.00 (0.00) n = 6 Lft 43.3	MN 17.33 (8.44) MNCM- 7.11 (3.91) MNCM+ 10.22(7.76) H 0.00 (0.00) n = 54 Lft 48.3
Expositie Niveau II 1 mSv < H_{cum,corr} < 5 mSv	MN 16.45 (7.50) MNCM- 7.48 (5.42) MNCM+ 8.97 (5.06) H 2.58 (1.01) n = 67 Lft 42.0	MN 17.19 (8.22) MNCM- 8.42 (5.48) MNCM+ 8.77 (4.91) H 3.14 (1.17) n = 26 Lft 42.7	MN 16.66 (7.67) MNCM- 7.74 (5.42) MNCM+ 8.92 (4.99) H 2.74 (1.08) n = 93 Lft 42.2
Expositie Niveau III 5 mSv < H_{cum,corr} < 10mSv	MN 17.88 (8.84) MNCM- 6.70 (4.23) MNCM+ 11.18 (7.46) H 6.89(1.29) n = 33 Lft 42.9	MN 16.78 (5.21) MNCM- 7.89 (2.89) MNCM+ 8.89 (3.44) H 7.17 (1.78) n = 9 Lft 45.0	MN 17.64 (9.01) MNCM- 6.95 (3.98) MNCM+ 10.69(6.83) H 6.96 (1.39) n = 42 Lft 43.3
Expositie Niveau IV 10 mSv < H_{cum,corr}	MN 18.56 (9.16) MNCM- 8.94 (6.83) MNCM+ 9.62 (4.35) H 71.25 (16.14) n = 18 Lft 43.8	MN 15.56 (7.98) MNCM- 8.75 (7.05) MNCM+ 6.81 (4.77) H 14.86 (4.14) n = 8 Lft 40.0	MN 17.63 (8.77) MNCM- 8.88 (6.75) MNCM+ 8.75 (4.50) H 16.27 (5.12) n = 26 Lft 43.1
I + II + III + IV	MN 17.22 (8.86) MNCM- 7.46 (5.04) MNCM+ 9.76 (6.55) H 15.39 (20.15) n = 166 Lft 44.3	MN 16.97 (6.99) MNCM- 8.18 (4.91) MNCM+ 8.79 (4.48) H 23.08 (21.85) n = 49 Lft 43.2	MN 17.16 (8.46) MNCM- 7.62 (5.01) MNCM+ 9.54 (6.15) H 17.14 (20.75) n = 215 Lft 44.0

Deze analyse toont geen enkel statistisch significant verschil op een betrouwbaarheidsniveau van 90 % tussen de verschillende groepen. De individuele resultaten voor de werknemers na correctie voor de leeftijdscategorie als functie van de gecumuleerde dosis over 10 jaar, gecorrigeerd voor de turn-over van de lymfocyten, zijn weergegeven in figuur 22.



Figuur 22. Individuele waarden van de MN, MNCM+ en MNCM- opbrengsten, na correctie voor de leeftijdsafhankelijkheid als functie van de stralingsbelasting over de laatste tien jaar, gecorrigeerd voor de lymfocyt turn-over. De volle lijnen een lineaire regressie.

De lijnen bekomen door lineaire regressie tonen opnieuw geen dosisafhankelijkheid van het aantal MNCM+ zoals verwacht, en een lichte toename van het aantal MN, te wijten aan een toename van het aantal MNCM- (0.10/mSv). Deze toename is echter statistisch niet significant.

IV. 3. Populatie van werknemers uit de nucleaire sector : het kernpark van Tihange

Voor een kleinere groep van werknemers werd het aantal translocaties gescoord door de onderzoeksgroep van de CHU Liège. Als controlegroep fungeerde een aantal werknemers met verwaarloosbare stralingsbelasting. In de volgende tabel zijn de resultaten van deze scoring samengevat. Opeenvolgend is voor de individuen van de controlegroep en de studiegroep opgegeven: leeftijd, stralingsbelasting gecumuleerd over het leven,

stralingsbelasting gecumuleerd over de laatste drie jaar, stralingsbelasting over het jaar vóór de bloedafname en de geobserveerde genoom translocatie frequentie. Deze resultaten werden bekomen na de scoring van 500 metafasen per donor.

Uit deze tabel blijkt dat het aantal translocaties bij de beroepshalve blootgestelde populatie hoger is dan bij de controle populatie. Toepassing op deze gegevens van een Wilcoxon test geeft echter als p-waarde 0.13, zodat het verschil niet als statistisch significant kan worden beschouwd. Verder is de gemiddelde leeftijd van de beroepshalve blootgestelde populatie hoger, wat mede oorzaak kan zijn voor de waargenomen verhoogde incidentie van translocaties. Een studie van grotere omvang, waarbij twee populaties van gelijke gemiddelde leeftijd worden beschouwd, dringt zich op ten einde uitsluitsel te krijgen over de statistische significantie van het geobserveerde verschil.

Controle groep					
Donor nr.	Leeftijd	H gecum. over leven (mSv)	H gecum over 3 jaar (mSv)	H gecum over 1 jaar (mSv)	Genoom transl. Freq. (per cel)
1	37				0.122
2	46				0.00
3	47				0.043
4	45				0.00
5	32				0.00
6	41				0.037
7	50				0.00
8	30				0.00
9	34				0.00
10	39				0.00
Gemidd (St.dev)	40.1 (6.8)				0.020 (0.039)
Studiegroep					
11	50	19.54	0.08	0.00	0.020
12	56	61.53	2.30	0.88	0.00
13	56	121.78	0.49	0.06	0.096
14	64	171.38	1.45	0.06	0.00
15	49	53.77	1.61	0.52	0.175
16	53	22.67	1.88	0.05	0.00
17	49	113.71	7.18	3.92	0.013
18	45	64.87	2.86	1.57	0.087
19	50	61.46	0.92	0.00	0.031
20	56	104.02	5.42	0.92	0.033
21	52	74.6	10.71	10.94	0.0775
22	48	56.1	0.17	0.00	0.035
23	53	85.91	3.45	1.44	0.102
24	42	174.94	3.74	0.00	0.00
25	52	185.6	2.62	1.07	0.026
26	52	103.4	1.33	0.27	0.0935
27	51	91.05	4.8	0.43	0.0415
28	39	50.16	2.66	0.82	0.00
29	47	66.2	1.56	1.51	0.075
30	51	242	0.67	0.14	0.045
31	44	65	3.08	0.57	0.028
Gemidd St.dev.	50.4 (5.4)	94.7 (56.9)	2.80 (2.54)	1.20 (2.41)	0.047 (0.045)

Op een controle- en studiegroep van werknemers van het kernpark van Tihange werd eveneens de micronucleus test toegepast door de onderzoeksgroep van de VUB. Deze resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel. Naast het gemiddeld aantal cellen dat een micronucleus bevat per 1000 binucleaire cellen en de standaarddeviatie hierop tussen de donoren zijn eveneens de minimale en de maximale waarde voor elke groep gegeven.

Tabel: overzicht van de resultaten met de micronucleus test van de werknemers van Tihange, onderverdeeld in controle- en aan straling blootgestelde groep, rokers en niet-rokers.

	Blootgestelde groep		Controle groep	
	Rokers	Niet-rokers	Rokers	Niet-rokers
Totaal MN (%)	26.9 (3.3)	26.1 (2.5)	28.1 (4.1)	21.3 (4.6)
MN (%) min-max	14.2-62.3	17.4-38.5	11.7 –44.2	7.8-37.4
N	13	8	8	6

Toepassing van de Mann-Whitney U test toont geen statistisch significante verschillen tussen de studie- en de controlegroepen voor de rokers ($p=0.94$) en de niet-rokers ($p=0.24$).

V. BESPREKING

Eerste doelstelling van het project was het op punt stellen en validatie van een aantal "State of the Art" cytogenetische technieken voor biomonitoring van werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling. Binnen het kader van het netwerk is aldus momenteel biomonitoring met de micronucleus-centromeer techniek en de scoring van translocaties naast dicentrische chromosoomaberraties mogelijk. In een collaboratieve studie werden de eigenschappen van deze cytogenetische technieken voor biomonitoring van betreffende werknemers vergeleken. Naast reproduceerbaarheid van de dosisafhankelijkheid zijn een hoge gevoeligheid en een snelle en gemakkelijke toepasbaarheid op grote schaal de belangrijkste eigenschappen waaraan de techniek dient te voldoen. In het licht van de grootte van de populatie, die in aanmerking komt voor biomonitoring, een paar honderd per jaar, dient de tijd noodzakelijk voor de scoring beperkt te worden tot één dag.

De relatief eenvoudige en snelle scoring van micronuclei maakt deze methode zeer attractief voor de biomonitoring van grote populaties. De evaluatie van 2000 binucleaire cellen laat voor een individueel geval detectie toe van dosiswaarden vanaf 0.2 Gy wanneer een betrouwbaarheid van 95 % volstaat. Toepassing van de micronucleus-centromeer techniek verlaagt deze drempeldosis tot 0.1 Gy. De manuele microscopische scoring van centromeer-negatieve micronuclei in 2000 binucleaire cellen neemt ongeveer een halve dag in beslag. In het kader van huidig project werd de semi-automatische scoring procedure voor de conventionele micronucleus test, gebaseerd op gecomputeriseerde beeldanalyse van Giemsa gekleurde preparaten, gevalideerd. De semi-automatische scoring met dit systeem vraagt ongeveer evenveel tijd als de manuele scoring doch is meer reproduceerbaar dan een manuele scoring. De semi-automatische detectie van centromeren in de micronuclei werd echter nog niet uitgewerkt en het momenteel beschikbaar beeldanalysesysteem is nog niet uitgerust voor fluorescentie microscopie zodat automatisatie van de micronucleus-centromeer techniek momenteel nog niet tot de mogelijkheden behoort. Een verdere verhoging van de gevoeligheid van de micronucleus test kan misschien worden verwacht door selectie van de B-lymfocyten. Uit de aanvullende studie behorend bij het project is namelijk gebleken dat deze subgroep van de lymfocyten uiterst stralingsgevoelig is (Vral et al. 1998).

De conventionele analyse van dicentrische chromosoomaberraties laat een scoring toe van ongeveer 200 tot 300 metafasen per dag. Rekening houdend met de interindividuele verschillen, waargenomen in huidige studie, geeft dit als detectiedrempel 0.5 Gy, wat iets hoger is dan de waarde vermeld in de literatuur, 0.3 Gy (Roy et al. 1996). Wanneer een groter aantal metafasen worden beschouwd, wat dan natuurlijk meer tijd in beslag neemt, kan de drempeldosis worden verlaagd en zelfs tot 0.02 Gy bij scoring van 10000 metafasen (Lloyd et al. 1992). Voor biomonitoring is dit natuurlijk geen realistische situatie.

Chromosoom "painting" met verschillende chromosoom-specifieke DNA proben is een nieuwe techniek die een relatief snelle en betrouwbare detectie van translocaties mogelijk maakt. Dit cytogenetisch eindpunt is van speciaal belang gezien translocaties als stabiele aberraties langer aanwezig blijven na de blootstelling, ze niet noodzakelijk fataal zijn voor de cel en ze in direct verband staan met carcinogenese. Voor de analyse van translocaties werd in huidig project chromosoom "painting" met proben voor de chromosomen 2, 4 en 8 uitgewerkt. Deze chromosomen samen maken ongeveer 19 % van het genoom uit. De scoring van twee preparaten neemt ongeveer een dag in beslag. Dit correspondeert grosso modo met 400 metafasen in de controle stalen en 100 metafasen in de bestraalde bloedstalen. De resultaten, bekomen in huidige studie, geven aan dat onder deze omstandigheden de detectielimiet met het chromosoom 2,4,8 systeem rond de 1 Gy ligt. Uit de waargenomen frequentie van de translocaties, waarbij de beschouwde chromosomen betrokken zijn, kan de genoom translocatie frequentie worden afgeleid via de uitdrukking van Lucas et al. (1992). Deze uitdrukking is gebaseerd op de evenredigheid tussen translocatie frequenties en de fysische lengte van de chromosomen. We observeerden echter een overrepresentatie van chromosoom 4 en een onderrepresentatie van chromosoom 2 vergeleken met hun fysische lengte, wat de waarde van de uitdrukking van Lucas voor de afleiding van de genoom translocatie frequentie in twijfel trekt. Wanneer we echter toch laatst vermelde uitdrukking gebruiken om de genoom translocatie frequentie af te leiden uit het aantal waargenomen translocaties, blijkt het totaal aantal translocaties groter te zijn dan het aantal dicentrische aberraties. Vergeleken met de conventionele scoring van de dicentrische ligt de detectielimiet voor de uitgewerkte chromosoom "painting", 1 Gy, duidelijk hoger wanneer de scoring wordt beperkt tot één dag. Dit is natuurlijk te wijten aan het feit dat het probleem van de statistische onzekerheid bij het "painting" systeem voor biodosimetrie groter is dan bij de scoring van dicentrische aberraties gezien slechts 30 % van alle translocaties kunnen worden gedetecteerd met het chromosoom 2,4,8 "painting" systeem. Verder zijn de interindividuele variaties in de spontane incidentie voor translocaties belangrijker dan bij dicentrische. Meer studies zijn noodzakelijk aangaande deze variaties voor de translocaties binnen een controle populatie, alsook hun leeftijdsafhankelijkheid. Uit het doorgevoerde onderzoek blijkt dat observatie van minstens 1000 metafasen noodzakelijk is om de dosisdrempel naar beneden te brengen tot een waarde van 0.25 Gy met de gebruikte chromosoom 2,4,8 "painting". Het is duidelijk dat de detectie van translocaties voor biodosimetrie

beperkt blijft tot een klein aantal geselecteerde individuen of stralingsaccidenten doch niet geschikt is voor biomonitoring van aan straling blootgestelde populaties. Het blijft echter belangrijk dat translocaties fungeren als een cumulatieve dosimeter gezien hun frequentie niet beïnvloed wordt door de duur van de blootstelling en de tijd verstreken tussen de blootstelling en de bloedafname.

