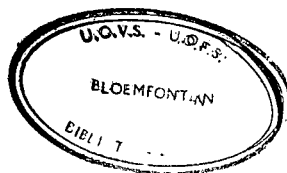


**DIE INVLOED VAN IONISERENDE STRALE EN ELEKTRONE
OP DIE CHROMOSOME VAN DIE MENS**



deur

STANDER JANSEN

*Verhandeling voorgelê ter vervulling van die vereistes vir die graad M.Med.Sc.
in die Fakulteit van Geneeskunde (Departement Biofisika) aan die Universi-
teit van die Oranje-Vrystaat.*

Promotor: Prof. Dr. P.C. Minnaar

20 Desember 1974.

UOVS-SASOL-BIBLIOTEEK 0175435



111004556902220000010

175435

...LAAR MAG ...
...STANDIGHEDE ...
...STELLEN VERWYDER ...

H.d.l.

Ek verklaar dat die verhandeling wat hierby vir die graad M.Med.Sc. deur my ingedien word, my selfstandige werk is en nie voorheen deur my vir 'n graad aan 'n ander Universiteit ingedien is nie.



S. JANSEN

Bloemfontein

20 Desember 1974.

BEDANKINGS

My opregte dank aan Prof. P.C. Minnaar wat as studieleier opgetree het, vir sy bereidwilligheid om my te alle tye met raad te bedien, sy opbouende kritiek en boweal, die aanmoediging wat ek oor die jare van hom ontvang het.

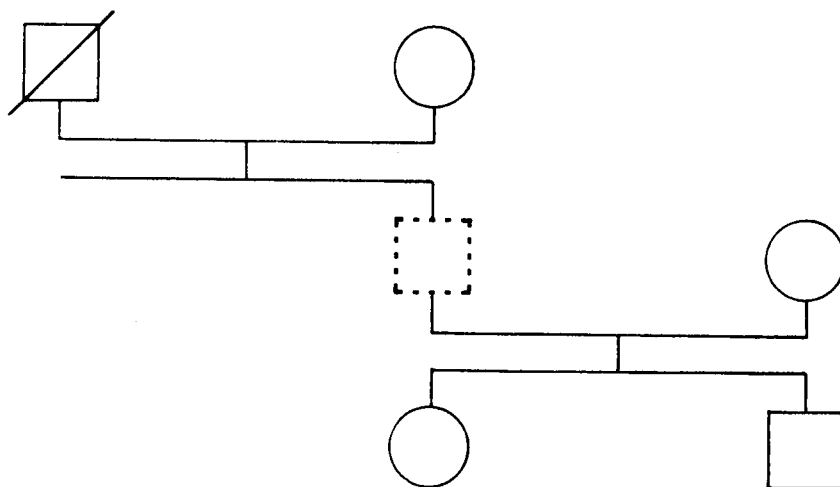
Graag betoon ek ook my dank aan die departement Biofisika, Radioterapie en Anatomiese Patologie, vir die fasiliteite wat tot my beskikking gestel is, sowel as die hulp wat ek ontvang het in die uitvoer van die eksperimente.

Ek is ook baie dank verskuldig aan my hoof, Prof. D.J.J. van Velden, vir die artikels wat hy van tyd tot tyd aan my voorsien het, asook sy hulp en ondersteuning.

Waardering word uitgespreek teenoor mev. U. Swanepoel wat altyd gewillig was om bloed te skenk vir die uitvoer van die eksperimente; my kollega, mev. E. Myburgh, vir haar samewerking; asook mev. C.M. Kühn wat 'n groot gedeelte van die voorlopige tikwerk gedoen het.

Hiermee erken ek ook met waardering die hulp van mej. Veronica Clack wat die verhandeling getik het, en die offerings wat sy moes maak om dit betyds gereed te kry vir die drukproses. Wat laasgenoemde betref, wil ek ten slotte mnr. A.T. Burger bedank vir sy hulp en welwillendheid in die druk en bind van die verhandeling.

Hierdie verhandeling word opgedra aan my



uit erkenning vir die aanmoediging, begrip en lojaliteit
wat ek van hulle ontvang het.

INHOUDSOPGAWE

1.0	INLEIDING	
1.1	LITERATUUROORSIG	1
1.1.1	Die Selsiklus	4
1.1.1.1	Die effek van colcemid op die selsiklus	6
1.1.1.2	Die effek van PHA op die selsiklus	9
1.1.1.3	Ioniserende strale en die selsiklus	10
1.2	DIE EFFEK VAN IONISERENDE STRALE OP CHROMOSOME	18
1.2.1	Algemene morfologie van die chromosoom	18
1.2.2	Tipes aberrasies verkry deur ioniserende strale	18
1.2.2.1	Chromosoom-aberrasies	26
1.2.2.2	Chromatied-aberrasies	34
1.2.2.3	Subchromatied-aberrasies	37
1.2.2.4	Aneuploiëdie	37
1.2.2.5	Poliploiëdie	39
1.2.2.6	Endoreduplikasie	40
1.2.3	Aberrasies in vivo	41
1.2.4	Aberrasies in vitro	53
1.2.5	Die interaksie van X-strale en elektrone met materie	64
1.2.5.1	Die absorpsie van X-strale	66
1.2.5.1.1	Die foto-elektriese effek	67
1.2.5.1.2	Die Compton-effek	67
1.2.5.1.3	Paarproduksie	68
1.2.5.2	Sekondêre bestraling	69
1.2.5.2.1	Deltastrale	69
1.2.5.2.2	Bremsstrahlung	69
1.2.5.3	Die meting van bestraling	69
1.2.5.3.1	Die Roentgen en die Rad	70

1.2.5.3.2	Relatiewe biologiese effek= tiwiteit (RBE)	71
1.2.5.3.3	Lineêre energie-oordrag (LET)	72
1.3	CHEMOTERAPEUTIESE MIDDELS AS INDUSEERDERS VAN SKADE IN KERNMATERIAAL	73
1.3.1	Alkilerende agense, bv. endoksaan en chloorambu= siel	74
1.3.2	Antimetaboliëte, bv. 5-fluoro-urasiel	77
1.3.3	Antibiotika, bv. bleomisien	78
2.0	METODES	79
2.1	TIPE SELLE GEBRUIK EN KULTUURMETODES	79
2.2	APPARATUS	81
2.2.1	X-strale	81
2.2.2	Die lineêre versneller	84
2.3	PROSEDURE	89
2.3.1	Tydsverloop na opstel van kulture	89
2.3.2	Dosis bestraling	90
	2.3.2.1 Kilovolt masjien	90
	2.3.2.2 Lineêre versneller	91
2.3.3	Toestande tydens bestraling	91
	2.3.3.1 X-strale	91
	2.3.3.2 Elektrone	91
2.3.4	Tydsverloop na bestraling	92
2.3.5	Oes van kulture	92
2.3.6	Kleurtegniek	95
3.0	RESULTATE	95
4.0	GEVOLGTREKKINGS	122
	OPSOMMING	125
	VERWYSINGS	129

1.0 INLEIDING

Menslike limfosiëte in kultuur is bestraal met X-strale en elektrone. 'n Bykomstige reeks eksperimente is ook gedoen waar bleomisien, endoksaan en 5-fluoro-urasiel by die kulture gevoeg is. Die doel van die ondersoek was as volg:

- (i) Om die invloed van ioniserende strale, elektrone en sitostatika op die D.N.A. van die limfosiet, op 'n chromosomale vlak, te bepaal in terme van:
 - (a) Die invloed op die mitotiese indeks.
 - (b) Chromatied-aberrasies, oftewel gapings of breuke in 'n enkele chromosoomarm nadat dit gedupliseer het.
 - (c) Chromosoom-aberrasies, d.w.s. die ontstaan van sentriese of asentriese fragmente voor die lengteverdeling van die chromosoom in chromatiede.
 - (d) Die posisionele verandering van 'n chromosoomsegment binne dieselfde chromosoom (intraruil) of tussen verskillende chromosome (interruil).
- (ii) Die meganisme te bestudeer waardeer stralingsgeïnduseerde chromosoom-aberrasies ontstaan.
- (iii) 'n Vergelykende studie te maak tussen die aberrasies verkry by verskillende dosisse X-strale, elektrone en sitostatika.

1.1 LITERATUUROORSIG

Dit is 'n bekende feit dat aberrasies in chromosoomstruktuur (chromosomale aberrasies of strukturele veranderinge in chromosome) en veranderinge in chromosoomgetal teen 'n lae tempo spontaan in somatiese en geslagselle van plante en diere kan ontstaan en dat die frekwensie van hierdie aberrasies vermeerder na blootstelling aan ioniserende strale. Alhoewel 'n groot deel van die geïnduseerde chromosomale aberrasies kan optree as dominante letale effekte, het alle aberrasies nie die onmiddellike verlies van lewensvatbaarheid tot gevolg nie, maar kan hul as mutante veranderinge oorgedra word aan die nageslag van die sel of bestraalde individu.

Tot betreklik onlangs is die meeste navorsingswerk gedoen op spesies met 'n relatiewe klein aantal groterige chromosome. Ekstrapolasie van gegewens hierdeur verkry, kon nie sonder meer op menslike chromosome gedoen word nie, aangesien die stralingssensitiwiteit van menslike chromosome as verwysingspunt moet dien. Die logiese uitvloeisel hiervan was dus dat sedertdien 'n groot hoeveelheid navorsing op menslike chromosome gedoen is om hul sensitiwiteit ten opsigte van ioniserende strale te bepaal.

Koernicke (1905)⁽¹⁾ was die eerste persoon om aan te toon dat ioniserende strale chromosome kan fragmenteer en herrangskikkings in chromosomale struktuur tot gevolg kan hê.

Hy het die blomknoppe van die plant Lilium martagon geneem en dit aan radiumstrale blootgestel. Dertig jaar later het Karl Sax die plant Tradescantia gebruik om die induksie van chromosoomaberrasies deur X-strale aan te toon. Tot ongeveer tien jaar gelede is die meeste werk in hierdie veld gedoen op plante en diere wat geskik was vir telings= eksperimente, byvoorbeeld die vrugtevlieg Drosophila.

In die jare vyftig is tegnieke ontwikkel wat dit moontlik gemaak het om roetine sitogenetiese ondersoeke op soogdiere, waaronder ook die mens, te doen. Die ondersoek van menslike chromosome is gekniehalter deur verskeie tegniese probleme wat oorbrug moes word. Een hiervan is die relatiewe groot hoeveelheid chromosome per sel, en dat hierdie chromosome neig om te klompeer en oormekaar te lê. Deur die toevallige fout van 'n tegnikus, het Hsu en Pomerat in 1952 gevind dat wanneer 'n hipotoniese oplossing by selkulture gevoeg word, dit swelling van die selle tot gevolg het, sodat hul bars en die chromosome vry van mekaar lê⁽²⁾.

Joe Hin Tjio en Albert Levan het hierdie verbeterde tegniek gebruik in embroniese longweefsel kulture, en dit het hul in staat gestel om in 1956 bo alle twyfel vas te stel dat die mens 46 chromosome per somatiese selkern bevat.

Ondersoeke wat volgens hierdie metodes gedoen is, het egter ook hul beperkende faktore gehad. Alhoewel dit ons in staat gestel het om somatiese chromosome van verskeie tipes weefsel te ondersoek, d.w.s. of deur 'n kultuur of van stukkies biopsie-materiaal, was daar geen tegniek waarop maklik be=

skikbare weefsel ondersoek kon word nie. In 1960 vind dr. Peter Nowell egter verskeie selle in mitose nadat hy bloed waarby phytohemagglutininien gevoeg is, geïnkubeer het⁽³⁾. Hierdie phytohemagglutininien (P.H.A.) is 'n boon=tjie ekstrak wat jare reeds gebruik word om rooiselle van die ander bloedkomponente te skei. Colchicine is gebruik om seldeling tydens die metafase stadium te stop deurdat dit spoelvorming verhoed. Hierdeur ontstaan dan 'n korttermyn kultuur van perifere bloed limfosiete.

Die eerste persone wat bogenoemde tegniek gebruik het om die effek van X-strale op menslike chromosome te ondersoek, was Tough et al (1960)⁽⁴⁾. Hulle het die chromosome van twee pasiënte met ankilerende spondilose ondersoek na terapeutiese behandeling met X-strale en veral gelet op numeriese sowel as strukturele abnormaliteite van die chromosome. Geen poging is egter aangewend om tussen die verskillende tipes strukturele abnormaliteite te onderskei nie. Hulle vind dat hierdie abnormaliteite 'n hoogtepunt bereik op die derde dag na bestraling, terwyl daar op die vyfde dag 'n merkbare afname was, met 'n terugkeer na die normale. Dit was dus 'n in vitro ondersoek na aberrasies wat in vivo geïnduseer is.

Spoedig is navorsing in verskeie rigtings gekanaliseer. So byvoorbeeld is die selsiklus ondersoek om te bepaal hoe dit in kultuur beïnvloed word deur P.H.A., asook wat die invloed van X-strale op die selsiklus is. Ander rigtings wat onder=

soek is, was in vivo bestraling gevolg deur in vivo ondersoek, in vitro bestraling en ondersoek van chromosome. Namate die kennis van die molekulêre aspekte van genetiese materiaal verbreed het, is heelwat werk gedoen om die effek van ioniserende strale op D.N.A. te bepaal. Met die ontwikkeling van hoë energiebronne soos die verskillende tipes versnellers, kon toedieningsdosisse en tempo van toediening verhoog word. Hierdie versnellers kon afgesien van ioniserende strale, ook elektrone produseer, wat vir dieselfde ondersoeke gebruik kon word.

1.1.1 Die Selsiklus

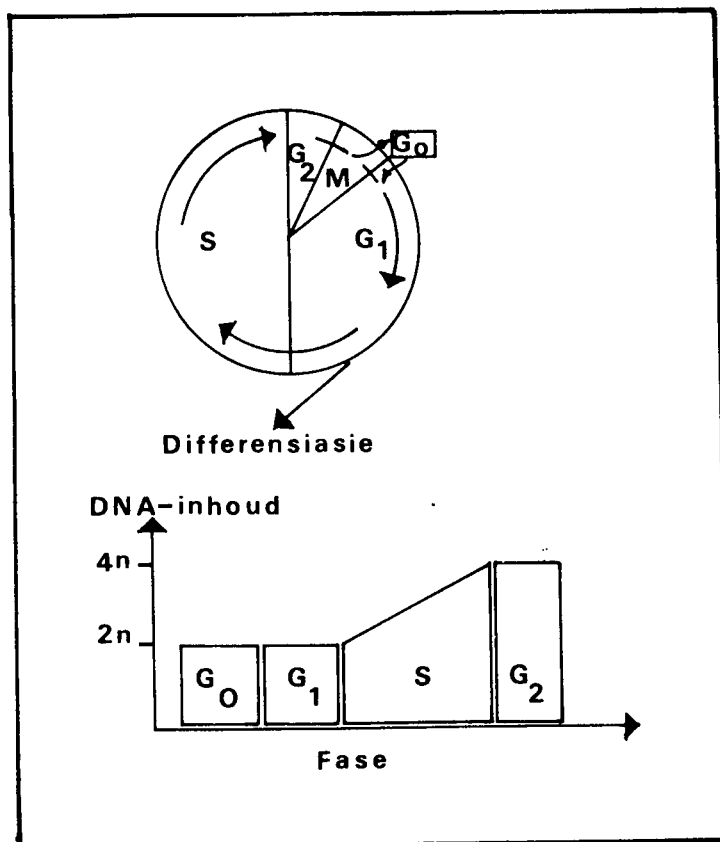
Omdat selle in aktiewe proliferasie deur stadia van D.N.A. sintese en nie-sintese tussen opeenvolgende mitoses gaan en omdat radiobiologiese skade tot 'n mate beïnvloed word deur die fase van die siklus waarin die sel verkeer, word in die eerste plek gekyk na die eienskappe van die selsiklus van proliferende selle.

Een van die kenmerke van normale eukariotiese selle, is dat daar 'n definitiewe sikliese volgorde van sintese, groei en verdeling is met uitsondering van die tyd wanneer hul hul van die selsiklus onttrek om in 'n rustende fase te verkeer. Hierdie siklus word gerieflikheidshalwe in vier fases verdeel, nl. G₁, S, G₂ en M. Die eerste drie fases word van mekaar onderskei volgens die verskillende molekules wat in elke fase gesintetiseer word, terwyl die vierde die fase van mitose of seldeling is⁽⁵⁾. Laasgenoemde is die fase waarty-

dens chromosome onder die ligmikroskoop waargeneem kan word.

Deur middel van outoradiografiese studies waarin getritieerde timidien as voorloper van D.N.A.-sintese gebruik is, kon vasgestel word dat die D.N.A. van chromosome gesintetiseer word gedurende 'n kort pouse (die S fase) tussen twee opeenvolgende mitotiese delingsfases⁽⁶⁾. Die D.N.A.-sintese fase word van die voorafgaande mitose geskei deur G_1 , en van die volgende mitose deur G_2 . Laasgenoemde periodes word onderskei omdat geen D.N.A.-sintese dan plaasvind nie.

Die makromolekules wat tydens G_1 en G_2 vervaardig word, word bepaal deur 'n gemerkte voorloper by te voeg wat spesifiek vir die besondere tipe makromolekuul is en daarin geïnkorporeer word⁽⁷⁾.



Figuur 1: Diagram van die selsiklus.

Die lengte van die selsiklus varieer. Daar is verskille tussen verskillende persone, tussen verskillende selpopulasies in dieselfde persoon, asook tussen verskillende selskulture van dieselfde persoon geneem oor 'n sekere periode (8, 9, 10). S , G_2 en M is relatief konstant in lengte en duur ongeveer 6, 2 en 0,5 tot 1 uur onderskeidelik, terwyl die tydsduur van G_1 kan varieer van 'n kort rukkie tot 12 uur^(10, 11). G_1 mag selfs van sel tot sel binne dieselfde sellyn varieer. Die aantal selle in 'n gegewe fase van die selsiklus is proporsioneel tot die lengte van die fase.

Al die selle in 'n gegewe tipe weefsel is nie noodwendig aktief besig om te prolifereer nie. Die groeifraksie (G.F.) soos gedefinieer deur Mendelsohn⁽⁹⁾, is die verhouding van die aantal selle in siklus tot die totale aantal selle (T_s/T_c)⁽¹¹⁾. Hierdie verhouding kan slegs teoreties bepaal word, waar T_c as die gemiddelde tydsduur van die selsiklus geneem word. Die aantal selle in siklus word bepaal deur D.N.A. merking.

1.1.1.1 Die effek van Colcemid op die selsiklus

Die alkaloid colchicine se blokkerende effek op selle in mitose, is vir die eerste keer in 1889 deur Pernice⁽¹¹⁾ gedemonstreer. Hy het na toediening van colchicine aan honde gevind dat daar 'n groot aantal verdelende selle in die krupte van Lieberkühn en epiteliumselle van die maag teenwoordig was. Hy het ook gemerk dat daar 'n afwesigheid was van latere stadia van verdeling (waarskynlik ana=

fase en telofase). Die eerste persone wat colchicine in die studie van selkinetika gebruik het, was o.a. Ludford (1936), Brues (1936), Smith en Gardner (1937)⁽¹¹⁾.

Colcemid se funksie is beperk tot die inhibering van mitose en affekteer nie enige ander fase van die selsiklus nie⁽¹²⁾. Dit word bewys deur die feit dat die totale generasietyd na die toevoeging van colcemid, presies ooreenstem met dié soos verkry deur die meting van die groeitempo van selkulture en die direkte bepaling van die generasietyd deur bepaling van die gemiddelde tyd tussen mitoses in 'n aaneenlopende sellyn deur die gebruik van kinematografie⁽⁷⁾.

Indien colcemid in die korrekte dosis by 'n selkultuur gevoeg word, word alle selle wat die mitotiese fase binnegaan, se deling in metafase gestop⁽¹¹⁾. 'n Periode van vertraagde aksie bestaan tussen die toediening van colcemid en die werklike inhibering van spoelformasie. Hierdie periode wissel tussen 15 en 30 minute. Die reaksie van selle wat reeds in mitose verkeer tydens toediening van colcemid, verskil in verskillende soorte selle. In die geval van ovariële selle van die Chinese hamster, word slegs dié selle in metafase gestop wat nog nie in die mitotiese fase was tydens toediening van colcemid nie. By longselle van die Chinese hamster en menslike limfosiete daarenteen, word dié selle wat reeds in die mitotiese fase is, ook deur colcemid geblokkeer. 'n Moontlike verklaring vir hierdie verskil is dat spoelformasie in die ovariële weefsel op 'n vroeër stadium plaasvind as in

die longselle, m.a.w. op 'n tydstip voor chromosomale kondensasie, wat as die begin van mitose beskou word, d.w.s. wanneer mitose nog nie in 'n sel waargeneem kan word nie⁽⁷⁾.

Die akkumulasie van selle in mitose na die toediening van colcemid, kan deur die volgende formule bereken word⁽⁷⁾.

$$\text{Log } (1 + N_m) = \frac{0,301}{T} (T_m + t)$$

waar:

N_m = gedeelte van die selpopulasie in mitose

T = generasietyd van die kultuur

T_m = tydsduur van mitose

t = tydsverloop sedert toediening van colcemid.

$\text{Log } (1 + N_m)$ staan dan bekend as die akkumulasie-funksie.

Een van die praktiese toepassings van hierdie formule is in die kartering van die selsiklus om die presiese tyd te bepaal wanneer 'n spesifieke makromolekuul gesintetiseer word. Hiervoor word 'n gemerkte voorganger benodig wat in 'n spesifieke makromolekuul geïnkorporeer word. Die colcemid en voorganger word dan gelyktydig toegedien. Alle metafases word eers getel om 'n gewone akkumulasiefunksie te bepaal, en daarna word slegs die gemerkte mitoses getel. Die tydsverskil tussen die twee akkumulasie funksies sō verkry, verteenwoordig dan diē tydsverloop tussen die aanvang van mitose en die punt vroeër in die selsiklus waar sintese van

die makromolekuul geëindig het.

1.1.1.2 Die effek van P.H.A. op die selsiklus

Die limfosiet is lank beskou as 'n nie-delende sel. Limfositete in perifere bloed kulture, wanneer hul met P.H.A. gestimuleer word, kan egter transformeer tot blast selle⁽¹⁵⁾. Verskillende persone reageer egter verskillend op PHA-stimulasie⁽¹⁴⁾. Dieselfde persoon sal ook oor 'n tydperk van maande, verskillend reageer, sodat daar 'n groot variasie in die tempo van mitose binne dieselfde individu bestaan⁽⁸⁾. Verskille in die kultuurmedia speel hier nie 'n rol nie, omdat dieselfde verskille in mitotiese indeks met verskillende media verkry word.

Indien die selsiklus op sigself konstant bly, kan hierdie variasies toegeskryf word aan faktore teenwoordig in die plasma wat by die kulture gevoeg word. Humorale substansie wat lei tot 'n verhoging in die tempo van limfositete produksie kom voor in o.a. die timus, leukopenie en is teenwoordig wanneer limfositose plaasvind. Daar is voorgestel dat al hierdie substansie limfopoiëties is en dit kon aangetoon word dat die limfopoiëties teenwoordig in chroniese limfatiese leukemie serum, mitose verder stimuleer in PHA gestimuleerde menslike limfositete⁽⁸⁾. Dit is dus moontlik dat die variasie van die mitotiese indeks binne dieselfde individu, die gevolg is van die variasie in die hoeveelheid limfopoiëties en ander reguleerders teenwoordig in die plasma. Omdat limfo=

sietkulture nie baie suksesvol is sonder die byvoeging van plasma nie, is so 'n variasie onvermydelik.

Byvoeging van PHA tot limfosiet kulture affekteer nie die selle wat alreeds DNA-sintese ondergaan nie. Dit veroorsaak dus sintese van DNA en die aanvang van mitose in 'n gedeelte van die selpopulasie, wat feitlik sonder uitsondering geïdentifiseer is as blastselle. Die meganisme van PHA stimulasie hou verband met 'n verhoging in selmetabolisme aangesien daar 'n verhoging in DNA en proteïensintese tydens die vroeë stadia van limfosiettransformasie voorkom. Conard en Demoise⁽¹³⁾ het in 1970 d.m.v. outoradiografiese tegnieke aangetoon dat daar 'n sitoplasmiese lokalisasie van getritieerde PHA in menslike limfosietkulture is, en dat die hoogste aktiwiteit in mitochondriale fraksies voorkom. Mitochondria speel dus 'n groot rol in sellulêre metabolisme.

1.1.1.3 Ioniserende strale en die selsiklus

Die mees ooglopende gevolg van die bestraling van selkulture, is die inhibering van groei⁽¹⁶⁾. Dit is die gevolg van inmenging op verskeie gebiede met selproliferasie, waarvan die belangrikste waarskynlik die verlies is om voort te plant. Die oorgrote meerderheid van die selpopulasie verloor die vermoë van herhaalde proliferasie na die absorbering van dosisse van 'n paar honderd rads en word dan mikrobiologies as dood beskou. Na 'n aantal selgenerasies is die kultuurfles

gevol met metaboliese onaktiewe vorme en sel-debris, sodat die selle dan ook as fisiologiese en morfologies dood beskou kan word. Op 'n nog later stadium sal die oorlewende selle egter prolifereer en die kultuurfles vul.

Permanente inhibering van selproliferasie en die induksie van seldisintegrasië vind nie onmiddellik na bestraling plaas nie (generasie 0), d.w.s. die sel mag nog een of meer mitotiese siklusse voltooi. Na 'n dosis van bv. 500 rads mag die meeste selle in die populasie deel en voortgaan na die volgende siklus (generasie 1). Dit is eers tydens die tweede mitose dat party selle hul vermoë tot proliferasie verloor. As gevolg van hul beperkte proliferasievermoë, vorm hierdie reproduktief gedoemde selle klein "abortiewe" kolonies. Verdelings wat tot sulke kolonies aanleiding gee, is dikwels abnormaal. Sitoplasmiese brûe kom tussen susterselle voor, en die voorkoms van versmelting het reuseselle tot gevolg, wat kenmerkend in groot hoeveelhede in bestraalde kulture voorkom.

Direk na bestraling vind 'n verlaging in die mitotiese indeks plaas en dit mag binne een uur tot nul daal. Dit word gevolg deur 'n herstel van die mitotiese indeks tot 'n vlak gelyk aan of selfs hoër as dié in 'n nie-bestraalde selkultuur. Hierdie kenmerk staan bekend as stralings-geïnduseerde mitotiese vertraging⁽¹⁷⁾. Geen verskille in mitotiese vertraging kom in kulture voor na in vivo en in vitro bestraling nie⁽¹⁴⁾.

Die sensitiviteit van 'n sel ten opsigte van bestraling is nie konstant deur sy selsiklus nie⁽⁹⁾. Ioniserende strale het absorpsie van energie tot gevolg, wat gewoonlik groot genoeg is om enige molekulêre verbinding te breek. Die variasie in oorlewing na 'n lae energie-oordrag weerspieël waarskynlik die ouderdomsafhanklike vermoë om skade te oorkom, aangesien die graad van skade in vergelyking met oorlewing grootliks afhanklik van ouderdom is. Selle besit dus 'n groter vermoë om subletale skade te herstel tydens D.N.A.-sintese of net daarna^(21, 23).

