

# Säugetierspermatogenese als biologischer Indikator für ionisierende Strahlung

Mammalian Spermatogenesis as a Biological Indicator for Ionizing Radiation

Ursula Hacker-Klom, Eva-Maria Meier und Wolfgang Göhde

Abteilung für Klinische Strahlenbiologie, Radiologische Klinik und Poliklinik, Universität, Hittorfstr. 17, D-4400 Münster

Z. Naturforsch. **40c**, 898–907 (1985); received July 10/October 3, 1985

Ionizing Radiation, Mouse Spermatogenesis, Biological Dosimetry, Radiation Mutagenesis, Cytocid Radiation Effects

We have analysed spermatogenetic cells by flow cytometry to quantify effects of ionizing radiation. The radiation-induced reductions of testicular DNA-synthesizing cells, primary spermatocytes, haploid round and elongated spermatids as well as the increases of numerical chromosome aberrations (abnormal diploid spermatids and aneuploidies) in NMRI inbred mice are described. Testicular weights were determined as a parameter of germ cell decrease, and histologic cross sections of the testes were analysed. Since even an exposure of 0.05 Gy (= 5 rad) may be detected by a reduction of DNA-synthesizing cells (Acta Radiol. Oncol. Radiat. Phys. Biol. **21**, 349–351 (1982) [1]), the use of the *in vivo* system "spermatogenesis" as a biological dosimeter to monitor low dose effects and to determine RBE values of different radiation qualities is suggested.

## Einleitung

Strahlung ist ein wichtiger ökologischer Faktor, der die Organismen seit der Entstehung des Lebens begleitet, und an den sie sich evolutiv durch die Entwicklung verschiedenartiger Reparaturmechanismen angepaßt haben. Die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Organismen sind von großem allgemeinen Interesse, vor allem in Hinblick auf die Strahleninduktion genetischer Mutationen beim Menschen.

Die Strahlendosimetrie lediglich auf physikalischer oder chemischer Ebene gibt keinen quantitativen Aufschluß über die Reaktion biologischer Objekte auf Strahlung und auf unterschiedliche Strahlenqualitäten; diese Methoden allein erlauben deshalb keine Abschätzung des Strahlenrisikos. Biologische Methoden sind erforderlich.

Ein als biologisches Dosimeter geeignetes System muß eine hohe Empfindlichkeit besitzen, d.h. bereits auf niedrige Strahlendosen ansprechen, und seine Anwendbarkeit sollte sich nicht auf ein allzu kurzes Zeitintervall nach dem Strahleninsult beschränken.

Die Gonaden sind insbesondere für die Abschätzung des genetischen Risikos ein wichtiges Zielorgan, wenn ein Individuum ionisierender Strahlung

oder chemischen Noxen ausgesetzt wird. Deshalb bietet sich das Modell „Spermatogenese“ für die Erstellung von Referenzkurven mit dem Ziel an, Niedrigdoseneffekte zu überwachen. Es ist bereits bekannt, daß es sich um ein empfindliches Modell handelt (vgl. [1–8]).

Für die folgenden Untersuchungen wurde die durchflußcytophotometrische DNS-Analyse eingesetzt. Diese Methode, mit der bereits viel Erfahrung gesammelt wurde [1–8], erlaubt die schnelle quantitative Bestimmung unterschiedlicher Keimzellformen auf der Grundlage ihres unterschiedlichen DNS-Gehaltes bzw. ihrer unterschiedlichen Kern-Plasma-Relation (DNS- zu Protein-Verhältnis). Die strahleninduzierten Reduktionen des Anteils dieser spermatogenetischen Zellformen sowie die Zunahme von meiotischen und postmeiotischen Keimzellen mit abnormem DNS-Gehalt können gemessen werden.

Im folgenden sollen die bislang nach Röntgenstrahlung untersuchten Effekte auf die Spermatogenese dargestellt und Anhaltswerte für die Übertragbarkeit auf den Menschen diskutiert werden.

## Material und Methoden

Männliche NMRI-Mäuse im Alter von 6 bis 12 Wochen wurden verwendet, sofern nicht anders vermerkt. Die Mäuse wurden mit Röntgenstrahlung einer Hochspannung von 200 kV und einer 0.5 mm Cu-Filterung bei einer Dosisleistung von 0.5 Gy/min

Reprint requests to Dr. U. Hacker-Klom.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0341–0382/85/1100–0898 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

mit einem Röntgengerät RT 200 der Fa. C. H. Müller, Hamburg, bestrahlt. Die vordere Körperhälfte der Mäuse wurde durch 0.2 cm dickes Blei abgeschirmt. Die Bestrahlung erfolgte akut (einmalig) oder fraktioniert in zwei gleich hohen Teilfraktionen („split dose“) bei gleichhoher Gesamtdosis wie bei einmaliger Exposition (0.05–15 Gy).

Für die durchflußcytophotometrischen Messungen sind Einzelzellsuspensionen erforderlich, die durch Behandlung des Hodengewebes mit Pepsin gewonnen wurden. Die zelluläre DNS wurde mit Ethidiumbromid/Mithramycin angefärbt und die zelluläre RNS mit RNase verdaut [9, 10]. Für die gleichzeitige Anfärbung von DNS und Protein wurden Dapi und Sulforhodamin verwendet [11]. Die Durchflußcytophotometrie wurde mit einem Gerät der Firma PARTEC AG, Arlesheim, Schweiz, durchgeführt.

Die impulszytophotometrischen Ergebnisse wurden mit histologischen Befunden verglichen. Das unzerschnittene Testisgewebe wurde zunächst 2 h in Bouin'scher Lösung, danach 24 h in 70%igem Äthanol und anschließend bis zur Herstellung der 6 µm dicken Querschnitte in Formalin aufbewahrt [12]. Die Färbung erfolgte mit PAS/Hämatoxylin. Die Stadien des Samenepithels wurden nach Oakberg [13] klassifiziert. Der zeitliche Ablauf der Mäusespermatogenese [14] wurde verwendet, um abzuschätzen, welche Vorläufer-Zellstadien jeweils bestrahlt worden waren.