Biologische indicatoren van genetische stralingsschade zijn eveneens van groot belang bij stralingsaccidenten. Rekening houdend met de specifieke eigenschappen van elke methode, heeft elk cytogenetisch eindpunt zijn typische toepassingen na een stralingsaccident. De micronucleus-centromeer techniek laat een snelle screening toe bij ongevallen met een groot aantal blootgestelden. De analyse van de dicentrische aberraties is de methode van de eerste keuze bij een acute overbestraling van een beperkt aantal individuen. Voor dosisschattingen na chronische blootstellingen en voor retrospectieve dosimetrie is de analyse van translocaties aangewezen doch de analyse zal in dit geval een aantal dagen duren per individu. In conclusie, het is duidelijk dat via huidig project de know-how en de methodologie is uitgebouwd voor evaluatie van de genetische stralingsschade voor doeleinden van biomonitoring en bij stralingsaccidenten.

Met de op punt gestelde "State of the Art" cytogenetische technieken werd een screening uitgevoerd van een aantal populaties van werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling. Zo werd de micronucleus-centromeer techniek toegepast op een populatie van werknemers uit de medische sector (120 individuen) en op een populatie uit de nucleaire sector (215 individuen). De controlegroepen in deze studies leverden ons waardevolle data aangaande de spontane incidentie van de centromeer positieve en negatieve micronuclei. Beide studies toonden aan dat de toename van het aantal micronuclei met de leeftijd 0,24-0,31 per jaar, voor een mannelijke populatie bijna compleet te wijten is aan centromeer positieve micronuclei, wat wijst op een verhoogd chromosoomverlies met toenemende leeftijd. De studie van de werknemers uit de medische sector gaf eveneens aan dat de spontane incidentie bij een vrouwelijke populatie ongeveer een derde hoger ligt in vergelijking met een mannelijke populatie en dat dit verschil eveneens voornamelijk toe te schrijven is aan een hoger aantal centromeer-positieve micronuclei, waarschijnlijk door een verhoogd verlies van het X-chromosoom. De gegevensbank van de spontane micronucleus opbrengsten, opgebouwd tijdens deze studies, is van groot nut bij de screening van populaties blootgesteld aan straling. Opmerkelijk is dat in beide studies een beperkt aantal individuen een hoog (meer dan 50) aantal micronuclei vertoonden, welke eveneens nagenoeg compleet toe te schrijven waren aan centromeer-positieve micronuclei. Deze individuen behoorden zowel tot de controle- als tot de studiegroep van aan straling blootgestelde werknemers. Hiermee rekening houdend en eveneens met de clastogene werking van straling, is het zeer onwaarschijnlijk dat deze verhoogde micronucleus frequenties veroorzaakt werden door straling. We zouden in dat geval op zijn minst eveneens een verhoogd aantal centromeer-negatieve micronuclei mogen verwachten. De analyse van gegevens van beide studies naar de invloed van het rookgedrag op het aantal micronuclei was negatief: er kon geen verband worden gelegd tussen roken en een verhoogd aantal centromeer-positieve of negatieve micronuclei.

De conclusies naar de impact van de stralingsbelasting op de werkplaats op de beschouwde cytogenetische eindpunten zijn minder eenduidig. Alhoewel we er sterk de nadruk op leggen dat de waargenomen effecten statistisch niet significant zijn binnen 95 % betrouwbaarheidsgrenzen, werd bij de populatie uit de medische sector, beroepshalve blootgesteld aan straling, een verhoogd aantal centromeer-positieve micronuclei waargenomen, terwijl de populatie uit de nucleaire sector een lichte toename van het aantal centromeer-negatieve micronuclei vertoonden. Voortgaand op de voornamelijk clastogene werking van straling is eerstgenoemde observatie moeilijk uit te leggen. Naast blootstelling aan chemicaliën met aneugene werking, is genoom instabiliteit een mogelijke verklaring. Het gedrag waargenomen voor de werknemers uit de nucleaire sector is meer zoals verwacht: het aantal centromeer-positieve micronuclei blijft constant terwijl het aantal centromeer-negatieve micronuclei toeneemt pro rata 0,10 micronuclei per mSv. Deze waarde is in goede overeenkomst met de dosisafhankelijkheid, volgend uit een vorige studie van radiotherapie patiënten, 0,13 micronuclei per mSv (Thierens et al.1995). Deze observatie wijst op het feit dat een drempeldosis voor de clastogene werking niet bestaat en ondersteunt de benadering van de International Commission on Radiological Protection van de risico's van ioniserende straling: een lineaire dosisafhankelijkheid zonder drempel. De resultaten van onze studies i.v.m. de aneugene werking van straling daarentegen wijzen wel op een drempeldosis, gelegen tussen 0,5 en 1 Gy.

Met de op punt gestelde chromosoom "painting" van chromosoom 2,4 en 8 werd een vergelijkende studie uitgevoerd van het aantal translocaties bij een controle groep en een groep van werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling uit de nucleaire sector. Deze studie toont een verhoogde incidentie van het beschouwd cytogenetisch eindpunt voor deze laatste, alhoewel hier ook geen statistische significantie wordt bereikt, voornamelijk door het beperkt aantal individuen in elke groep. Uitbreiding van de bestudeerde populaties is hier noodzakelijk. Fundamenteel probleem is het arbeidsintensief karakter van de scoring van translocaties zoals vermeld bij de bespreking van de vergelijkende studie van de cytogenetische technieken.

In conclusie kunnen we stellen dat momenteel enkel de micronucleus-centromeer techniek een hoge gevoeligheid met een aanvaardbare tijd voor scoring kan combineren voor biomonitoring van relatief grote populaties van werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling. Een screening met deze techniek van werknemers met een belangrijke blootstelling zou de bepaling van de bloedformule, momenteel uitgevoerd als stralingsspecifiek onderzoek ter gelegenheid van het periodiek medisch onderzoek, kunnen vervangen. Dit zou in een preventief kader de individuele opvolging van de werknemer naar mogelijke genetische stralingseffecten verbeteren. Ten einde dit door te voeren dienen eveneens de ethisch-sociale aspecten van deze systematische biomonitoring te worden bestudeerd.

VI. BIBLIOGRAFISCHE VERWIJZINGEN

ICRP Publication 60, 1991. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP, Vol. 21, No. 1-3, Pergamon Press, Oxford.

Kirsch-Volders, M., Tallon, I., Tanzarella, C., Sgura, A., Hermine, T., Parry, E.M. and Parry, J.M. 1996. Mitotic non-disjunction as a mechanism for in vitro aneuploidy induction by X-rays in primary human cells. *Mutagenesis*, 11, 307-131.

Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Leonard, A., Deknuddt, G.L., Verschaeve, L., Natarajan, A.T., Darroudi, F., Obe, G., Palitti, F., Tanzarella, C. and Twan, E.J. 1992. Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 335-343.

Lucas, J.N., Awa, A., Straume, T., Poggensee, M., Kodama, Y., Nakano, M., Ohtaki, K., Weier, H.-U., Pinkel, D., Gray, J. and Littlefield, G., 1992. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 53-63.

Lucas, J.N., Hill, F.S., Burk, C.E., Fester, T., and Straume, T., 1995. Dose-response curve for chromosome translocations measured in human lymphocytes exposed to ⁶⁰Co gamma rays. *Health Physics*, 68, 761-765.

Natarajan, A.T., Vyas, R.C., Wiegant, J., and Curado, M.P. 1991. A cytogenetic follow-up study of the victims of a radiation accident in Goiania (Brazil). *Mutat. Res.*, 247, 103-111.

Roy, L., Sorokine-Durm, I., and Voisin, P. 1996. Comparison between fluorescence in situ hybridisation and conventional cytogenetics for dicentric scoring: a first step validation for the use of FISH in biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 665-669.

Thierens, H., Vral, A., Van Eijkeren, M., Speleman, F., and De Ridder, L. 1995. Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 529-539.

Thierens, H., Vral, A., De Scheerder, F., De Ridder, L., and Tate, A. 1997. Semi-automated micronucleus scoring in cytokinesis-blocked lymphocytes after irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 72, 319-324.

Thierens, H., Vral, A., De Ridder, L., Touil, N., Kirsch-Volders, M., Lambert, V. and Laurent, C. 1999. Scoring of different cytogenetic endpoints after in vitro low dose gamma-exposure: interlaboratory comparison for biomonitoring of radiological workers. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75, 23-34.

Uchida, I.A., Lee, C.P.V. and Byrnes, E.M. 1975. Chromosome aberrations induced in vitro by low doses of radiation: non-disjunction in lymphocytes of young adults. *Am. J. Hum. Gen.* 27, 419-429.

UNSCEAR 1994. Sources and effects of ionizing radiation, 1994. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly.

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

Vral, A., Louagie, H., Thierens, H., Philippé, J., Cornelissen, M., and De Ridder, L. 1998. Micronucleus frequencies in cytokinesis-blocked human lymphocytes after low dose γ -irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73, 549-555.

Bijhorende studie

INDUCTIE VAN MICRONUCLEI IN HUMANE LYMFOCYTEN SUBPOPULATIES IN VIVO DOOR IONISERENDE STRALING.

L. De Ridder, A. Vral, K.Herdveldt, L.Louagie, M. Cornelissen
Laboratorium voor Histologie, Universiteit Gent,

J. Philippé
Departement Klinische Biologie, Universitair Ziekenhuis Gent,

H. Thierens
Laboratorium voor Standaard Dosimetrie, Universiteit Gent,

I. INLEIDING

I.1. Algemene context van het onderzoek.

De populatie van lymfocyten in het perifere bloed bestaat uit verschillende subpopulaties die verschillen in aantal, levensduur en functie. Uit recente literatuurgegevens blijkt dat een aantal van deze verschillende subpopulaties eveneens een verschillende stralingsgevoeligheid vertonen in vitro (Ban and Cologne 1992, Wuttke et al. 1993, Holmen et al. 1994).

Dit onderzoeksproject had in eerste instantie tot doel om de genetische stralingsgevoeligheid te bestuderen in de verschillende lymfocyttaire subsets. Hiervoor maakten we gebruik van de "cytokines block" micronucleus methode gecombineerd met immuuncytochemische kleuringstechnieken. De identificatie van een subpopulatie met een hogere stralingsgevoeligheid kan een belangrijke vooruitgang betekenen voor de verfijning van de biologische dosimetrie voor lage dosis detectie alsook voor het bepalen van de individuele stralingsgevoeligheid. Momenteel hebben de huidig gebruikte biologische dosimetrie methoden zoals dicentrische chromosoom aberraties, translocaties en micronuclei het nadeel dat ze of te arbeidsintensief zijn en hierdoor niet bruikbaar voor routine applicaties of onvoldoende gevoelig zijn voor detectie van in vivo stralingschade veroorzaakt door lage dosis.

Naast het bepalen van de genetische stralingsgevoeligheid werd in een tweede fase van de studie de stralingsgevoeligheid van lymfocyttaire subsets eveneens bestudeerd op cellulair niveau. Hiertoe werd het percentage apoptotische cellen geëvalueerd. Uit literatuurgegevens blijkt immers dat ioniserende straling apoptose induceert in heel wat celtypes, o.a. Go lymfocyten.

De analyse van stralingsgeïnduceerde apoptose zal ons toelaten om de correlatie tussen micronuclei en apoptose te onderzoeken alsook om de toepasbaarheid van apoptose assays voor biologische dosimetrie te evalueren. Verder zal het ons toelaten om het apoptose proces beter te begrijpen.

I.2. Doelstellingen.