Hierdie ouderdomsafhanklike sensitiviteit van selle ten opsigte van bestraling is baie kompleks en word deur verskeie faktore beïnvloed, nl.: Die verskil in generasietyd tussen verskillende selle in dieselfde populasie, die verskil in tydsduur van die fase, die verskil tussen fases waarin bestraling plaasvind en verskille by verskillende dosisse.

Die duur van die generasietyd is soos reeds genoem, nie dieselfde vir alle selle in 'n populasie nie⁽⁹⁾. Hierdie onderlinge verskil is soveel as 10 tot 20 persent⁽¹⁰⁾, wat meebring dat selle wat aanvanklik goed gesinchroniseer was, neig om te desinchroniseer binne die tydsverloop van een generasie. Na bestraling vind daar gewoonlik selverlies plaas. Verskeie homeostatiese meganismes bestaan egter vir die kompensasie van die selverlies, bv. verkorting van die selsiklus. Solank as wat die onomkeerbaar beskadigde selle ooglopend normaal bly, word die homeostatiese reguleringsmeganisme nie in werking gestel nie, met 'n gevolglike lae selomset, verlaagde stra-

lingssensitiwiteit en 'n beperkte kapasiteit om subletale letsels te herstel.

In soverre dit die tydsduur van die fase betref, kan oor die algemeen gesê word dat waar G_1 kort is, sulke selle die sensitiefste is in mitose en G_2 , meer weerstandigheid openbaar in G_1 en die minste sensitief is in die laaste gedeelte van $S^{(10)}$. In selle met 'n lang G_1 is daar tesame met bogenoemde ook 'n weerstandige fase in die vroeë G_1 , gevolg deur 'n sensitiewe fase in die laat G_1 .

Die verskille tussen fases waartydens bestraling plaasvind, is waarskynlik die afdeling waarop die meeste navorsing gedoen is. Hier word veral gedink aan die invloed van bestraling tydens G_1 , S , G_2 en M , die delingsvertraging wat dit tot gevolg het en die invloed van PHA op die transformering van limfosiete na blaste tydens bestraling.

Die verskille in sensitiwiteit van bestraling tydens G_1 , S , G_2 en M kan kortliks as volg saamgevat word: Gedurende 'n enkele selsiklus kom twee pieke van sensitiwiteit voor, naamlik gedurende mitose (M) en iewers naby die oorgang van G_1 na S . Twee pieke van weerstandigheid kom ook voor en wel in die vroeë G_1 en laat $S^{(16, 17, 18, 19, 20, 21)}$.

Die posisie van die pieke mag varieer na gelang van die lengte van G_1 , d.w.s. 'n kort G_1 toon nie 'n weerstandige piek in G_1 nie.

Die volgende vier eienskappe van die ouderdomsreaksie werp meer lig op die meganismes betrokke by die verskille soos hierbo genoem: Eerstens verskil die dosisreaksie-kurwes vir bestraling wat tydens maksimum en minimum sensitiwiteit uitgevoer is met 'n faktor van ten minste 3, d.w.s. daar is 'n merkbare verskil in effek⁽¹⁶⁾.

Tweedens blyk dit taamlik duidelik te wees dat dié veranderings in respons wat nie in verband staan met mitose nie, geleidelik binne individuele selle plaasvind, d.w.s. die sensitiwiteit van G_1 of S sal nie gekenmerk word deur 'n spesifieke paar dosisoorlewingskurwes nie, al was die selle ook volkome gesinchroniseer. Sensitiwiteit verander dus gedurende hierdie fases. Dit dui daarop dat die reaksie op X-strale noue verband hou met die metaboliese staat waarin die sel verkeer.

Derdens staan die dalende reaksie wat gedurende die vroeë gedeelte van S ondervind word, direk in verband met D.N.A.-sintese^(12, 14, 19, 20, 21). Alhoewel die voorkoms van 'n minimum piek in oorlewing tydens die oorgang van die sel van G_1 na S dui op 'n korrelasie tussen D.N.A.-sintese en sensitiwiteit, moet daar in gedagte gehou word dat verskeie sel-lulêre aktiwiteite ook tydens hierdie oorgang verander. Die verhouding tussen D.N.A.-sintese en sensitiwiteit word duidelik geïllustreer deur die byvoeging van fluorodeoksieuridien voordat selle die S fase binnegaan. Fluorodeoksieuridien is 'n spesifieke inhibeerder van D.N.A.-sintese, sodat selle op=

hoop aan die einde van G_1 , met 'n gevolglike verhoging in sensitiwiteit. Die sensitiwiteit van die geblokkeerde populasie bly egter hoogstens vir 'n paar uur konstant, en begin daarna afneem ten spyte van die feit dat selle nie D.N.A. sintetiseer nie. Die aard van hierdie verskynsel is nie duidelik nie, maar dit mag verband hou met die ongebalanseerde metaboliese staat waarin die sel verkeer. Die feit dat sensitiwiteit afneem gedurende die eerste helfte van S en konstant bly tydens die tweede helfte, dui daarop dat die D.N.A. wat in die eerste helfte gesintetiseer word, 'n spesiale betekenis vir die sel het, maar daar moet in gedagte gehou word dat ander sellulêre funksies wat geen ooglopende verband met D.N.A.-sintese het nie, ook drastiese veranderings gedurende hierdie periode ondergaan (16, 20).

Vierdens bly die oorsake vir die wisseling in respons tydens die selsiklus, insluitende die daling in die eerste helfte van S, onbekend. Daar is voorgestel dat die fluktuasies in intrasellulêre konsentrasie van die sulfhidriëlverbindings deels verantwoordelik daarvoor is, aangesien dit bekend is dat hul beskerming teen bestraling verleen. Die veranderinge in chromosomale organisasie en hoë aktiwiteite mag wel in verband gebring word met die hoë sensitiwiteit van hierdie fase. Die sensitiwiteitstoename in die middel van G_1 mag toegeskryf word aan die herstelprosesse wat plaasvind of verandering in metabolisme van die sel, maar bly grootliks onbekend, so ook die tydelike blokkering van bestraalde selle in G_2 .

Die mitotiese vertraging vir 'n gegewe dosis X-strale vermeerder in direkte verhouding tot die verhoging in verdubbelingstyd van die selpopulasie⁽²²⁾. Hierdie mitotiese vertraging word uitgedruk in terme van minute per rad. Vir L-selle is daar 'n vertraging van 1,2 minute per rad by 250 rads en 1,4 minute per rad by 1000 rads. Dewey et al⁽²²⁾ het aangetoon dat hierdie lineêre verwantskap tussen mitotiese-vertraging en dosis geld tussen 200 en 1000 rads. Wanneer die vertraging soos verkry met dosisse heelwat laer as 200 rads vergelyk word met dié verkry by dosisse groter as 1000 rads, is die mitotiese vertraging lineêr aan die log van die dosis. Daar vind dus 'n toename in vertraging by baie lae dosisse plaas, wat by HeLa selle soveel as 6 min/rad by 'n dosis van 9 rads kan wees. By dosisse bokant 1200 rads, is die laat S nie meer weerstandig as die vroeë S nie⁽²⁰⁾.

In soverre dit faseverskille betref, vind ons by L-selle 'n vertraging van 0,4 tot 0,5 min/rad vir selle bestraal in G₁, terwyl die waardes vir G₂, 2,3 tot 2,4 min/rad is. Selle bestraal in 'n deel van S daarenteen, gee 'n intermediêre waarde⁽¹²⁾. Die aantal selle wat na bestraling mitose bereik, verminder in terme van die dosis vinniger vir selle bestraal in S of G₂ as dié in G₁.

Onder delingsvertraging verstaan ons die vertraging in die hervatting van deling na bestraling⁽¹²⁾. Vir dosisse bokant 100 rads is daar 'n vinniger vermeerdering in delingsvertraging as 'n mitotiese vertraging. Die feit dat delingsvertraging

vertraging vinniger toeneem as mitotiese vertraging, is 'n verdere bewys dat mitose verleng as 'n funksie van toegediende dosis.

Die laaste faktor wat 'n belangrike rol speel in die invloed van ioniserende strale op die selsiklus, is PHA.

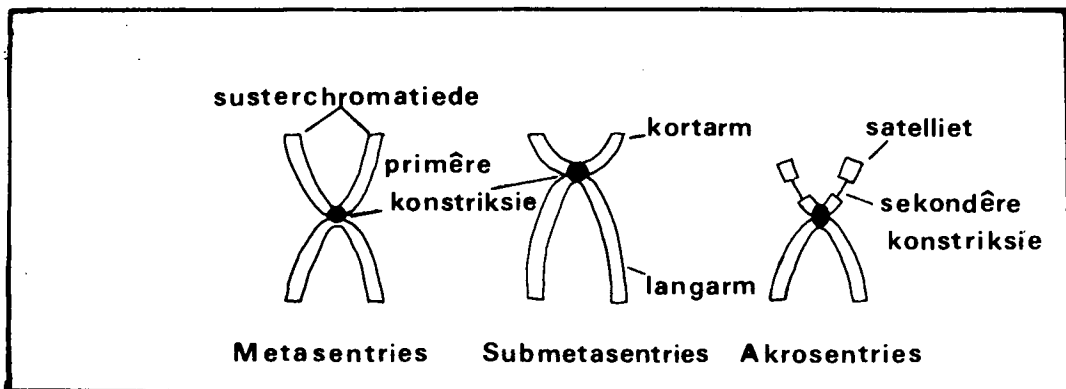
Die maksimum reduksie in PHA-geïnduseerde blastvorming is by 750 R. Bokant hierdie dosis bly die waarde betreklik konstant⁽¹³⁾. Reduksie is gewoonlik maksimaal in die eerste 3 tot 4 dae na bestraling. Vir dosisse onder 300 R neig kulture om 'n mate van herstel na 3 dae te toon. Bestraling van kulture waarby geen PHA gevoeg is nie, het 'n groot vernietiging van limfosiëte tot gevolg. Bestraling inhibeer dus hoofsaaklik seldeling en het min invloed op die transformering van limfosiëte tot blaste.

Hierdie beskermingsmeganisme van PHA, naamlik om limfosiëte toe te laat om tot blaste te transformeer ten spyte van bestraling, is nie bekend nie. PHA het waarskynlik sekere veranderinge in die sel tot gevolg voor die aanvang van seldeling. Geen verskil in beskerming word gevind by in vivo en in vitro bestraling van limfosiëte nie⁽¹⁴⁾.

1.2 DIE EFFEK VAN IONISERENDE STRALE OP CHROMOSOME

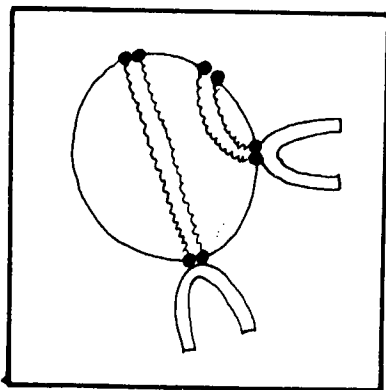
1.2.1 Algemene Morfologie van die Chromosoom

Menslike mitotiese chromosome het 'n X-vormige voorkoms, wat gedupliseerde chromosome voor skeiding verteenwoordig. Die susterchromatiede word bymekaar gehou deur die sentromeer of primêre konstrikasie, wat die posisie aandui waar die vesels van die spoel aan die chromosoom vasheg. Die posisie van die sentromeer mag mediaan, submediaan of subterminaal wees, en sulke chromosome word dan metasentries, submetasentries en telosentries genoem. Die mediane sentromeer verdeel die chromosoom in twee enere helftes, terwyl die submedian sentromeer die chromosoom verdeel in twee gedeeltes wat verskillend in lengte is en wat bekend staan as die kortarms en langarms. 'n Sekondêre konstrikasie mag op beide arms voorkom, die bekendste waarvan dié is wat aanleiding gee tot die vorming van 'n satelliet of traband. 'n Satelliet kan gedefinieer word as 'n knopvormige terminale gedeelte van die arm van 'n chromosoom wat van die res geskei word deur 'n dun steeltjie, wat dan verteenwoordigend van die sekondêre konstrikasie is. Die grootte van die chromosoom, posisie van die sentromeer en die aan- of afwesigheid van sekondêre konstrikasies speel 'n belangrike rol in die identifikasie van menslike chromosome en die bepaling van die teenwoordigheid of afwesigheid van abnormaliteite⁽²⁴⁾.



Figuur 2: 'n Skematiese voorstelling van metafase chromosome.

Die nukleolus-organiseerders word by die mens meesal gevind in die omtrek van hierdie satelliete⁽²⁴⁾. Sekere bewyse bestaan wat daarop dui dat elk van die chromosome met satelliete in staat is om 'n nukleolus in die interfase-kern te produseer. Hierdie nukleolus neig om met die ander te versmelt om sodoende een groot nukleolus te vorm. Gedurende hierdie stadium is die arms van die chromosome wat die nukleolus vorm, baie uitgerek.



Figuur 3: Nukleolusvorming.

Gedurende die deling wat daarop volg, verdwyn die nukleolus en die chromosome skei van mekaar. Die uitgerekte nukleolus-organiserende gebiede van die chromosome verkort, sodat hulle gedurende metafase as sekondêre konstriksie waargeneem kan word. Hierdie nukleolus-organiseerder staan ook bekend as die primêre organiseerder en is dus die voorloper

van die nukleolus. Dit skyn asof die lank uitgerekte akrosentriese chromosome gedurende interfase meer sensitief ten opsigte van beskadiging is, wat dan aanleiding gee tot chromosomale breuke. Hul noue kontak met mekaar gedurende hierdie periode verhoog die moontlikheid van translokasie tussen gebreekte eindes.

Ondersoeke wat met fase-kontrasmikroskopie gedoen is, het aan die lig gebring dat die menslike metafase-chromosoom 'n spiraalvormige struktuur het^(24, 25, 26, 27). Elke chromatied bestaan uit twee primêre onderafdelings, wat bekend staan as chromonemata of half-chromatiede, wat op hul beurt uit twee sekondêre subeenhede, die kwart-chromatiede bestaan. Laasgenoemde is in vier tersiêre subeenhede verdeel. Hierdie strukturele rangskikking kan onder die ligmikroskoop waargeneem word na behandeling vandie chromosome met 0,01 M KCl, wat 'n despiralisasie en dissosiasie van die chromosome tot gevolg het⁽²⁵⁾.

Oor die jare heen is heelwat argumente aangevoer om te probeer aantoon of chromosome uit 'n enkel-ketting D.N.A. of uit veelvoudige kettings bestaan. Tot dusver kon nog geen definitiewe uitsluitsel oor hierdie onderwerp gegee word nie. Trosko en Wolff (1965) het aangevoer dat chromosome uit veelvoudige kettings bestaan na aanleiding van navorsing gedoen op wortelpunte van Vicia faba⁽²⁶⁾. Dieselfde bevinding is deur Maguire (1966) by die chromosome van Zea mays verkry. Daar moet egter in gedagte gehou word dat aangesien die maksimale resolusie van 'n ligmikroskoop 0,2 tot 0,3 μ s is,

dit onmoontlik is om hiervolgens tussen veelvoudige kettings en 'n baie lang gevoude ketting van minder as $0,2 \mu$ in breedte, te onderskei. Dit het Taylor (1966)⁽²⁵⁾ die bewering laat maak dat daar geen regverdiging bestaan vir die gevolgtrekkings van Trosko, Wolff en Maguire nie.

Chromosome besit spesifieke kleurreaksies, d.w.s. verskillende dele van die chromosoom reageer verskillend op kleurings, wat verdere onderskeid tussen hul moontlik maak.

Euchromatien is daardie gedeelte van die chromosoom wat geen variasie in kleuringsreaksie toon nie, in teenstelling met heterochromatien wat donker of lig kleur. Die donkergekleurde deel van die heterochromatiese area word na verwys as positief heteropiknoties, terwyl die ligter gekleurde gedeelte bekend staan as negatief heteropiknoties. Dit wil voorkom asof heterochromatien 'n beperkte aantal aktiewe gene besit in teenstelling met die onaktiewe euchromatien. Die heterochromatiese area word waarskynlik gevorm deur kondensasie en spiralisering van chromonemata. So 'n area is laat repliserend⁽²⁴⁾.

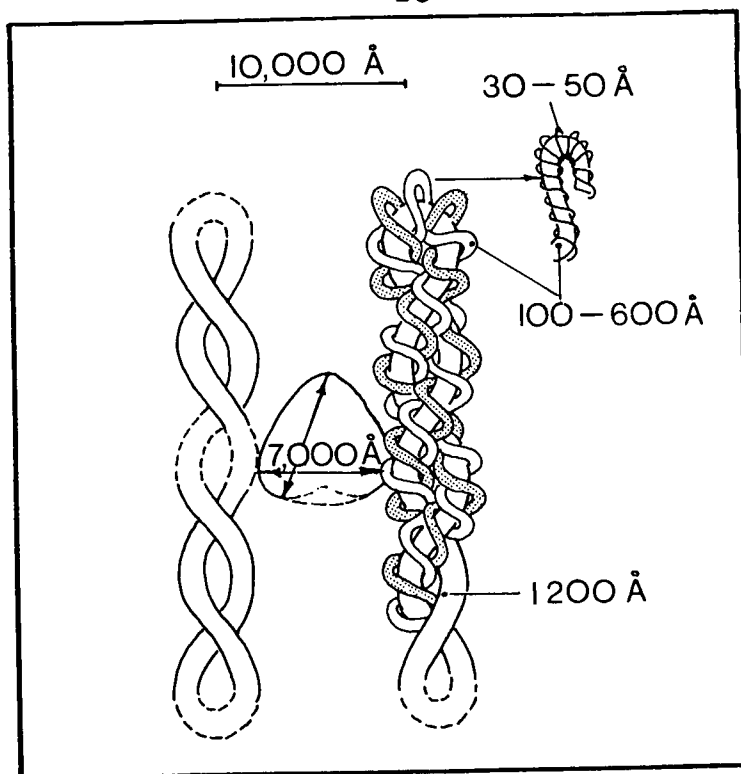
'n Belangrike kenmerk van die eindpunte van chromosome, is dat hul nie aanmekaar vasheg nie. Wanneer die ente egter breek, neig sulke chromosome om onstabiel tydens seldeling te wees as gevolg waarvan hegting van die gebreekte eindes aan susterchromatiede plaasvind. 'n Afgebreekte stukkie van 'n chromosoom kan slegs aan 'n ander gebreekte chromosoom vasheg. Dit skyn asof die eindpunte van die chromo-

some, bekend as telomere, 'n belangrike funksie in hierdie verband uitoefen.

Die ligmikroskoop kon geen fyner detail as hierbo genoem, aan die lig bring nie. Die logiese gevolg was dus dat die elektronmikroskoop ingespan is. Osgood et al (1964)^(24, 28) het voorgestel dat elk van die vier tersiêre subeenhede bestaan uit 'n dubbelketting spiraalvormige D.N.A., waaraan R.N.A. en histone geheg is. Hoskins (1965)⁽²⁸⁾ vind in sy ondersoek op Chang-lewerselle dat die sentromeer 'n kwasi-driehoekige struktuur is met 'n maksimum breedte van 700 nm. Soms mag die sentromeer ook hartvormig wees gedurende die vroeë stadia van seldeling.

Vanaf die gebied van die sentromeer strek daar oor die lengte van elke chromatied 'n lang filament van ongeveer 120 nm dikte en klein elektrondigtheid. By die telomeer buig hierdie filament terug op homself om weer oor die lengte van die chromatied te strek, op so 'n manier dat dit blyk asof daar twee filamente teenwoordig is wat op 'n losse manier om mekaar gedraai is⁽²⁸⁾.

Rondom elk van hierdie segmente van 120 nm kom ander filamente voor wat in dikte tussen 10 nm en 60 nm wissel. Hierdie filamente het 'n gemiddelde elektrondigtheid en ten minste sommige van hierdie filamente word op hul beurt weer omring deur filamente van 3 tot 5 nm in dikte met 'n baie hoë elektrondigtheid.



Figuur 4: Skematiese voorstelling van die algemene morfologie van 'n metafase chromosoom.

Sekondêre konstrikies en satelliete is ook deur Hoskins onder die elektronmikroskoop waargeneem, maar hy lewer geen kommentaar oor hul moontlike morfologie nie. Al bogenoemde resultate is verkry op chromosome wat gefikseer en/of gedroog is in asynsuur, etanol, metanol, formaldehyd, gluteraldehyd, chroomtrioksied, lanthanumnitraat, kaliummolibdaat en fosfor-tungstensuur. Die outeur wys daarop dat chromosome wat met 'n hipotoniese oplossing behandel is en daarna met asynsuur gefikseer is, nie hierdie strukturele eenhede van die sentro= meer aantoon nie.

Yu (1971)⁽³⁰⁾ het chromosome onder die elektronmikroskoop ondersoek na bestraling met 500 R X-strale. Hy vind dat veral by chromosome 1 en 2, 'n growwe oppervlak teenwoordig is wat bestaan uit verskeie longitudinale kettings, wat waarskynlik

die chromonemata verteenwoordig. Hierdie growwe oppervlaktes van sekere chromosome maak soms kralevormige uitstulps na natriumsitraat behandeling. Deur gebruik te maak van 'n 0,017 M natriumsitraat oplossing, kan die kralevormige materiaal verwyder word, waarna fyn filamente sigbaar word. Om hierdie kralevormige materiaal te identifiseer, is chromosome met orceïen gekleur. Onder die ligmikroskoop word dan die buitelyne van die D.N.A.-gekleurde chromosoom waargeneem met 'n ongekleurde area tussen susterchromatiede. Onder die elektronmikroskoop egter kon geen gaping tussen die susterchromatiede waargeneem word nie. Dit dui dus daarop dat die oppervlaksmateriaal nie D.N.A. bevat nie, terwyl die gaping tussen susterchromatiede met dieselfde materiaal gevul is. Die aanduiding is dat dit nukleo-proteïne is, aangesien dit bekend is dat daar 'n noue assosiasie tussen nukleoproteïne en metafase chromosome bestaan. Die filamente is waarskynlik verteenwoordigend van D.N.A. spirale, wat as die "ruggraat" van die chromosoom optree, wat dan bedek word met proteïne. Die teenwoordigheid van kettings in die chromosome is steeds geen bewys dat chromosome nie uit enkel-kettinge kan bestaan nie.

Yu het die beskikbare gegewens gebruik om die aard van 'n X-straal geïnduseerde chromosoomgaping te probeer bepaal en gevind dat die gaping soos onder die ligmikroskoop waargeneem eg mag wees, maar nie noodwendig volledig nie. Hy het twee chromatiedbreuke waargeneem, die een waarvan beperk was tot 'n halfchromatied. Die ander gaping het oor

die hele breedte van die chromatied gestrek, maar die twee segmente was nog steeds aanmekaar geheg deur 'n enkele filament. Die afleiding wat hieruit gemaak kan word, is dat 'n eenmalige ionisasie nie genoegsaam is om die hele chromatied te breek nie, met die voorbehoud dat gedeeltelike herstel nie intussen plaasgevind het nie. 'n Ongedefinieerde gaping bly egter verteenwoordigend van 'n egte breuk.

Wat die chemiese samestelling betref, noem Evans (1973)⁽²⁹⁾ vyf verskillende tipes komponente wat uit soogdierchromatien geïsoleer is nl. D.N.A., R.N.A., histone en nie-histone proteïne; en lipiede. Die lipiede is waarskynlik afkomstig van die kernmembraan, sodat vier hoof tipes materiaal in die chromosome self voorkom. Die nie-histone proteïne is 'n swak afgebakende groep en mag strukturele en weefsel-spesifieke proteïne en polimerases insluit. Soortgelyke onkunde heers ook oor "chromosomale" R.N.A., 'n tipe R.N.A. wat geassosieer word met histone, maar tog 'n duidelike verskil toon van ander tipes R.N.A. wat met die chromosoom in verband staan. Die D.N.A. en geassosieerde histone proteïne maak verreweg die grootste gedeelte van die chromosoommateriaal uit en is teenwoordig in ongeveer 'n 1:1 verhouding.

Die histone bestaan uit vyf redelik duidelike gedefinieerde fraksies, bestaande uit relatiewe kort molekules. Verwydering van hierdie fraksies uit die metafase chromosoom deur verdunde sure, verander nie die algemene struktuur van die chromosoom nie. Histone het desnieteenstaande 'n noue ver-

band met D.N.A. en daar is voorgestel dat hul meer basiese gebiede in die groot groef van D.N.A.-spiraal gesetel is, sodat hul om die D.N.A.-spiraal strek.

Die D.N.A.-spiraal met sy geassosieerde proteïne het 'n deursnee van ongeveer 3 nanometer. Dit word algemeen aanvaar dat die 10 nm en 25 nm chromatienvesels soos onder die elektronmikroskoop waargeneem, die gevolg is van die interaksie van histone om 'n skynverhoging in spiralisasie van D.N.A. te gee⁽³⁴⁾. Daar is ook aanduidings dat die twee sisteïenresidue in histone fraksie III, 'n belangrike rol speel in chromosoomkontrakisie gedurende mitose deur die vorming van S-S bindings.

'n Menslike diploïede somatiese sel bevat gedurende metafase ongeveer 12 μ g D.N.A. in die vorm van 'n dubbelspiraal met 'n lengte van 3,8 meter wat tussen die 23 pare chromosome versprei is. Die gemiddelde chromatied bevat dus D.N.A. met 'n lengte van 4 sentimeters. Aangesien die lengte van saamgetrekte metafase-chromosome wissel tussen 2 μ m en 8 μ m, is die chromatied in terme van lengte, 10^4 keer korter as die lengte van die D.N.A. wat dit bevat. Uit outoradiografiese studies wat op D.N.A.-filamente van tot 2 cm lengte gedoen is, wil dit voorkom asof die D.N.A. in 'n chromatied bestaan uit 'n enkele molekule met baie voue.

1.2.2 Tipes Aberrasies verkry deur Ioniserende Strale

1.2.2.1 Chromosoomaberrasies

Chromosomale aberrasies, d.w.s. aberrasies waarin beide chro=

matiede van 'n chromosoom gebreek of uitgeruil word by die= selfde lokus en op dieselfde manier, is die beste by die mens bestudeer. Breking van die chromosome mag gevolg word deur 'n abnormale hegting van die gebreekte ente binne die= selfde chromosoom (intraruil), of tussen verskillende chromosome (interruil). Studies op die metafases van somatiese selle het aan die lig gebring dat sewe verskillende tipes chromosomale aberrasies onderskei kan word^(1, 31):

Normaal	Terminale delesie	Koldelesie	Sentriese ring en frag	Asentriese ring	Perisentriese inversie
Normaal	Disentriese en fragment		Simmetriese interrui		

Figuur 5: Chromosoom-tipe aberrasies wat in metafase onderskei kan word.

(i) Terminale delesies is gepaarde asentriese fragmente wat skyn asof hul die gevolg is van 'n enkele breuk dwars= oor die chromosoom en wat nie in verband staan met 'n uit= ruilingsaberrasie soos 'n ring of interrui nie.

(ii) Interstisiële, isodiametriese of koldelesies is gepaarde asentriese fragmente, heelwat kleiner in grootte as terminale delesies, met die voorkoms van gepaarde kolletjies chromatien. Hierdie delesies is gewoonlik nie terminaal nie,

maar interkalêr van aard en is die gevolg van twee nabyme=kaar geleë dwarsbreuke oor die chromosoom.