Die Prozentanteile der vier testikulären Zellformen wurde mit Hilfe der kumulativen Häufigkeitsverteilung berechnet [15]. Da sich die Nichtkeimzellen beim adulten Mammalier nur im 2c-Bereich darstellen und mindestens 80% der 2c-Zellen Nichtkeimzellen sind [2], die nur gering empfindlich gegen die Mehrzahl der cytotoxischen Agentien sind, wurde der 2c-Prozentsatz als Referenz genommen, um den absoluten Keimzellverlust abzuschätzen. Das Verhältnis der aus den DNS-Histogrammen berechneten Keimzell-Prozentsätze zum 2c-Zell-Prozentsatz wurde zu diesem Zweck verwendet. So wurden die Ergebnisse der Auswertung als 4c %/2c % bzw. 1c %/2c %-Verhältnisse oder Absolutzahlen [3] dargestellt.

## Ergebnisse

### 1. Ergebnisse bei unbehandelten Individuen

Abb. 1 zeigt den Aufbau eines DNS-Histogramms testikulärer Zellen (vgl. [2, 10]). Der Gipfel I stellt

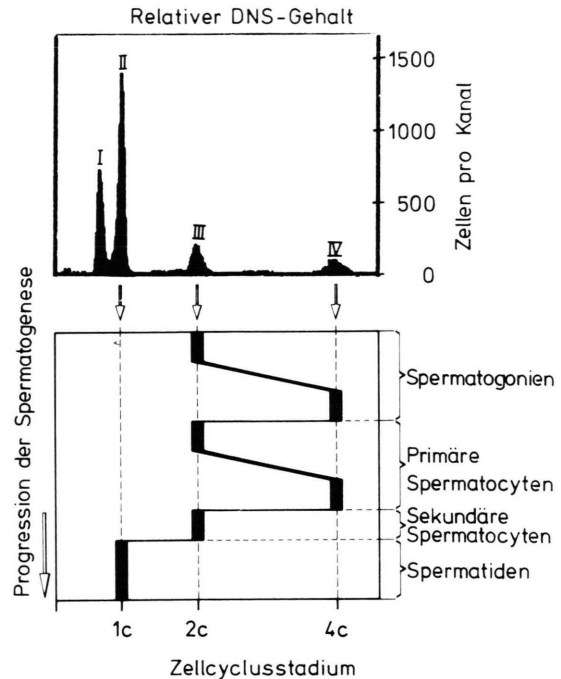


Abb. 1. DNS-Histogramm testikulärer Zellen (oben) und DNS-Mengenänderungen im Laufe der Spermatogenese (unten) (in: [2]).

die DNS-Meßwerte länglicher Spermatoiden dar, der Gipfel II im 1c-Bereich die Meßwerte der runden Spermatoiden; Gipfel III repräsentiert unterschiedliche Keimzellen ( $G_{0/1}$ -Spermatogonien,  $G_1$ -Präleptotän- und sekundäre Spermatocyten) und Nichtkeimzellen (Sertoli- und Leydig-Zellen, Macrophagen etc.) mit einem 2c-DNS-Gehalt und Gipfel IV Zellen mit einem 4c-DNS-Gehalt (2–4%  $G_2$ +M-Spermatogonien und 96–98% primäre Spermatocyten) [2]. Im Bereich zwischen 2c und 4c werden DNS-synthetisierende Zellen registriert (ca. 50% Spermatogonien und ungefähr 50% Präleptotän-Spermatocyten) [2].

Der Prozentsatz haploider Keimzellen nimmt zwischen der 3. und 6. Lebenswoche zu und bleibt dann lebenslang in etwa konstant (Abb. 2). Die Variabilität zwischen Mäusen und auch zwischen den beiden Testes einer Maus ist offenbar insbesondere bei Inzuchtstämmen sehr gering. Bei 124 Mäusen (= 248 Testes) im Alter von 8 Wochen und darüber beträgt der arithmetische Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Prozentsatzes haploider Keimzellen pro Testis  $67 \pm 5$ . Die Standardabweichung liegt in den meisten Altersstufen unter 0.1 des Mittelwertes.

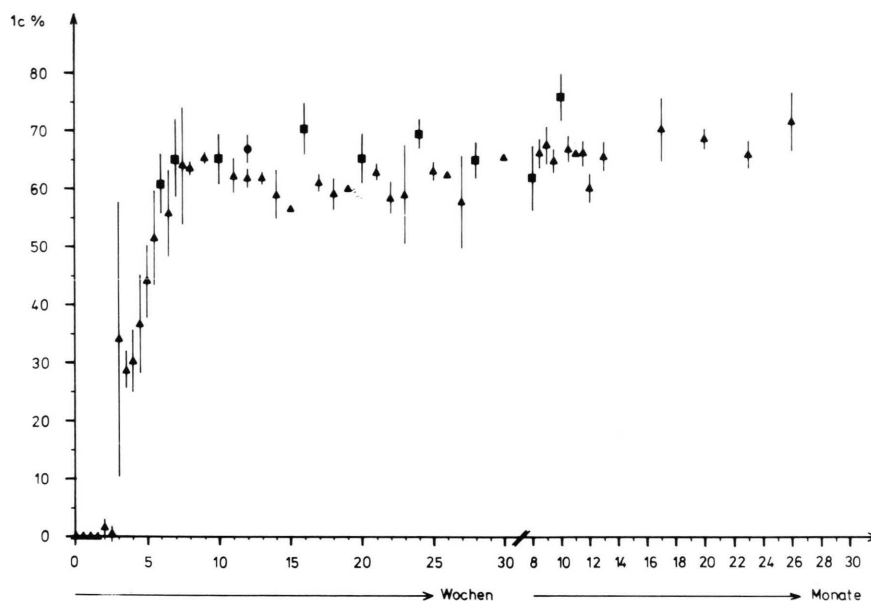


Abb. 2. Altersabhängigkeit und individuelle Variabilität des Prozentsatzes haploider Keimzellen pro Testes der Maus. Die unterschiedlichen Symbole bedeuten: ▲ Versuch IV, je 4 Testes pro Punkt; ● Versuch VII (1), je 20 Testes; ■ Mittelwert von beiden Versuchen, je 24 Testes. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für alle 124 Mäuse, die 8 Wochen und älter waren:  $66,8 \pm 5,6\%$  1c-Zellen.