- 1.a. Nagaan of er verschillen zijn in genetische stralingsgevoeligheid tussen lymfocyttaire subpopulaties gebruik makend van de 'cytokines block' micronucleus methode.
- b. Verder uitwerken van de 'cytokines block' micronucleus methode voor de meest stralingsgevoelige subpopulatie en dit om de gevoeligheid van de biologische dosimetrie te verhogen in het lage dosis gebied.
2. Nagaan of er verschillen zijn in stralingsgeïnduceerde apoptose in de lymfocyttaire subsets.
3. Nagaan of er een correlatie bestaat tussen de expressie van cytogenetische schade (micronuclei) en apoptose inductie in verschillende lymfocyttaire subpopulaties na in vitro bestraling.
4. Nagaan of de verschillen in stralingsgevoeligheid geobserveerd na in vitro bestraling ook relevant zijn voor de in vivo situatie van bestraalde kankerpatiënten.
5. Inzicht verwerven in het mechanisme van stralingsgeïnduceerde apoptose. Hierbij wordt de cytochrom c/caspase 3 pathway onderzocht.

II. METHODOLOGIE

II.1. Materiaal

- 1) Bloedstalen van gezonde vrijwilligers. Deze bloedstalen werden in vitro bestraald met verschillende dosissen ⁶⁰Co-gamma stralen.
- 2) Bloedstalen van 10 cervixcarcinoma patiënten van het U.Z. Gent. Deze bloedstalen werden genomen vóór en op verschillende tijdstippen tijdens de therapie. Deze patiënten werden geselecteerd omdat ze enkel radiotherapeutisch werden behandeld en geen chemotherapie kregen. De patiënten kregen een tumordosis van 46 tot 50 Gy MV X-stralen gegeven in dagelijkse fracties van gemiddeld 2Gy. De equivalente totale lichaamsdosis werd berekend door de integrale tumordosis te delen door het lichaamsgewicht.

II.2. Methoden

1. Identificatie van lymfocyttaire subpopulaties.

We maakten gebruik van immunocytochemische kleurtechnieken voor het visualiseren van de verschillende CD's (clusters of differentiation) aanwezig in de membraan van de onderscheiden subpopulaties. De gemerkte subpopulaties werden dan verder geanalyseerd via flow cytometrie. De onderzochte subpopulaties omvatten de T helper cellen (CD3+/CD4+), de suppressor/cytotoxische T cellen (CD3+/CD8+), de B lymfocyten (CD20+; CD19+) en de 'natural killer' cellen (CD3-/CD56+). Binnen de groep van de T lymfocyten maakten we eveneens een onderscheid tussen de naïve (nog niet antigen geprimeerd, CD45RA+/CD45RO-) en de geheugen cellen (CD45RA-/CD45RO+). De immunocytochemische kleuringen voor deze verschillende subsets (alle antilichamen werden aangekocht bij Becton Dickinson (BD)) gebeurden 1) op mitogen gestimuleerde lymfocyten (MN assay), 2) op lymfocytensuspensies voor en na 24h cultuur (in vitro apoptose studies) en 3) op verse bloedstalen (in vivo patiëntenstudie).

Voor de cytogenetische studies werden, na het beëindigen van de cultuurperiode, de B cellen en NK cellen immunocytochemisch aangekleurd. Hiertoe werden de B cellen geïncubeerd (20 min, KT, donker) met CD20 (Leu-16) geconjugeerd met phycoerytrin (PE), de NK cellen met CD3 (Leu-4) geconjugeerd met fluoresceïne isothiocyanaat (FITC) en CD56 (Leu-19) geconjugeerd met PE (10 µl/100µl cellen). Daarna werden de cellen gewassen in PBS/BSA en gedurende 15 min geïncubeerd met FACS brand lysing oplossing en opnieuw gewassen vooraleer te worden gesorteerd met de FACSort flow cytometer.

Voor de apoptose studie in lymfocyttaire subsets werden lymfocytensuspensies (100 µl; 1.10⁶ cellen/ml) geïncubeerd (20 min, kamertemperatuur (KT), in het donker) met 10µl CD3(Leu-4) of met CD45 RA (Leu-18) niet gelabelde antilichamen. Daarna werden de cellen gewassen met PBS/BSA en geïncubeerd met 10 µl RAM (rat anti-mouse) IgG1 geconjugeerd met peridin-chlorophyll (PerCP, BD) en dit gedurende 20 min bij KT in het donker. De cellen werden dan opnieuw gewassen en geïncubeerd (20 min, KT, donker) met respectievelijk 10 µl CD 4 (Leu-3A), CD8 (Leu-2A) of CD 56 (Leu-19) antilichamen allen PE geconjugeerd. 100µl cellen werden eveneens geïncubeerd met 10µl CD 20 antilichaam (Leu-16, PE gelabeld, BD) (Philippé et al. 1997). De verschillende celgroepen werden dan opnieuw gewassen en gekleurd met FITC gelabeld annexine V voor apoptose bepaling (zie methodes voor apoptose detectie).

Voor de in vivo studie werd 100 µl vers bloed, voor en na in vivo bestraling, geïncubeerd met 5 µl CD 3 (Leu-4) geconjugeerd met FITC samen met respectievelijk 5 µl CD 4 (Leu-3A), CD8 (Leu-2A) of CD 56 (Leu-19) antilichamen allen PE geconjugeerd. 100µl bloed werd eveneens geïncubeerd met 5 µl CD 20 (Leu-16, PE gelabeld). Na 20 min incubatie in het donker werden de rode bloedcellen gelyseerd en werden de stalen geanalyseerd met de FACSort flow cytometer (BD). Per staal werden minstens 10000 cellen geanalyseerd

2. "Cytokinesis block" micronucleus methode.

Voor de toepassing van de MN methode op de verschillende subsets werd gewerkt met lymfocyten culturen in plaats van bloedculturen. Hiertoe werden de lymfocyten geïsoleerd via Ficoll-Hypaque dichtheitsgradient centrifugatie (Lymphoprep) en vervolgens bestraald met verschillende doses γ -stralen. De bestraalde en controle cellen werden gekweekt in RPMI milieu met 10% foetaal kalf serum bij 37°C en 5% CO₂ begazing.

Wat betreft de T lymfocyten werden de cellen in cultuur gestimuleerd tot deling door toevoeging van het mitogen phytohaemagglutinin (PHA-P, 30 µg/ml; Difco Lab.). Na 48h cultuurperiode werd cytochalasin B (6 µg/ml, Sigma) toegevoegd, een stof die de cytokinesis inhibeert, waardoor dubbelkernige cellen ontstaan. In die dubbelkernige cellen kunnen dan de stralingsgeïnduceerde afgebroken chromosoomfragmenten of micronuclei (MN) gescoord worden na druppelen van de gefixeerde cellen (metahanol/ijsazijn) op een draagglas en aankleuren met een klassieke Giemsa-kleuring (Vral et al. 1994 a).

Voor de B lymfocyten werden de cellen geïncubeerd met 2.5% pokeweed mitogen voor 5 dagen. Na 72h werd cytochalasin B toegevoegd. Voor de NK cellen werd incubatie met recombinant interleukine 15 (rIL-15) (10 ng/ml; Immunex Corp.) voor 5 dagen optimaal bevonden. Cytochalasin B werd toegevoegd na 72h.

Aangezien het % B cellen en NK cellen aanwezig in het perifere bloed laag is werd gezocht naar een methode om deze cellen te isoleren en hierdoor sterk te concentreren. Hiertoe werden na het beëindigen van de cultuurperiode de B cellen en NK cellen immuocytochemisch aangekleurd (zie 1.a.). Vervolgens werden de met AL geconjugeerde cellen gesorteerd volgens CD20 en CD56 positiviteit via de FACSort flow cytometer.

Aangezien de flowcytometrische sorteringmethode meestal resulteerde in een laag rendement werd eveneens een andere aanrijkmethode toegepast gebaseerd op immunomagnetische beads. Deze methode laat toe om o.a. B lymfocyten af te scheiden uit een suspensie van mononucleaire cellen. Hierbij worden de mononucleaire cellen na het beëindigen van de cultuurperiode gedurende 15 min, bij 4°C, geïncubeerd met CD 19 gemerkte magnetische beads (MACS (Magnetic Cell Sorting System), Miltenyi Biotec). Daarna worden de cellen gewassen met PBS/BSA en gelopen over een scheidingskolom bevestigd aan een magneet. In de eerste fracties worden de niet gelabelde cellen (T cellen, NK cellen en monocytten) opgevangen terwijl de magnetisch gelabelde B cellen vastgehouden worden in de kolom. Daarna wordt de kolom van de magneet gehaald en wordt nogmaals 5 ml PBS/BSA over de kolom gelopen. De fractie die nu wordt opgevangen bevat de CD 19 gelabelde cellen. Deze fractie wordt vervolgens behandeld met KCl (hypotone shock) en gefixeerd met methanol/ijsazijn. Daarna worden de gefixeerde cellen op draagglasjes gedruppeld en gekleurd met Romanowsky-Giemsa. Deze methode is veel minder omslachtig en resulteerde in een veel hogere celopbrengst dan isolatie via de sorteermodule van de flow cytometer.

3. Methodes voor apoptose detectie.

Voor het apoptose onderzoek werden lymfocytenstalen gedurende 24h geïncubeerd bij 37°C en CO₂ begazing.

Verschillende technieken werden gebruikt om apoptose te detecteren in lymfocyten.

De gedetailleerde protocols worden beschreven in Hertveldt et al. 1997, Phillipé et al. 1997, Vral et al. 1998b, Louagie et al. 1998a en b, Cornelissen et al. 1998, Louagie et al. submitted to Cell Biology: International Reports).

A. Electronenmicroscopie van apoptotische cellen.

Electronenmicroscopische analyse, nog steeds beschouwd als gouden standaard voor apoptose bepaling, werd verricht op een aantal stalen ter confirmatie van het apoptose proces. Dit is een zeer arbeidsintensieve techniek die echter niet geschikt is als kwantitatieve techniek waarbij een groot aantal cellen moet worden gescreend. Voor EM analyse werden lymfocyten 24h na incubatie gepelleterd. De celpellet werd gedurende 1 h gefixeerd in koude glutaraaldehyde (2%) in cacodylaat buffer en gedurende 1 h gepostfixeerd met OsO₄. De pellet werd ingebed in epoxy hars en gesneden voor EM analyse. De EM secties werden gecontrasteerd met Ur-acetaat en Pb-citraat (Cornelissen et al. 1998).

B. Lichtmicroscopie van apoptotische cellen.

Het voorkomen van pyknotische nucleï is een kenmerk van apoptotische cellen dat lichtmicroscopisch kan worden geanalyseerd. Hiertoe werden de lymfocyten na 24h incubatie gedurende 30 min gefixeerd in methanol/ijsazijn (10/1) en vervolgens op draagglasjes gebracht. De cellen werden gekleurd met Haematoxyline-Eosine en per staal werden 1000 lymfocyten gescoord voor de aanwezigheid van pyknotische kernen (Vral et al. 1998b).

C. Flow cytometrische technieken voor apoptose detectie.

1. Annexine V

De Annexine V flow cytometrische assay steunt op het principe dat apoptotische cellen fosfatidylserine op hun buitenste membraan tot expressie brengen wat vervolgens aan te kleuren is met Annexine V - FITC. Dubbelkleuring voor Annexine V -FITC binding en cellulair DNA met propidium iodide (PI) werd uitgevoerd. Hiertoe werden 3x10⁵ lymfocyten geresuspendeerd in 50 µl HEPES buffer en vervolgens geïncubeerd met 1 µl Annexine V- FITC gedurende 30min bij kamertemperatuur (KT), in het donker. Juist voor de analyse van de cellen met een BD FACSort toestel werd aan de cellen PI (0.25 µg/ml) toegediend om een onderscheid te kunnen maken tussen vroeg apoptotische cellen (Annexine V + / PI -) en laat apoptotische of secundair necrotische cellen (An V + / PI +)(Hertveldt et al. 1997, Louagie et al. 1998b, Louagie et al. submitted to Cell Biology: International Reports). De Annexine V flowcytometrische techniek werd eveneens toegepast op lymfocyttaire subsets (Phillippé et al. 1997).

2. DiOC6.

DiOC6 accumulatie werd bestudeerd om de afname in $\Delta\Psi_m$ (mitochondriaal transmembraan potentiaal) in apoptotische cellen te analyseren. DiOC6 kleuring is hoog in viabele cellen omdat de mitochondriën van viabele cellen een hoge negatieve membraan potentiaal vertonen. Apoptotische cellen daarentegen vertonen een gereduceerde mitochondriaal potentiaal en vertonen een zwakke kleuring voor DiOC6. De kationische kleurstof DiOC6 werd bewaard in DMSO (conc. 1mM). Het werd verder verdund in ethanol waarvan 2 μ l (eindconc. 40 nM) werd toegevoegd aan 3×10^5 PBMC verdund in 500 μ l PBS. Cellen werden gedurende 15 min geïncubeerd in het donker bij 37°C en vervolgens gekleurd met PI juist voor analyse met de FACSort. Tweekleuren flowcytometrische analyse werd uitgevoerd (Hertveldt et al. 1997, Louagie et al. submitted to Cell Biology: International Reports).