(iii) Asentriese ringe is die gevolg van twee dwarsbreuke en 'n uitruil binne die chromosoom. Die lineêre afstand tussen die twee breuke is groter as in die geval van koldelesies, sodat die uitgeslote paar fragmente groter en ringvormig is. Die onderskeid tussen koldelesies en ringe is dikwels arbitrêr, aangesien dit suiwer gebasseer is op die grootte van die interstisiële area wat betrokke is by die delesie.

(iv) Sentriese ringe is ringvormige chromosome wat die gevolg is van twee breuke aan weerskante van die sentromeer. Die sentriese ringaberrasie word onderskei van die asentriese ring deurdat hy wel 'n sentromeer besit, asook die teenwoordigheid van een paar (selde twee paar) asentriese fragmente in sy onmiddellike omgewing.

(v) Perisentriese inversies ontstaan deur twee breuke weerskante van die sentromeer, gevolg deur 'n inversie van die sentromeriese segment, waarna dit weer in die chromosoom geïnkorporeer word. Indien die twee breuke of uitruilingspunte nie ewe ver van die sentromeer is nie, het dit 'n verskuiwing van die posisie van die sentromeer tot gevolg, wat maklik waargeneem kan word. In die meeste gevalle egter is die verskil in afstand van die uitruilingspunte vanaf die sentromeer so gering, dat dit nie in mitotiese selle waargeneem kan word nie, maar slegs in meïose nadat chromosoom=

paring plaasgevind het.

Parasentriese inversies, waar beide uitruilingspunte aan dieselfde kant van die sentromeer geleë is, kan slegs tydens meïose waargeneem word.

By tipes (ii) en (v) mag die uitruiling in 'n minderheid gevalle onvolledig wees, dit wil sê slegs twee van die vier eindes betrokke by die uitruiling heg werklik aanme-
kaar. Dit het tot gevolg dat 'n onvolledige parasentriese inversie getel mag word as 'n terminale delesie of 'n ring-chromosoom met twee pare asentriese fragmente.

(vi) Simmetriese interruiel of resiproke translokasies is uitruilingsaberrasies wat ontstaan deur 'n breuk in twee aparte chromosome. Die hegting wat hierop volg vind op so 'n manier plaas dat daar 'n uitruiling of translokasie van die distale gedeeltes tussen die betrokke twee chromosome plaasvind. Die aberrasies word as simmetries beskryf omdat hul nie die vorming van 'n disentriese struktuur tot gevolg het nie. Soms mag die uitruiling onvolledig wees, waarna 'n asentriese fragment ontstaan. Daar word soms na simmetriese interruiel tussen twee akrosentriese chromosome verwys as sentriese versmeltingstipe translokasies. Hul ontstaan deur die translokasie van volledige chromosoomarms, terwyl die gebied van uitruil in die omgewing van die sentromere van die betrokke twee chromosome geleë is.

(vii) Asimmetriese interrui, waaronder disentriese en meer komplekse polisentriese aberrasies geklassifiseer word, is uitruilingsaberrasies wat ontstaan deurdat breuke in elk van twee of meer chromosome plaasvind, gevolg deur 'n hegting tussen die proksimale gedeeltes van die betrokke chromosome. Afhangende van die hoeveelheid chromosome betrokke, ontstaan disentriese of polisentriese strukture, met 'n geassosieerde asentriese paar fragmente, (selde twee paar).

Soos hierbo genoem, lei onvolledige hegting na uitruiling tot 'n verhoogde voorkoms van vry fragmente. Daar moet egter onthou word dat die fragmente wat gepaard gaan met uitruilingsaberrasies soos in die geval van 'n disentriese en sentriese ring, deel vorm van die uitruilingsaberrasie en nie getel word as 'n aparte fragment soos in die geval van 'n terminale delesie nie. Die teenwoordigheid van disentriese of sentriese ringstrukture sonder 'n gepaardgaande fragment, is 'n feitlik sekere bewys dat die betrokke sel deur ten minste een mitotiese deling gegaan het na bestraling en voor waarneming.

Daar is ook melding gemaak van die probleme wat mag ontstaan in die bepaling van perisentriese inversies en simmetriese interruiings in somatiese selle, sodat al sewe die chromosoomtipe aberrasies nie met ewe veel sekerheid bepaal kan word nie. Veral by die menslike chromosoomkomplement waar verskeie chromosome arms het wat amper ewe lank is, mag dit dikwels gebeur dat simmetriese uitruilings nie

waargeneem kan word nie. Hierdie oneffektiwiteit geld nie vir chromatied-aberrasies nie. Susterchromatiede is gewoonlik naby mekaar geleë, wat dit moontlik maak om asimmetriese en simmetriese aberrasies ewe maklik waar te neem.

Die effektiwiteit in die bepaling van simmetriese aberrasies in menslike chromosome is nie meer as 20% nie. Dit is as gevolg van die feit dat alhoewel die frekwensie van disentriese plus sentriese ringaberrasies dieselfde moet wees as dié van resiproke translokasies plus perisentriese inversies, dit eksperimenteel gevind is dat die frekwensie van disentriese en ringchromosome vyf keer meer is as vir abnormale monosentriese chromosome. Soortgelyk sou ons ook gelyke frekwensies verwag vir die asentriese ring-plus isodiametriese aberrasies aan die een kant en parasentriese inversies aan die ander kant. Soos reeds genoem, kan parasentriese inversies nie in mitotiese selle waargeneem word nie.

Volgens bogenoemde redes word die klassifikasie van chromosomale aberrasies beperk tot terminale delesies, koldelesies, asentriese ringe, sentriese ringe en disentriese of polisentriese chromosome. Wanneer die frekwensie van chromosoom-aberrasies gebruik word as aanduiding van die grootte van die dosis geabsorbeer, is dit noodsaaklik dat klassifikasie volgens hierdie vyf kategorieë geskied.

'n Ander faktor wat in gedagte gehou moet word, is dat fragmente sonder 'n sentromeer neig om gedurende mitose verlore te raak omdat hul staties bly en neig om uit die twee dogterselle gesluit te word. Afhangende van die belangrikheid van die weggelate genetiese materiaal vir die nuutgevormde sel, sal die sel na die eerste mitose afsterf, of bly voortbestaan met 'n beperkte oorlewingspotensiaal. Oor die algemeen gesproke kan ons dus sê dat die meeste van die asimmetriese aberrasies 'n korttermyn ramp is in die sin dat selle wat draers van sulke aberrasies is, 'n verkorte lewensverwagting het.

In teenstelling hiermee lei simmetriese aberrasies slegs tot 'n herrangskikking van genetiese materiaal binne dieselfde chromosoom of tussen verskillende chromosome van dieselfde komplement, sodat daar nie sprake is van 'n verlies van enige materiaal nie. Selle wat draers van sulke aberrasies is, sal dus geen meganiese probleme hê om 'n mitotiese siklus te voltooi nie en mag heeltemal lewensvatbaar wees. Dit sal egter nie tydens meïose geld nie, want dan mag ongebalanseerde gamete ontstaan wat geheel en al onvatbaar vir oorlewing mag wees. Daar moet dus in gedagte gehou word dat die meriete waarvolgens aberrasies bepaal word, nie gebaseer is op hul spesifieke biologiese belangrikheid nie.

In die afgelope aantal jare is 'n addisionele en meer algemene tipe klassifikasiesisteen ontwikkel wat veral toegepas word by kulture wat oor langer periodes strek^(31, 35). Hierdie klassifikasie lê klem op dié selle wat die aberra-

sies bevat en die seltipes wat onderskei kan word op grond van tipes aberrasies wat in hul voorkom, soos hieronder uiteengesit:

Tipe A selle besit geen bewyse van struktureel abnormale selle nie. Hul mag verdeel word in modale A selle wat oënskynlik normale diploiëde selle is, en nie modale A selle wat eneuploiëd is, d.w.s. wat meer of minder chromosome as die normale diploiëde getal besit.

Tipe B selle sluit twee tipes selle in, naamlik dié wat chromatied- of isochromatiedgapings besit, d.w.s. die chromatiede is nog intakte, en dié wat chromatiedbreuke, oftewel chromatied-terminale delesies bevat.

Tipe C selle bevat chromosoom-tipe-aberrasies, wat op hul beurt weer onderverdeel word in C_u en C_s selle. C_u selle bevat asimmetriese of onvolledige simmetriese aberrasies, terwyl C_s bestaan uit stabiele aberrasies, byvoorbeeld volledige simmetriese aberrasies.

Daar kan egter geen twyfel bestaan nie dat die maksimum informasie uit die eerste klassifikasiesisteen verkry word; waar aberrasies geklassifiseer word op grond van hul gedetailleerde struktuur.

1.2.2.2 Chromatied-Aberrasies

Chromatied-aberrasies ontstaan deur skade veroorsaak gedurende of net na verdeling van chromosome en replikasie in die laat G_1 en S periodes van die selsiklus⁽³¹⁾. In die geval van onverdeelde G chromosome, sal enige stralingsskade wat behoue bly, op sigself gerepliseer word wanneer seldeling voortgaan na S, sodat die hele chromosoom (beide chromatiede) betrokke is in 'n chromosoom-tipe aberrasie, dit wil sê beide susterchromatiede word identies by dieselfde loki geaffekteer.

Chromatied-aberrasies word dus in selle geïnduseer wat bestraal word tydens die D.N.A. sintese (S) en post- D.N.A. sintese (G_2) periodes van interfase. Hierdie aberrasies kan ook spontaan ontstaan as gevolg van repliseringsfoute. Chromatied-aberrasies kan ook maklik in vivo en in vitro geïnduseer word deur 'n verskeidenheid van chemiese substansie en sekere virusinfeksies^(32, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43). 'n Belangrike kenmerk van virusse, alkilerende agense en die meeste van die ander chemiese mutagense, is dat slegs chromatied-aberrasies in die eerste mitose na behandeling gevind word. Aberrasies gevorm deur hierdie agense is waarskynlik die gevolg van wanreplikasie, sodat aberrasies nie direk gevorm word wanneer selle in die G_1 of interfase blootgestel word nie, omdat dit gewoonlik aanleiding gee tot chromosomale aberrasies. Geen verskil in die tipe chromatied-aberrasies kom voor as gevolg van bogenoemde faktore nie.

By chromatied-aberrasies is die eenheid van aberrasies die

chromatied, en aangesien susterchromatiedes in pare naby mekaar lê tydens mitose, toon hierdie aberrasies 'n groter verskeidenheid en kan hul makliker tydens mitose waargeneem word as chromosoom-aberrasies.

Die verskillende tipes aberrasies wat mag voorkom, is kortliks as volg: Terminale delesies, interkalêre delesies, asentriese ringe, isochromatied delesies, duplikasies, inversies, interarm asimmetriese intraruilings (sentriese ringe), interarm simmetriese intraruilings (ekwivalent aan perisentriese inversies), simmetriese of resiproke translokasies en asimmetriese interruilings of disentriese chromatiede. Tesame hiermee kom ook chromatiedgapings voor, wat onvolledige egte breuke in 'n chromatied verteenwoordig⁽³⁰⁾.

Chromatied-aberrasies en veral chromatied-delesies ontstaan teen 'n variërende frekwensie spontaan in kultuurselle. Hierdie variasie in frekwensie is in alle waarskynlikheid as gevolg van die feit dat selle in kultuur meer as een mitotiese siklus voltooi voordat hul ge-oes word, en aangesien hierdie aberrasies in kultuur ontstaan, verwag ons dus dat die frekwensie sal verhoog namate die kultuurtyd verleng.

Mouriquand et al⁽³¹⁾ het in 'n studie van 1000 leukosiete na 'n kultuurperiode van 72 uur, 'n chromatied-delesie frekwensie van 0,057 per sel gevind, terwyl chromatiedgapings teen 'n frekwensie van 0,077 per sel voorgekom het. In teenstelling hiermee vind Court Brown et al⁽⁸⁹⁾ dat indien kulture na die eerste mitose (48 - 54 uur) gestop word, die frekwen-

sie van chromatied-aberrasies slegs 0,033 per sel is wat 'n goeie aanduiding is van die afhanklikheid van die tydsduur vir die persentasie voorkoms van chromatied-aberrasies.

Aangesien chromatied-aberrasies nie direk deur bestraling in ongestimuleerde leukosiete geïnduseer kan word nie, is hul teenwoordigheid in sulke selle in alle waarskynlikheid die gevolg van sekondêre effekte wat lei tot hul ontstaan in kultuur. Chromatied-aberrasies kan daarenteen wel in vitro deur bestraling veroorsaak word indien bestraling tydens laat interfase plaasvind.

Daar moet in gedagte gehou word dat die simmetriese chromatied intraruilings, waaronder duplikasie en perisentriese inversies tel, asook simmetriese interrui, almal sal lei tot die ontstaan van 'n abnormale monosentriese chromosoom in een (of beide in geval van interrui) van die dogterselle na mitose. Die replisering van hierdie abnormale chromosome sal lei tot die verskyning van "verworwe" simmetriese chromosoom-aberrasies tydens die tweede mitose na induksie. Insgelyks sal asimmetriese chromatied-interruillings en chromatied-fragmente, indien hul in die dogterkerne ingesluit word, lei tot "verworwe" chromosoom-tipe-aberrasies gedurende die tweede mitose. Die waarskynlikheid dat sulke asimmetriese chromatied-aberrasies, bv. 'n disentriese chromatied, oorgedra word na een van die dogterkerne, is 0,5, sodat die helfte van hulle uiteindelik kan lei tot die vorming van "verworwe" chromosoom-aberrasies.

1.2.2.3 Subchromatied-Aberrasies

Dit is uitruillings binne dieselfde chromosoom of tussen chromosome, waarby 'n subeenheid van 'n chromatied betrokke is. Hierdie aberrasies ontstaan spontaan in meiotiese profase-selle, maar baie min is daaroor by die mens bekend^(26, 31). Chromatied-gapings sal volgens die jongste getuienis⁽³⁰⁾ hieronder geklassifiseer kan word.

1.2.2.4 Aneuploiëdie

Verandering in die aantal chromosome per sel, word dikwels veroorsaak deur 'n onvermoë van chromosome om tydens anafase van seldeling na verskillende pole te beweeg. Hierdie entiteit staan bekend as nondisjunksie⁽⁴⁴⁾. Nondisjunksie in 'n eng sin verwys na 'n enkele chromosoompaar wat nie aan die end van metafase van mekaar skei nie en na dieselfde pool beweeg, of waar die een lid van die paar te stadig beweeg, of glad nie beweeg nie, en sodoende uit beide dogterselle gesluit word deurdat dit op die metafaseplaat agterbly (anafasevertraging). Die vorming van veelvoudige pole mag ook verantwoordelik wees vir 'n verandering in die verspreiding van genetiese materiaal tussen selle⁽⁴⁵⁾.

Aneuploiëdie word dus gekenmerk deur 'n verandering in die aantal chromosome per sel. Die aantal chromosome teenwoordig, is nooit 'n presiese veelvoud van die haploiëde (n)

stel nie. Wanneer een of meer chromosome ontbreek, staan dit bekend as hipodiploïed, terwyl ons van 'n hiperdiploïede aantal chromosome praat wanneer een of meer ekstra teenwoordig is.

Hipodiploïede selle kom meer dikwels in normale selle voor as hiperdiploïede selle en is waarskynlik die gevolg van die hipotoniese behandeling voor fiksering, d.w.s. die sel bars en een of meer chromosome gaan verlore deur oormatige verspreiding.

Sitogenetiese studies in menslike bevolkings het aangetoon dat aneuploïëdie meer dikwels by vroue as mans voorkom. Die voorkoms van aneuploïëdie by vroulike persone is waarskynlik as gevolg van die verlies van die onaktiewe X-chromosoom, terwyl dit by mans die gevolg is van 'n Y-chromosoom verlies⁽³¹⁾. Aneuploïëdie neem toe met ouderdom. By pasgebore babas is die voorkoms 3 persent, by volwasse vroue 13 persent en 7 persent by mans⁽⁴⁷⁾. Die insidensie van aneuploïëdie in enige gegewe kultuur neem ook toe hoe langer die kultuurtyd duur, d.w.s. toename in die aantal mitotiese delings wat in vitro plaasvind.

Waar leukosiete bestraal is en vir 72 uur in kultuur gehou is, het aneuploïëdie toegeneem namate die dosis toegeneem het. Daar moet egter onthou word dat selle wat na 72 uur geroes word, alreeds in hul tweede of derde mitotiese delings=

fase is, sodat hier nie net van die invloed van bestraling gepraat kan word nie⁽⁴⁸⁾.

Die teenwoordigheid van struktureel abnormale chromosome na bestraling sal heel dikwels lei tot chromosoomverlies wanneer so 'n chromosoom nie die meganiese probleme van sel=deling kan oorbrug nie.

Uit bogenoemde gegewens blyk dit duidelik te wees dat aneu=ploiëdie nie as 'n kwantitatiewe aanduiding van geabsorbeer=de stralingsdosis kan dien nie.

1.2.2.5 Poliploiëdie

Die teenwoordigheid van een of meer volledige stelle haploiëde chromosome ekstra, staan bekend as ploiëdie. Die voorvoegsel dui die aantal stelle aan. Die $3n$ -sigoot bevattende 69 chromo=some staan dan bekend as triploiëd, terwyl die versmelting van twee diploiëde ($2n$) selle, aanleiding sal gee tot die ontstaan van 'n tetraploiëde ($4n$) sel met 92 chromosome.

Selle word op dieselfde manier deur bestraling geaffekteer ten opsigte van die vorming van poliploiëde selle as by aneuploiëdie. Geen verhoging in die frekwensie word na in vitro bestraling verkry indien die kultuur na 48 tot 54 uur gestop word nie, terwyl daar 'n kwantitatiewe verhouding tus=sen poliploiëdie en stralingsdosis bestaan vir kulture wat na 72 tot 96 uur ge-oes word. Die frekwensie van aberrasies in poliploiëde selle na bestraling is egter baie verhoog,

veral met betrekking tot disentriese chromosome en sentriese ringe. Hierdie aberrasies kom dan gewoonlik ook in pare voor. So het Ishihara en Kumatori⁽³¹⁾ na 'n kultuurperiode van 96 uur en 'n dosis van 350 R, gevind dat al die poliploiëde selle gepaarde aberrasies besit het, terwyl slegs 33 persent van die diploiëde selle enige tipe aberrasie besit het. Dit dui daarop dat poliploiëdie grootliks die gevolg van die teenwoordigheid van chromosomale aberrasies is. Asimmetriese aberrasies sal 'n stremming plaas op die skeiding van susterchromatiede tydens mitose, met die gevolg dat die ineengestrengelde chromosome en chromosoombrûe nie normaal van mekaar sal skei tydens anafase nie.

Poliploiëdie is dus 'n sekondêre verskynsel waarvan die insidensie sal afhang van die toegediende dosis en die aantal mitotiese siklusse wat die sel voltooi het.

1.2.2.6 Endoreduplikasie

Dit is die proses van chromosomale replikasie wat, indien dit nie gevolg word deur mitose nie, lei tot poliploiëdie⁽⁴⁶⁾.

Endoreduplikasie word soms gevind in onbehandelde limfosietkulture, en die vorming daarvan mag aangehelp word deur spoelonderdrukkers soos colcemid. Geen verhouding bestaan tussen die persentasie voorkoms van endoreduplikasie en die grootte van die toegediende dosis X-strale nie⁽³¹⁾. Hierdie verskynsel word baie selde waargeneem.

1.2.3 Aberrasies In Vivo

Navorsing aangaande die effek van bestraling in vivo het om verskeie redes momentum verkry. Van die eerste persone wat navorsing op hierdie gebied gedoen het, was Bender en Gooch (1962)^(35, 36, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54). Ander persone wie se name prominent in die literatuur verskyn aan die beginjare, is dié van Norman, Ottoman, Sasaki en Veomett (1964)^(52, 54), Nowell en Hungerford (1964)⁽⁵¹⁾, Norman (1967)⁽⁵⁴⁾, Evans (1967)⁽⁵⁴⁾. Hierdie persone was veral geïnteresseerd in die bepaling van die geabsorbeerde dosis na toevallige bestraling. Omdat vroeër heelwat navorsing gedoen is met plante en diere as eksperimentele materiaal (36, 51, 55), is daar gepoog om meer kennis op te doen aangaande die effek van bestraling op die mens, hetsy toeval- lig of terapeuties, asook om die resultate van in vivo en in vitro bestraling te vergelyk. Noodwendig het sulke ondersoeke baie bygedra om die effek van die verskeie tipes bestraling in terme van stralingsskade veroorsaak, te bepaal, asook die moontlike gevolge vir die bestraalde persoon en sy nageslag.

Soos reeds genoem, moet die aberrasies wat in ag geneem word by die bepaling van die stralingseffek op chromosome sowel as chromatiede, beperk word tot terminale delesies, koldelesies, asentriese ringe, sentriese ringe en disentriese of polisentriese chromosome en chromatiede. Indien 'n evaluering gemaak word van die vroeëre werk wat gedoen is op die gebied van in vivo bestraling, moet baie van die verkrygte resultate met versigtigheid behandel word. Faktore wat veral

hiervoor verantwoordelik is, is die verskille in kultuur= tegnieke wat deur die onderskeie laboratoria gebruik is, die tydsverloop vanaf bestraling totdat chromosoomonder= soeke gedoen is, die tipes aberrasies wat gebruik is om sekere afleidings te maak en toestande tydens bestraling.

Fliedner et al (1959)⁽⁷⁷⁾ het persone ondersoek wat per ongeluk blootgestel is aan gemengde neutron- en gamma= strale. Hy het beenmurgselle ondersoek met behulp van die papdrukmetode. Geen melding word gemaak van die grootte van die oppervlak van bestraling nie. Hy het veral onder= soek ingestel na die klewerigheid wat gebreekte chromosoom= punte vertoon, klompering van chromosome en brugvorming ty= dens anafase.

Tough et al (1960)⁽⁴⁹⁾, het die chromosome van twee manlike pasiënte ondersoek na X-straal-behandeling vir ankilerende spondilose. Hulle gebruik die kultuurmetode van Hungerford et al⁽⁷⁶⁾, wat basies dieselfde is as dié van Moorhead. In die bepaling van die ploiëdie van selle, word fragmente as ekstra chromosome getel, wat volgens huidige standarde foutief is. Die eerste pasiënt het 'n totale veldosis van 1500 rads X= strale ontvang, versprei oor tien gelyke toedienings, terwyl die tweede pasiënt 'n enkele dosis van 250 rads ontvang het. Bloedmonsters is voor en na elke dosis geneem. In die geval van die eerste pasiënt word 'n groot aantal numeries-abnor= male selle, en selle met strukturele chromosoom-abnormaliteite gevind. Dieselfde verskynsel kom voor by die pasiënt wat 'n

enkeldosis X-strale ontvang het. Daar word gevind dat 21 persent van die selle 47 chromosome bevat het, teenoor 1 persent voor bestraling. Geen poging is aangewend om tussen die verskillende chromosomale abnormaliteite te onderskei nie.

Bender en Gooch (1962)⁽³⁶⁾ het die aantal brekings per sel per roentgen in menslike leukosiete bepaal onder in vivo en in vitro toestande. Hul vind 'n gemiddelde van 0,00352 brekings/sel/roentgen.

Migeon en Merz (1964)⁽³²⁾ het die relatiewe in vivo sensitiviteit van chromosome by babas ten opsigte van diagnostiese X-strale ondersoek. Dosisse het tussen 2 en 20R gewissel. Moorhead se tegniek is as kultuurmetode gebruik, met 'n kultuurperiode van 48 uur, maar geen melding word gemaak van die tydsverloop vanaf bestraling totdat bloed getrek is nie. Die mees algemene aberrasies wat gevind word, is chromatied-delesies. Onder die kontrolegroep babas het die frekwensie van chromatied-aberrasies tussen 1,6 en 8 persent gewissel, terwyl daar by die volwasse kontroles tussen 10,2 en 17,9% teenwoordig was. Daar was dus 'n toename in frekwensie met ouderdom onder kontroles. Daarenteen is 'n gemiddelde van 29,8% chromatied-aberrasies gevind by babas wat 'n dosis van 20R ontvang het en 7,9% by dosisse van 2 tot 4 uur. Die ouderdomme van die blootgestelde babas het tussen 13 dae en 5 weke gewissel, terwyl die kontrolegroep babas se ouderdomme tussen 1 en 5 dae gewissel het.

Geen toename in frekwensie was teenwoordig met betrekking tot die ouderdom van die blootgestelde babas nie. Daar moet egter onthou word dat die ouderdomsvariasie onder hulle heelwat kleiner was as onder die kontrolegroep. Migeon en Merz wys daarop dat die hoë voorkoms van chromosomale-delesies in teenstelling is met wat verwag word as in ag geneem word dat sirkulerende limfositete in G_1 verkeer, 'n stadium in die selsiklus waar bestraling gewoonlik chromosoom-aberrasies tot gevolg het. Hulle beskou dus die delelesies as artefakte.

Nowell, Hungerford en Cole (1964)⁽⁵¹⁾, in hul ondersoek op leukemiepatiënte, wys daarop dat persone wat aan groot dosisse bestraling blootgestel is, jare daarna nog steeds stabiele chromosomale abnormaliteite in hul hematopoïëtiese weefsel bevat. In 'n nie-leukemiese pasiënt wat met P^{32} behandel is vir die miëloproliferatiewe sindroom, vind hul 'n konstante chromosomale abnormaliteit in alle ondersoekte beenmurgselle vyf jaar na bestraling. Die abnormaliteit teenwoordig, was 'n deleisie van die langarm van 'n D-groep chromosoom. Wat hier in gedagte gehou moet word, is dat Nowell et al 'n direkte kultuur gebruik het in die ondersoek van beenmurgselle. Die selle is dus hoogstens 3 tot 5 uur in kultuur, sodat die abnormaliteite gevind, nie in vitro kon ontstaan het nie. Hul voer ook die uitkenning van aberrasies 'n stappie verder deur die presiese abnormaliteite teenwoordig in bogenoemde geval, uit te ken.

Nowell et al vind dat disentriese chromosome, ringchromosome en asentriese fragmente steeds teenwoordig is in die perifere bloed van nie-leukemiese sowel as leukemie pasiënte jare na bestraling plaasgevind het. Nowell wys daarop dat aangesien limfosiete nie deling ondergaan in vivo nie, hul vir baie jare in die liggaam mag voortbestaan en wanneer hul dan in vitro gestimuleer word om te deel, hulle die abnormaalteite sal toon.

'n Voorbeeld van 'n lang oorlewingsperiode van limfosiete met chromosoom-aberrasies in nie-leukemie pasiënte, word gevind by pasiënte met ankilerende spondilose na X-straal behandeling. Buckton en Pike (1964)⁽³⁵⁾ vind dat na 'n totale veldosis van 1500 rads wat oor 10 behandelings verdeel is, daar baie lank na bestraling nog steeds abnormaalteite teenwoordig is. Kultuurtye het van 48 tot 96 uur gewissel, terwyl klassifikasie van aberrasies volgens die meer nie-spesifieke sisteem gedoen is, naamlik tipe A, B, C_u en C_s selle. By ankilerende spondilose word daar veral 'n verhoging van C_u en C_s selle na bestraling gevind. Die frekwensie van C_u selle neig om 'n progressiewe daling te toon, maar die frekwensie is sewe jaar na bestraling nog steeds hoër as voor bestraling. Daarenteen bly die aantal C_s selle teenwoordig, relatief onveranderd tot 20 jaar na bestraling.