Beim Menschen ist die Streuung der Prozentsätze haploider Keimzellen zwischen Individuen größer: Bei 28 Patienten über 17 Jahre mit einem Durch-

schnittsalter von  $34 \pm 11$  Jahre betrug der Prozentsatz haploider Keimzellen im Mittel  $42 \pm 12$  [16].

Die gleichzeitige Bestimmung der zellulären DNS- und Proteingehalte (biochemisches Äquivalent der Kern-Plasma-Relation) in einer Zweiparametermessung ermöglicht im Gegensatz zur Einparametermessung anscheinend eine Differenzierung der Keimzellen und Nichtkeimzellen mit einem 2c-DNS-Gehalt sowie weiterer Zellsubpopulationen im 1c-DNS-Bereich (s. Abb. 3). Diese weitergehende Differenzierung ist möglich, da sich verschiedene spermatogene-

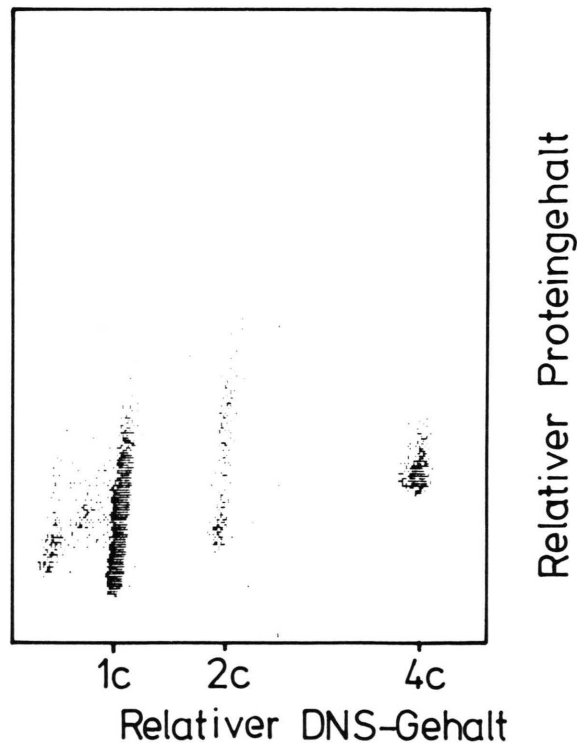


Abb. 3. Zweiparameterhistogramm von testikulären Zellen der Maus nach Färbung der Zellen mit Dapi/Sulforhodamin. Das Histogramm stellt eine Aufsicht dar. Auf der X-Achse ist der relative DNS-Gehalt dargestellt, auf der Y-Achse die relative Proteinfluoreszenz und auf der Z-Achse die Anzahl der Zellen pro Kanal.

tische Zellen und Nichtkeimzellen in ihrer Größe und dem damit korrelierten Proteingehalt unterscheiden.

## 2. Ergebnisse bei strahlenexponierten Tieren

Bestrahlung führt zu unterschiedlichen Veränderungen im DNS-Histogramm. Die verschiedenen Effekte lassen sich zu unterschiedlichen Zeiten nach einer Bestrahlung nachweisen. Die Abb. 4 zeigt z. B. eine Reduktion runder Spermatiden 21 Tage nach Bestrahlung. Es hat sich ein zusätzlicher deutlich sichtbarer Gipfel im Bereich zwischen 1c und 2c gebildet, der das vermehrte Auftreten diploider länglicher Spermatiden anzeigt. Der Anteil der 4c-Zellen hat ab- und der Anteil der 8c-Zellen zugenommen.

Im folgenden werden die zeit- und dosisabhängigen Beziehungen für die unterschiedlichen strahleninduzierten Effekte dargestellt.

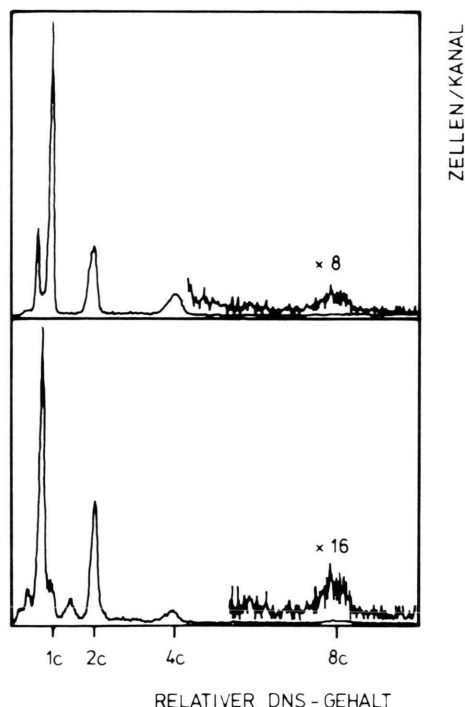


Abb. 4. DNS-Histogramme testikulärer Zellen zur Demonstration von Strahlenschäden: a) Kontrollhistogramm einer unbestrahlten adulten Maus; b) Histogramm einer vor 21 Tagen mit 5 Gy bestrahlten Maus (in: [7]).