3. DNA fragmentatie

Het op regelmatige afstanden verknippen van het DNA door endonucleasen is een specifiek kenmerk voor apoptose. Het identificeren van DNA fragmenten via TUNEL assay (Boehringer) is dan ook een veel gebruikte assay om apoptose te meten. Voor de TUNEL assay werden 2×10^6 lymfocyten gewassen met PBS/BSA. Vervolgens werden de cellen gefixeerd en gepermeabiliseerd met Starfiqs IQP-200 (BD). Daarna werden de cellen geïncubeerd met TUNEL reactiemengsel (60 min, 37°C), gewassen en vervolgens geanalyseerd met de FACSort flow cytometer (Louagie et al. submitted to Cell Biology: International Reports).

Om het mechanisme dat het apoptose proces reguleert te bestuderen werd nagegaan of de triggering gebeurt via vrijstelling van cytochroom-c uit de mitochondria en caspase-3 activatie (Louagie et al. submitted to Cell Biology: International Reports).

Gebruikte technieken:

1. Metingen van vrijstelling van cytochroom-c en caspase-3 activiteit via Western Blotting.

Voor het meten van het totaal cytochroom-c gehalte en caspase-3 bepaling werden lymfocyten gewassen met PBS en gelyseerd in lysisbuffer (1% NP40, 200mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH = 7, 1 mM PMSF). Voor de detectie van cytoplasmatisch cytochroom-c werden de cellen gelyseerd in lysisbuffer met 0.02% digitonine i.p.v. 1% NP40. De cellysaten werden gezuiverd door centrifugatie en 100 μ g proteïne werd vervolgens geanalyseerd via SDS-PAGE elektroforese. Na elektroforese werden de eiwitten getransferreerd naar een Hybond nitrocellulose membraan en immuocytochemisch gedetecteerd met anti-cytochroom-c of anti-humaan caspase-3 antilichamen. De blottingen werden ontwikkeld met een chemiluminiscentie methode (ECL, Amersham). Cytochroom-c en caspase-3 werden geanalyseerd op verschillende tijdstippen (1h, 5h, 12h, 24h en 48h na bestraling).

2. Fluorometrische assays voor het bepalen van 'caspase-3-like' activiteit in cellysaten

'Caspase-3-like' activiteit werd gemeten door 25 μ g cellysaat (preparatie zie Western blotting) gedurende 1h, bij 30°C te incuberen met 50 μ M Ac-DEVD.AMC fluorogeen substraat in een totaal volume van 150 μ l reactiebuffer. Het vrijstellen van AMC werd spectrofluorometrisch bepaald (CytoFluor, PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA). De data werden uitgedrukt als toename in fluorescentie (ΔF) in functie van de tijd ($\Delta F/\text{min}$). 'Caspase-3-like' activiteit werd gemeten op verschillende tijdstippen (1h, 5h, 12h, 24h en 48h na bestraling).

3. Flow cytometrische bepalingen van 'caspase-3-like' caspases.

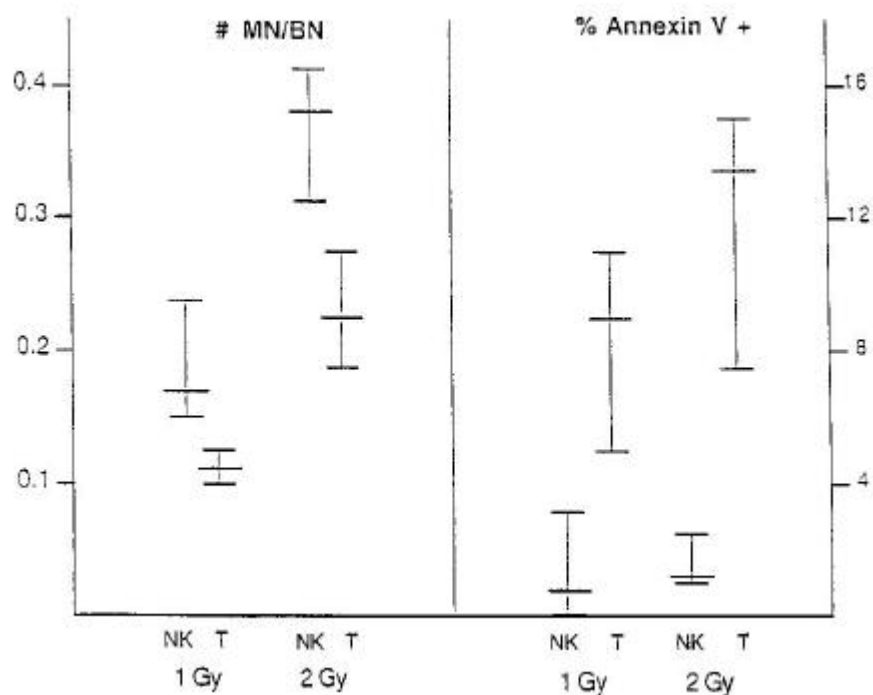
Voor de flowcytometrische analyse van 'caspase-3-like' activiteit werd gebruik gemaakt van PhiPhiLux-G1D2 substraat. Hiertoe werd een celpellet van 10^6 cellen gedurende 1h (37°C, 5%CO₂) geïncubeerd met 50 μ l 10 μ M substraat oplossing en 5 μ l foetaal kalf serum. Nadien werd 500 μ l ijskoude buffer samen met 1 μ l PI toegevoegd en werden de stalen onmiddellijk geanalyseerd met de FACSort. Dit experiment werd uitgevoerd zowel op lymfocyten als op thymocyten, 24h na bestraling.

III. RESULTATEN EN DISCUSSIE

III.1. Genetische stralingsgevoeligheid van lymfocyttaire subpopulaties.

III.1.a. Inductie van micronuclei in NK cellen en T lymfocyten na in vitro γ bestraling (Louagie et al. 1998a).

De resultaten van deze studie toonden aan dat in vitro bestraling met 2 Gy γ -stralen resulteerde in een hogere MN frequentie in NK cellen dan in T lymfocyten en dit na optimale stimulatie van beide subsets (Tabel 1, Figuur 1). Andere studies die resultaten beschrijven van MN inductie in lymfocyttaire subsets handelen niet over NK cellen uitgezonderd de studie van Ban en Cologne (1992) waar een lager aantal MN werd vastgesteld in NK cellen. In deze studie werden MN echter gescoord in CD 56+ cellen, hetgeen niet helemaal correct is aangezien NK cellen eveneens CD3- moeten zijn en een dubbele kleuring zoals uitgevoerd in onze studie nodig is. Verder werden NK cellen in deze studie gestimuleerd met PHA wat geen optimale stimulatie is voor NK cellen. In onze studie werd gebruik gemaakt van IL-15, een cytokine waarvan geweten is dat het NK cellen stimuleert en proliferatie van deze cellen initieert (Leclercq et al. 1996, Warren et al. 1996).

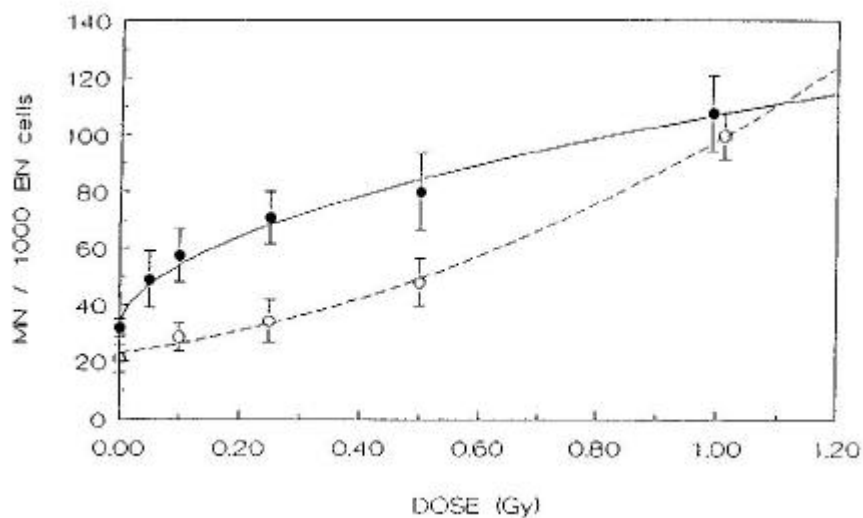


Figuur 1. Micronucleus (uitgedrukt als het aantal MN per tweekernige cel) en apoptose inductie (uitgedrukt als het % Annexine-V positieve cellen) in NK cellen en T lymfocyten, na een dosis van 1 en 2 Gy γ stralen.

III.1.b. Inductie van MN in B lymfocyten na lage dosis γ stralen (Vral et al. 1998a).

Uit tal van literatuur studies blijkt dat B lymfocyten de meest stralingsgevoelige subpopulatie zijn en dit met betrekking tot verschillende eindpunten zoals immuunfunctie, clonogenic cell survival, apoptose en proliferatie. Wat betreft de genetische stralingsgevoeligheid van B cellen zijn slechts een beperkt aantal publicaties voorhanden die echter een gebrekkige methodologie vertonen.

Uit onze studie blijkt dat lage dosis γ stralen (< 1 Gy) een significant hoger aantal MN induceert in B lymfocyten dan in T lymfocyten en dit na optimale stimulatie van beide subsets en aanrijking van B cellen via de sorteermodule van de flowcytometer (Tabel 2). De MN dosis-respons curve voor B lymfocyten vertoont een initieel sterke stijging voor doses tot en met 0.1 Gy gevolgd door een afvlakken van de curve voor de hogere doses (figuur 2). Dit afvlakken van de curve zou kunnen wijzen op ernstige schade thv. het DNA en het spoelfiguur hetgeen zal interfereren met normale celdeling en dus ook met de vorming van MN in de meest beschadigde cellen. Een verhoogde mitotische radiosensitiviteit in B cellen werd eveneens aangetoond in de studies van Wüttke et al. 1993 en Schwartz et al. 1980, 1983).



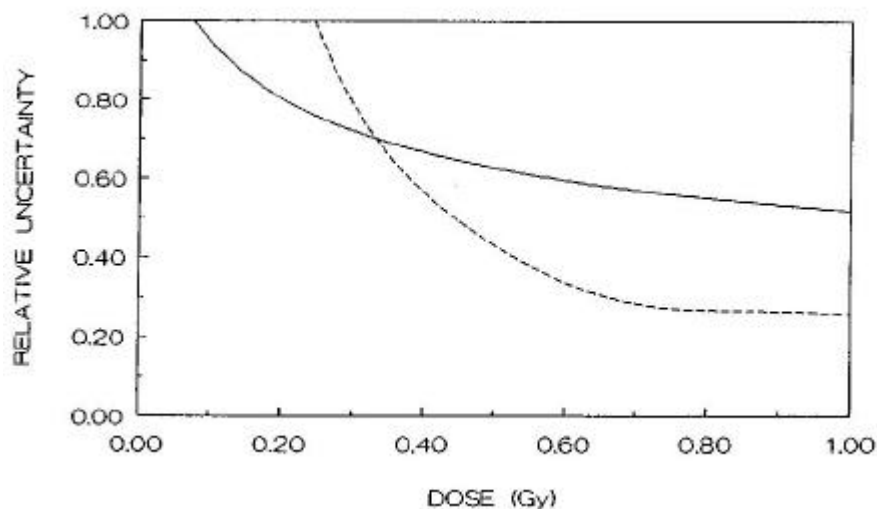
Figuur 2. Het gemiddeld aantal MN voor T (●) en B (○) lymfocyten, uitgedrukt als het aantal MN per tweekernige cel in functie van de stralingsdosis voor 6 donoren. De volle lijnen zijn de resultaten van de beste fittings door de data. De foutenvlaggen zijn de standaard deviaties (S.D.).

Het radiosensitieve gedrag van B lymfocyten kan echter nog niet volledig worden verklaard. Volgens een recente publicatie (Müller et al. 1998) zou de radiosensitiviteit van B cellen gecorreleerd zijn met de activiteit van DNA-afhankelijk proteïne kinase (DNA-PK) in deze cellen. DNA-PK speelt een belangrijke rol bij het herstel van DNA dubbelstrengbreuken.