Die werk van Warren en Meisner (1965)⁽⁴⁷⁾, gee 'n goeie aanduiding van die verskille in frekwensies tussen aberrasies verkry na terapeutiese behandeling van pasiënte met verskeie soorte maligniteite. Limfosietkulture is opge-

stel volgens die tegniek van Moorhead et al, maar geen melding word gemaak van die tydsduur van die kulture nie. Monsters is, waar moontlik, voor sowel as na bestraling geneem. 2 MeV X-strale is in verskillende dosisse toegedien. Die totale dosis ontvang, het gewissel van 100 tot 5500 rads vir pasiënte onder behandeling.

Om die dosisse van die verskillende pasiënte makliker met mekaar te kon vergelyk, is die X-straal dosis vermenigvuldig met die oppervlakte van die bestraalde gebied. 'n Duidelike styging in die persentasie aneuploïëde selle teenwoordig, is 24 uur na toediening van 'n enkeldosis X-strale gevind. Fragmente en disentriese chromosome maak ook op hierdie stadium hul verskyning. Na gelang die behandeling vorder, varieër die aantal aneuploïëde selle met 10 tot 40 persent tussen die onderskeie pasiënte, d.w.s. geen verwantskap bestaan tussen die persentasie aneuploïëde selle en die grootte van die toegediende dosis nie. Daarenteen styg die frekwensies van struktureel abnormale chromosome met toename in dosis. Disentriese chromosome en fragmente word by dosisse so laag as 1,8 rad reeds verkry.

Pasiënte onder behandeling het Ca-long, Ca-blaas, Ca-testis, retikulo-endoteliële sarkoom, limfsarkoom en Ca-mamma gehad, terwyl daar by pasiënte wat twee maande tot 30 jaar na bestraling ondersoek is, afgesien van bogenoemde tipes, ook gevalle voorgekom het van Ca-serviks en Ca-uterus.

In terme van totale toegediende dosis, was die persentasie aneuploïëde selle in die eerste groep die laagste by Ca-mamma en die hoogste by die retikulo-endoteliële sarkoom. Die persentasie voorkoms by Ca-long en Ca-blaas was egter bykans dieselfde as by die retikulo-endoteliële sarkoom. Geen noemenswaardige verskil in die frekwensie van selle met strukturele aberrasies was egter teenwoordig by die verskillende tipes maligniteite nie.

By die tweede groep was die persentasie aneuploïëde selle die laagste by Ca-serviks sestion jaar na bestraling, en die hoogste by Ca-mamma 110 dae na bestraling. Die persentasie strukturele abnormaliteite teenwoordig, het 'n groot afname met verloop van tyd getoon en het gewissel van 46% by Ca-uterus 64 dae na bestraling tot 1% by Ca-serviks 9 dae na bestraling.

Oorlewendes van die atoombom aanvalle op Hiroshima en Nagasaki, maak verreweg die grootste groep mense uit waarop in vitro ondersoeke gedoen is na "toevallige" in vivo bestraling. Navorsing is gekanaliseer in studies op in-utero blootgestelde oorlewendes⁽⁵⁷⁾, kinders wat in die eerste vyf jaar na bestraling gebore is⁽⁵⁶⁾, tipes aberrasies verkry tot agtien jaar na blootstelling⁽⁵³⁾, die risiko vir die ontwikkeling van leukemie⁽⁵⁸⁾, verskille as gevolg van verskil in afstand vanaf die hiposentrum^(58, 59), ens.

Die tipes ioniserende strale waaraan bogenoemde groep mense blootgestel was, was grootliks gammastrale in Nagasaki en

'n mengsel van gammastrale en neutrone in Hiroshima⁽⁵⁸⁾.

In die studie van 38 in-utero blootgestelde kinders, was die moeders aan ten minste 100 rad bestraling blootgestel tydens swangerskap. Bloom et al (1968)⁽⁵⁷⁾ vind dat komplekse abnormaliteite in 0,52% van die selle van hierdie kinders voorkom, terwyl 0,04% in die kontroles teenwoordig was. Nege-en-dertig persent van die in-utero bestraalde kinders het die aberrasies getoon, teenoor 4% van die kontrolegroep. Daar kan dus gesê word dat beide die limfositetvoorlopers en volwasse immunologies-kompetente limfositete, in-utero deur ioniserende strale van die A-bom geaffekteer is.

'n Duidelike styging in die hoeveelheid abnormale selle teenwoordig word gevind met styging in blootgestelde dosis. So byvoorbeeld word 0,37% abnormale selle gevind by dosisse van 100 tot 150 rads, teenoor 0,77% abnormale selle by dosisse van meer as 300 rads. By nadere ondersoek van die verskillende tipes aberrasies is gevind dat twee van die disentriese chromosome en albei ringchromosome wat in die betrokke ondersoek teenwoordig was, fragmente besit het wat daarop dui dat geen deling vanaf vorming van die ring- en disentriese chromosome plaasgevind het nie. Bloom et al wys daarop dat limfositete wat in 'n vroeë stadium van die fetale lewe gevorm word, vir die res van die persoon se lewe in sy liggaam mag bly voortbestaan.

Van Furth et al (1965)⁽⁵⁷⁾ het aangetoon dat die immunoglo-

buliene IgM en IgG, aktief gevorm word na die twintigste week van swangerskap. Die vorming van hierdie globuliere is hoofsaaklik beperk tot die milt, terwyl die hoeveelheid immunofluoresserende selle in die timus baie gering is. Die milt blyk dus 'n belangrike bron van immunologies-bestemde limfosiete gedurende die fetale lewe te wees.

Dit is redelik om aan te neem dat ten minste party van die geaffekteerde selle wat gesien word in persone wat in die tweede en derde trimester bestraal is, tydens blootstelling in die milt teenwoordig was. Dit dui op sy beurt weer daarop dat die milt 'n primêre bron van sitogeneties abnormale limfosiete in bestraalde persone mag wees.

In die studie op kinders waar die swangerskap voor of na blootstelling 'n aanvang geneem het, vind Asa et al (1968)⁽⁵⁶⁾ dat daar geen verhoging in stilgeboortes of neonatale dood voorgekom het nie. Hierdie studie is gedoen op kinders wat in die eerste 5 jaar na die ontploffings gebore is en waar ten minste een ouer aan 100 rad bestraling of meer blootgestel was. Uit die 185 ondersoekte kinders was 182 kariotipes normaal.

Dioda et al (1965)⁽⁵³⁾ wys daarop dat 'n lang oorlewing karakteristiek mag wees vir neutron-bestraling. In hul ondersoek na die tipes aberrasies wat 17 tot 18 jaar na bestraling steeds aanwesig was, vind hulle dat die frekwensie van chromatied-aberrasies dieselfde is as by die kontroles. Indien die verkrygte aberrasies vergelyk word met pasiënte wat terapeutiese

dosisse gammastrale ontvang het, word gevind dat die meer eenvoudige tipes aberrasies soos delesies en translokasies, by oorlewendes voorkom, terwyl die aberrasies teenwoordig by bestraalde pasiënte meer gekompliseerd van aard is. Verder word gevind dat hiperdiploïëde selle meer dikwels by oorlewendes voorkom as hipodiploïëde selle, nl. in die verhouding 112,8 : 100.

Awa et al (1971)⁽⁵⁹⁾, vind dat daar 'n verskil in die frekwensies van stabiele en onstabiele chromosoom-aberrasies tussen die twee stede bestaan, maar dat die rede daarvoor onbekend is. Persone is ondersoek wat aan proksimale bestraling blootgestel was. Die geskatte grootte van die geabsorbeerde dosisse het tussen 100 en 400 rad gewissel. Wat die tipes aberrasies betref, word gevind dat die stabiele tipes soos perisentriese inversies en translokasies meer dikwels aanwesig was.

Die insidensie van leukemie in Hiroshima en Nagasaki is vir die periode 1 Oktober 1950 tot 30 September 1966 deur Ishimaru et al (1971)⁽⁵¹⁾ ondersoek. Hulle kom tot die gevolgtrekking dat daar 'n merkbare verhoging in die voorkoms van leukemie was. In Hiroshima was die insidensie verhoog by persone wat aan selfs minder as 50 rad blootgestel was. Geen aanduiding van die teenwoordigheid van 'n drumpelwaarde vir die aanvang van leukemie met betrekking tot dosis kon egter verkry word nie.

'n RBE van 5 word verkry as neutrone met gammastrale vergelyk word in terme van leukemogenese. Die leukemogeniese

effek van bestraling hang egter af van die ouderdom van die persoon tydens blootstelling sowel as sy geslag, en varieër by die verskillende tipes leukemieë. So is gevind dat die leukemogeniese effek in beide stede groter was in mans as vroue. Dit was veral van toepassing in hoë-dosis gebiede. Wat ouderdom betref, skyn die leukemiese respons laer te wees by persone wat 40 jaar en ouer ten tye van blootstelling was. Tien jaar na blootstelling het die risiko vir alle tipes leukemieë begin daal, veral by persone wat aan 100 rad of meer blootgestel was.

Onder hierdie persone is vier tipes leukemieë gevind, nl. akute granulositiese, akute limfositiese, chroniese granulositiese leukemie en ander akute vorme. Die granulositiese vorm was die mees algemene in beide stede teenwoordig. Akute leukemie het meer dikwels onder jonger persone voorgekom. Wat afstand van die hiposentrum betref, is gevind dat chroniese granulositiese leukemie 'n baie hoër voorkoms getoon het onder persone wat nader as 2500 meter daarvandaan in Hiroshima as Nagasaki was.

Buckton et al (1971)⁽⁵⁴⁾ het aangetoon dat daar duidelike verskille tussen makro- en mikrokulture bestaan in die aberrasie opbrengs wat in vitro verkry word na in vivo bestraling. Dit onderstreep weereens die belangrikheid van uniformiteit in kultuurtegnieke gebruik vir eksperimentele doeleindes. Die twee tegnieke wat gebruik is, was die makrokultuur van Moorhead en die mikrokultuur van Hungerford. Hulle vind dat alhoewel daar geen verskil in frekwensie van disentriese- en ringchromosome tussen die twee kultuurmetodes voorkom nie,

'n hoër opbrengs van totale aantal aberrasies by makrokultuur gevind word. As moontlike verklaring vir hierdie verskynsel, word aangevoer dat die duur van die selsiklus beïnvloed mag word deur die kultuurtegniek wat gebruik word. Buckton wys egter daarop dat ten spyte van die verskille tussen verskillende individue, tussen kultuurtegnieke en die in vivo/vitro respons verskille, chromosoomskade na bestraling steeds 'n gevoelige eenheid van dosisgrootte is.

Skade wat in die menslike kariotiep deur ioniserende strale geïnduseer word, se verspreiding skyn eweredig te wees met die lengte van die individuele chromosome. Dit volg dus dat 'n meer akkurate identifisiemetode vir chromosome, sal lei tot 'n meer akkurate interpretasie van aberrasies verkry na bestraling. Verskeie sulke metodes is sedert 1969⁽⁶¹⁾ ontwikkel, die belangrikste waarvan die fluoressensietegniek⁽⁶¹⁾, G-bande⁽⁶²⁾ en C-bande⁽⁶²⁾ is. Hierdie bande kom in konstante posisies dwars oor die chromosome voor. Die konstante posisies van die bande word waarskynlik bepaal deur die basiese morfologiese spiraliserings van die chromatied, met sekere areas wat ryk is aan adenien-timien verbindings, afgewissel met areas wat ryk is aan sitosien-guanien verbindings⁽⁶²⁾.

Deur gebruik te maak van die fluoressensiekleurtegniek, het San Roman en Bobrow (1973)⁽⁶⁰⁾ daarin geslaag om abnormaliteite soos parasentriese inversies, simmetriese perisentriese inversies sowel as simmetriese translokasies, wat volgens die ou tegnieke nie onderskei kon word nie, suksesvol te identifiseer. So ook kan die materiaal waaruit 'n disentriese chromo-

soom bestaan, bepaal word. By die bepaling van die aantal breekpunte in 'n chromatied, is elke chromosoomarm in drie gelyke dele verdeel, naamlik sentromeries, middel en telomeries. Hiervolgens vind hulle dat by pasiënte wat 10 mCi ^{198}Au vir gewrigsrumatiek en 29 mCi ^{131}I vir 'n maligne melanoon ontvang het, 'n verspreiding van 60 breuke in die sentromeriese deel, 63 in die middel en 126 in die telomeriese deel. D, E, F en G groepe chromosome is uit die ondersoek gelaat vanweë hul klein kortarms. Hierdie data mag daarop dui dat gebiede met 'n hoë herhalingskoëffisiënt van dieselfde D.N.A. basispare, en wat gewoonlik meer sensitief is ten opsigte van stralingsskade, in die telomeriese gebiede van chromosome aanwesig is. San Roman en Bobrow wys daarop dat breuke meesal in die gebiede van die chromosoom voorkom wat swak fluoresseer.

Endoreduplikasie is 'n verskynsel wat selde waargeneem word, en soos reeds genoem, word dit ook aangetref in onbehandelde kulture. Baie min inligting bestaan hieroor in die literatuur. Kelly en Brown⁽⁶³⁾ vind egter 'n viervoudige verhoging in die frekwensie van voorkoms (0,2 tot 0,8%) tussen dosisse van 280 en 400R wat in vivo toegedien is. Hul wys egter daarop dat daar geen dosisreaksie verhouding vir selle wat endoreduplikasie toon, bestaan nie.

1.2.4 Aberrasies in Vitro

Die faktore wat aanleiding kan gee tot verskille in resultate verkry met in vivo bestraling, is grootliks van toepassing op

kulture wat in vitro bestraal word. Daar sal dus nie weer volledig op hierdie verskille ingegaan word nie, maar eerder gelet word op addisionele faktore wat aanleiding tot verskille mag gee.

Daar kan nie sonder meer aanvaar word dat gegewens wat in vitro verkry is, net so van toepassing op in vivo omstandighede sal wees nie. Alhoewel daar 'n groot ooreenkoms bestaan tussen resultate in vivo en in vitro verkry, is dit nie identies nie. Clemenger en Scott (1970)⁽⁷⁰⁾ vind dat die aantal disentriese chromosome per sel met 'n faktor 10 verskil tussen verskillende individue waarvan die limfosiëte in vivo (heellicgaam bestraling) en in vitro bestraal is met 30 tot 50 rads ⁶⁰Co. Hulle skryf hierdie verskil veral toe aan die lae dosis bestraling wat gebruik is.

Norman et al (1964)⁽⁵²⁾ het 'n 6 MeV Linac, met effektiewe fotonenergie van 1,9 MeV, gebruik as X-straal energiebron. Dosistempo's van 200 rad per minuut en 10 rad per minuut is vir in vivo bestraling sowel as in vitro bestraling van die heel bloed gebruik, waarna die limfosiëte van die heel bloed geskei is en 72 tot 96 uur kulture opgestel is. Hulle vind dat die frekwensie van disentriese chromosome in vivo met 'n faktor 2 hoër of laer kan wees as in vitro, by dieselfde dosis X-strale. Dit lyk dus asof daar 'n groter ooreenkoms tussen in vivo en in vitro reaksies bestaan by hoër dosisse, ten minste wat die opbrengs van disentriese chromosome betref.

'n Baie interessante eksperiment is deur Field et al (1972)⁽⁷¹⁾

gedoen wat heelwat lig werp op die meganismes wat verantwoordelik mag wees vir verskille in aberrasies wat in vivo en in vitro verkry word. Hy het die immunosuppressiewe invloed van bestraling ondersoek by pasiënte wat nieroorplantings moes ondergaan. Hiervoor is van 'n ekstrakorporeale verbypad gebruik gemaak. Bloed het die liggaam se sirkulasie-sisteem verlaat, deur 'n bestralingsklos gevloei, waarna dit weer tot die sirkulasie toegelaat is. Bloed is aan die inlaatkant van die klos voor aanvang van bestraling, asook met tussenposes tydens en na bestraling geneem, waarna kulture volgens Moorhead se tegniek opgestel is. Aberrasies is na 48 uur in kultuur ondersoek om die hoeveelheid beskadigde limfosiete na sekere tye en dosisse van bestraling te bepaal. Dosisse het tussen 300 en 600 rads gewissel.

Uit gegewens volgens hierdie tegniek verkry, blyk dit dat bestraalde limfosiete 'n gemiddelde verblyfperiode van 2,2 tot 2,7 minute in die bloedstroom het, waarna dit uit sirkulasie onttrek word en deur onbeskadigde limfosiete vervang word. Die tempo van vervanging was egter sodanig dat Field et al tot die gevolgtrekking gekom het dat die limfoïëde organe nie alleen as siftingspunte vir beskadigde limfosiete kan optree nie, maar dat 'n groot gedeelte van die vaskulêre endotelium, pulmonaal sowel as sistemies, ook hierby betrokke is.

Daar kan dus verwag word dat hoe langer die periode is wat volg op bestraling in vivo totdat bloed getrek word, hoe groter sal die verskil tussen in vivo en in vitro resultate wees.

Wisselinge in suurstofspanning binne kulture, beïnvloed veral die herstel van selle na in vitro bestraling. Hall (1972)⁽⁶⁸⁾ vind dat wanneer die suurstofinhoud van 'n bestraalde kultuur tot 16 dele per miljoen en minder daal, die herstel van subletale skade totaal geïnhibeer word.

Die ouderdom van die persoon is 'n ander faktor wat in gedagte gehou moet word. Liniecki et al (1971)⁽⁶⁹⁾ het PHA-gestimuleerde limfosiete van manlike en vroulike persone tussen die ouderdomme 0 (pasgeborenes) en 72 jaar geneem en dit in vitro bestraal met 'n konstante dosis van 300 rads X-strale by 37°C. Selle afkomstig van die eerste mitose is ondersoek. Geen verskil in die opbrengs van chromosomale aberrasies tussen die twee geslagte kon waargeneem word nie. Alhoewel die frekwensie van asentriese fragmente, ringchromosome en koldelesies onafhanklik van die skenker se ouderdom was, is gevind dat die opbrengs van disentriese chromosome, lineêr en negatief gekorrelleer met ouderdom was. Indien die opbrengs van disentriese chromosome vergelyk word met die frekwensie per sel in pasgeborenes, word daar 'n afname van 0,4 persent per jaar in opbrengs gevind.

Vroeër is gewys op die effek van PHA op limfosiete^(8, 13, 15), en dat die stimulasie wat dit op limfosiete uitoefen om tot blaste te transformeer, nie deur bestraling geaffekteer word nie. In sommige kultuurmetodes word gemengde menslike serum as addisionele groeistimulant gebruik. Alhoewel hierdie metode nie deur die skrywer gebruik is nie, is dit tog interessant om te let op die effek van bestraling op groeistimulasie

in sulke kulture. Kasakura et al (1968)⁽⁶⁵⁾ vind dat al= hoewel limfosiëte nie meer in staat is tot D.N.A. sintese en mitose na 'n dosis van 1500 R in vitro nie, die gemengde serum nie sy vermoë verloor het om intakte limfosiëte tot blastvorming te stimuleer nie.

In terme van die aantal selle per kultuur, verkry Kasakura die maksimum respons op PHA-stimulasie na bestraling by 3 tot 6×10^6 limfosiëte. Bokant selkonsentrasies van 12×10^6 , is die stimulasie-vermoë van PHA nie meer so effektief nie. Hierdie resultate is verkry nadat heel bloed met 2000R X-strale bestraal is en kulture 30 min. daarna opgestel is.

Schrek et al (1963)⁽⁶⁴⁾ het 'n direkte metode ontwikkel waardeur die sensitiwiteit van interfase-limfosiëte waargeneem kon word. Limfosiëte is in vitro bestraal met 100 R X-strale, waarna dit in 'n inkubator by 37°C geplaas is en periodiek in 'n telkamer ondersoek is. Na twee uur het sekere morfologiese veranderings ingetree, die eerste waarvan die vorming van 'n klein vakuole binne die sel was. Dit word gevolg deur 'n vormverandering van die sel. Die vakuole vergroot en word omring deur 'n donker chromatienring. Uiteindelik breek die ring, gevolg deur 'n kondensering van die chromatien om 'n klein, ronde, soms fragmentariese kern te vorm. Na 24 uur word feitlik geen oorlewende limfosiëte gevind nie. Die persentasie-effek van bestraling by 'n sekere dosis is as volg bepaal:

$$\% \text{ effek} = 100 \left(1 - \frac{\text{aantal bestraalde limfosiëte}}{\text{aantal onbestraalde limfosiëte}} \right)$$

'n Belangrike toepassing van die direkte bepaling van stralingssensitiwiteit van limfosiëte oor 'n periode van 24 uur, is om 'n voorafbepaling te doen van hoe 'n pasiënt op 'n sekere dosis ioniserende strale sal reageer. Schrek et al het die sensitiwiteit van leukemiese en nie-leukemiese pasiënte se limfosiëte ondersoek. Geen verskil in sensitiwiteit is by die twee groepe gevind nie. By 19 ondersoekte pasiënte met chroniese limfositiese leukemie (leukemiese fase) word egter limfosiëte gevind wat meer weerstandigheid as die van normale pasiënte getoon het. Sommige van hierdie pasiënte se limfosiëte was geheel en al weerstandig teen 1000 R bestraling. Dit is verbasend as in gedagte gehou word dat normale limfosiëte selfs vir dosisse so laag as 2 R gevoeligheid toon. Hieruit volg dus dat 'n pasiënt met weerstandige limfosiëte 'n groter dosis bestraling sal moet ontvang om dieselfde reduksie in witseltelling te verkry as ander.

Lindgren en Raekallio (1967)⁽⁶⁶⁾ neem dieselfde morfologiese veranderinge in interfase limfosiëte waar na 600 tot 1000 rads bestraling as Schrek en sy medewerkers. ⁶⁰Co is as bron gebruik en dosisse het tussen 200 en 60,000 rads gewissel. Na dosisse van 200 tot 400 rads kon daar 24 uur na bestraling 'n merkbare inhibering van groei waargeneem word. Die groot verskil in sensitiwiteit tussen kernmateriaal en sitoplasmiese ensiemaktiwiteit word geïllustreer deur die feit dat waar veranderinge in chromatie na dosisse van 200 rads binne 24 uur waargeneem kan word, 'n daling in aktiwiteit van AS-esterase en sitochroom-oksidase eers na 20,000 rads waargeneem kon word. Na 60,000 rads het hierdie ensieme nog steeds

'n mate van aktiwiteit getoon. Dosistoediening het 24 tot 48 uur voor oesting plaasgevind, oftewel 24 uur na opstel van kulture.

Alhoewel die sensitiwiteit van menslike chromosome onafhanklik van temperatuurwisselinge is, word daar gevind dat herstel van X-straal geïnduseerde breuke makliker plaasvind by lae temperature. Bora en Soper (1971)⁽⁶⁷⁾ het limfosiete in kulture met 306 R X-strale bestraal teen 'n tempo van 102 R per minuut. Die kulture is in twee groepe verdeel, waarna hul by 37°C en 5°C onderskeidelik, bestraal is. Hierdie temperature is vir 65 minute na bestraling gehandhaaf en daarna is beide groepe by 37°C geïnkubeer. Chromosoomondersoeke het na 54 uur in kulture geskied. 'n Groter persentasie chromosoom-aberrasies is by kulture wat by 37°C bestraal is, gevind as by dié wat by 5°C bestraal is. Bora en Soper noem drie moontlike redes vir die verskille wat voorkom:

- (i) Meer primêre breuke word by hoër as lae temperature gevorm.
- (ii) Die herstel van breuke vind meer effektief by lae temperature plaas.
- (iii) Die meganisme van uitruil vir 'n gegewe aantal breuke wat tot uitruilings in staat is, vind stadiger plaas by lae temperature.

Aangesien ATP nodig is vir die hegting van chromosomale breuke (Wolff en Luippold, 1955)⁽⁶⁷⁾, stel Bora en Soper voor dat daar 'n meer geredelike beskikbaarheid van ATP in die perifere limfosiet is by hoër temperature. Die waarskynlikheid dat twee

gebreekte chromosoom-eindes binne 'n hegtingsafstand van mekaar geleë is, blyk ook groter te wees by hoë as lae temperature.

Verskeie siektetoestande is verantwoordelik vir 'n verhoging in die chromosomale brekingsindeks na bestraling, die bekendste waarvan die volgende is: Telangiëktatiese ataksie, Bloom se sindroom en Fanconi se anemie. Higurashi et al (1971)⁽⁷²⁾ (1973)⁽⁷³⁾ het die sensitiwiteit van limfosiete afkomstig vanaf bogenoemde pasiënte ondersoek deur dit in vitro by kamertemperatuur bloot te stel aan dosisse van 10 en 100 rads gammastrale, afkomstig van 'n ¹³⁷Cs eksperimentele eenheid. Die kultuurtegniek van Moorhead is gebruik, terwyl die inkubasieperiode 52 uur was.

Die aantal chromosomale breuke per sel per rad wat deur Higurashi et al by die onderskeie kulture gevind is, was as volg: $0,0017 \pm 0,0012$ by bestraalde kontrole, $0,0062 \pm 0,0019$ by telangiëktatiese ataksie, $0,0062 \pm 0,0019$ by Bloom se sindroom en $0,0085 \pm 0,0023$ by Fanconi se anemie. Sover dit die aantal disentriese en ringchromosome per sel na 100 rads betref, was daar ook 'n merkbare verhoging in voorkoms by persone met die "chromosomale brekingssindrome" as by bestraalde kontroles. Dit blyk dus dat daar 'n beslissende verhoging in chromosomale stralingssensitiwiteit van persone met genoemde siektetoestande voorkom.

Evans (1972)⁽¹⁾ het soortgelyke bevindings verkry by persone met Down se sindroom nadat kulture met 300 rads X-strale bestraal is, veral met betrekking tot koldelesies, disentriese-

en ringchromosome. Daarenteen vind Chiduna (1968)⁽⁷⁴⁾ by laer dosisse (10 - 40 R) dat, alhoewel daar 'n verhoging in sensitiwiteit by die bestraalde limfosiete van Down-sindroom-kindern voorkom indien dit met kontrole kindern vergelyk word, hierdie sensitiwiteit nie hoër is as dié van kontrole volwassenes nie. Die mate van sensitiwiteit hang dus af van die siektetoestand, sowel as die toegedien=de dosis.

Ploïëdie as bepalende faktor by stralingssensitiwiteit, is van minder belang volgens die bevindings van Mauersberger et al (1965)⁽⁷⁵⁾. Hulle het L. en Hela selle met 2n sowel as 4n chromosome, met X-strale by dosisse van 100, 300 en 500 R bestraal (200 kV, 16 mA, 0,5 mm Cu, 1 mmAl, 100 R/min, FSD 45 cm). In teenstelling met die geval by plante, kon geen noemenswaardige verskil in sensitiwiteit tussen 2n en 4n selle waargeneem word nie, alhoewel die verskille merkbaarder by 500 R was.

Die effek van tydsduur van kulture op die aantal aberrasies wat na bestraling verkry word, word geïllustreer deur die werk van Sasaki en Norman (1967)⁽⁴⁸⁾. Heel bloed is aan 500 R X-strale in vitro blootgestel, waarna dit afgeswaai en die limfosietbevattende plasma gebruik is vir die opstel van kulture. Kultuurtye het van 50 tot 72 uur gewissel.