## 2.1. Strahleninduzierte Zellinaktivierungen

### 2.1.1. Reduktion der S-Phase-Zellen

Die DNS-synthetisierenden Zellen sind 24 Stunden bis 21 Tage nach einer Bestrahlung mit mittelhohen Dosen reduziert (Abb. 5). Schon eine Strahlenexposition mit nur 0.05 Gy führt zu einer signifikanten Reduktion des Anteils von S-Phase-Zellen ( $p = 0.012$ ). Die Dosis-Effekt-Beziehung (Abb. 7a) zeigt keine Schulter. Der Parameter „S-Phasen-Reduktion“ ist somit einer der bislang empfindlichsten biologischen Parameter zum Nachweis biologischer Strahleneffekte. In der Dosis-Effekt-Beziehung in Abb. 7a sind zwei Komponenten unterscheidbar: ca. 30% der Zellen sind strahlenempfindlich ( $D_0$ : 0.4 Gy), und ca. 70% der Zellen gehören einer strahlenresistenteren Population an ( $D_0$ : 2.1 Gy). Bei der strahlenempfindlicheren Zellpopulation handelt es sich um differenzierte Spermatogonien, bei der strahlenresistenteren um die unreiferen, sich differenzierenden Spermatogonien.

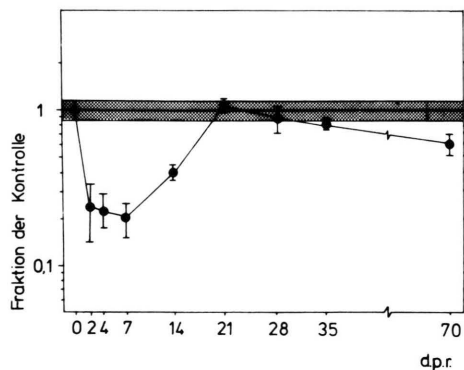


Abb. 5. Reduktion der S-Phase-Zellen der Testes nach Bestrahlung mit 2,5 Gy zur Demonstration der Zeitabhängigkeit (in: [2]).

### 2.1.2. Reduktion des Hodengewichtes

Die Reduktion des Hodengewichtes ist ein Maß für die strahleninduzierte Keimzellreduktion, besonders der zahlenmäßig überwiegenden haploiden Keimzellen. Das Hodengewicht ist vom 14. bis zum 40. Tag nach einer Bestrahlung mit einer mittelhohen Dosis reduziert (Abb. 6a). Auch wenn alle Keimzellen abgetötet sind, sinkt das Hodengewicht maximal auf ca. 30% des Kontrollwertes ab.



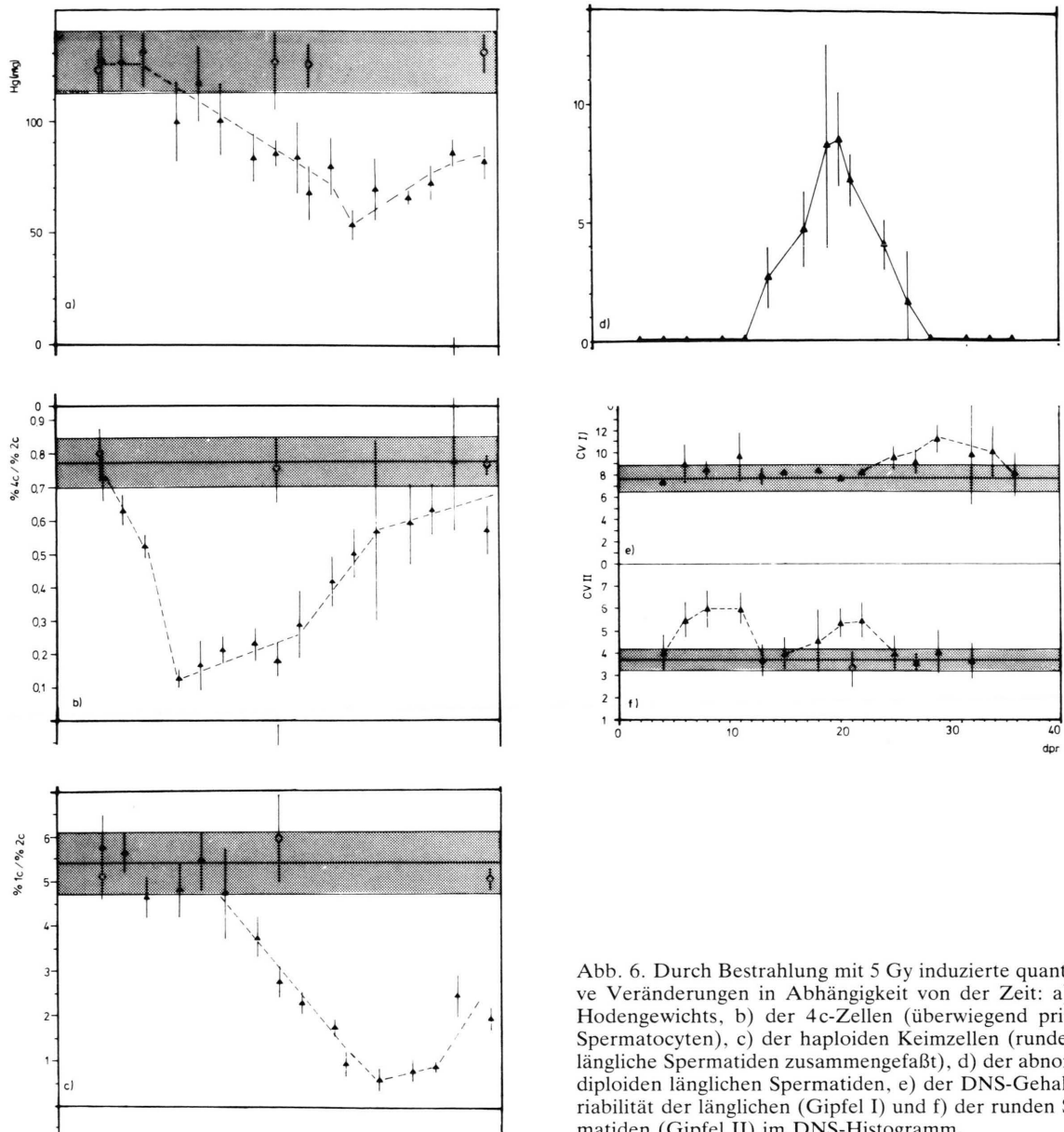


Abb. 6. Durch Bestrahlung mit 5 Gy induzierte quantitative Veränderungen in Abhängigkeit von der Zeit: a) des Hodengewichts, b) der 4c-Zellen (überwiegend primäre Spermatocyten), c) der haploiden Keimzellen (runde und längliche Spermatiden zusammengefaßt), d) der abnormen diploiden länglichen Spermatiden, e) der DNS-Gehaltsvariabilität der länglichen (Gipfel I) und f) der runden Spermatiden (Gipfel II) im DNS-Histogramm.