Donor	Dose (Gy)	T lymphocytes		B lymphocytes	
		Number of BN	Number of MN/BN	Number of BN	Number of MN/BN
1	0	1000	0.0210	754	0.0265
	0.05			990	0.0364
	0.1	1000	0.0320	1000	0.0510
	0.25	1000	0.0380	977	0.0645
	0.5	1000	0.0465	809	0.0606
	1	1000	0.1040	663	0.1220
2	0	1000	0.0195	727	0.0330
	0.05			487	0.0640
	0.1	1000	0.0245	733	0.0505
	0.25	1000	0.0275	447	0.0650
	0.5	1000	0.0405	553	0.0690
	1	1000	0.1000	417	0.1130
3	0	1000	0.0145	700	0.0357
	0.05			1000	0.0430
	0.1	1000	0.0208	777	0.0620
	0.25	1000	0.0253	855	0.0620
	0.5	1000	0.0530	582	0.0770
	1	1000	0.0990	900	0.0844
4	0	1000	0.0285	523	0.0306
	0.05			403	0.0470
	0.1	1000	0.0355	352	0.0710
	0.25	1000	0.0420	480	0.0830
	0.5	1000	0.0620	533	0.097
	1	1000	0.1030	494	0.1150
5	0	1000	0.0175	439	0.0340
	0.05			472	0.0570
	0.1	1000	0.0285	572	0.0630
	0.25	1000	0.0300	350	0.0820
	0.5	1000	0.0400	566	0.0850
	1	1000	0.0840	357	0.1010
6	0	1000	0.0240	644	0.0310
	0.05			392	0.0460
	0.1	1000	0.0295	366	0.0460
	0.25	1000	0.0420	454	0.0680
	0.5	1000	0.0465	619	0.0905
	1	1000	0.1080	857	0.1110
mean (S.D.)	0	6000	0.0208 (0.0049)	3787	0.0318 (0.0032)
	0.05			3744	0.0489 (0.0100)
	0.1	6000	0.0285 (0.0052)	3800	0.0573 (0.0093)
	0.25	6000	0.0342 (0.0075)	3563	0.0708 (0.0093)
	0.5	6000	0.0480 (0.0083)	3662	0.0798 (0.0136)
	1	6000	0.0997 (0.0083)	3688	0.1077 (0.0133)

Tabel 2. Het aantal spontane en stralingsgeduceerde micronuclei (MN) in T en B lymfocyten uitgedrukt als het aantal MN per tweekernige (BN) cel.

(dsb). B cellen vertonen een variante vorm van het Ku proteïne, resulterend in een verminderde capaciteit voor het binden van de catalytische subunit van het complex, DNA-PKcs, wat uiteindelijk resulteert in een verminderde DNA-PK activiteit. Deze resultaten zouden erop wijzen dat het stralingsgevoelig gedrag van B lymfocyten met betrekking tot genetische schade te wijten is aan een slecht DNA dsb herstelmechanisme. Aangezien B cellen zeer stralingsgevoelig blijken te zijn onderzochten we de mogelijke toepasbaarheid van de B cel MN test voor biologische dosimetrie van individuen na acute accidentele of medische blootstelling aan lage dosis ioniserende stralen. Figuur 3 geeft de relatieve onzekerheid op de dosisbepaling weer verkregen met de conventionele en de B cel MN test. Deze figuur toont aan dat wanneer de spontane micronucleus frequentie niet gekend is, wat meestal het geval is bij stralingsaccidenten, doses van 0.08Gy kunnen gedetecteerd worden met de B cel micronucleus methode en dit terwijl de klassieke micronucleus test hier enkel dosis detectie toelaat vanaf 0.25Gy. Voor doses hoger dan 0.25 Gy wordt de conventionele MN test gevoeliger aangezien de relatieve onzekerheid op de dosis bepaling hier zeer groot wordt met de B cel MN test. Daar slechts een heel klein dosisgebied (0.08 - 0.25 Gy) kan geanalyseerd worden met de B cel MN test en de blootstellingsdosis meestal niet geweten is bij een stralingsaccident kan deze test de klassieke MN test niet vervangen maar enkel toegepast worden wanneer met de klassieke MN test geen verhoogde MN frequentie wordt gemeten. De korte 'in vivo lifespan' van B lymfocyten (3 à 4 dagen) brengt verder met zich mee dat men deze test enkel kan toepassen als men bloedstalen neemt binnen de 24h na blootstelling.



Figuur 3. De relatieve onzekerheid op de dosisbepaling, bij 95 % betrouwbaarheids grenzen, verkregen met de conventionele MN methode (---) en de B cel MN methode (—).

In praktijk betekent dit dat wanneer een bloedstaal genomen wordt binnen de 24h na blootstelling, 2 lymfocytenculturen worden gestart - 1 voor de conventionele MN test en 1 voor de B cel MN test - hetgeen geen extra werk inhoudt. Enkel indien geen verhoogde MN frequentie wordt gemeten met de conventionele test kunnen B cellen gesorteerd worden en MN gescoord in deze cellen. Momenteel is er echter nog geen alternatieve cytogenetische methode beschikbaar die dosisdetectie toelaat beneden 0.1 Gy en die tevens praktisch uitvoerbaar is.

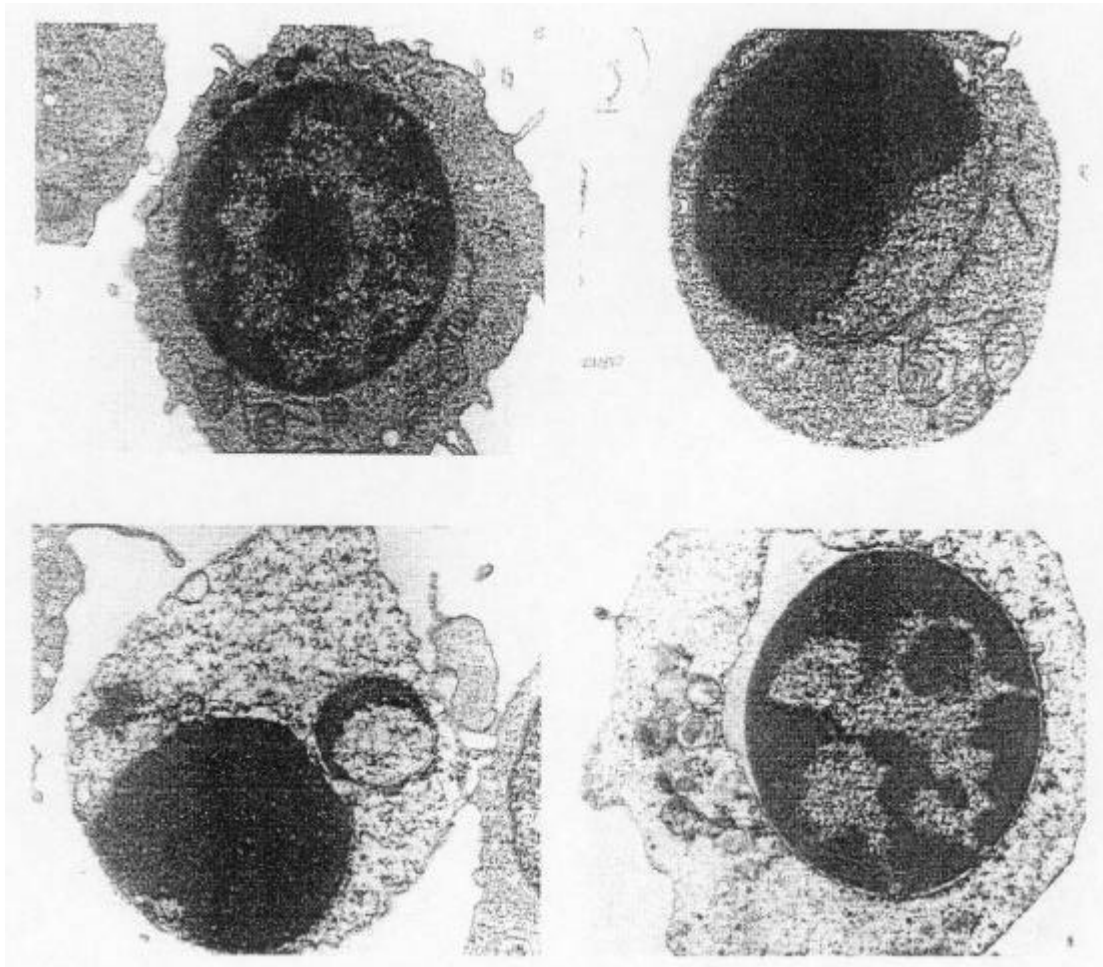
Alhoewel het groot aantal beperkingen voor het gebruik van de B cel MN test bij stralingsaccidenten, lijkt deze test voornamelijk geschikt te zijn voor dosisevaluatie bij patiënten die diagnostisch of therapeutisch behandeld worden met een lage stralingsdosis. Bij medische toepassingen is een controle bloedstaal steeds voorhanden en is er tevens geen probleem voor het afnemen van een bloedstaal onmiddellijk na bestraling.

Vooraleer de B cel MN test zal kunnen gebruikt worden voor in vivo dosis evaluatie dringt verder onderzoek zich op naar :

- 1) de stabiliteit van de spontane MN frequentie in B cellen,
- 2) de reproduceerbaarheid van de resultaten
- 3) het in vivo gedrag van B cellen met betrekking tot MN inductie. Wat dit laatste punt betreft wijzen preliminaire resultaten erop dat na in vivo bestraling van cervixcarcinooma patiënten een hoger aantal MN voorkomt in B cellen dan in T cellen, dit in overeenkomst met onze in vitro MN resultaten.

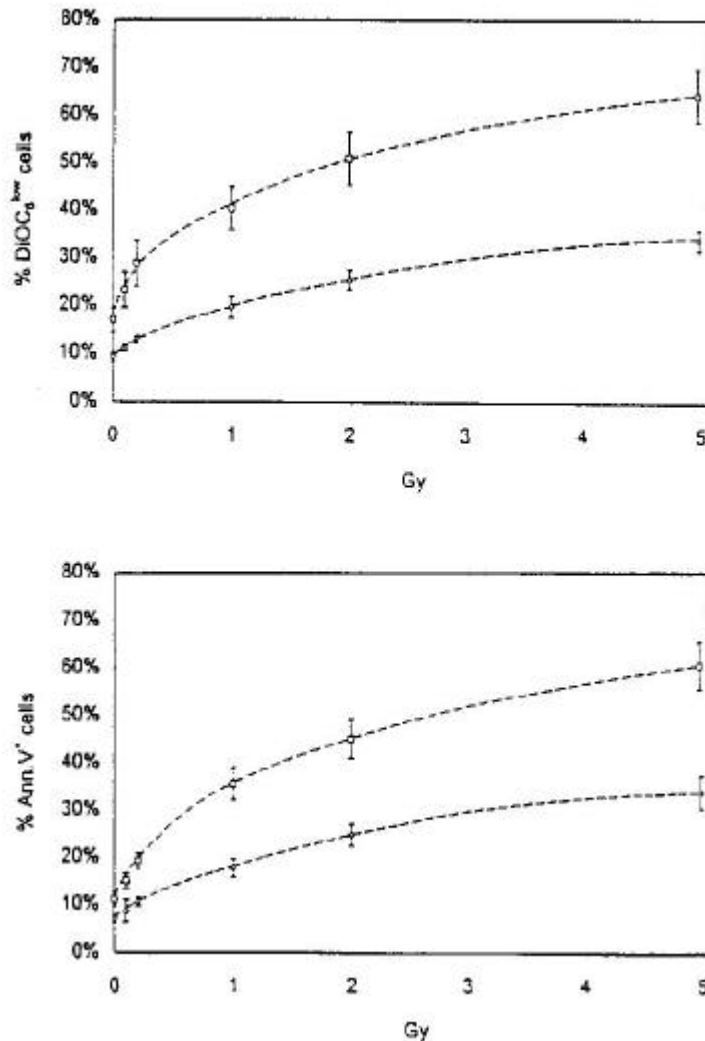
III.2. Stralingsgevoeligheid van lymfocyten en lymfocyttaire subsets met als eindpunt apoptosis (Hertveldt et al. 1997, Philippé et al. 1998, Vral et al. 1998b, Louagie et al. 1998a & b, Cornelissen et al. 1998).

Vooraleer apoptose te evalueren in de verschillende lymfocyttaire subsets werd de invloed van straling op deze parameter eerst onderzocht in de totale lymfocytenpopulatie. Voor de kwantificatie van het aantal apoptotische cellen werd gebruik gemaakt van lichtmicroscopie (pyknotische kernen) en Annexine-V en DiOC6 flowcytometrische technieken. De bruikbaarheid van deze technieken voor apoptose detectie werd geëvalueerd via electronenmicroscopie, de gouden standaard voor het karakteriseren van apoptose. We konden besluiten dat de hierboven vermelde technieken bruikbaar zijn als kwantitatieve apoptose assays; de Annexine-V en DiOC6 flowcytometrische technieken hebben als voordeel dat ze een snelle analyse toelaten. We moeten echter wel vermelden dat deze technieken niet toelaten om een onderscheid te maken tussen apoptose (vroeg apoptose en secundair necrose) en necrose (primair necrose), zodat E.M. confirmatie van het apoptose proces noodzakelijk is (Figuur 4). E.M. analyse toonde aan dat voor neutronen en gamma stralen, doses gaande tot 5 Gy enkel apoptose induceren en geen primaire necrose.