Selle met chromosomale aberrasies is gegroepeer in onstabiele selle met polisentriese chromosome, ringchromosome en asentriese fragmente; en stabiele selle met 'n hipo-, hiper-

of diploïede aantal chromosome. Na die eerste mitose (50 uur kultuurtyd) het die onstabiele selle 92% van die totaal uitgemaak, en almal behalwe 2% het asentriese fragmente besit. Na die tweede en derde mitose (72 uur kultuurtyd) het die onstabiele selle 'n skerp daling in getal getoon, terwyl die asentriese fragmente almal gepaard was.

Die aantal disentriese chromosome per sel het afgeneem van 1,2 na die eerste mitose, tot 0,6 na die tweede mitose en 0,3 na die derde mitose. Die waarskynlikheid dat 'n disentriese chromosoom die eerste en tweede mitose in vitro sal oorleef, is dus baie na aan 0,5, terwyl die waarskynlikheid dat 'n onstabiele sel eerder 'n deling sal oorleef as 'n stabiele sel, as 0,35 gevind is.

Die frekwensie voorkoms van chromosoom- en chromatied-aberrasies is in vitro deur Kelly en Brown (1965)⁽⁶³⁾ ondersoek. Bloed is van twee gesonde manlike persone, onderskeidelik 33 en 21 jaar oud, getrek en onmiddellik daarna bestraal met X-strale (200 kV, 20 mA, HWL 1,5 mm Cu, dosistempo 42,2 tot 48,3 R/min) by dosisse wat tussen 50 en 1600 R gewissel het. Limfosiete is gekweek volgens die tegniek van Moorhead, terwyl inkubasieperiodes gewissel het van 73 tot 77 uur, vir 0 tot 100 R bestraling; en 70 tot 96 uur vir 150 tot 1600 R bestraling.

Die chromatied-aberrasies, geneem as enkelfragmente wat losstaande van 'n chromosoom met oneweredige pare arms voorgekom het, was teen 'n frekwensie van 0,038 per sel in kontro-

les teenwoordig. Ten spyte van hul lae frekwensie van voorkoms, kon die lineêre verwantskap tussen dosis en respons tog aangetoon word.

Geen chromosoom-tipe aberrasies was in die kontrole-kulture aanwesig nie. In bestraalde kulture was hul teenwoordig as delesies, disentriese en trisentriese chromosome, ringchromosome en translokasies. Die frekwensie van chromosoom-tipe delesies, geneem as pare asentriese fragmente, was gelyk aan die vierkantswortel van die X-straal dosis. Dieselfde het gegeld vir die frekwensie waarin disentriese en trisentriese chromosome voorgekom het. 'n Koëffisiënt van $0,09 \times 10^{-5}/\text{sel/R}^2$ is gevind vir die opbrengs van disentriese chromosome. Ringchromosome het selde voorgekom. Dieselfde het vir translokasies gegeld by dosisse van 250 R en hoër.

Die induksie van breuke het teen 'n tempo van 0,0069 breuke/sel/R voorgekom, wat bereken is as die gemiddelde van die totale aantal breuke/sel by elke dosis. Hierdie waarde het chromatiedbreuke ingesluit. Die aantal breuke/sel/R was 0,015 en 0,018 by 800 en 1600 R onderskeidelik, wat daarop dui dat minder breuke by hoër dosisse voorgekom het. Hierdie tipe berekening is dus baie afhanklik van die minimum en maksimum grense van dosisse wat by die berekening betrokke is.

Verder is gevind dat chromosoom-tipe delesies by dosisse van so laag as 50 R waargeneem kan word, disentriese chromosome by 100 R, translokasies by 200 R en ringchromosome by 250 R.

1.2.5 Die Interaksie van X-strale en Elektrone met materie

Ionisasie word veroorsaak deur elektromagnetiese golwe soos X-strale en gammastrale, sowel as deur partikels soos alpha-, beta-partikels, (elektrone van verskeie bronne, positrone) neutrone en protone⁽⁸⁰⁾.

Uit 'n mediese of biologiese oogpunt beskou, is die belangrikste effek van ioniserende strale, die feit dat hul ionisasie tot gevolg het. Alle biologiese veranderinge wat binne lewende weefsel plaasvind na bestraling, kan teruggevoer word na die effekte van ionisasie. Die verskille in effekte wat waargeneem word, kan teruggevoer word na die graad van penetrasie, die krag waarmee ionisasie plaasvind, die dosis van toediening sowel as die geabsorbeerde dosis, die betrokke weefsel en ander sekondêre faktore.

Die ioniserende effek op individuele atome het die uitskop van elektrone in hul bane om die atoomkern tot gevolg, waarna hierdie elektrone ioonpare vorm. Baie meer energie word benodig om elektrone uit die skille nader aan die atoomkern te skop, gevolglik is die ioonpare wat in weefsel gevorm word, hoofsaaklik van die buitenste skille afkomstig. Die gemiddelde energie benodig vir die produksie van so 'n ioonpaar, word as 33,5 elektronvolt (eV) aangegee. In terme van energie bereken in 'n meer bekende eenheid, is dit so laag dat 'n geweldige hoeveelheid ionisasie (of bestraling) nodig sal wees om die temperatuur van die weefsel slegs 'n gedeelte van 'n

graad te verhoog. Die ernstige biologiese skade deur ioniserende strale veroorsaak, kan dus nie net bloot aan omset van energie na hitte toegeskryf word nie, maar aan fisiochemiese veranderings wat plaasvind.

Indien een of meer atome van 'n molekule geïoniseer word, kan verwag word dat die molekule chemiese veranderinge sal ondergaan. Sulke veranderinge affekteer nie slegs dié substansie wat in suspensie of kolloïdale vorm in die weefsel teenwoordig is nie, maar die vloeistof self, oftewel water, word geaffekteer. Waterstof en suurstof molekules word dikwels tot hul atomiese vorm gereduseer, terwyl spore waterstofperoksied, OH groepe en organiese peroksiede ook hul verskyning mag maak. 'n Groot verskeidenheid van veranderinge mag plaasvind as gevolg van die verplasing van elektrone wat by molekulêre verbindings betrokke is. Dit het die vorming van verspreide gebiede van chemiese interferensie met metabolismiese prosesse en beheermeganismes tot gevolg, bv. onderdrukking van selrespirasie; inaktivering van ensieme en denaturasie van proteïene; delingsvertraging of vertraging in die mitotiese indeks en leses, aberrasies in die kernmateriaal van 'n sel.

Kwantitatief gesproke, produseer die eenheid van ioniserende straling, nl. die roentgen, $1,16 \times 10^{12}$ ioonpare per gram weefsel. Indien dit egter vergelyk word met die aantal atome per mol nl. $6,023 \times 10^{23}$, blyk die aantal ioonpare wat deur een roentgen ioniserende strale gevorm word, nie meer in ver-

houding tot die totale aantal atome, so baie te wees nie⁽⁸¹⁾. Indien die skade egter in byvoorbeeld groot proteïenmolekules wat 'n lewensbelangrike funksie in die sel vervul plaasvind, mag dit letaal vir die sel wees. Daarbenewens is die effek van sekondêre faktore wat as gevolg van ionisasie ontstaan, sodanig dat dit fataal is by dosisse onder 800 R.

1.2.5.1 Die absorpsie van X-strale

Die absorpsie van X-strale word bepaal deur die digtheid en dikte van die betrokke materiaal of substans. Hierdie verhoudingskonstante staan bekend as die koëffisiënt van absorpsie, waardeur die relatiewe verlies aan intensiteit per sentimeter van die afstand wat die X-straal aflê, gegee word. Die verhouding tussen die koëffisiënt van absorpsie en die halfwaarde laag (H.W.L.) d.w.s. die dikte van 'n gegewe materiaal benodig om die intensiteit van die invallende strale met die helfte te verminder, word deur die volgende vergelyking aangetoon: ⁽⁸⁰⁾

$$\mu = \frac{0,693}{T_{\frac{1}{2}}}$$

waar $T_{\frac{1}{2}}$ = die H.W.L.

μ = koëffisiënt van absorpsie

Absorpsie vind op drie maniere plaas, afhangende van die energievlakke van die bestraling, nl., deur die foto-elektriese effek, Compton-terugslag en paarproduksie.

1.2.5.1.1 Die foto-elektriese effek

Laë energie X-strale word hoofsaaklik deur die foto-elektriese effek geabsorbeer. Die foton dra al sy energie oor aan die elektron. Slegs 'n klein gedeelte, nl. 30 tot 50 eV, word gebruik om die elektron uit sy skil te skop, terwyl die res oorgaan in kinetiese energie. Die foton met energie $h\nu$ (Planck se konstante vermenigvuldig met die frekwensie) word dus geabsorbeer, wat 'n aktiveringsenergie W in die atoom tot gevolg het. Sodoende word 'n elektron met massa m en snelheid v vrygestel⁽⁸¹⁾.

$$h\nu = \frac{1}{2} mv^2 + W$$

die formule $\frac{1}{2} mv^2$ verteenwoordig die kinetiese energie wat benodig word om die elektron uit sy skil te skop.

Die omgekeerde van die foto-elektriese effek is ook moontlik, d.w.s. botsende elektrone kan fotone produseer met 'n frekwensie en golflengte eweredig aan die waarde verkry volgens bogenoemde formule.

1.2.5.1.2 Die Compton-effek

Hoë energie strale is by die Compton-terugslag betrokke. Slegs 'n gedeeltelike energie-oordrag vind hier plaas, deurdat die foton met die elektron bots, hom uit sy skil skop, en daarna in 'n ander rigting met verminderde energie voortbeweeg. Verminderde energie impliseer op sy beurt weer dat die foton nou 'n langer golflengte en laer fre-

kwensie besit. Die elektron wat deur die foton uitgeskop is, beweeg op dieselfde wyse van die moderatoom weg as die foto-elektron.

Na Compton-terugslag bly daar dus twee energiebronne oor, nl. 'n gedegradeerde foton wat meeste van sy energie verloor het, en 'n vinnige elektron. Die gedegradeerde foton word gewoonlik vinnig geabsorbeer deur die foto-elektriese effek.

1.2.5.1.3 Paarproduksie

Wanneer die energie van 'n invallende foton grootter as 1,02 MeV is, mag die foton deur die meganisme van paarproduksie geabsorbeer word. Sekere fotone wat digby die kern verbygaan, word aan die sterk veld van die kern blootgestel, waarna dit skielik mag verdwyn. In die plek daarvan verskyn dan 'n elektronpaar met teenoorgestelde ladings, te wete 'n elektron en 'n positron. Die positron verdwyn feitlik dadelik deur 'n annihilasie-reaksie, met die totstandkoming van twee gamma kwarta van 0,5 MeV elk.⁽⁸¹⁾ Onder annihilasie word verstaan dat die stadig bewegende positron met een van die vry elektrone wat volop in materie voorkom, verbind om twee stralingsfotone te vorm.

Opsommend word die absorpsie van straling in sagte weefsel by verskillende foton-energieë gegee:

Foton-energie

- 0 keV tot 50 keV: Foto-elektriese absorpsie speel 'n belangrike rol.
- 60 keV tot 90 keV: Foto-elektriese effek en Compton terugslag is ewe belangrik.
- 200 keV tot 1 MeV: Slegs Compton absorpsie is teenwoordig.
- 2 MeV tot 10 MeV: Paarproduksie begin toenemend plaasvind.
- 50 MeV tot 100 MeV: Paarproduksie is die belangrikste tipe absorpsie.

1.2.5.2 Sekondêre Bestraling

1.2.5.2.1 Deltastrale

'n Aantal sekondêre elektrone wat deur ionisasie gevorm word, besit genoeg energie om opsigself ionisasie te produseer⁽⁸⁰⁾. Die elektrone wat so tot stand kom, staan bekend as deltastrale.

1.2.5.2.2 Bremsstrahlung

Die absorpsie van elektrone het 'n afname in versnelling of remmende effek tot gevolg. Namate die elektron die einde van sy pad bereik, word die remmende invloed al hoe groter, en die energie word in X-strale omgesit. Hierdie X-strale word dikwels na verwys as bremsstrahlung, wat remmende strale in Duits beteken.

1.2.5.3 Die Meting van Bestraling

1.2.5.3.1 Die Roentgen en die Rad

In die verlede is die roentgen op twee maniere gebruik wat heelwat van mekaar verskil het. Eerstens is dit gebruik om straling te meet wanneer dit die apparaat verlaat, terwyl dit in die tweede plek gebruik is om die hoeveelheid geabsorbeerde energie in byvoorbeeld weefsel, te bepaal.

Die definisie van die roentgen maak dit egter onmoontlik om straling te meet indien die stralingsbundel se energie 3 MeV oorskry. Verder word die roentgen slegs met betrekking tot elektromagnetiese bestraling gedefinieer, sodat dit nie gebruik kan word vir partikels soos elektrone, protone en neutrone nie. Dit het daartoe gelei dat 'n nuwe eenheid van dosis, die rad, tot stand gekom het. Die roentgen is dus 'n eenheid van blootstelling, terwyl die geabsorbeerde dosis in rads gemeet word.

Die roentgen word gedefinieer as die eenheid van blootstelling wat die produksie van $1,610 \times 10^{12}$ ionpare/gram lug tot gevolg het. Aangesien die gemiddelde energie wat benodig word om 'n ionpaar in lug vry te stel nl. 33,7 eV/ionpaar, feitlik dieselfde vir alle elektronenergieë is, kan die verwantskap tussen blootstelling en die energie wat in lug geabsorbeer word, as volg aangetoon word:

1 roentgen stel $1,610 \times 10^{12}$ ionpare/gram in lug vry.

Die energie geabsorbeer deur 1 gram lug blootgestel aan 1R

$$\begin{aligned}
 &= 1,610 \times 10^{12} \frac{\text{ioonpare}}{\text{gram lug}} \times 33,7 \frac{\text{ev}}{\text{ioonpaar}} \\
 &= 54,0 \times 10^{12} \frac{\text{ev}}{\text{gram lug}} \times 1,602 \times 10^{12} \frac{\text{ergs}}{\text{ev}} = 86,9 \frac{\text{ergs}}{\text{gram lug}}
 \end{aligned}$$

Die eenheid van geabsorbeerde dosis word arbitrêr gedefinieer as 100 ergs/gram. Dus: Energie geabsorbeer per gram lug blootgestel aan 1R = 0,869 rads.

1.2.5.3.2 Relatiewe biologiese effektiwiteit (RBE)

Alhoewel alle tipes straling dieselfde tipes biologiese effekte produseer, is die grootte van die respons per eenheid geabsorbeerde dosis egter nie dieselfde nie. Die omgekeerde verhouding van die geabsorbeerde dosis van een stralingstipe tot dié van 'n ander stralingstipe benodig om dieselfde graad van gestipuleerde effek te produseer, staan bekend as relatiewe biologiese effektiwiteit⁽⁸³⁾.

Die rad kan ook omskryf word as die hoeveelheid geabsorbeerde dosis van enige tipe straling, wat die produksie van 100 ergs energie per gram tot gevolg het⁽⁸⁰⁾. Die stralingstipe wat in die eerste definisie as verwysingspunt gebruik word, is gammastrale vanaf ⁶⁰Co en 200 - 250 kV X-strale.

Daar bestaan nie 'n spesifieke RBE vir 'n gegewe tipe straling nie, aangesien die waarde afhang van die weefsel, die sel, die biologiese effek wat ondersoek word, die totale dosis en die dosistempo.

1.2.5.3.2 Lineêre Energieoordrag (LET)

Die basiese indeks van stralingskwaliteit is die aantal gebeurtenisse wat tot energieverlies lei, per eenheids=
lengte van die pad van 'n ioniserende partikel. Dit staan bekend as die lineêre energie-oordrag of LET⁽⁸⁴⁾.

Kwalitatief beskou, kan enige biologiese effek wat deur lae LET straling geproduseer word, ook deur hoë LET stralings soos alpha-partikels en vinnige neutrone, gevorm word. Daar bestaan egter kwantitatiewe verskille tussen die twee. Die reaksies op lae LET stralings word deur die volgende gekenmerk:

(a) Die eksperimentele dosis-oorlewingskurwe van selle vorm 'n "skouer" voordat dit 'n eksponensiële vorm aanneem, wat 'n opeenhoping van subletale skade weerspieël.

(b) 'n Tweede reeks dosisse wat etlike ure na die eerste dosis volg, het die herverskyning van 'n "skouer" tot gevolg, wat daarop dui dat gedeeltelike herstel van subletale sellulêre skade plaasgevind het.

(c) Vanweë die herstel van subletale skade, word 'n duidelike dosistempo afhanklikheid van effek waargeneem, dit wil sê by laer dosistempo, word 'n hoër dosis benodig om dieselfde tipe biologiese effek tot gevolg te hê.

(d) Die graad van die effek is baie afhanklik van toestande soos suurstof-spanning, ensovoorts.

Die reaksies van die LET straling is as volg:

- (a) 'n Kleiner geabsorbeerde dosis is nodig om 'n sekere graad van effek, d.w.s. RBE, tot gevolg te hê.
- (b) Die dosis-oorlewingskurwe is eksponensieël of baie naby daaraan, wat meebring dat weinig, indien enige herstel van subletale skade plaasvind.
- (c) Verdeling van die dosis veroorsaak slegs 'n geringe verandering van die dosis-effek kurwe, wat 'n gebrek aan herstel van subletale skade aandui.
- (d) Weinig of geen dosistempo afhanklikheid in die graad van die effek, word waargeneem.
- (e) Suurstofspanning is nie veel van belang nie.

1.3 CHEMOTERAPEUTIESE MIDDELS AS INDUSEERDERS VAN SKADE IN KERNMATERIAAL

Die chemoterapeutiese middels kan in verskeie groepe verdeel word nl.: Alkilerende agense; sulfhidriel-onderdrukkers; antimetaboliete; antibiotika, alkaloiëde en retiene; steroïëde en hormone; ander soorte verdowingsmiddels⁽⁸⁵⁾.

Bleomisien, endoksaan en 5-fluoro-urasiel is as voorbeelde deur die skrywer gebruik in die ondersoek na die effek van chemoterapeutiese middels op menslike mitotiese chromosome, daarom sal slegs alkilerende agense, antimetaboliete en anti=

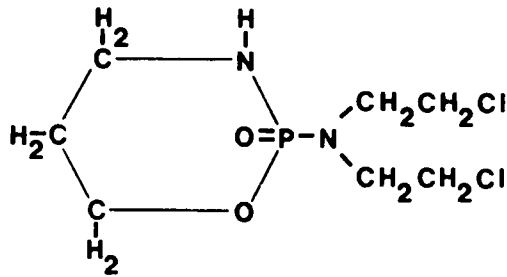
biotika hieronder bespreek word.

1.3.1 ALKILERENDE AGENSE, BV. ENDOKSAAN EN CHLOORAMBUSIEL

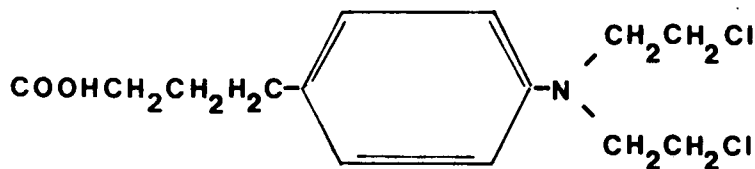
Die alkilerende agense is 'n hoogse reaktiewe groep chemiese verbindings wat waterstofatome in verskeie organiese verbindings deur 'n alkielgroep (bv. $R-CH_2-CH_3$) kan verplaas. By bepaling van die sitotoksiese effek van hierdie verbindings, is dit veral die alkilering van die nukleïensure, waarvan die effek op DNA die belangrikste is⁽⁸⁶⁾, wat van belang is. Alkilering veroorsaak breuke in die DNA molekule, sowel as dwarsverbindings tussen die twee DNA kettings. Hierdie dwarsverbindings verhoed dat die twee DNA kettings van mekaar skei, d.w.s. replisering van DNA en transkripsie van RNA word verhoed⁽⁸⁷⁾. Die alkilerende agense staan ook bekend as radiomimetiese stowwe, sodat hul net soos X-strale, ook chromosomale aberrasies tot gevolg sal hê.

Daar bestaan twee tipes alkilerende agense, nl. monofunksionele verbindings met een alkilerende groep; en polifunksionele verbindings met veelvoudige alkilerende groepe. Algemeen gesproke het die polifunksionele verbindings hulself as klinies meer bruikbaar bewys. Met uitsondering van een, is die klinies-sukksesvolle alkilerende agense almal derivate van stikstof-mosterd.

Die verskil in aktiwiteit van die verskillende alkilerende agense, is waarskynlik te wyte aan verskille in absorpsie-



Figuur 6: Chemiese struktuur van siklo-fosfo-amied bv. Endoksaan⁽⁸⁶⁾.



Figuur 7: Chemiese struktuur van chloorambusiel⁽⁸⁶⁾.

tempo en posisie van metabolisme en weefsel-affiniteit eerder as aan 'n basiese verskil in manier van werking. Daarbenewens is die werking van die alkilerende agense nie afhanklik van die fase van die siklus waarin 'n sel hom bevind nie.

Endoksaan word onder andere gebruik vir die behandeling van Hodgkin se siekte en ander limfome; chroniese leukemieë en karsinome van die mamma, ovarium, long, serviks, uterus, testis, larinks en gastro-intestinale kanaal. Chloorambusiel is veral bekend vir die behandeling van limfome, limfositiese leukemie, Hodgkin se siekte en retikulumsel sarkome.

Studies wat deur Stevenson en Patel⁽³⁷⁾ (1973) gedoen is om die in vitro effek van chloorambusiel op limfosiete te

bepaal, het aan die lig gebring dat dit hoofsaaklik verantwoordelik is vir die vorming van chromatied-aberrasies.

Chloorambusiel (CBC) is teen vier verskillende konsentrasies nl.: 0,5; 1,0; 2,0 en 3,0 $\mu\text{g/ml}$ by limfosietkulture direk na opstelling gevoeg. Die metode van Arakaki en Sparkes is vir die opstel van kulture gebruik, terwyl die inkubasie periode 72 uur was. Indien die konsentrasies wat in vitro gebruik is, vergelyk word met die in vivo konsentrasie van behandeling (200 $\mu\text{g/kg}$ liggaamsgewig), is die laagste konsentrasie (0,5 $\mu\text{g/ml}$) wat in vitro gebruik is, steeds hoër as dié wat 'n pasiënt ontvang.

Uit die verkrygte resultate was dit duidelik dat, soos reeds genoem, CBC hoofsaaklik chromatied-aberrasies tot gevolg het; dat daar 'n konsentrasie-afhanklike verhoging in chromatied-skade vanaf 0,5 $\mu\text{g/ml}$ tot 3,0 $\mu\text{g/ml}$ CBC was; en dat feitlik geen metafases verkry is by konsentrasies hoër as 3,0 $\mu\text{g/ml}$ CBC nie.

Uit 'n totaal van 600 ondersoekte metafases in die twee hoër konsentrasies, nl. 2,0 en 3,0 $\mu\text{g/ml}$, is slegs vyf disentriese chromosome gevind, waarvan vier fragmente besit het. Laasgenoemde dui daarop dat die metafase waarin hierdie disentriese chromosome plus fragmente voorgekom het, verteenwoordigend van die eerste mitotiese deling nadat skade plaasgevind het, was. Daarenteen was die disentriese chromosoom wat in die vyfde metafase waargeneem is, waarskynlik afkomstig van 'n tussendeling in die 72 uur periode, waar=

tydens die fragment verlore geraak het.

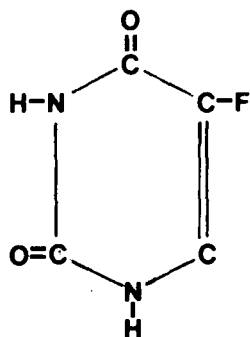
By die interpretasie van hierdie resultate moet in gedagte gehou word dat dubbele fragmente as chromosoom-breuke getel kan word, met die implikasie dat hul in G_1 ontstaan het; of as isochromatied-breuke indien hul in die S-fase ontstaan het.

1.3.2 ANTIMETABOLIE, BV. 5-FLUORO-URASIEL

5-Fluoro-urasiel is 'n analoog van timien, oftewel 5-metiel urasiel, een van die pirimidien-basisse wat in DNA voorkom. Die gehalogeneerde urasiele het 'n halogeen, fluorien in hierdie geval, in die 5-posisie van urasiel of sy derivate.

Die moontlike effek van 5-fluoro-urasiel, is inmenging in die volgorde van reaksies wat uitloop op die biosintese van die deoksieribonukleotied van timien, bekend as timidiezuur, wat 'n voorloper van DNA is⁽⁸⁶⁾.

Die effek van 5-fluoro-urasiel op menslike limfosiete sal dus hoofsaaklik in die vorm van onderdrukking van DNA sintese wees. Geen chromosomale abnormaliteite word verwag nie, aangesien 5-fluoro-urasiel nie in DNA geïnkorporeer word nie, en aangesien geen selle die metafase-stadium van deling behoort te bereik nie.



Figuur 8: Chemiese struktuur van 5-fluoro-urasiel⁽⁸⁵⁾.

1.3.3 ANTIBIOTIKA, BV. BLEOMISIEN

Bleomisien is 'n mengsel van nouverwante verbindings, waarvan die presiese samestelling tot nog toe onbekend is. Wat wel bekend is, is dat hul polipeptiedagtig van aard is en sekere ongewone aminosure sowel as koper bevat⁽⁸⁸⁾.

In soverre dit die meganisme van werking betref, is dit bekend dat bleomisien met DNA reageer; inmeng met DNA sintese; die transkripsie van DNA en RNA bemoeilik. Wanneer bleomisien met DNA reageer, veroorsaak dit fragmentasie, d.w.s. chromosomale aberrasies sal in limfosietkulture wat met bleomisien behandel is, waargeneem kan word.

Bleomisien word veral in die chemoterapie van epiteliële tumore gebruik. Verder besit dit besliste anti-mitotiese eienskappe in die G₂ fase van die selsiklus, maar nie van dieselfde orde as 5-fluoro-urasiel nie. Wheatley et al (1974)⁽⁸⁸⁾, in hul werk op HeLa S-3 selle, wys daarop dat 5 µg/ml bleomisien stadiger groei tot gevolg het in kulture

waar die selle oppervlaksgebonde is, maar dat 10 µg/ml of meer nodig is om groei totaal te inhibeer. By totale inhibering van DNA sintese, word gevind dat die sitoplasmiese massa steeds vermeerder het, wat daarop dui dat bleomisien nie RNA- en proteïensintese onderdruk het nie. By dosisse laer as 5 µg/ml, kon geen mitotiese effek op HeLa S-3 selle waargeneem word nie. Bleomisien toon dus 'n lae toksiteit teenoor die belangrike selfunksies.

By suspensiekulture van HeLa S-3 selle vind Wheatley et al egter dat die selle baie meer gevoelig is vir bleomisien, en dat antimitotiese aktiwiteit by konsentrasies van 0,1 µg/ml of minder, waargeneem kon word.

2.0 METODES

2.1 TIPE SELLE GEBRUIK EN KULTUURMETODES

As bestralingsmateriaal is menslike limfosiëte in kultuur gebruik. Perifere bloed van 'n agt-en-twintigjarige, gesonde vroulike persoon is getrek in 'n spuit wat met heparien natgemaak is. Pularin heparien, teen 'n konsentrasie van 5000 eenhede/ml is hiervoor gebruik.