### 2.1.3. Reduktion primärer Spermatocyten

Die Reduktion primärer Spermatocyten (4c-Zellen) ist 11 Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy am stärksten ausgeprägt (Abb. 6b). Der  $D_0$ -Wert beträgt 1.4 Gy (Abb. 7b). Diese Zellen wurden als differenzierte Spermatogonien bestrahlt. Auch hier findet sich keine Schulter in der Dosis-Effekt-Beziehung.

### 2.1.4. Reduktion der haploiden Keimzellen

Die haploiden Keimzellen (runde und längliche Spermatiden zusammengefaßt) sind 29 Tage nach der Bestrahlung von differenzierten Spermatogonien mit einer mittelhohen Dosis – ungefähr zur gleichen Zeit wie das Hodengewicht – am stärksten verringert (Abb. 6c). Die runden Spermatiden weisen ihre

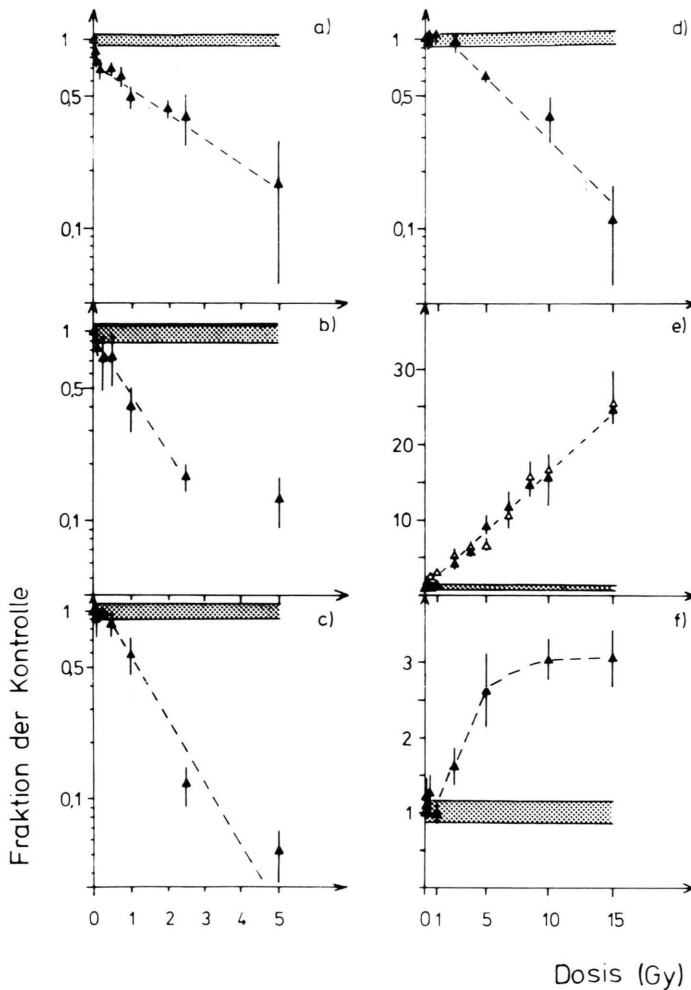


Abb. 7. Nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen dargestellte Dosis-Effekt-Beziehungen: a) der S-Phase 2 d p.r., b) der 4c-Reduktion 14 d p.r., c) der Reduktion haploider Keimzellen 28 d p.r. und d) 70 d p.r. (in: [5]), e) der Induktion diploider länglicher abnormer Spermatiden 21 d nach akuter ( $\blacktriangle$ ) oder fraktionierter ( $\triangle$ ) Bestrahlung (in: [7]) und f) der Zunahme der DNS-Gehaltsvariabilität der runden Spermatiden (Gipfel II im Histogramm) 7 d p.r. In Abb. 2 und 5–7 sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Werte von mindestens 3 Mäusen (= 6 Testes) aufgetragen ( $1n = 1$  Testes).  $\cdots$ ,  $\circ$  Kontrollbereich;  $\blacktriangle$ ,  $\bullet$  Experimentalwerte.

stärkste Reduktion 22 d p.r. auf und die länglichen Spermatiden 32 d p.r. (unveröffentlichte Ergebnisse). Diese zeitliche Abfolge ermöglicht einen Rückschluss auf die ursprünglich bestrahlten Targetzellen.

Die Dosis-Effekt-Beziehung für die 1c-Reduktion 29 d p.r. zeigt einen  $D_{37}$ -Wert von 1.8 Gy (Abb. 7c). Abb. 7d spiegelt die Empfindlichkeit von Stammzellen wieder: Diese Dosis-Effekt-Beziehung weist einen  $D_{37}$ -Wert von ungefähr 9 Gy für haploide Keimzellen, die 70 Tage zuvor als Stammzell-Spermatogonien bestrahlt wurden, auf. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Reduktion runder Spermatiden 21 d nach akuter und fraktionierter Bestrahlung mit 8 h-Intervall (Abb. 8). Die Dosis-Effekt-Beziehung setzt sich aus zwei Abschnitten zu-

sammen, die die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der differenzierten Spermatogonien (ca. 90% der Zellen) und der jungen Spermatocyten (etwa 10% der strahlenexponierten Zellen) widerspiegelt ( $D_0$ : ca. 1 bzw. 4 Gy).