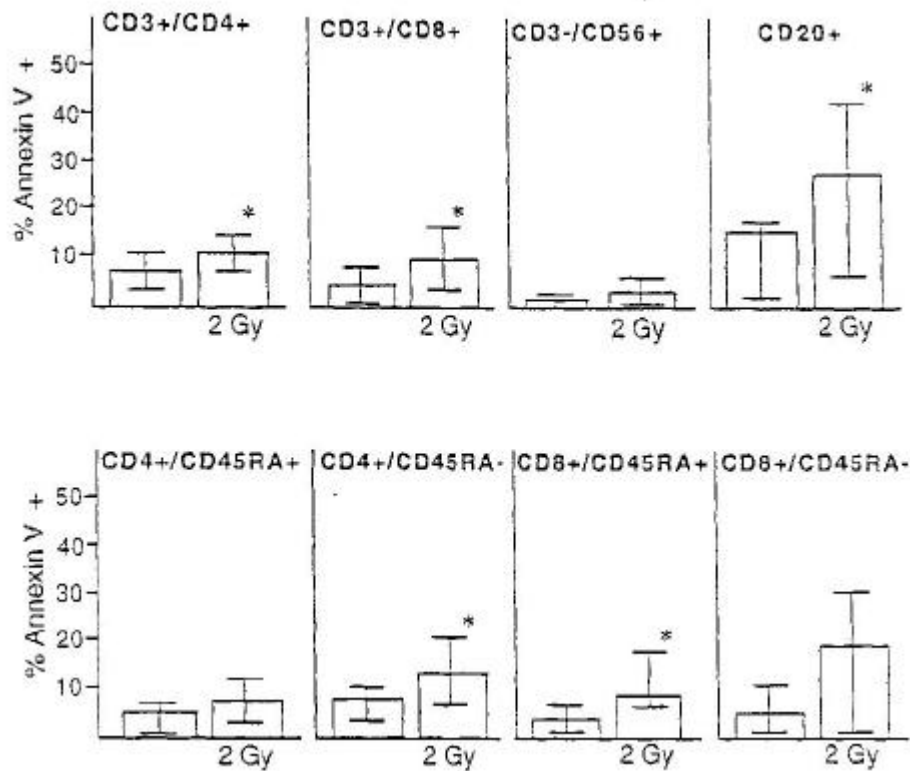
Figuur 4. Electronenmicroscopische foto's:
 a. viabele lymfocyt
 b. vroeg apoptotische lymfocyt
 c. laat apoptotische (secundair necrotische) lymfocyt
 d. primair necrotische lymfocyt

Dosis-respons curven verkregen met de Annexine-V en DiOC6 flowcytometrische technieken na 24h en 48h cultuur vertoonden een sterke stijging voor doses lager dan 1 Gy gevolgd door een afvlakken van de curven bij hogere doses (figuur 5a,b). Bij een 48h cultuurtijd lag het aantal stralingsgeïnduceerde apoptotische cellen hoger dan na 24h maar ook het % spontane apoptose nam sterk toe wat samen met de grote interindividuele verschillen in apoptose inductie lage dosisbepaling bemoeilijkt. Bij kortere cultuurtijden (4h, 12h) werd geen apoptose vastgesteld. Voortbouwend op deze resultaten werd een 24h incubatieperiode standaard gebruikt in ons verder onderzoek.



Figuur 5(a,b). Het gemiddeld percentage van DiOC₆^{low} (fig. 5a) en Annexine V⁺ (fig. 5b) cellen van 6 donoren na 24 (○) en 48 (●) uur en dit voor een controle staal en na 0.1, 0.2, 1, 2 en 5 Gy γ stralen. De foutenvlaggen zijn de standaard fouten op het gemiddelde (SEM). De curve is de best passende kromme doorheen de datapunten.

Wat de analyse van apoptose in lymfocytair subpopulaties betreft, werd geopteerd voor Annexine-V flowcytometrie aangezien dit de mogelijkheden biedt om multiplere labelingen toe te passen en aldus per subpopulatie specifiek te gaan kijken naar stralingsgeïnduceerde apoptose. Voor deze analyse gebruikten we 3 kleuren flowcytometrie waarbij Annexine-V labeling gecombineerd werd met de labeling van 2 lymfocytenoppervlakte antigenen. Op deze wijze analyseerden we apoptose in T helper cellen (CD3+/CD4+), suppressor/cytotoxische T cellen (CD3+/CD8+), B lymfocyten (CD20+), 'natural killer' cellen (CD3-/CD56+) en in naïve (CD45RA+/CD45RO-) versus geheugen cellen (CD45RA-/CD45RO+). Zowel wat stralingsgeïnduceerde als spontane apoptose betreft konden verschillen worden vastgesteld tussen de onderzochte subsets. Na bestraling met een 2 Gy gamma dosis vertoonden de B cellen het meest, de NK cellen het minst apoptose. Binnen de T lymfocyten vertoonden de CD4 positieve, CD45RA negatieve cellen meer apoptose dan de CD8 positieve, CD45RA positieve cellen (Figuur 6). Onze resultaten toonden tevens aan dat de verschillen in spontane apoptose in subsets van in vitro gekweekte cellen correleert met de verschillen in stralingsgeïnduceerde apoptose in de verschillende subsets.

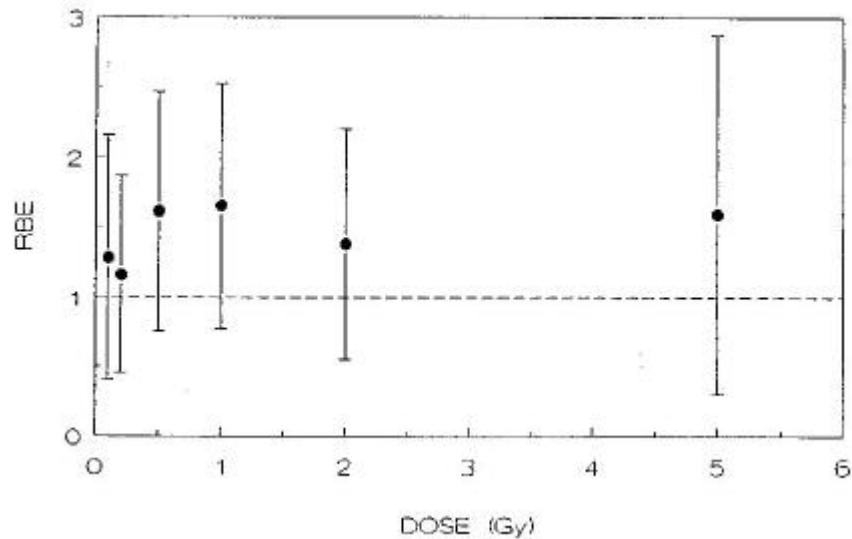


Figuur 6. De histogrammen geven de percentages weer van Annexine V positieve cellen voor de verschillende subsets. (medians and ranges, N= 6 : niet bestraald en niet gestimuleerd ; 2 Gy en niet gestimuleerd). * Significante verschillen ($P < 0.05$) binnen de subsets werden vergeleken met de controle cellen.

Ook konden we een correlatie vaststellen met de in vivo 'lifespan' van de verschillende subsets. Subsets met een kortere in vivo lifespan (CD 20, CD45RO) zijn gevoeliger voor apoptose in vitro en vice versa. Cellen met een korte 'lifespan' hebben een hoge 'turnover'. Voornamelijk in deze cellen zal er een goed evenwicht moeten zijn tussen mitose en apoptose.

III.3. Correlatie tussen micronucleus frekwentie en apoptose (Phillipé et al. 1997, Louagie et al. 1998a en Vral et al. 1998a en b).

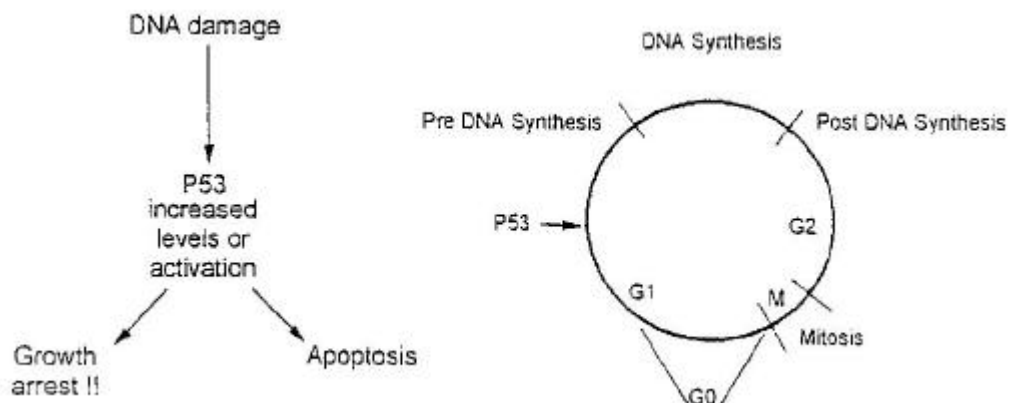
Onze resultaten toonden aan dat cytogenetische schade en apoptose, beide geïnduceerd door straling, niet noodzakelijk gecorreleerd zijn. NK cellen vertoonden weinig apoptose doch veel MN (Figuur 1) terwijl B cellen daarentegen veel apoptose en veel micronuclei vertoonden. Een verklaring hiervoor kan zijn dat DNA herstelmechanismen, die een belangrijke rol spelen bij de expressie van cytogenetische schade zoals MN, van geen belang zijn bij apoptose. Deze hypothese wordt verder ondersteunt door een studie (Vral et al. 1998b) waarbij twee stralenkwaliteiten met verschillende LET werden gebruikt. Geen significante verschillen in RBE (relative biological efficiency) waarden voor gamma stralen (lage LET) en snelle neutronen (hoge LET) werden gevonden (Figuur 7). Dit in tegenstelling tot resultaten



Figuur 7. Gemiddelde RBE waarden en S.D. verkregen voor apoptose inductie bij 9 donoren.

verkregen in vroegere studies met de MN assay (Vral et al. 1994 b) voor dezelfde stralenkwaliteiten. Snelle neutronen waren veel effectiever dan gamma stralen wat MN inductie betreft met RBE waarden variërend van 5.31 tot 1.64 voor doses van 0.1 tot 3 Gy. Hogere RBE waarden voor hoge LET stralen zijn kenmerkend voor stralingsgeïnduceerde chromosoomaberraties die het resultaat zijn van niet of slecht herstelde DNA dsb. De initiële productie van DNA dsb door straling is daarentegen opnieuw weinig LET afhankelijk (Vaughan 1991). De hierboven beschreven bevindingen, nl. geen correlatie tussen apoptose en MN en geen LET afhankelijkheid bij apoptose, ondersteunen de hypothese dat stralingsgeïnduceerde apoptose eerder bepaald wordt door initiële DNA schade maar niet door DNA repair.

Dat DNA schade de initiële trigger zou zijn bij stralingsgeïnduceerde apoptose in lymfocyten wordt verder ondersteund door de bevindingen dat het apoptose proces in heel wat celltypes o.a. thymocyten en lymfocyten gecontroleerd wordt door het p53 tumor suppressor gen dat geactiveerd wordt in respons op directe DNA schade met als doel het behoud van de genomische integriteit (Lane 1992, Seki et al. 1994). Het p53 eiwit is normaal gezien kort-levend maar wanneer cellen blootgesteld worden aan DNA beschadigende agentia zoals ioniserende stralen wordt dit eiwit gestabiliseerd en de cellulaire concentratie neemt toe. Deze opregulatie leidt tot G1 cell cycle arrest wat DNA herstel zal toelaten vooraleer de cel overgaat naar de S fase. Indien de schade niet herstelbaar is, zal de verhoogde concentratie aan p53 de cellen sturen in de richting van apoptose (Figuur 8).



Figuur 8. DNA schade leidt tot een verhoogde productie van het p53 proteïne wat zal resulteren in ofwel 'cell cycle arrest' ofwel apoptose.

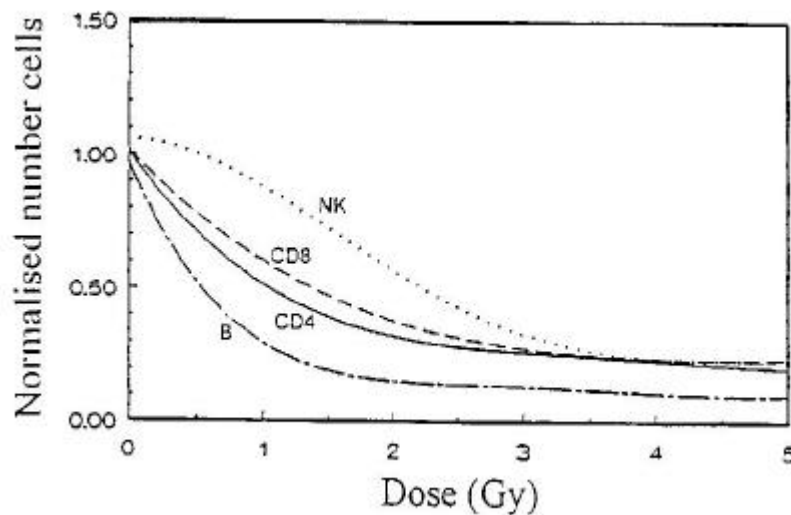
Naast de studies die wijzen op het belang van DNA in het apoptose proces zijn er momenteel ook heel wat studies die erop wijzen dat naast DNA ook andere celorganellen zoals mitochondriën (Castedo et al. 1996)

en de celmembranen (Ramakrishnan et al. 1993, Haimovitz-Friedman et al. 1994) een belangrijke rol spelen bij apoptose.