Die heelbloed is in die spuit gemeng om stolling te voorkom, waarna dit in 'n steriele plastiese proefbuis oorgeplaas is. By elke 10 ml bloed getrek, is 0,05 ml phytohemagglutininien (Wellcome HA 15) asepties gevoeg, waarna dit

vir 30 minute in 'n yskas by 4°C gelaat is.

Die prosedure wat hierna gevolg is, kan kortliks as volg saamgevat word:

i) Na verstryking van die halfuur, en indien rooisel= sedimentasie nie genoegsaam plaasgevind het as gevolg van die byvoeging van die phytohemagglutininien nie, is die bloed vir 5 minute by 600 o.p.m. afgeswaai.

ii) Die limfosiet-bevattende plasma, tesame met 'n klein hoeveelheid gesedimenteerde rooiselle is met behulp van 'n steriele pasteurpipet opgetrek; ± 1 ml op 'n keer.

iii) Hierdie ± 1 ml plasma plus rooiselle is by 5 ml kultuurmedium (medium 150, verkry vanaf Polionavorsingsinstituut, Johannesburg) gevoeg, wat vooraf in 'n McCartney botteltjie geplaas is.

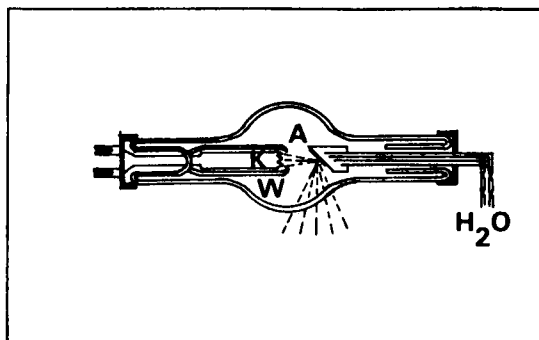
iv) Op hierdie manier is 'n reeks kulture opgestel, (nooit minder as vier op 'n keer nie), waarna dit in 'n inkubator met 'n konstante temperatuur van $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ geplaas is.

Bogenoemde prosedure is so steriel moontlik uitgevoer deur gebruik te maak van 'n gasvlam en hibitane as ontsmettingsmiddel. 'n Gewysigde tegniek van Moorhead et al⁽³⁾ (1960) is gebruik vir die opstel van die kulture.

2.2 APPARATUS

2.2.1 X-STRALE

'n Kilovolt masjien is as bron van X-strale gebruik, wat in werking basies ooreenstem met die Coolidgebuis⁽⁷⁸⁾.



Figuur 9: Die Coolidgebuis.

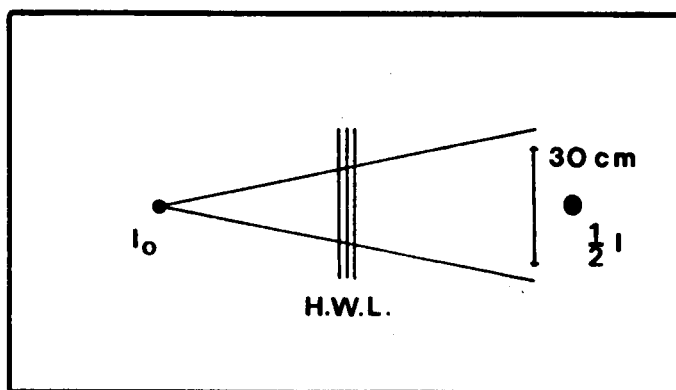
Dit bestaan uit 'n glasbuis wat onder vakuum verkeer. Elektrone word verkry van 'n gloeidraad K wat deur 'n elektriese stroom verhit word. 'n Potensiaalverskil V bestaan tussen die katode K en anti-katode A, en hierdie potensiaalverskil versnel die elektrone van K na A. Rondom die gloeikatode K is 'n silinder W, met 'n opening in lyn met die katode en anti-katode. Hierdie sogenaamde Wehneltcilinder W, is by dieselfde negatiewe potensiaal as K. Die negatiewe elektrone wat die katode verlaat, word m.b.v. die Wehneltcilinder gefokuseer sodat 'n smal elektronbundel op die anti-katode val. Hier word die kinetiese energie van die elektrone dan omgesit in stralingsenergie ($E = h\nu$) of Roentgenstrale, en warmte-energie (Q).

$$\frac{1}{2} mv^2 \text{ (Elektrone)} = h\nu \text{ (Roentgenstrale)} + Q \text{ (Warmte)}^{(78)}.$$

Slegs 1% van die kinetiese energie van die elektrone word in Roentgenstrale omgesit terwyl die res verlore gaan as warmte-energie. Dit bring mee dat die anti-katode met water verkoel moet word.

Die frekwensie, en dus ook die golflengte van die Roentgenstrale, sal afhang van die snelheid waarmee die elektrone die anti-katode tref, wat op sy beurt weer afhanklik is van die potensiaalverskil V . Tydens bestraling van die limfosietkulture, was die spanning oor die buis 90 kV, die stroom 20 mA, die lengte van applikator 30 cm en die afstand tussen die applikator en die weefselhouer was 1,3 cm. Geen filter is gebruik nie.

'n Spanning van 90 kV is gelyk aan die energie gemeet in terme van die H.W.L. (halfwaarde laag), en is in die orde van ± 3 mm Aluminium.



Figuur 10: Bepaling van die H.W.L.

I_0 is die intensiteit van die stralingsbundel by die ontstaanpunt.

$\frac{1}{2} I$ is die intensiteit van die bundel by die toedieningspunt.

Die intensiteit word bepaal deur die spanning, wat op sy beurt weer verband hou met die kinetiese energie van die bewegende partikels. Hieruit volg:

$$I \propto (kV)^n$$

waar I = intensiteit van die stralingsbundel.

kV = spanning tussen katode en anode in kilovolt.

n se waarde hang af van die graad van filtrasie van die bundel.

$$eV = KE_{\bar{e}}$$

waar $\bar{e}$ = elektronlading

V = spanning in Volt

$KE_{\bar{e}}$ = kinetiese energie van die elektrone.

Die tweede belangrike faktor by die bepaling van intensiteit, is die stroomsterkte. Die intensiteit is eweredig aan die stroomsterkte.

$$I \propto i$$

$$\text{Dus : } I \propto i (kV)^n$$

waar i = stroomsterkte.

Opsommend kan gesê word dat die limfosietkulture bestraal is met harde en sagte X-strale, omdat geen filter gebruik is nie. Hieruit volg dat die waarde van n gelyk aan 1 was. Die intensiteit van die stralingsbundel kan dan as volg be-

reken word:

$$I \propto i \text{ (kV)}^n$$

$$I \propto 0,20 \text{ (90 000)}^1$$

$$\text{dus } I \propto 1 \text{ 800 R}$$

2.2.2 DIE LINEÊRE VERSNELLER

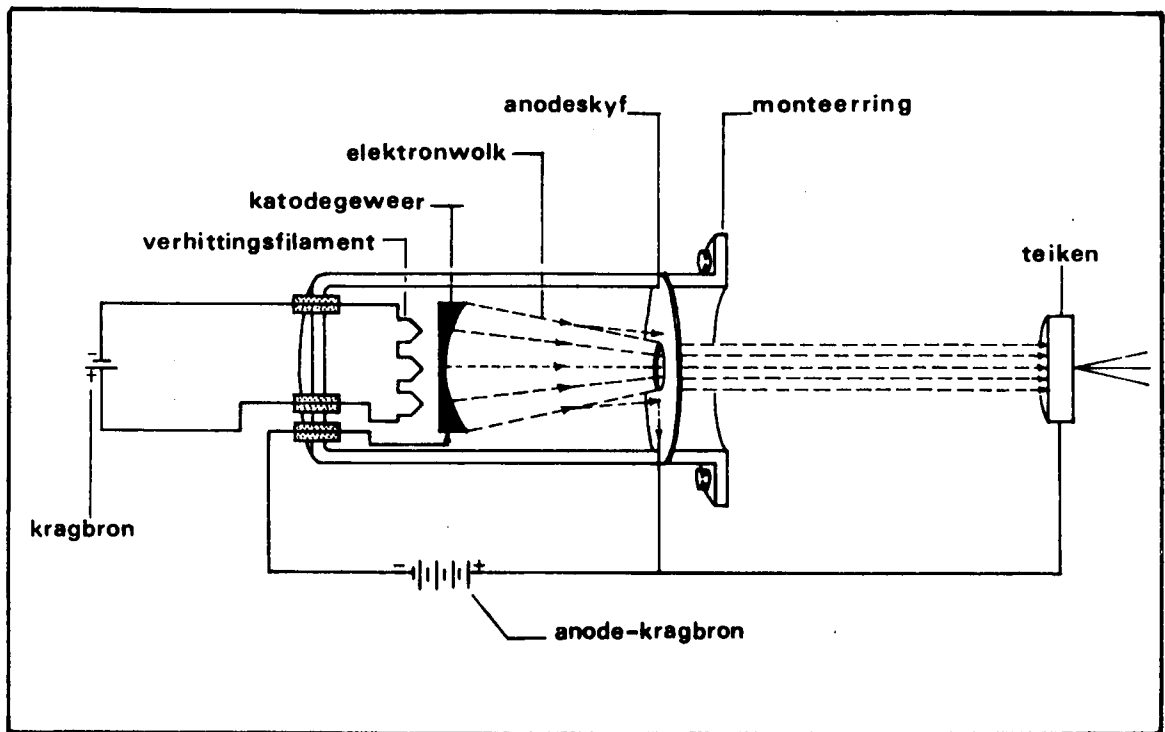
Vir die tweede reeks eksperimente is 'n Mevatron VIII lineêre versneller gebruik. Volgens elektron-energie kalibrerings wat op die instrument gedoen is, is die werklike energieë by 4 MeV en 7 MeV as 5,1 en 7,6 MeV onderskeidelik gevind ⁽⁷⁹⁾. Met 'n $10 \times 10 \text{ cm}^2$ elektronveld was daar 'n variasie in die platheid van die veld van $\pm 5\%$ by 7 MeV. Die stabiliteit in dosistempo was baie goed, terwyl die X-straal kontaminasie van die elektronveld, minder as 3% by die maksimum elektrondosis was.

'n Basiese lineêre versnellersisteem bestaan uit 'n elektrongeweer, versnellingsgolfgang, buigmagneet, skywe, modulatorsisteem en mikrogolfsisteem.

Die Elektrongeweer

Figuur (11) toon 'n skematiese voorstelling van die elektrongeweer.

'n Elektriese gloeidraad verhoog die temperatuur van die katode tot $\pm 700^\circ\text{C}$. Die katode is 'n konkawe skyf waarop



Figuur 11: Tipiese elektrongeweer.

'n lagie bariumoksied neergeslaan is. Die verhitting van die katode het 'n verhoogde elektronenergie van die barium=oksied-atome tot gevolg, en sommige van hierdie elektrone ontsnap om 'n elektronwolk rondom die katode te vorm.

Die skyfvormige anode is ongeveer 5 cm voor die katode geplaas en bevat 'n klein gaatjie, die iris, by sy middelpunt. Die anode en katode word respektiewelik aan die positiewe en negatiewe terminale van 'n hoogspanningsbron verbind. Die kragbron trek die grootste persentasie van die vrye elektrone uit die anode, sodat 'n sterk positiewe lading op die anode ontstaan. Elektrone in die elektronwolk rond=

om die katode, word na die anode aangetrek. Hierdie aantrekkingskrag staan bekend as elektrostatiese aantrekking.

As gevolg van die konkawe vorm van die katode, konvergeer die elektrone na die middelpunt van die anode, en tree deur die iris te voorskyn as 'n bundel. Elektrone wat die anode=skyf tref, word d.m.v. die hoogspanningsbron na die katode teruggevoer. Die elektrone in die bundel beweeg teen $2/3$ van die snelheid van lig ($c = 3 \times 10^8$ m/s). Dit word na die versnellingsbuis gevoer waar dit versnel word totdat die elektrone byna die snelheid van lig bereik.

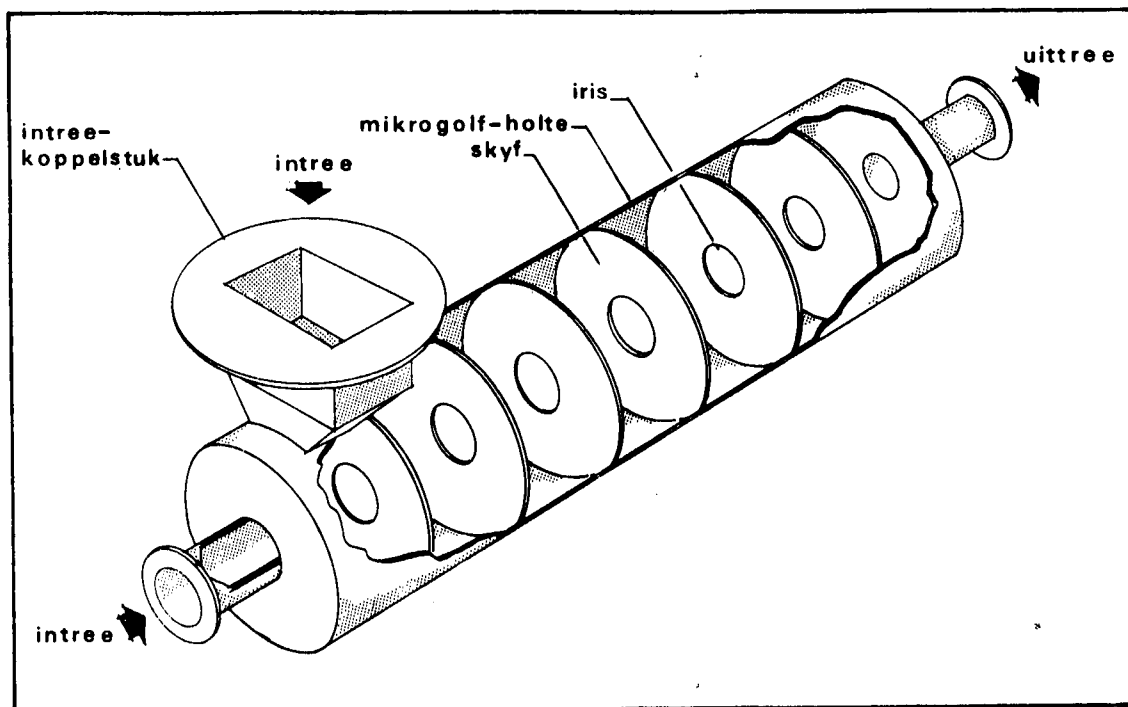
Die Versnellingsbuis

Die versneller wat gebruik is, besit 'n elektromagnetiese of mikrogolfaangedrewe versnellingsbuis, in teenstelling met die elektrostatiese versnellingsbuis. Deur die gebruik van mikrogolwe, is dit moontlik om met 'n versnellingsbuis van 80 cm, elektronenergieë van 8 MeV te bereik. Die mikrogolwe gebruik, is elektromagneties en het 'n golflengte van 10 cm. Hierdie golwe word deur 'n ossillator opgewek by 'n frekwensie van 2998 MHz; versterk, en na die versnellingsbuis gevoer.

'n Lineêre versneller wat aangedryf word teen 2998 MHz, staan bekend as 'n S-band versneller, en produseer 'n hoë energie elektronbundel teen 'n gemiddelde drywing.

Die versnellingsbuis, ook versnellingsgolfgang genoem, bevat 'n reeks versnellingsskywe wat op 'n eweredige afstand

van mekaar in 'n kopersilinder gerangskik is, soos aange-
toon in Figuur (12). 'n Toestel bekend as 'n intree-kop=



Figuur 12: Tipiese versnellingsgolfgang

pelstuk, kom aan die een kant van die versnellingsbuis
voor, en dra die mikrogolwe oor die intreekant van die
versnellingsbuis, vanwaar die golwe deur die buis na die
uittreekant beweeg. Die hele buis word gevolglik met
mikrogolwe gevul.

Die gebied tussen die versnellingsskywe staan bekend as
'n mikrogolf-holte. Indien so 'n holte met mikrogolwe ge=
vul word, ontstaan 'n intense elektriese- sowel as magneet=

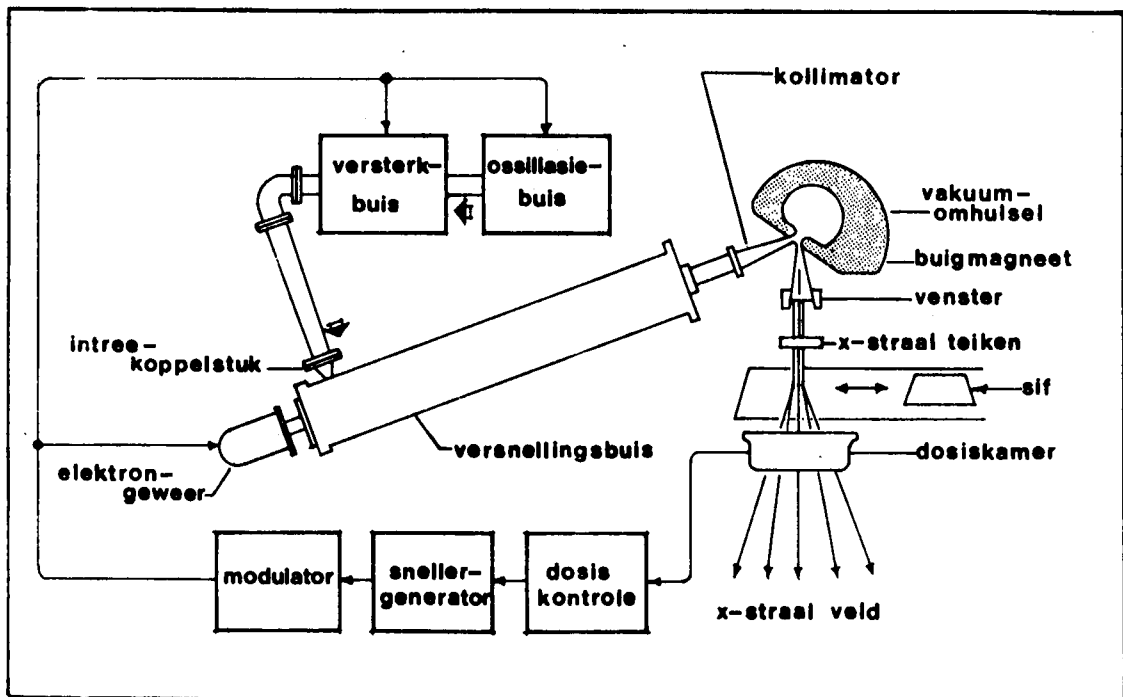
veld. Saam vorm hulle 'n elektromagnetiese veld, wat na die uittreekant van die versnellingsbuis teen byna die snelheid van lig beweeg. Dit duur slegs 3,33 nanosekondes vir 'n elektromagnetiese golf om deur 'n afstand van 1 meter deur die golfgang te beweeg.

Die elektriese veldkomponent van die bewegende golf is gering langs die as van elke silindriese holte, tussen die irisse van die versnellingsskywe. Elektrone word deur die elektrongeweer in die digste gedeelte gelaat op so 'n tyd=stip dat hul die eerste holte sal bereik net agter 'n gebied van positiewe lading. Laasgenoemde beweeg van iris na iris, en trek die elektrone na die uittreekant van die versnellingsgolfgang. Die bewegende elektromagnetiese veld verloor energie, wat deur die elektrone gewen word. Die versnellingsbuis moet dus nie so lank gemaak word dat die mikrogolwe naderhand soveel energie verloor dat dit nie meer die elektrone tot 'n gewenste snelheid kan versnel nie.

'n Elektronbundel-geleibuis en bundelkollimator kom aan die uittreekant van die versnellingsbuis voor, waarlangs die elektrone na 'n buigmagneet vervoer word. Die bundel sal divergeer wanneer dit die versnellingsbuis verlaat, daarom word die bundelkollimator aangewend om die elektronbundel te vernou tot 'n deursnee van 1 cm.

Hierdie bundel van 1 cm deursnee beweeg deur 'n vakuum omhulsel wat tussen die pole van die buigmagneet voorkom. 'n

Sterk magneetveld buig dan die versnelde elektronbundel deur 'n hoek van 261 grade. Die elektrone verlaat die buigmagneet deur 'n venster bestaande uit dun foelie wat elektrone, maar geen lug deurlaat nie, en val in op 'n elektronsif. Die sif is elektrostaties gelaai. 'n Sekere persentasie elektrone word deur die sif weggelei, terwyl die orige persentasie wat deur die sif beweeg, verstrooi word om 'n bundel van 25 cm by 25 cm te gee.



Figuur 13: 'n Basiese lineêre versneller-sisteem.

2.3 PROSEDURE

2.3.1 TYDSVERLOOP NA OPSTEL VAN KULTURE

Die gemiddelde tydverloop tussen die opstel van kulture

en bestraling, was 24 uur. Indien kulture bestraal word net nadat hul opgestel is, d.w.s. wanneer al die limfosiëte in interfase verkeer, word gevind dat die eerste generasie mitoses 48 tot 54 uur later waargeneem kan word⁽⁴⁸⁾.

Dit volg dus dat waar kulture 24 uur na opstelling bestraal is, die eerste generasie mitoses wat volg op bestraling, 48 uur later waargeneem sal word, d.w.s. 72 uur na die opstel van kulture. Kulture wat 24 uur na opstel bestraal word, verkeer in G_1 of S, d.w.s. 'n weerstandbiedende gedeelte van die siklus⁽¹⁰⁾.

Die eindresultaat behoort dus 'n weerspieëling te wees van die minimum aberrasie-opbrengs verkry deur 'n sekere dosis X-strale en elektrone, terwyl die aantal asook die generasie metafases wat uiteindelik ondersoek is, bepaal sou word deur die invloed van X-strale en elektrone op die mitotiese indeks, delingsvertraging en groeifraksie van die selle.

2.3.2 DOSIS BESTRALING

2.3.2.1 Kilovolt masjien

Dosisse van 500, 750 en 1000 roentgen is onderskeidelik vir 4,76; 7,16 en 9,55 minute aangewend. Dit is gedoen by 'n potensiaalverskil van 90 kilovolt, 'n stroomsterkte van

20 milli-ampère, en 'n applikator van 30 cm lengte. Die afstand tussen die applikator en kulturbotteltjie was 1,3 cm. Geen filter is gebruik nie.

2.3.2.2 Lineêre Versneller

Dieselfde verskillende dosisse elektrone is gebruik teen 'n dosistempo van 200 rads per minuut, 'n applikator van 10 x 10 cm, en op 'n afstand van 100 cm. Elektrone met energieë van 4 MeV en 7 MeV onderskeidelik, is gebruik.

2.3.3 TOESTANDE TYDENS BESTRALING

2.3.3.1 X-Strale

'n Perspexbak gevul met water by 37°C is voor die applikator geplaas. Hierin is die kulturbotteltjie vertikaal gemonteer, op so 'n manier dat die middelpunt van die applikator met die middelpunt van die kultuur ooreengestem het.

2.3.3.2 Elektrone

Elke kulturbotteltjie is sywaarts na die applikator gerig, om die grootste moontlike oppervlak van die kultuur aan die stralingsdosis bloot te stel. Bestraling is in lug by kamertemperatuur gedoen. Voor elke bestraling, hetsy met X-strale of elektrone, is die kulture omgeroer om te verseker dat die limfosiete in suspensie verkeer ty=

dens bestraling.

2.3.4 TYDSVERLOOP NA BESTRALING

Alle kulture is aanvanklik 48 uur na bestraling gestop deur die byvoeging van colcemid (GIBCO, 10 µg/ml in Hanks basiese soutoplossing), waardeur spoelvorming tydens metafase verhoed is. Na 'n totale inkubasieperiode van 72 uur is egter baie swak resultate verkry met kulture wat met elektrone bestraal is, en die kultuurperiode is toe verleng na 96 uur. Feitlik dieselfde aantal metafases is na 4 MeV elektronetoediening verkry as wat na 72 uur met X-straal behandelde kulture verkry is, maar die 7 MeV kulture het steeds so 'n geringe aantal metafases getoon, dat dit uit die eksperimentele data gelaat is.

2.3.5 OES VAN KULTURE

Colcemid is drie uur voor verstryking van die inkubasieperiode in die onderskeie kulture bygevoeg. Die volgende prosedure is hierna gevolg:

- (i) Na byvoeging van colcemid is die kulture teruggeplaas in die inkubator, waar dit vir drie uur gelaat is.
- (ii) Na verstryking van die drie uur, is die kulture uit die inkubator gehaal en vir 5 minute by 1000 o.p.m. afgeswaai.

(iii) Die medium is met behulp van 'n pasteurpipet afgetrek totdat ongeveer 1 ml bokant die afgesakte limfosiete en rooiselle behoue gebly het.

(iv) Die selle is in die oorblywende 1 ml medium geresuspendeer, waarna 5 ml Hanks basiese soutoplossing bygevoeg is. Dit is as eerste hipotoniese behandelingsmetode van die selle gebruik.

(v) Die afswaaiproses is herhaal.

(vi) Die soutoplossing is, met uitsondering van 1 ml, afgetrek, waarna pirogeenvrye water as finale hipotoniese behandeling bygevoeg is. Die selle is geresuspendeer. Die water het hemolise van die rooiselle tot gevolg, sodat net die limfosiete agterbly. Hierdie hipotoniese behandeling het opswelling van die limfosiete tot gevolg, wat veroorsaak dat die selwande makliker bars, om sodoende die chromosome vry te stel, wat beter verspreiding veroorsaak.

(vii) Die gesuspendeerde seloplossing is vir 20 minute teruggeplaas in die inkubator.

(viii) Na verloop van die inkubasieperiode, is die oplossing uitgehaal en afgeswaai.

(ix) Die water is afgetrek, die limfosiete is versigtig in die oorblywende 1 ml vloeistof geresuspendeer, en daarna in die pasteurpipet opgetrek.

(x) Carnoy se vloeistof (3 dele metanol: 1 deel ysasyn) is vars opgemaak en 3 ml is in die proefbuis gevoeg, waarna die inhoud van die pasteurpipet in die proefbuis teruggespuit is. Dit het 'n gelyktydige fiksering van al die selle tot gevolg.

(xi) Die gefikseerde selle is oornag in 'n yskas by 4°C gelaat. Die volgende oggend is die proses van fiksering twee keer herhaal. In die finale stap is slegs 1 ml fikseermiddel bygevoeg.

(xii) Voorwerpglasies is vir ten minste twee dae in absolute alkohol (etanol) gelaat om alle vetterigheid te verwyder. Hierna is hul uitgehaal, drooggeevryf en in gedistilleerde water geplaas. Die temperatuur van die water is net bo vriespunt gehou. Bogenoemde prosesse dra by tot die verkryging van goed verspreide metafases op die voorwerpglasies.

(xiii) Die selle is in die pasteurpipet opgetrek, die ergste water van die voorwerpglasie afgeblaas, en 6 tot 8 druppels van die selsuspensie op die voorwerpglasie, wat skuins gehou is, laat val.

(xiv) Die voorwerpglasie is vinnig deur 'n vlam getrek om die oormaat fikseermiddel af te brand, en verder drooggewaai. Die plaatjies was nou gereed vir kleuring.

2.3.6 KLEURTEGNIËK

Giemsa (Merck) en May-Grünwald (Merck) word as kleurstowwe gebruik. Die kleurproses is as volg:

- (i) Plaas in absolute metanol vir 5 minute.
- (ii) Kleur in May-Grünwald vir 6 minute.
- (iii) Spoel ergste kleurstof of in fosfaatbuffer, pH6,8.
- (iv) Kleur in Giemsa vir 3 minute.
- (v) Spoel af in tweede fosfaatbuffer.
- (vi) Spoel af in gedistilleerde water.