## 2.2. Strahleninduktion von numerischen Chromosomenmutationen

### 2.2.1. Induktion diploider Spermatiden

Spermatiden, deren Vorläuferzellen sich in der Meiose nur einmal geteilt haben, bleiben diploid. Besonders viele diploide längliche Spermatiden werden 20 und 21 Tage nach Bestrahlung von primären

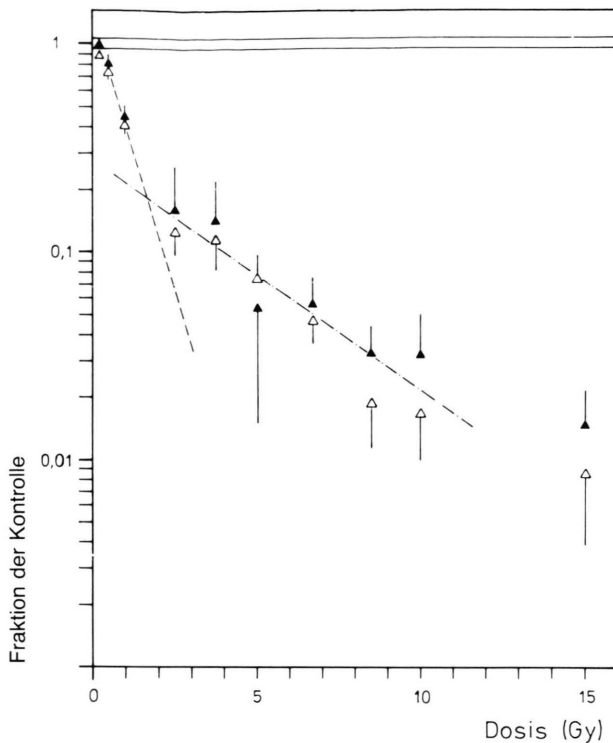


Abb. 8. Reduktion runder Spermatiden 21 d nach akuter (▲) oder fraktionierter (△) Bestrahlung mit 8-h-Intervall. In den Abb. 5, 7b, 7c und 8 sind die Absolutzahlen aufgetragen, in allen übrigen Zellinaktivierungskurven die Verhältnisse der Keimzellenprozentsätze zu den 2c-Prozentsätzen.

Spermatocyten beobachtet (Abb. 6d). Gleichzeitig treten übergroße Spermatiden in histologischen Präparaten gehäuft auf. Die Dosis-Effekt-Beziehung der impulsphotometrisch ermittelten Zunahme diploider länglicher Spermatiden ist über einen weiten Dosisbereich hin linear (Abb. 7e). Die Verdopplungsdosis beträgt ca. 1,5 Gy. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Auswirkungen einer akuten und einer fraktionierten Strahlenexposition mit 8 h-Intervall. Auch beim Menschen konnten wir eine Häufung diploider Spermien im Ejakulat 35 Tage nach Bestrahlung von primären Spermatocyten im Rahmen einer Strahlentherapie nachweisen (unveröffentlicht).

#### 2.2.2. Zunahme der numerischen Chromosomenmutationen

Die Zunahme der Variabilität des zellulären DNS-Gehaltes von runden bzw. länglichen Spermatiden ist 7 bzw. 21 Tage nach Bestrahlung von primären Spermatocyten am stärksten ausgeprägt (Abb. 6e, f). Die beiden anderen Gipfel III und IV zeigen keine strahleninduzierten Verbreiterungen der Histo-

gramme. Abb. 7f zeigt, daß die Zunahme der DNS-Gehalts-Variabilität von runden Spermatiden (Gipfel II), die als primäre Spermatocyten bestrahlt wurden, "sigmoid" ist. Die Dosis-Effekt-Beziehung der Zunahme der DNS-Gehalts-Variabilität von länglichen Spermatiden ist linear [2]. Die Verdopplungsdosis beträgt ca. 3 Gy.

#### Diskussion

Bei allen cytotoxischen Noxen, ionisierende Strahlung eingeschlossen, ist die Frage von Bedeutung, inwiefern Auswirkungen auf die Gametogenese und damit auf die Keimbahn zu erwarten sind. Beim weiblichen Säugetier teilen sich die Oocyten nach der Geburt nicht mehr; die im Laufe des Lebens mit Schadstoffen in Berührung gekommenen Oocyten werden nicht durch ein Zellerneuerungssystem ersetzt. Beim männlichen Säugetier hingegen werden in der Spermatogenese ständig neue Keimzellen aus den Stammzellen gebildet.

In den beschriebenen Experimenten erwies sich mit der Durchflußcytophotometrie die hohe Strahlenempfindlichkeit der differenzierten Spermatogo-

nien gegen Zellinaktivierung, die früher schon mit arbeitsaufwendigeren Verfahren festgestellt wurde (vgl. z.B. [17, 18]). Zuerst tritt nach einer Bestrahlung die Reduktion der S-Phase-Zellen auf, dann sind die primären Spermatocyten, die runden und schließlich die länglichen Spermatiden verringert. Diese Keimzellverminderungen können als Kriterium für die Strahlenwirkung verwendet werden. Die  $D_{37}$ -Werte für die differenzierten Spermatogonien, gemessen an den Kriterien „S-Phasen-Reduktion“ (0.4 Gy), „4c-Reduktion“ (1.4 Gy) und „Reduktion haploider Keimzellen“ (1.8 Gy) unterscheiden sich: je weiter die Zellen durch die Spermatogenese fortschreiten, desto höher werden die  $D_{37}$ -Werte. Dies mag auf einen Rückkopplungsmechanismus zurückzuführen sein, der den strahleninduzierten Zellverlust kompensiert. Vielleicht degenerieren weniger Keimzellen als normalerweise auf dem Weg zu reifen Spermatozoen (M. L. Meistrich, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser hohen Sensibilität der differenzierten Spermatogonien, auf die die eben genannten Effekte zurückzuführen sind, ist der Nachweis einer Strahlenwirkung bereits wenige Stunden bis Wochen nach Einwirkung geringer Dosen möglich. Die Verwendung des Modells als biologisches Dosimeter bietet sich an [3]. Die Reduktion der DNS-synthetisierenden Zellen ist der empfindlichste Parameter zur Abschätzung der Auswirkung einer Strahlenexposition im Niedrigdosenbereich. Werte bis hinab zur Dosis von 0.05 Gy lassen sich nachweisen. Auch zur Bestimmung der Relativen Biologischen Wirksamkeiten unterschiedlicher Strahlenarten eignet sich das Modell.