III.4. Correlatie tussen de in vitro en in vivo stralingsgevoeligheid van lymfocyten subpopulaties (Philippé et al. 1997, Louagie et al. 1998c).

Alle hierboven beschreven resultaten werden bekomen na in vitro bestraling van lymfocyten. Om de correlatie na te gaan met in vivo bestraling werden verschuivingen binnen de lymfocytair subpopulaties gevolgd gedurende de opeenvolgende therapeutische behandelingen in 11 cervixcarcinoom patiënten. Lymfopenie in de verschillende subsets werd hierbij gebruikt als parameter voor stralingsgevoeligheid. In deze studie werden per staal, voor en na bestraling, een minimum van 10 000 cellen flow cytometrisch geteld en de percentages van T helper cellen (CD3+/CD4+), T suppressor/cytotoxische cellen (CD3+/CD8+), Natural Killer cellen (CD3-/CD56+) en B cellen (CD20+) werden geanalyseerd.

Gedurende de radiotherapeutische behandeling werd een significante afname vastgesteld van het aantal cellen in alle onderzochte subsets. Deze afname was echter het meest uitgesproken voor de B cellen terwijl het aantal NK cellen bijna niet daalde. Geen significante distributie verschillen tussen T helper en T suppressor/cytotoxische cellen werd vastgesteld (Figuur 9).



Figuur 9. Vergelijking van de dosis-respons curven, verkregen door het samenvoegen van de data van alle patiënten, voor de verschillende subsets. De resultaten werden genormaliseerd t.o.v. de waarden verkregen voor de start van de radiotherapie (Y-axis) en uitgezet versus de equivalente lichaamsdosis (Gy, X-axis).

In tegenstelling tot de in vitro situatie worden apoptotische lymfocyten in de in vivo situatie snel verwijderd uit de circulerende bloedstroom door het mononucleair fagocytair systeem (MPS). Bijgevolg kunnen we verwachten dat de geobserveerde veranderingen in cellaantallen in de onderzochte subsets gedurende therapie te wijten zijn aan verschillen in apoptose-inductie gevolgd door het verwijderen van deze apoptotische cellen door het MPS. Vandaar is het ook niet onverwacht dat onze in vitro resultaten goed correleren met de in vivo bevindingen in deze patiëntenpopulatie. Alhoewel lymfopenie voor een groot deel het gevolg is van apoptose-inductie moeten we ook vermelden dat andere processen zoals 'cell cycle arrest' en reproductieve celdood (t.g.v. cytogenetische schade) hierbij ook een rol spelen.

Wat cytogenetische schade betreft wijzen preliminaire resultaten verkregen met de MN assay erop dat na in vivo bestraling van cervixcarcinoom patiënten een hoger aantal MN voorkomt in B cellen dan in T cellen, dit in overeenkomst met onze in vitro MN resultaten.

III.5. Mechanisme van stralingsgeïnduceerde apoptose (Louagie et al. submitted to Cell Biology: International Reports).

Finaal bestudeerden we tevens het mechanisme dat aan de basis ligt van het apoptose proces in lymfocyten na bestraling. Naast het genotoxisch effect van stralingsgeïnduceerde apoptose (zoals o.a. geïllustreerd door de p53 opregulatie) zouden effecten t.h.v. de mitochondria ook een belangrijke rol spelen in het apoptose

proces (Figuur 10). De afname in mitochondriaal membraan potentiaal ($\Delta\Psi_m$), een vroeg gebeuren tijdens het apoptotisch proces, is een bewijs van de betrokkenheid van de mitochondriën. Bovendien heeft men kunnen vaststellen dat apoptotische cellen cytochroom c vrijstellen uit de mitochondriën in het cytoplasma. Vrijgesteld cytochroom-c vormt vervolgens een complex met Apaf-1 (homoloog van ced-4) en procaspase 9. In de aanwezigheid van dATP wordt procaspase 9 omgezet tot actief caspase 9 dat dan procaspase 3 omzet in actief caspase 3 dat beschouwd wordt als één van de sleutelenzymes bij de 'executie' van het apoptose proces (Zou et al. 1997, Li et al. 1997).

Deze sequentie van gebeurtenissen werd beschreven bij apoptose geïnduceerd door FAS/FAS ligand of het TNF/TNF receptor systeem in lymfocyten. Het mechanisme bij stralingsgeïnduceerde apoptose is echter minder goed gekend. Daarom onderzochten we of bovengenoemd mechanisme (afname in $\Delta\Psi_m$, cytochroom-c release en caspase-3 activatie) ook optreedt bij stralingsgeïnduceerde apoptose.

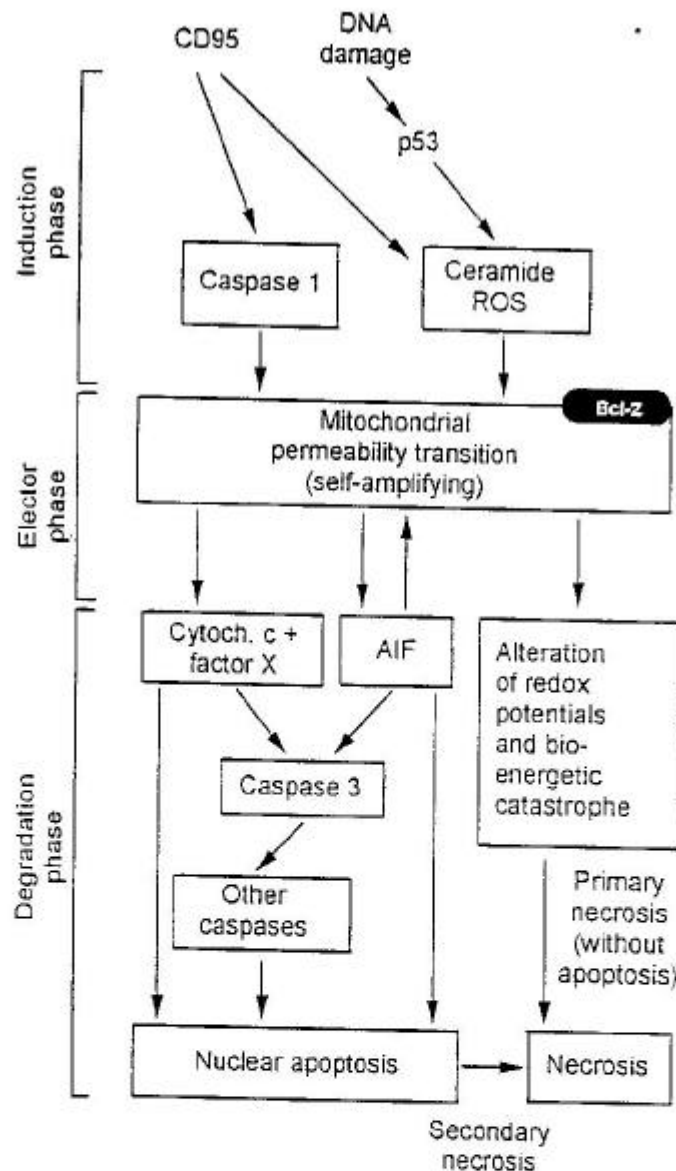
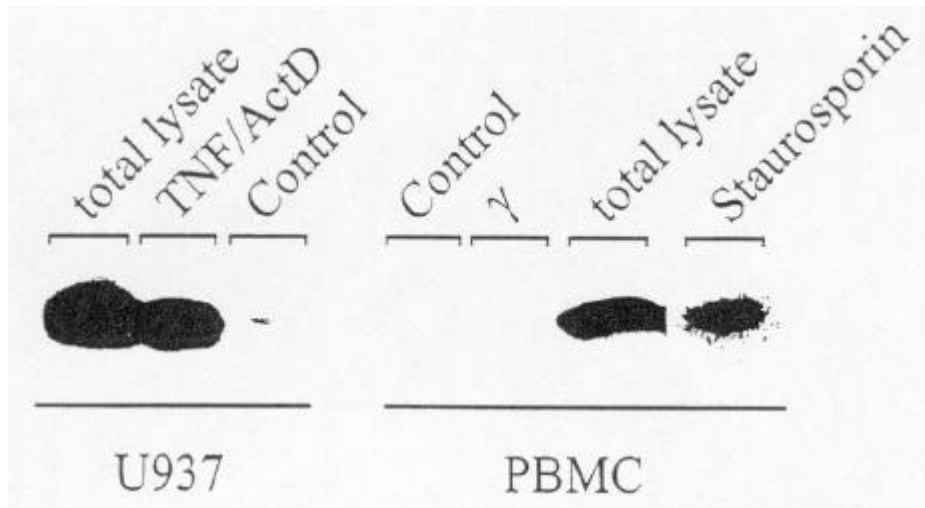
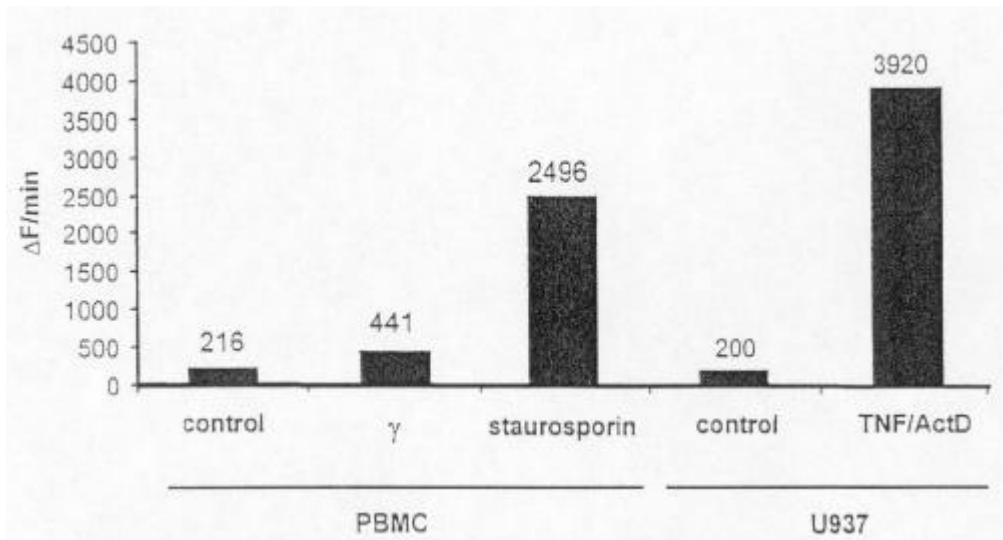


Figure 10. Different death-triggering pathways employ distinct signal transduction pathways that will culminate in the induction of permeability transition (PT). PT induced by DNA damage requires p53 activation, whereas induction of PT by ligation of Fas/Apo-1/CD95 requires the activation of ICE-like caspases. PT constitutes the first rate-limiting event of the common pathway of apoptosis and can be induced either in Bcl-2 regulated or in a Bcl-2 independent fashion. Ceramide-induced PT is inhibited by overexpression of Bcl-2. In contrast, PT induced by caspase-1-like proteases is not inhibited by Bcl-2. Upon PT, apoptogenic factors are released from the mitochondrial intermembrane space and leak into the cytosol. At least two factors have been characterised: cytochrome-c and apoptosis inducing factor (AIF). Different proteases from the caspase family can participate in the apoptotic degradation phase downstream of PT. Massive induction of PT with subsequent rapid depletion of energy-rich phosphates causes primary necrosis. A more subtle, regulated induction of PT allows for the activation and action of proteases, giving rise to the apoptotic phenotype. Whether this cascade of events is also applicable for γ irradiated PBL remains speculative and is one of the research subjects of this thesis.

We konden aantonen dat apoptose geïnduceerd via een dosis van 5 Gy gamma stralen gekenmerkt wordt door een afname in mitochondriaal membraan potentiaal $\Delta\Psi_m$ (gemeten via DiOC6 merking) maar echter niet door een vrijstelling van cytochroom-c (Western blot) (Figuur 11) en slechts door een zwakke caspase-3 activiteit (flowcytometrie)(Figuur 12). Bij behandeling van lymfocyten met staurosporine daarentegen ging afname in $\Delta\Psi_m$ wel gepaard met cytochroom-c release en duidelijke caspase-3 activatie. Deze resultaten suggereren dat in gamma bestraalde Go lymfocyten, zowel caspase afhankelijke als caspase onafhankelijke pathways worden gevolgd maar dat cytochroom-c blijkaar niet betrokken is bij het stralingsgeïnduceerde apoptose proces.