Na die kleurproses word die voorwerpglasies op 'n droog=
rak by 40°C geplaas, waarna dekglasies met behulp van
DePeX opgesit word.

3.0 RESULTATE

'n Chromosoom-analise van 821 metafases is gemaak om die
in vitro skade veroorsaak deur X-strale, elektrone en sito=
statika te bepaal. 'n Totaal van 3 634 aberrasies is ge=
vind, waarvan 141 by die 181 metafases wat as kontroles ge=
dien het, teenwoordig was. Die verskillende tipes aberra=
sies is in twee hoofgroepe verdeel, afhangende of 'n hele
chromosoom of slegs 'n chromatied daarby betrokke was.
Chromosoom- en chromatied-aberrasies is op hul beurt weer
in 8 en 7 groepe onderskeidelik, verdeel. Sekere van hier=
die aberrasies was beperk tot dieselfde chromosoom of chro=

matied, en is geklassifiseer as intraruil-tipe aberrasies; terwyl waar meer as een chromosoom of chromatied deel gevorm het van 'n aberrasie, dit as verteenwoordigend van die interrui-tipe aberrasie beskou is.

Nie alle aberrasies teenwoordig is vir hierdie ondersoek gebruik nie, maar slegs die wat meer geredelik uitgeken kon word. Interpretasie van en onderskeid tussen die verskillende tipes aberrasies, is gedoen volgens die klassifikasiesisteen soos gepubliseer in UNSCEAR (1969)⁽³¹⁾.

'n Addisionele tipe aberrasie, naamlik chromosoom- en chromatiedbreuke is hierby gevoeg, aangesien hierdie tipe aberrasie sedert 1969 as 'n egte aberrasie, en nie slegs 'n "gaping" nie, bewys is⁽³⁰⁾.

Uitkenning van aberrasie is gedoen vanaf foto's wat gemaak is van metafases wat met 'n Zeiss fotomikroskoop op 35 mm swart-en-wit film afgeneem is. Op hierdie manier is 'n finale gemiddelde vergroting van 7000 verkry.

Die resultate wat verkry is, word in die onderstaande tabelle aangetoon, terwyl die grafieke ter illustrasie dien van die verband tussen sekere tipes aberrasies in terme van hoeveelheid en dosis; tipe bestraling, ens., wat gevind is.

Tabel I gee 'n uiteensetting van die verskillende tipes chromosoom-aberrasies wat vir die ondersoek in ag geneem is by die verskillende dosisse of konsentrasies bestraling

TABEL I

TIPES CHROMOSOOM-ABERRASIES VERKRY MET X-STRALE, ELEKTRONE EN SITOSTATIKA

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	AANTAL META= FASES ONDER= SOEK	TIPES ABERRASIES							
			TERMINALE DELESIES	KOLDELESIES	ASENTRIESE RINGE	DISENTRIESE CHROMOSOOM & FRAGMENTE	SENTRIESE RING & FRAGMENT	BREUKE	TRISENTRIESE CHROMOSOOM & FRAGMENT	ENDOREDU= PLIKASIE
X-strale 90 kV Elektrone 4 MeV	500	153	162	324	9	67	3	46	0	0
	750	174	187	281	3	73	10	42	2	1
	1000	89	129	314	12	58	10	19	9	0
	Kontrole	60	1	15	0	0	0	5	0	0
	500	31	10	158	1	6	0	1	0	0
	750	9	2	107	0	0	0	0	0	0
	1000	59	38	95	5	42	1	0	2	0
	Kontrole	52	0	8	0	0	0	8	0	0
Tipe sitosta= tika	Konser= trasie									
Bleomisien	0,4 µg/ml	30	2	17	0	4	0	9	0	0
Endoksaan	30 µg/ml	95	4	6	0	0	0	22	0	0
5-Fluoro-ura= siel	20 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrole	67	3	5	0	0	0	6	0	0

Dieselfde aantal kulture is vir elke tipe- en dosisbestra-
ling sowel as elke tipe sitostatikum gebruik, opgestel.
Die getal metafases aangetoon in kolom 3, is die aantal
bruikbare metafases by elke kultuur gevind. Soveel moont-
lik metafases is in elke afsonderlike geval gefotografeer
om waardes te verkry wat so na as moontlik aan 'n statis-
ties betroubare weergawe van gebeurtenisse is. Om hier-
die rede word die aantal metafases gevind by 750 λ elek-
trone, as ontoereikend beskou.

Uit die tabel blyk dit dat heelwat minder metafases na
elektrone-toediening verkry is as met X-strale, ten spyte
van die feit dat die kultuurtyd in eersgenoemde geval ver-
leng is na 96 uur, nadat geen metafases 48 uur na bestra-
ling (72 uur na aanvang van kultuur) gevind is nie. Dit
dui op 'n groter verlenging van die selsiklus na elektrone-
behandeling as in die geval van X-strale. Onderlinge ver-
skille tussen kulture wat op dieselfde tydstip en oor 'n
periode van bykans twee jaar opgestel is, bemoeilik die be-
paling van die presiese oorsaak hiervoor verantwoordelik.
Daar kan dus net bespiegel word oor die moontlike rol van
delingsvertraging, die groeifraksie, PHA, letale aberra-
sies, ens.

By die verskillende sitostatika is drie keer meer metafases
na endoksaan-toediening verkry as met bleomisien. Dit
hou verband met die feit dat endoksaan nie alleen propor=

sioneel minder aberrasies veroorsaak nie, maar dat die aberrasies ook van 'n minder gekompliseerde tipe is, soos aangedui deur die afwesigheid van disentriese chromosome. Terselftertyd word verwag dat bleomisien chromosoom-aberrasies sal veroorsaak, aangesien dit met DNA reageer. Daarenteen is die werking van endoksaan sodanig dat dit net chromatied-aberrasies in generasie 1 tot gevolg het. Dat daar wel chromosoom-aberrasies teenwoordig is, is 'n bewys dat sekere van die ondersoekte metafases in generasie 2 verkeer het. Geen metafases is met 5-fluoro-urasiel verkry nie, wat, soos verwag word, daarop dui dat DNA-sintese letaal verhoed is.

Die verskillende tipes en aantal chromatied-aberrasies word in tabel 2 op dieselfde manier geïllustreer.

Uit tabel 2 blyk dat dat, met voorbehoud van die rol wat die groter aantal ondersoekte metafases mag speel, die grootste verskeidenheid chromatied-aberrasies by 750 R X-strale gevind is. Die algemene prentjie by elektrone is ook dié van 'n kleiner verskeidenheid en groter opeenhoping van sekere tipes aberrasies.

Die feit dat endoksaan meer chromatied- as chromosoom-aberrasies tot gevolg gehad het, dui daarop dat die meerderheid metafases in generasie 1 tydens die byvoeging van colcemid verkeer het.

TABEL 2

TIPES CHROMATIED-ABERRASIES VERKRY MET X-STRALE, ELEKTRONE EN SITOSTATIKA

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	AANTAL META= FASES ONDER= SOEK	TIPES ABERRASIES						
			TERMINALE DELESIES	KOLDELESIES	ASENTRIESE RINGE	SENTRIESE RINGE	BREUKE	ISOCHROMATIED DELESIES	DISENTRIESE CHROMATIED
X-strale 90 kV	500	153	86	261	3	0	68	9	0
	750	174	30	219	5	1	64	0	1
	1000	89	1	193	2	0	39	0	0
	Kontrole	60	0	32	0	0	19	0	0
Elektrone 4 MeV	500	31	0	112	0	0	15	0	0
	750	9	0	62	0	0	4	0	0
	1000	59	0	19	2	0	13	0	0
	Kontrole	54	0	8	0	0	14	0	0
Tipe sitosta= tika	Konsen= trasie								
Bleomisien	0,4 µg/ml	30	1	6	0	0	60	0	0
Endoksaan	30 µg/ml	95	0	5	0	0	39	0	0
5-Fluoro-ura= siel	20 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrole	67	0	0	0	0	17	0	0

In tabelle 3, 4 en 5 word die totale aantal aberrasies per sel gevind, aangetoon in terme van dosis by X-strale en elektrone; en konsentrasie van die sitostatika toegedien. Aberrasies is in twee hoofgroepe verdeel, synde van 6f chromatied- of chromosoom-tipes.

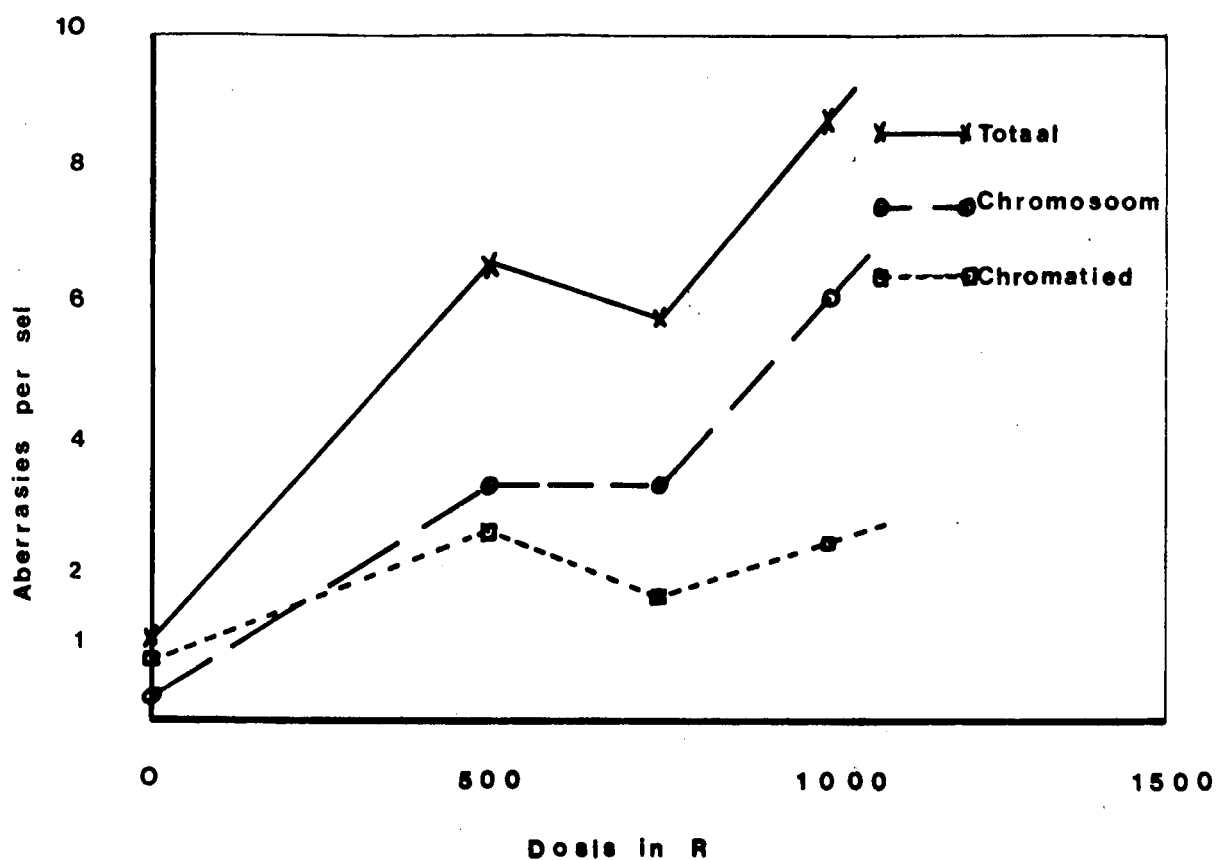
TABEL 3

ABERRASIES VERKRY MET X-STRALE (90 kV)

DOSIS IN R	CHROMOSOOM- ABERRASIES PER SEL	CHROMATIED- ABERRASIES PER SEL	TOTALE ABERRASIES PER SEL
500	3,40	2,79	6,79
750	3,43	1,84	5,85
1000	6,19	2,64	8,82
Kontrole	0,35	0,85	1,2

Die resultate aangetoon in tabel 3, word grafies in figuur 14 voorgestel ten opsigte van totale aberrasies per sel, chromosoom-aberrasies per sel en chromatied-aberrasies per sel teenoor toegedienende dosis X-strale.

'n Progressiewe toename met dosis van chromosomale aberrasies per sel word gevind. Slegs 'n geringe toename kom voor wanneer die dosis van 500 na 750 R verhoog word, terwyl daar amper 'n verdubbeling van aberrasies tussen 750 en 1000 R plaasvind.



Figuur 14: Aberrasies per sel teenoor toegediende dosis X-strale.

Uit figuur 14 kan gesien word dat die aantal chromosoom-aberrasies per sel feitlik 'n parallele styging met die totale aantal aberrasies per sel by dosisse bokant 750 R X-strale toon, terwyl daar 'n daling in die aantal chromatied-aberrasies vanaf 500 R voorkom. Daar kan dus gesê word dat bokant 750 R, die styging in totale aberrasies per sel, hoofsaaklik te danke is aan die aantal chromosoom-tipe-aberrasies per sel.

Die dalende neiging in totale aberrasies per sel, veral a.g.v. die daling in totale aberrasies per sel tussen dosis=

se van 500 en 750 R, strook nie met wat verwag word nie, en is 'n verskynsel wat verdere ondersoek regverdig. Daar kan dus gesê word dat by 750 R X-strale, 'n verandering in die effek van bestraling ten opsigte van kernmateriaal voorkom, wat nie inpas by die verwagte lineêre styging met dosisverhoging nie.

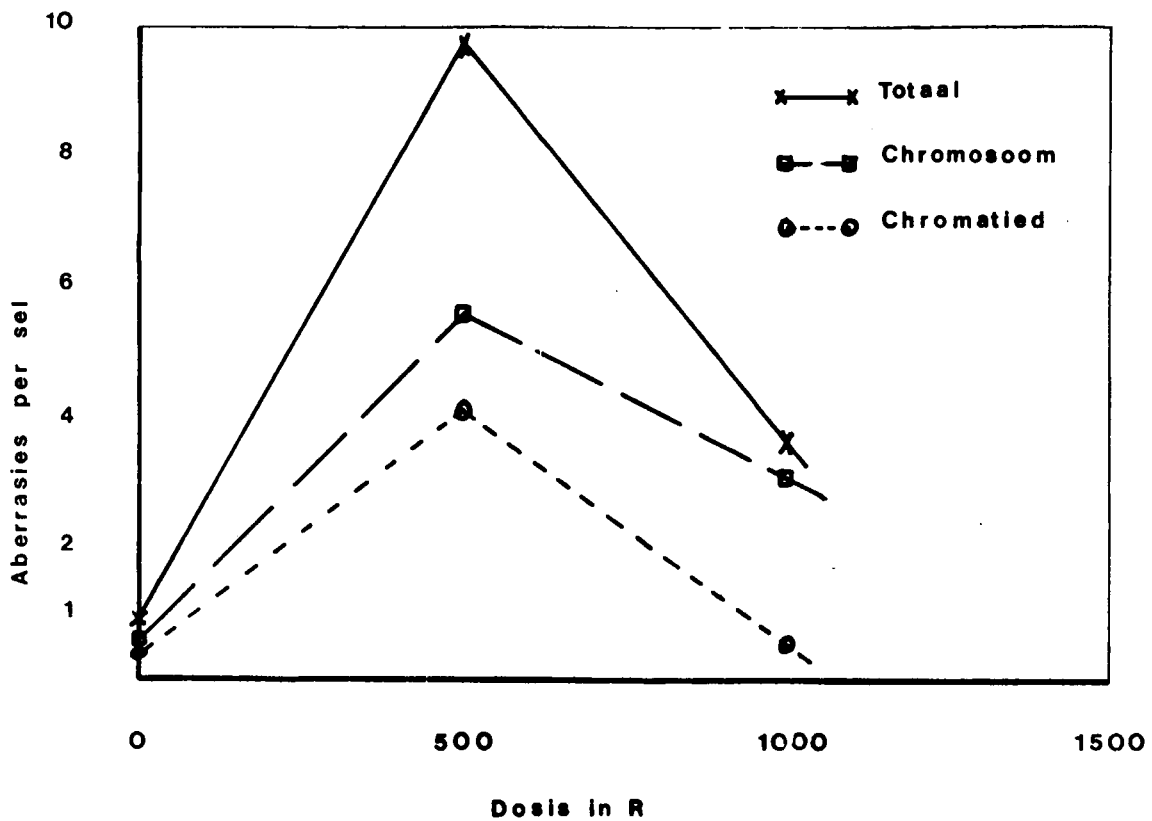
TABEL 4

ABERRASIES VERKRY MET X-STRALE (90 kV)

DOSIS IN R	CHROMOSOOM- ABERRASIES PER SEL	CHROMATIED- ABERRASIES PER SEL	TOTALE ABERRASIES PER SEL
500	5,68	4,10	9,78
750	12,11	7,33	19,44
1000	3,10	0,58	3,68
Kontrole	0,615	0,423	0,96

Die aantal aberrasies per sel soos in tabel 4 aangetoon, word in figuur 15 grafies vergelyk met die toegediende dosis elektrone.

Indien die statistiek verkry by 750 R elektrone buite rekening gelaat word weens statistiese onbetroubaarheid, word uit tabel 4 gesien dat daar 'n algemene daling in die onderskeie tipes aberrasies per sel voorkom met ver=



Figuur 15: Aberrasies per sel teenoor toegediende dosis elektrone.

hoging in dosis, en dat by 1000 R, die aantal chromatied-aberrasies per sel nie veel hoër as dié van die kontrole-kulture is nie. Die patroon van verhoging in chromosoom-aberrasies ten koste van chromatied-aberrasies met toename in dosis, is basies dieselfde as wat by X-strale gevind word, alhoewel dit meer uitgesproke is in eersgenoemde geval.

Die feit dat heelwat minder limfosiëte die elektrone-toediening oorleef het as in die geval by X-strale, dui daarop dat meer letale aberrasies ontstaan het en dat hierdie letaliteit lineêr toeneem met verhoging in dosis en energie

van die toegediende elektrone. Dit word gestaaf deur 'n meer dramatiese styging in chromosoom- teenoor chromatied-aberrasies met dosistoename en die feit dat na bestraling met 7 MeV elektrone, slegs 6 metafases by 500 R toediening verkry is, terwyl daar 'n totale afwesigheid van metafases by 750 en 1000 R was.

TABEL 5

ABERRASIES VERKRY MET SITOSTATIKA

KONSENTRASIE	CHROMOSOOM- ABERRASIES PER SEL	CHROMATIED- ABERRASIES PER SEL	TOTALE ABERRASIES PER SEL
Bleomisien 0,4 µg/ml	1,066	2,233	3,300
Endoksaan 30 µg/ml	0,337	0,463	0,800
Kontrole	0,209	0,254	0,463

Bleomisien veroorsaak bykans vier keer meer aberrasies per sel as endoksaan. Heelwat minder metafases is ook met bleomisien verkry, wat inpas by bogenoemde verskynsel. Wat beide tipes aberrasies betref, is dit duidelik dat bleomisien en endoksaan minder effektief is in die produksie van aberrasies as X-strale en elektrone. Die aantal aberrasies deur endoksaan geproduseer, is nie veel hoër as die kontrole-frekwensies nie. Die groter chromatied- as chromosoom-aberra-

rasies by bleomisien, toon die minder ernstige effek wat dit op kernmateriaal het.

Tabel 6 is 'n voorstelling van die frekwensie van chromosomale intraruil per sel by die verskillende dosisse en konsentrasies bestraling en sitostatika.

Uit tabel 6 blyk dit dat koldelesies die mees algemene tipe chromosomale intraruil per sel is wat voorkom.

'n Stelsematige verhoging in chromosomale intraruil word met toename in dosis X-strale gevind, met uitsondering van die daling wat in koldelesies, sentriese en asentriese ringe voorkom by 'n dosis van 750 R.

By die dosis van 750 R elektrone word die statistieke weereens geïgnoreer, waarna 'n styging in terminale dele-sies en sentriese en asentriese ringe verkry word, terwyl daar 'n afname in koldelesies by 1000 R voorkom. Die toename in chromosomale intraruil vind dus oor 'n breër front plaas by elektrone as in die geval van X-strale.

Wat die sitostatika betref, is dit duidelik dat, afgesien daarvan dat chromosomale intraruil teen laer frekwensies voorkom, dit beperk is tot terminale- en koldelesies. Die feit dat geen sentriese of asentriese ringe teenwoordig is nie, dui daarop dat chromosomale breuke deur sitostatika veroorsaak, so na aan mekaar geleë is, dat slegs terminale-

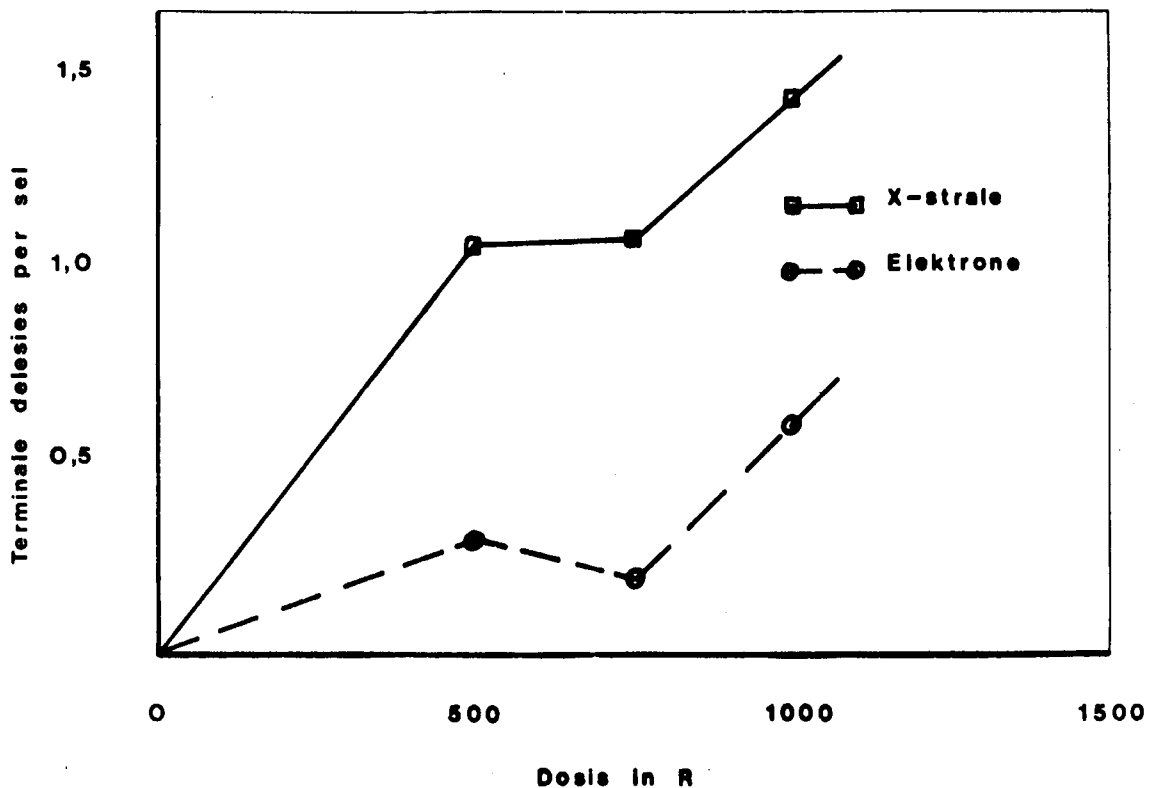
TABEL 6

CHROMOSOMALE INTRARUIL PER SEL VERKRY MET X-STRALE, ELEKTRONE EN SITOSTATIKA

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	TERMINALE DELESIES	KOLDELESIES	SENTRIESE RINGE & FRAGMENTE	ASENTRIESE RINGE
X-strale 90 kV	500	1,059	2,118	0,0196	0,0588
	750	1,075	1,615	0,0574	0,017
	1000	1,450	3,528	0,112	0,135
	Kontrole	0,017	0,25	0,000	0,000
Elektrone 4 MeV	500	0,323	5,077	0,000	0,323
	750	0,222	11,889	0,000	0,000
	1000	0,644	1,610	0,0166	0,085
	Kontrole	0,000	0,15	0,000	0,000
Tipe Sitosta=tika	Konsen=trasie				
Bleomisien Endoksaan	0,4 µg/ml	0,067	0,567	0,000	0,000
	30 µg/ml	0,042	0,063	0,000	0,000
	Kontrole	0,044	0,074	0,000	0,000

en koldelesies gevorm kan word. Daar is dus 'n merkbare verskil in afstand tussen aberrasies veroorsaak in die= selfde chromosoom by sitostatika in vergelyking met X-strale en elektrone. Dieselfde argument kan gebruik word om aan te toon dat die gemiddelde afstand tussen breuke, groter by elektrone as X-strale is.

In figuur 16 word die aantal terminale chromosoom-delesies grafies vergelyk met die toegediende dosis X-strale en elektrone.

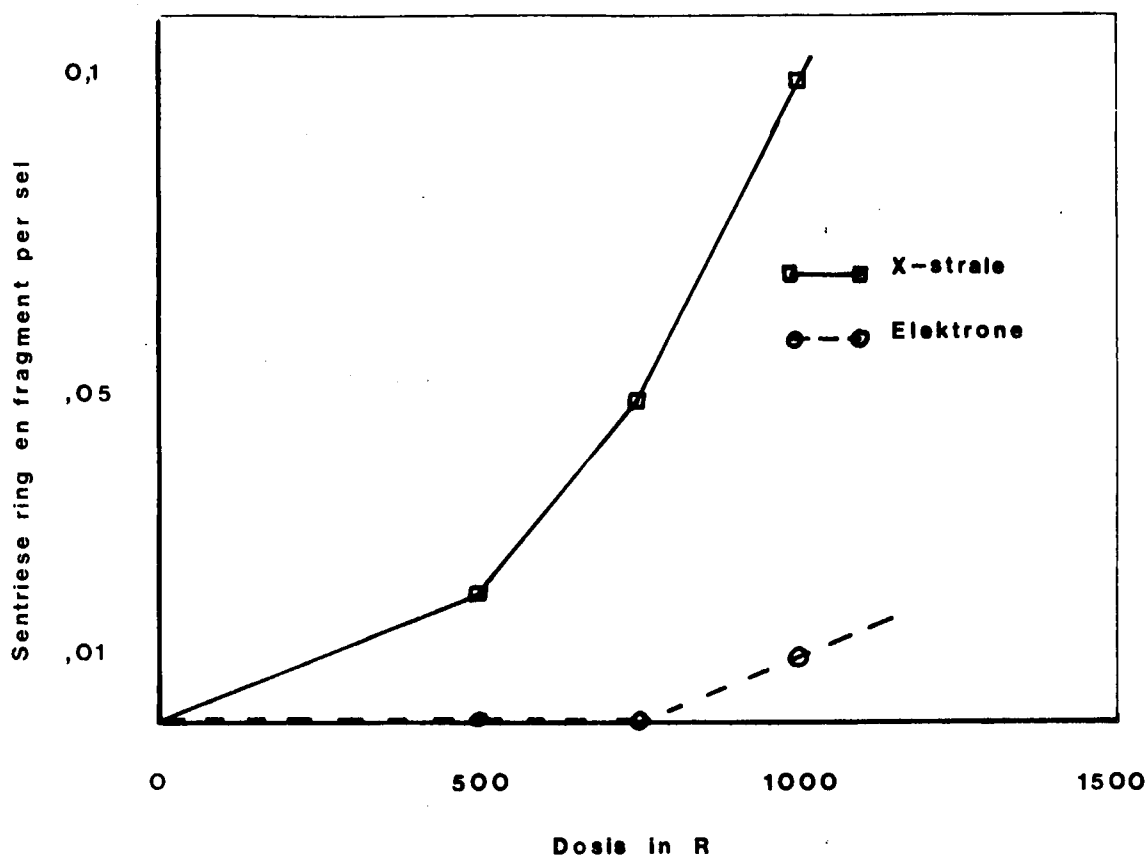


Figuur 16: Aantal terminale chromosoom-delesies teen dosis X-strale en elektrone toegedien.