Sterilität und genetische Veränderungen als Langzeiteffekte ionisierender Strahlung und vergleichbarer Noxen sind auf Schädigung der Stammzellspermatogonien zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit stellen sich die Stammzellen als wenig empfindlich gegen Zellinaktivierung dar. Die  $D_{37}$  beträgt für Stammzellspermatogonien 9 Gy, gemessen am Überleben der davon abstammenden haploiden Keimzellen. Demnach ist bei Mäusen das Risiko strahleninduzierter Sterilität nur bei hohen Strahledosen vorhanden. 16 Gy wird als Sterilisierungsdosis für die Maus angegeben [19].

Nach einer „split-dose“ – Bestrahlung mit 24 oder 48 Stunden Intervall wurden durch die 12 Gy hohe absorbierte Strahledosis mehr Stammzellen inaktiviert als durch eine „split-dose“ – Strahlenexposition mit 4 oder 8 Stunden Intervall zwischen den bei-

den gleich hohen Teilfraktionen oder einer akuten Strahlenexposition [5]. Withers *et al.* [20] interpretierten dieses Phänomen als Hinweis auf empfindlichere und weniger empfindliche Zellzyklusphasen der Stammzellen, die die überlebenden Zellen nach der ersten Teilfraktion durchlaufen. Die Regenerationsfähigkeit der Stammzellen ist auch nach fraktionierter Bestrahlung sehr hoch.

Bisher sprechen die verfügbaren Daten dafür, daß sich die Sensibilitätsmuster der Keimzellen gegen ionisierende Strahlung bei Mensch und Maus ähneln. Nach Clifton und Bremner [21] reagieren die A-Spermatogonien des Menschen jedoch etwa um den Faktor drei empfindlicher auf die cytociden Strahleneffekte als die der Maus. Nach Meistrich und Samuels [22] sind beim Menschen vor allem die frühen, 2 bis 9 Monate nach dem Strahleninsult nachweisbaren Effekte auf die Spermienbildung viel ausgeprägter als bei der Maus. Beide Spezies unterscheiden sich jedoch nicht so sehr in ihren irreversiblen Langzeitschäden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Induktion abnormer diploider Spermatiden und die Zunahme von Aneuploidien als Parameter für mutagene Strahlenwirkung verwendet. Die Zunahme von Aneuploidien wurde an einer Steigerung des Variationskoeffizienten (CV) im DNS-Histogramm festgestellt (vgl. [23–25]). Strahleninduzierte Chromosomenbrüche sind mit Steigerungen des CV's korreliert [25]. Die Verdopplungsdosis für die Zunahme diploider Spermatiden betrug ungefähr 1.5 Gy, die der Zunahme der genetischen Variabilität, gemessen an der Steigerung des CV's im DNS-Histogramm, lag bei ca. 3 Gy. Die strahleninduzierten Mutationen in Keimzellen stellen also keine genügend empfindlichen Kriterien für die biologische Dosimetrie dar, eignen sich jedoch als Indikatoren der mutagenen Wirkung ionisierender Strahlung und liefern somit ein Mutagenitätstestsystem. Diese mutagenen Strahleneffekte sind wie die cytociden Strahlenwirkungen nur vorübergehend an spermatogenetischen Zellen nachzuweisen. Die Bestrahlung primärer Spermatocyten mit 4c-DNS-Gehalt führt zu signifikantem Anstieg von Aneuploidien bei den haploiden Keimzellen bzw. zur Bildung von diploiden Spermatiden.

Auch andere Autoren haben beschrieben, daß die Spermatocyten besonders empfindlich gegen die mutagene Strahlenwirkung sind, so gegen die Induktion von Aneuploidien durch Nondisjunction [26], Spermatozoonkopfabnormalitäten [27], die als Repara-

tursynthese beschädigter DNS interpretierte „unscheduled DNA synthesis“ [28] und Verklebungen der Chromosomen [2, 28] sowie Zunahmen des CV's der DNS-Histogramme von Spermatozoen aus dem Epididymis [29–31]. Die Verbreiterung der Verteilung, die bei den reifen Spermien nachweisbar ist, bedeutet, daß die geschädigten Zellformen offenbar nicht während der Spermiohistogenese und der Nebenhodenpassage durch Selektion ausgesondert werden. Zellen, die in diesem Stadium (als primäre Spermatocyten bis reife Spermien) bestrahlt wurden, tragen die Potenz in sich, Mutationen weiter zu tragen. Werden Zellen vor der Meiose bestrahlt, kommt es nicht zu einer Verbreiterung der DNS-Verteilung reifer Spermatozoen. Derartige Stadien spielen anscheinend für die Weitergabe strahleninduzierter Mutationen eine vernachlässigbare Rolle.

Daraus folgt die strahlenbiologisch begründbare Empfehlung, mit der Kinderzeugung zumindest so lange zu warten, bis die zum Zeitpunkt des Strahlensinsults prämeiotischen Stadien zum Zuge kommen, oder, um noch sicherer zu gehen, eine zusätzliche Spermatogenesedauer.

### Danksagung

Die Untersuchungen wurden unterstützt durch die Europäische Gemeinschaft, Vertrags-Nr.: BIO-E-538-D, und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Nr.: Go-393/1-1. Unser Dank gebührt insbesondere Herrn Dr. J. Schumann für zahlreiche Anregungen und ständige Unterstützung. Wir danken Frau H. Zöld und Frau P. Berkes für die sorgfältige Durchführung der Versuche.