Figuur 11. Geen vrijstelling van cytochroom c in **g**bestraalde perifere bloed lymfocyten (PBL). De lanen 'total lysate' stellen de totale hoeveelheid mitochondriaal cytochroom-c voor in de cellen. In alle andere lanen werd cytochroom-c gemeten in het cytosol (extra mitochondriale ruimten). Voor positieve controles werden PBL behandeld met staurosporine en U937 cellen met hTNF/actinomycine D. Uit deze figuur blijkt duidelijk dat in **g**bestraalde PBL geen vrijstelling plaatsvindt van cytochroom-c in het cytosol.



Figuur 12. Caspase-3'like' activiteit ($\Delta F/min$) in staurosporine ($1\mu M$) en **g**bestraalde (5 Gy) PBL vergeleken met hTNF/actinomycine D behandelde U937 cellen. Als substraat werd Ac-DEVD.AMC gebruikt.

IV. ALGEMENE BESLUITEN

Uit deze studie kunnen we besluiten dat lymfocyttaire subpopulaties verschillen vertonen in radiosensitiviteit en dit zowel wat MN inductie als het percentage apoptose betreft.

Wat MN aangaat blijken B cellen het meest stralingsgevoelig te zijn. Ook NK cellen zijn stralingsgevoeliger dan T lymfocyten. Uit de studie waarin het stralingsgevoelig gedrag van B lymfocyten verder werd onderzocht in het lage dosis gebied met als doel het ontwikkelen van een gevoelige biologische dosimeter konden we besluiten dat, wanneer de spontane MN frekwentie niet gekend is wat meestal het geval is bij stralingsaccidenten, doses tot 0.08Gy kunnen worden gedetecteerd dit terwijl de dosisdetectielimiet voor de klassieke MN assay ligt rond 0.25Gy. Voor doses > 0.25Gy is de accuraatheid van dosisbepaling hoger met de klassieke MN test. Wat toepasbaarheid betreft, betekent dit dat wanneer bloedstalen genomen worden binnen de 24h na acute blootstelling (korte lifespan van B lymfocyten), de B cel MN assay een gevoelige biologische dosimeter blijkt te zijn voor lage dosis detectie. Deze methode moet echter beschouwd worden als een supplementaire test t.o.v. de klassieke MN test. Ondanks de beperkingen van de B cel MN assay bij stralingsaccidenten lijkt deze test voornamelijk geschikt te zijn voor individuele dosisbepaling in geval van medische applicaties met lage dosis ioniserende straling. Verder validatie studies en in vivo analyses zijn nodig om de praktische waarde van deze test vast te leggen. Preliminaire resultaten verkregen met de MN assay wijzen er reeds op dat na in vivo bestraling van cervixcarcinoma patiënten een hoger aantal MN voorkomt in B cellen dan in T cellen, dit in overeenkomst met onze in vitro MN resultaten.

Wat het luik apoptose betreft blijken B cellen eveneens zeer stralingsgevoelig te zijn terwijl NK cellen daarentegen radioresistent zijn na in vitro bestraling. Binnen de T lymfocyten vertoonden de CD4 positieve, CD45RA negatieve cellen meer apoptose dan de CD8 positieve, CD45RA positieve cellen. Onze resultaten toonden tevens aan dat de verschillen in spontane apoptose in subsets van in vitro gekweekte cellen correleren met de verschillen in stralingsgeïnduceerde apoptose in de verschillende subsets. Ook konden we een correlatie vaststellen met de in vivo 'lifespan' van de verschillende subsets. Subsets met een kortere in vivo lifespan (CD 20, CD45RO) zijn gevoeliger voor apoptose inductie in vitro en vice versa.

We konden tevens besluiten dat er geen noodzakelijke correlatie bestaat tussen cytogenetische schade (MN) en apoptose. Dit zou er kunnen op wijzen dat het apoptose proces eerder bepaald wordt door initiële DNA schade en niet door DNA herstelmechanismen die daarentegen wel een belangrijke rol spelen bij de vorming van chromosoom aberraties. Het feit dat geen verschillen in RBE waarden werden waargenomen voor gamma stralen (lage LET) en snelle neutronen (hoge LET) met betrekking tot apoptose inductie ondersteunen verder deze hypothese.

De waargenomen verschillen in radiosensitiviteit tussen de verschillende lymfocyttaire subsets waargenomen na in vitro bestraling werden grotendeels bevestigd in onze in vivo experimenten in cervixcarcinoma patiënten. De B cel subpopulatie werd gekenmerkt door een snelle en substantiële afname in aantal cellen in de circulerende bloedstroom terwijl het aantal NK cellen bijna niet daalde tijdens therapie. Geen significante distributie verschillen tussen T-helper en T-suppressor/cytotoxen werden vastgesteld. Alhoewel de geobserveerde veranderingen in cel aantallen in de onderzochte subsets gedurende therapie grotendeels te wijten zijn aan verschillen in apoptose inductie gevolgd door het verwijderen van deze apoptotische cellen door het MPS moeten tevens worden vermeld dat andere processen zoals 'cell cycle arrest' en reproductieve celdood (t.g.v. cytogenetische schade) hierbij ook een rol spelen. De afname in B cellen zal leiden tot een snel en substantieel verlies van de humorale immuniteit en kan de immuunproblemen voorkomend tijdens radiotherapie verklaren. In T cellen is het geheugen fenotype (CD45RO+/RA-) meer radiosensitief dan het naïve type wat alsook leidt tot een verlaagde immuniteit.

Wat betreft de "biochemische pathway" gevolgd bij stralingsgeïnduceerde apoptose konden we besluiten dat in γ bestraalde G0 lymfocyten, zowel caspase afhankelijke als caspase onafhankelijke pathways worden gevolgd maar dat cytochroom-c blijkbaar niet betrokken is bij het apoptose proces. Verdere experimenten zijn nodig om de rol van de mitochondriën versus de kern in het apoptose proces te bestuderen.

REFERENTIES

BAN, S. and COLOGNE, J.B. X-ray induction of micronuclei in human lymphocyte subpopulations differentiated by immunoperoxidase staining. *Radiation Research*, **131**, 60-65 (1992).

CASTEDO, M., HIRSCH, T., SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N., MARCHETTI, P., MACHO, A. and KROEMER, G. J. *Immunology*, **157**, 512-521 (1996).

- CORNELISSEN, M., VRAL, A., THIERENS, H., LOUAGIE, H., PHILIPPE, J. and DE RIDDER, L. Radiation-induced apoptosis and necrosis in human peripheral blood lymphocytes after moderate and high doses of γ -rays and fast neutrons: an electron microscopic approach. *Scanning Microscopy* (in press)
- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., KAN, C.C., EHLEITER, D., PERSAUD, R.S., McLOUGHLIN, M., FUKS, Z. and KOLESNICK, R.N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, **180**, 525-535 (1994).
- HERTVELDT, K., PHILLIPE, J., THIERENS, H., CORNELISSEN, M., VRAL, A. and DE RIDDER, L. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, **71**: 429-433 (1997).
- HOLMEN, A., KARLSSON, A., BRATT, I. and HOGSTEDT, B. Micronuclei and mitotic index in B, T4 and T8 cells treated by mitomycin C and gamma-irradiation. *Mutation Research*, **309**, 93-99 (1994).
- LANE, D.P. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16 (1992).
- LECLERCQ, G., DEBACKER, V., DE SMEDT, M. and PLUM, J. Differential effects of Interleukin-15 and Interleukin-2 on differentiation of biopotential T/Natural Killer progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine*, **184**, 325-336 (1996).
- LI, F., SRINIVASAN, A., WANG, Y., ARMSTRONG, R.C., TOMASELLI, K.J. and FRITZ, L.C. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30299-30305 (1997).
- LOUAGIE, H., PHILIPPE, J., VRAL, A., CORNELISSEN, M., THIERENS, H. and DE RIDDER, L. Induction of micronuclei and apoptosis in natural killer cells compared to T lymphocytes after g-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **73(2)**: 179-185 (1998a).
- LOUAGIE, H., CORNELISSEN, M., PHILIPPE, J., VRAL, A., THIERENS, H. and DE RIDDER, L. Flow cytometric scoring of apoptosis by annexin V binding in g irradiated lymphocytes is hampered by the presence of primary necrotic cells. *Cell Biology : International* (in press), 1998b.
- LOUAGIE, H., SCHOTTE, P., VRAL, A., CORNELISSEN, M., THIERENS, H., BEYAERT, R., DE RIDDER, L. and PHILIPPE, J. Apoptosis induced by γ -irradiation in peripheral blood lymphocytes is independent of cytochrome-c release with a limited role for caspase-3. Submitted to *Cell Biology:International Report*.
- MULLER, C., DUSSEAU, C., CALSOU, P. and SALLES, B. Human normal peripheral blood B lymphocytes are deficient in DNA-dependent protein kinase activity due to the expression of a variant form of the Ku86 protein. *Oncogene*, **16(12)**, 1553-1560 (1998).
- PHILLIPE, J., LOUAGIE, H., THIERENS, H., VRAL, A., CORNELISSEN, M. and DE RIDDER, L. Quantification of apoptosis with annexin V binding in lymphocyte subsets after in vitro gamma-irradiation and stimulation. *Cytometry*, **29**: 242-249 (1997).
- RAMAKRISHNAN, N., McLAIN, D.E. and CATRAVAS, G.N. Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis. *International Journal of Radiation Biology*, **63**, 693-701 (1993).
- SCHWARTZ, J.L. and GAULDEN, M.E. The relative contribution of B and T lymphocytes in the human peripheral blood mutagen test system as described by cell survival, mitogenic stimulation and induction of chromosome aberrations by irradiation. *Environmental Muagenesis*, **2**, 473-485 (1980).
- SCHWARTZ, J.L., DARR, J.C. and GAULDEN, M.E. Survival and PHA stimulation of gamma-irradiated human peripheral blood T-lymphocyte subpopulations. *Mutation Research*, **107**, 413-425 (1983)
- SEKI, H., KANEGANE, H., IWAI, K., KONNO, A., OHTA, K., YACHIE, A., TANIGUCHI, N. and MIYAWAKI, T. Ionizing radiation induces apoptotic cell death in human TcR- $\gamma\delta$ + T and natural killer cells without detectable p53protein. *European Journal of Immunology*, **24**, 2914-2917(1994).
- VAUGHAN, A.T.M., GORDON, D.J., CHETTLE, D.R. and GREEN, S. Neutron and Cobalt-60 gamma irradiation produce similar changes in DNA supercoiling. *Radiation Research*, **127**, 19-23 (1991).

VRAL, A., VERHAEGEN, F., THIERENS, H. and DE RIDDER, L. The in vitro cytokinesis-block micronucleus assay: a detailed description of an improved slide preparation technique for the automated detection of micronuclei in human lymphocytes. *Mutagenesis*, **9**: 439-443 (1994 a).

VRAL, A., VERHAEGEN, F., THIERENS, H. and DE RIDDER, L. Micronuclei induced by fast neutrons versus gamma rays in human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, **65**, 321-328 (1994b).

VRAL, A., LOUAGIE, H., THIERENS, H., PHILIPPE, J., CORNELISSEN, M. and DE RIDDER, L. Micronucleus frequencies in cytokinesis-blocked human B lymphocytes after low dose g-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **73(5)**: 549-555 (1998a).

VRAL, A., CORNELISSEN, M., THIERENS, H., LOUAGIE, H., PHILIPPE, J., STRIJCKMANS, K., DE RIDDER, L. Apoptosis induced by fast neutrons versus ⁶⁰Co-g-rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, **73(3)**: 289-295 (1998b).

WARREN, H.S., KINNEAR, B.F., KASTELEIN, R.L. and LANIER, L.L. Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *The Journal of Immunology*, **156**, 3254-3259 (1996).

WUTTKE, K., STREFFER, C. and MULLER, W.U. Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. *Mutation Research*, **286**, 181-188 (1993).

ZOU, H., HENZEL, W.J., LIU, X., LUTSCHG, A. and WANG X. *Cell*, **90**, 405-413 (1997).

Slotwoord

Deze studie was slechts mogelijk dank zij de actieve medewerking van een aantal Arbeidsgeneeskundige diensten. We vermelden hier meer speciaal : Dr. M. Barbé, C.B.M.T. , Medische Dienst Kernpark Doel, Dr. C. Thielemans, C.B.M.T., Medische Dienst Kernpark Tihange en Dr. R. Morthier, I.D.E.W.E, Medische Dienst Universitair Ziekenhuis Gent.

Verder zijn we veel dank verschuldigd aan I. Meirlaen, M.-R. Dobbelaere, F. De Scheerder en B. Aousalah voor de zorgvuldigheid waarmee ze de cytogenetische analyses hebben uitgevoerd.