- [1] U. Hacker, J. Schumann und W. Göhde, *Acta Radiol. Oncol. Radiat. Phys. Biol.* **21**, 349–351 (1982).
- [2] U. Hacker, *Biologische Dosimetrie ionisierender Strahlung am Modell der Spermatogenese der Maus*, Dissertation, Universität Münster (1981).
- [3] U. Hacker, J. Schumann, W. Göhde und K. Müller, *Acta Radiol. Oncol. Radiat. Phys. Biol.* **20**, 279–282 (1981).
- [4] U. Hacker, W. Göhde, J. Schumann und F. Otto, *Biologic dosimetry of low LET irradiation in mouse spermatogenesis – Implications for man*, in: *Proceedings of the 7th International Congress of Radiation Research*, Amsterdam 1983.
- [5] U. Hacker-Klom, *Acta Radiol. Oncol. Radiat. Phys. Biol.* (1985), im Druck.
- [6] U. Hacker-Klom, W. Göhde, J. Schumann, F. Otto und E.-M. Langer, *Biologische Dosimetrie niedriger LET-Strahlung am Modell der Spermatogenese*, in: *Medizinische Physik*, S. 383–387 (J. Schütz, Hrsg.), Dr. Alfred Hüthling Verlag GmbH, Heidelberg 1983.
- [7] U. Hacker-Klom, W. Göhde und J. Schumann, *Acta Radiol. Oncol. Radiat. Phys. Biol.* (1985), im Druck.
- [8] U. Hacker-Klom, W. Göhde und J. Schumann, *Mammalian spermatogenesis as a biological dosimeter for ionizing radiation*, in: *Biology Dosimetry*, S. 127–137 (W. G. Eisert und M. L. Mendelsohn, Hrsg.), Springer, Berlin, Heidelberg 1984.
- [9] J. Zante, J. Schumann, B. Barlogie, W. Göhde und T. Büchner, *New preparation and staining procedures for specific and rapid analysis of DNA-distributions*, in: *Second International Symposium on Pulse-Cytophotometry*, S. 97–106 (W. Göhde, J. Schumann und T. Büchner, Hrsg.), European Press, Ghent 1976.
- [10] J. Zante, J. Schumann, W. Göhde und U. Hacker, *Histochemistry* **54**, 1–7 (1977).
- [11] M. Stöhr und K. Goerttler, *Histochem. Cytochem.* **27**, 564–566 (1979).
- [12] C. C. Lu und M. L. Meistrich, *Cancer Res.* **39**, 3575–3585 (1979).
- [13] E. F. Oakberg, *Am. J. Anat.* **99**, 507–516 (1956).
- [14] E. F. Oakberg, *Am. J. Anat.* **99**, 507–516 (1956).
- [15] E.-M. Meier, *Zellbiologischer Informationsgehalt von DNS-Verteilungen von Säugetierzellen und menschlichen Spontantumoren*, Dissertation, Universität Münster (1983).
- [16] U. Hacker-Klom, G. Kleinhans und W. Göhde, *Andrologia* (1985), in Vorbereitung.
- [17] E. F. Oakberg und E. Clark, *Species comparison of radiation response of the gonads*, in: *Effects of ionizing radiation on the reproductive system*, S. 11–24 (W. D. Clarkson und F. X. Gassner, Hrsg.), Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1964.
- [18] M. J. Rowley, D. R. Leach, G. A. Warner und C. G. Heller, *Radiation Res.* **59**, 665–678 (1974).
- [19] R. Rugh, *Effects of ionizing radiation on the testes and spermatozoa*, in: *Mechanism in Radiobiology*, **Vol. II** (M. Errera und A. Forsberg, Hrsg.), Academic Press, New York, London 1960.
- [20] H. R. Withers, N. Hunter, H. T. Barkley und B. O. Reid, *Radiation Res.* **57**, 88–103 (1974).
- [21] D. K. Clifton und W. J. Bremner, *J. Androl.* **4**, 387–392 (1983).
- [22] M. L. Meistrich und R. C. Samuels, *Radiation Res.* **102**, 138–147 (1985).
- [23] W. Göhde, M. L. Meistrich, R. Meyn, J. Schumann, D. Johnston und B. Barlogie, *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 470–473 (1979).
- [24] M. L. Meistrich, S. Lake, L. L. Steinmetz und B. L. Gledhill, *Mutation Res.* **49**, 397–405 (1978).
- [25] F. J. Otto und H. Oldiges, *Cytometry* **1**, 13–17 (1980).
- [26] A. D. Tates, P. L. Pearson, M. van der Ploeg und N. de Vogel, *Mutation Res.* **61**, 87–101 (1979).
- [27] A. J. Wyrobek, *Genetics* **92** (Supplement), S. 105–119 (1979).
- [28] R. E. Sotomajor, G. A. Sega und R. B. Cumming, *Mutation Res.* **62**, 293–309 (1979).
- [29] B. L. Gledhill, S. Lake, D. Pinkel, M. A. Van Dilla



- und A. J. Wyrobek, Flow cytometric analysis of sperm from mice exposed to mutagens. II. Dose-responses. Proceedings of the Automated Cytology VII Symposium, Asilomar, California, USA, 25.–30. November 1979.
- [30] D. Pinkel, B. L. Gledhill, S. Lake, M. A. Van Dilla und A. J. Wyrobek, Increased fluorescence variability in sperm from mice exposed to X-rays: Is it due to induced DNA content variability? Proceedings of the 5th International Symposium on Flow Cytometry, Rome, 2.–5. Dezember 1980.
- [31] M. A. Van Dilla, D. Pinkel, B. L. Gledhill, S. Lake, G. Watchmaker und A. J. Wyrobek, Flow cytometry of mammalian sperm: Progress report, in: Proceedings of the IVth International Symposium on Flow Cytometry, S. 279–283 (O. D. Laerum, T. Lindmo und E. Thorud, Hrsg.), Universitetsforlaget, Bergen, Oslo, Tromsø 1980.