Indien op sekere van die intraruil-tipe chromosomale aberrasies afsonderlik gelet word, word gevind dat die aantal terminale delesies per sel, merkbaar hoër by X-strale as elektrone is. As in gedagte gehou word dat hierdie tipe terminale delesies die gevolg is van enkelbreuke dwars oor die chromosoom of mag ontstaan a.g.v. onvolledige hegting van die gebreekte eindes van 'n persentriese inversie, mag die resultate 'n weerspieëling wees van 'n groter aantal chromosomale enkelbreuke en onvolledige hegings by X-strale as elektrone. Indien die effektiwiteit van X-strale en elektrone by die verskillende dosisse uitgedruk word in terme van terminale delesies per sel per roentgen, word gevind dat dit by X-strale die hoogste is by 500 R, nl. 0,0021, terwyl dieselfde waardes by 750 en 1000 R verkry word, nl. 0,0014. In die geval van elektrone word net soveel terminale delesies per sel per roentgen by 500 R geproduseer as by 1000 R, nl. 0,00064.

In figuur 17 word die chromosoom-tipe-sentriese ringe en fragmente in terme van voorkoms per sel, met die dosis X-strale en elektrone vergelyk.

Die opvallendste verskil tussen X-strale en elektrone by hierdie tipe chromosomale intraruil-aberrasie, is dat sentriese ringe eers by 1000 R deur elektrone gevorm word. By X-strale daarenteen is daar 'n lineêre verhoging met toename in dosis vanaf 500 R. Daar skyn dus 'n hoë drum-



Figuur 17: Sentryese ringe en fragmente teenoor toegedien= de dosis.

pelwaarde te wees vir die produksie van sentriese ringe en fragmente deur elektrone.

Die voorkoms van chromosomale interrui soos verteenwoordig deur die aantal disentryese chromosome en fragmente per sel, word in tabel 7 by die onderskeie toegedien=de dosisse en konsentrasies bestraling en sitostatika gegee.

Die frekwensie waarteen disentryese chromosome en fragmente voorkom, is 'n goeie aanduiding van hoe ver ionisasie vanne=

TABEL 7

CHROMOSOMALE INTERRUIL PER SEL VERKRY MET X-STRALE,
ELEKTRONE EN SITOSTATIKA

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	DISENTRIESE CHROMOSOOM & FRAGMENTE
X-strale 90 kV	500	0,438
	750	0,420
	1000	0,652
	Kontrole	0,000
Elektrone 4 MeV	500	0,194
	750	0,000
	1000	0,712
	Kontrole	0,000
Tipe sitosta= tika	Konsen= trasie	
Bleomisien	0,4 µg/ml	0,133
Endoksaan	30 µg/ml	0,000
	Kontrole	0,000

kaar plaasgevind het. Slegs dié gebreekte punte wat nader as 'n sekere afstand van mekaar lê, sal heg om 'n disentriese chromosoom te vorm. Indien dit as uitgangspunt gebruik word, kan uit tabel 7 afgelei word dat daar 'n viniger toename in ionisasies per eenheidsafstand by elektrone voorkom as by X-strale, en dat dit die hoogste is by 1000 R elektrone. By laer dosisse, bv. 500 R, neig die

aantal ionisasie per eenheidsafstand egter om hoër te wees as by elektrone.

By endoksaan, indien die frekwensie van die totale aantal aberrasies in ag geneem word, vind die ionisasie te ver van mekaar plaas om disentriese chromosome tot gevolg te hê, terwyl die waarde verkry met bleomisien, bykans vergelykbaar is met die waarde verkry by 500 R elektrone.

Tabel 8 gee 'n uiteensetting van chromatied-intraruil per sel in terme van toegediende dosis X-strale en elektrone; sowel as konsentrasies sitostatika gebruik.

Die dalende tendens wat terminale delesies by X-strale volg en die afwesigheid by elektrone dui daarop dat, met verhoging van dosis en energie van bestraling, die aantal enkelbreuke of onvolledige hegtings by X-strale afneem en verdwyn by elektrone. Dubbelbreuke ontstaan in 'n toemende mate soos weerspieël deur die frekwensie van koldelesies. Hierdie breuke is so na aan mekaar dat sentriese en asentriese ringe teen 'n baie lae frekwensie by die verskillende dosisse X-strale aanwesig is en feitlik afwesig is by elektrone.

By bleomisien kom terminale- en koldelesies voor, terwyl dit by endoksaan beperk is tot koldelesies. By endoksaan is chromatied-intraruil dus beperk tot dubbelbreuke na aan mekaar geleë, terwyl by bleomisien daar 'n mengsel van en-

TABEL 8

CHROMATIED-INTRARUIL PER SEL VERKRY MET X-STRALE, ELEKTRONE EN SITOSTATIKA

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	TERMINALE DELESIES	KOLDELESIES	SENTRIESE RINGE	ASENTRIESE RINGE
X-strale 90 kV	500	0,55	1,71	0,000	0,020
	750	0,17	1,26	0,006	0,029
	1000	0,011	2,17	0,000	0,022
	Kontrole	0,000	0,53	0,000	0,000
Elektrone 4 MeV	500	0,000	3,61	0,000	0,000
	750	0,000	6,89	0,000	0,000
	1000	0,000	0,32	0,000	0,034
	Kontrole	0,000	0,15	0,000	0,000
Tipe Sitosta= tika	Konsen= trasie				
Bleomisien	0,4 µg/ml	0,033	0,200	0,000	0,000
Endoksaan	30 µg/ml	0,000	0,053	0,000	0,000
	Kontrole	0,000	0,000	0,000	0,000

kelbreuke en nabymekaar geleë dubbelbreuke gevorm word.

Die waardes gevind vir die interruiel-tipe chromatied-aberrasies by verskillende dosisse en konsentrasies X-strale, elektrone en sitostatika, word in tabel 9 aange=toon.

TABEL 9

CHROMATIED- INTERRUIL PER SEL VERKRY MET X-STRALE,
ELEKTRONE EN SITOSTATIKA

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	DISENTRIESE CHROMATIED
X-strale 90 kV	500	0,000
	750	0,0057
	1000	0,000
	Kontrole	0,000
Elektrone 4 MeV	500	0,000
	750	0,000
	1000	0,000
Tipe Sitosta= tika	Konsen= trasie	
Bleomisien	0,4 g/ml	0,000
Endoksaan	30 g/ml	0,000
	Kontrole	0,000

Met uitsondering van 750 R X-strale, is daar 'n totale af=wesigheid van chromatied-interruiel. Die enigste gevolgtrek=king wat hieruit gemaak kan word, is die afwesigheid van

enkel-ionisasie geleë op 'n afstand wat disentriese chromosoomvorming tot gevolg sal hê.

Tabelle 10 en 11 is 'n voorstelling van die aantal chromosoom- en chromatiedbreuke per sel per toegediende dosis of konsentrasie X-strale, elektrone en sitostatika.

TABEL 10

CHROMOSOOMBREUKE PER SEL

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	BREUKE PER SEL
X-strale 90 kV	500	0,30
	750	0,24
	1000	0,21
	Kontrole	0,083
Elektrone 4 MeV	500	0,032
	750	0,000
	1000	0,000
	Kontrole	0,015
Tipe sitostatika	Konsentrasie	
Bleomisien	0,4 µg/ml	0,000
Endoksaan	30 µg/ml	0,000
	Kontrole	0,000

Chromosoom- en chromatiedbreuke verteenwoordig dubbele en enkel subchromatied-aberrasies. Breking vind nie oor die

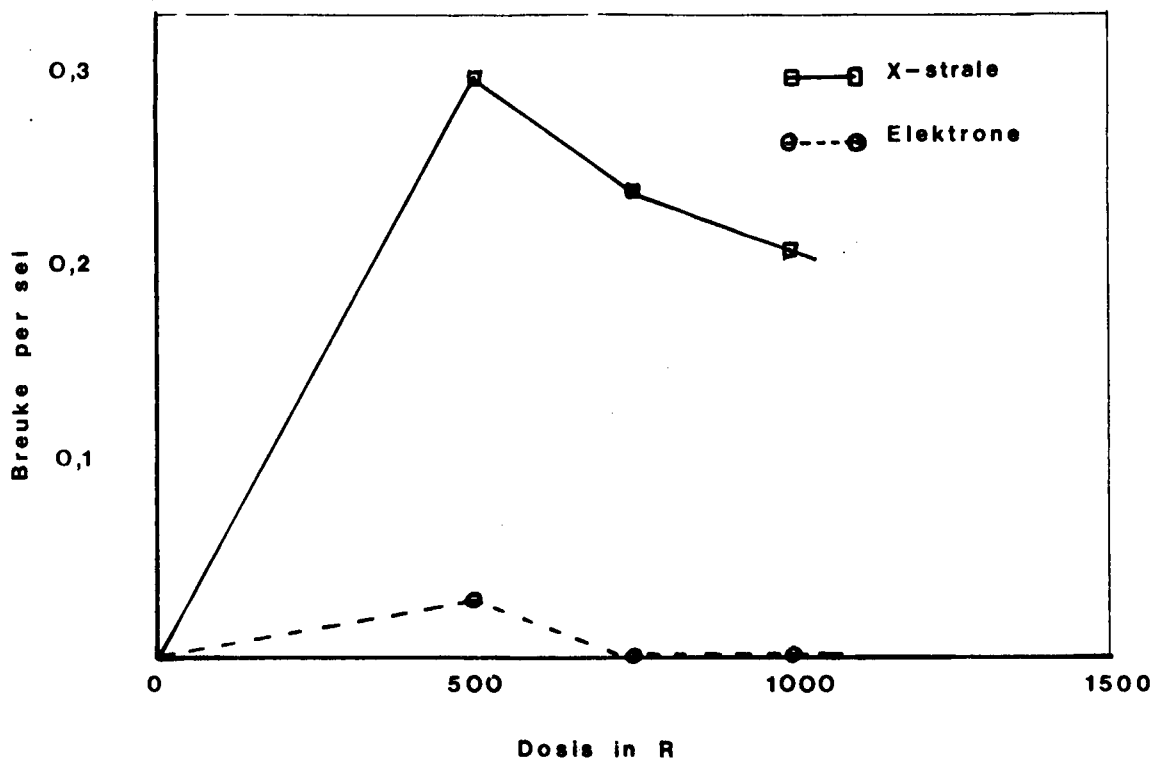
TABEL 11

CHROMATIEDBREUKE PER SEL

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	BREUKE PER SEL
X-strale 90 kV	500	0,44
	750	0,37
	1000	0,438
	Kontrole	0,083
Elektrone 4 MeV	500	0,48
	750	0,44
	1000	0,22
	Kontrole	0,26
Tipe Sitosta= tika	Konsen= trasie	
Bleomisien	0,4 µg/ml	2,0
Endoksaan	30 µg/ml	0,41
	Kontrole	0,25

hele breedte van die chromatied plaas nie, sodat die chromatied(e) intakte bly. Dit is die geringste vorm van skade wat onder die ligmikroskoop waargeneem kan word. Uit die tabelle blyk dit dat meer enkel- as dubbel subchromatiedbreuke voorkom.

Figuur 18 is 'n grafiese voorstelling van chromosoombreuke per sel teenoor dosis X-strale en elektrone.

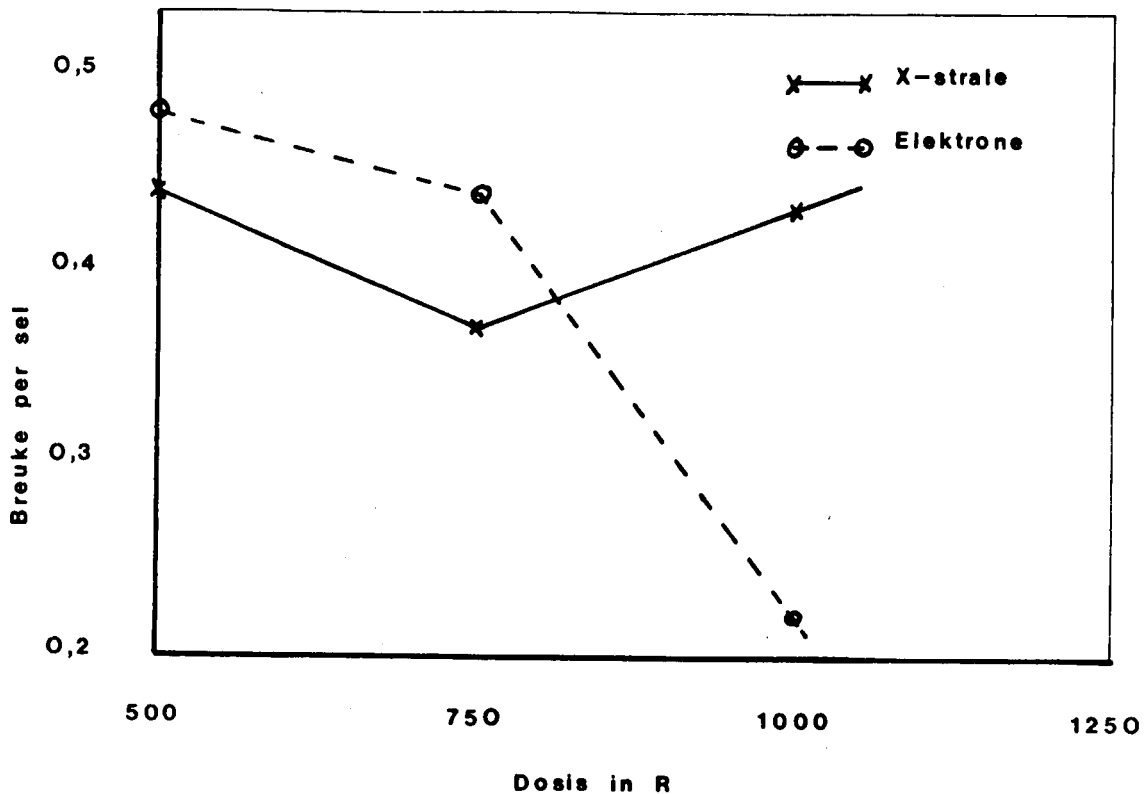


Figuur 18: Chromosoombreuke per sel teen dosis X-strale en elektrone toegedien.

Die kurwes in elektrone en X-strale betreffende die daling in chromosoombreuke met toename in dosis, stem baie ooreen, met dié verskil dat daar 'n laer frekwensie van chromosoombreuke by elektrone is en dat eliminering van die breuke by 'n laer dosis plaasvind.

Figuur 19 toon die aantal chromatiedbreuke per sel volgens toegediende dosis X-strale en elektrone.

Uit figuur 19 is dit duidelik dat die aantal chromatiedbreuke per sel by 'n spesifieke dosis X-strale gevorm, om-



Figuur 19: Chromatiedbreuke per sel teenoor dosis X-strale en elektrone.

gekeerd eweredig is aan die aantal chromatiedbreuke per sel wat by 'n ooreenstemmende dosis elektrone geproduseer word. By 'n teoretiese dosis van 630 R, behoort dan netsoveel breuke deur X-strale as elektrone per sel geproduseer word. Onderkant hierdie dosis sal meer chromatiedbreuke deur elektrone as X-strale gevorm word, terwyl die teenoorgestelde bo- kant 630 R sal plaasvind.

Tabel 12 gee 'n uiteensetting van die aantal aberrasies per sel by die individuele dosisse X-strale en elektrone, sowel as die totale aantal aberrasies per sel by die onderskeie

tipies bestraling.

TABEL 12

TOTALE ABERRASIES PER SEL PER ROENTGEN BESTRALING

TIPE BESTRALING	DOSIS IN R	ABERRASIES/SEL/ R/ BY 'N SEKERE DOSIS	TOTALE ABER= RASIES/SEL/R
X-strale 90 kV	500	0,0136	0,01006
	750	0,0078	
	1000	0,0088	
Elektrone 4 MeV	500	0,0196	0,01619
	750	0,0253	
	1000	0,0037	

Berekenings wat volgens bogenoemde manier gedoen word, is altyd afhanklik van die minimum en maksimum grense van toegediende dosisse, en aangesien bestraling by slegs drie relatief hoë dosisse uitgevoer is, moet die resultate verkry in hierdie lig gesien word. 'n Wisseling in die aberrasies/sel/R kom by die onderskeie dosisse X-strale en elektrone voor, sodat daar nie sprake van 'n lineêre toename van aberrasies met dosisstygning is nie. Dit mag misleidend wees, aangesien lae-energie aberrasies neig om meer volop voor te kom as die meer gekompliseerde tipies aberrasies wat deur hoë energie bestraling veroorsaak word. (Sien tabelle 3 tot 8). Bogenoemde gegewens moet dus slegs geïnterpreteer word as 'n maatstaf vir die bepaling van effektiwiteit van aberrasie-produksie, sonder dat die biologiese belangrikheid van

die onderskeie tipes aberrasies in ag geneem word.

Indien resultate op hierdie manier beskou word, kan gesien word dat 4 MeV elektrone, 1,51 keer of 51% meer effektief is as 90 kV X-strale in die produksie van aberrasies/sel/R by dosisse van 500, 750 en 1000 R.

4.0 GEVOLGTREKKING

Voordat enige bestraling gedoen kon word, moes 'n suksesvolle metode vir die in vitro kweking van menslike perifere limfosiete ontwikkel word. Die makro-kultuurmetode van Moorhead et al⁽³⁾ is as uitgangspunt gebruik, waarna dit gewysig is om die beste resultate in hierdie laboratorium te verkry. Daar word nie aanspraak gemaak dat 'n suksesvolle gestandaardiseerde kultuurtegniek ontwikkel is nie, maar dat die tegniek onder die spesifieke omstandighede in die betrokke laboratorium, in 90% gevalle tot suksesvolle sitogenetiese ondersoek lei, en dat dit voldoende genoeg was vir die uitvoer van die eksperimente.

Die invloed van ioniserende strale, elektrone en sitostatika op die selsiklus, kon bepaal word deur die aantal disentriese chromosome met of sonder fragmente te gebruik om die mate van sekerheid dat generasie 1 metafases na bestraling of toediening van sitostatika ondersoek is, vas te stel. Disentriese chromosome met fragmente is verteenwoordigend van generasie 1 metafases, en dié sonder fragmente as afkomstig

van generasie 2 en 3 metafases. Indien sekerheid van generasie 1 metafases as 'n persentasie uitgedruk word, is die volgende waardes verkry:

BRON:	% SEKERHEID VAN GENERASIE 1 METAFASES VERKRY:	
Bleomisien	50,0	
500 R X-strale	64,6	72 uur kultuurperiode
750 R X-strale	48,46	
1000 R X-strale	89,46	
500 R Elektrone	75,0	
1000 R Elektrone	75,0	96 uur kultuurperiode

Endoksaan en 750 R elektrone is nie in ag geneem nie, weens óf die afwesigheid van disentriese chromosome óf te 'n klein aantal ondersoekte selle. Hierdie data gee ook 'n goeie aanduiding van die verlenging in tydsduur van die selsiklus by verskillende dosisse X-strale en elektrone, asook by bleomisien, soos uitgedruk in die afname van generasie 2 en 3 metafases.

Uit die grafieke soos aangetoon in die weergawe van resultate gevind, is dit duidelik dat die aberrasies wat die naaste kom aan 'n lineêre styging met toename in dosis tussen 500 en 1000 R, chromosomale sentriese ringe en fragmente by X-strale is, terwyl 'n bykans lineêre daling in chromatiedbreuke met verhoging in dosis elektrone tussen 500 en 1000 R verkry word. Wat die res van die aberrasies betref, kom 'n groter fluktuasie by die verskillende dosisse

X-strale en elektrone voor. Die verskille in tipes en frekwensies van aberrasies geproduseer by die onderskeie dosisse X-strale en elektrone of 'n sekere tipe sitostatikum, is van so 'n aard dat dit as biologiese indikator van geabsorbeerde dosis, tipe bestraling of sitostatikum, en konsentrasie van sitostatikum, aangewend kan word. Die mate van sukses wat bereik word, sal afhang van die effektiwiteit waarmee die individuele aberrasies uitgeken kan word.

Daar word dus voorgestel dat bandpatroontegniese vir die bepaling die tipes aberrasies, sowel as presiese samestelling van aberrasies, gebruik word. Dit is 'n betroubare manier waarvolgens feitlik al die verskillende tipes aberrasies met ewe veel sekerheid bepaal kan word.

Die hoër aberrasie-opbrengste wat verkry is in vergeleke met die data van bv. Mouriquand⁽³¹⁾; Sasaki en Norman⁽⁴⁹⁾; Kelly en Brown⁽⁶³⁾; of Higurashi et al^(72, 73), kan verklaar word deur die makro-kultuurmetode gebruik, die relatief hoë dosisse en nou-grense van variasie in dosisse X-strale en elektrone, asook die feit dat chromosoom- en chromatiedbreuke as addisionele tipes aberrasies geneem is saam met die tipes soos uiteengesit in UNSCEAR⁽³¹⁾. Hierdie stap is as geregverdig bevind, deurdat aangetoon kon word dat chromosomale- en chromatiedbreuke 'n betroubare en maklike uitkenbare tipe aberrasie is in die bepaling van aberrasie-opbrengste.

OPSOMMING

Moorhead se limfosiet-kultuurtegniek is gewysig en aangewend om die in vitro effek van X-strale, elektrone en adisioneel, drie verskillende tipes sitostatika, op menslike metafase-chromosome te ondersoek.

Dosisse van 500, 750 en 1000 roentgen 90 kV X-strale is aangewend. Bestraling van hierdie kulture het in 'n waterbad by 37°C plaasgevind. Dieselfde dosis deur middel van 4 MeV elektrone is toegedien teen 'n dosistempo van 200 rad per minuut. Hierdie prosedures is in teenstelling met die geval by X-strale, by kamertemperatuur uitgevoer.

Die drie sitostatiese middels, nl. endoksaan, 5-fluoro-urasiel en bleomisien, is as voorbeelde van alkilerings-agense, antimetaboliëte en antibiotika onderskeidelik, teen konsentrasies van 30, 20 en 0,4 µg/ml aangewend. Hierdie konsentrasies stem ooreen met dié wat aan pasiënte toegedien word.

Kultuurperiodes het 72 uur by X-strale en sitostatika en 96 uur by elektron-toediening geduur. Bestraling en byvoeging van sitostatika is 24 uur na opstel van kulture gedoen.

Die effek van bogenoemde behandelingsmetodes is bepaal in terme van die hoeveelheid en tipes aberrasies geproduseer

by die onderskeie dosisse en konsentrasies. 'n Vergelykende studie is gemaak van die effekte van die verskillende tipes straling en sitostatika. Klassifikasie van chromosoom- en chromatied-aberrasies is gedoen volgens die V.V.O. verslag aangaande die effek van bestraling, waarby chromosoom- chromatiedbreuke as addisionele tipes aberrasies gevoeg is.

Uit die resultate kon aangetoon word dat die duur van die selsiklus verleng met stygende dosisse X-strale, terwyl die verlenging onder dieselfde omstandighede by elektron-toediening konstant gebly het. In sondering dit die sitostatika betref, het 5-fluoro-urasiel 'n totale inhibering van timidieelsuur tot gevolg gehad, waardeur D.N.A.-sintese, waarvan timidieelsuur 'n voorloper is, verhoed is. Die tydsduur van die selsiklus is die minste geaffekteer deur bleomisien-toediening terwyl die invloed van die endoksaan nie bepaal kon word nie, weens die afwesigheid van aberrasies wat as indikatore gebruik is in die berekening van bogenoemde effek. Hierdie berekenings is gedoen deur bepaling van die persentasie sekerheid dat generasie 1 metafases ondersoek is, deur die aantal disentriese chromosome met fragmente teenwoordig, te vergelyk met dié sonder fragmente. Eersgenoemde word aanvaar as verteenwoordigend van die eerste generasie metafases wat na bestraling of byvoeging van sitostatika hul verskyning in die kultuur maak, terwyl laasgenoemde as verteenwoordigend van generasies 2 en 3 beskou word.

Die mees algemene tipe chromosoom- en chromatied-aberrasies wat voorgekom het, was koldelesies. 'n Lineêre verband tussen toegediende dosis en frekwensie van voorkoms is slegs by twee tipes aberrasies gevind. Sentriese ringe en fragmente het 'n lineêre styging met toename in dosis X-strale getoon, terwyl chromatiedbreuke 'n lineêre daling teenoor 'n stygende dosis elektrone getoon het. Die res van die aberrasies het 'n meer komplekse patroon van wisseling by die onderskeie dosisse en tipes bestraling en sitostatika getoon. Tog was die biologiese belangrikheid van die individuele tipes aberrasies ten opsigte van subletale en letale selskade, duidelik hieruit waar te neem.

Die verskille in aberrasie-opbrengste deur X-strale geproduseer soos vergelyk met die gepubliseerde bevindings, kan verklaar word deur die relatiewe hoë dosisse gebruik, die nou grense tussen laagste en hoogste dosisse, asook die addisionele tipes aberrasies wat tot die klassifikasie-sisteem gevoeg is en wat nie voorheen deur navorsers in 'n volledige aberrasie-klassifikasie ingesluit is nie.

Ten spyte van beperkinge in die identifikasie van sekere chromosomale- en chromatied-aberrasies deur kleurtegnieke anders as bandpatrone, word hierdie metode steeds as 'n gevoelige dosismeter vir die bepaling van geabsorbeerde dosis en tipe bestraling beskou, en werp dit ook lig op die onderlinge verskille in chromosomale-aberrasies deur die

onderskeie tipes sitostatika geproduseer. Die insluiting van chromosoom- en chromatiedbreuke in die klassifikasiesisteem van aberrasies is as geregverdig bevind, aangesien dit aberrasies is wat met 'n groot mate van sekerheid bepaal kon word en goed inpas by die algemene aberrasie-patroon.

VERWYSINGS

1. Evans, H.J., "Actions of radiations on human chromosomes", Physics in Medicine and Biology, (1972), volume 17, number 1, pp. 1 - 13.
2. Amarose, A.P., "Chromosomal anomalies", Overview lecture, (1974).
3. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. and Hungerford, D.A., "Experimental Cell Research", volume 20, p. 613, (1960).
4. Tough, J.M., Buckton, K.E., Baikie, A.G. and Court Brown, W.M., "X-ray induced chromosome damage in man", Lancet, October 15, (1960), pp. 847 - 851.
5. Lerner, R.A. and Dixon, F.J., "The human lymphocyte as an experimental animal"
6. Whitmore, G.F. and Till J.E., "Quantitation of cellular radiobiological responses", Annual Review of Human Genetics, (1963), pp. 347 - 374.
7. Puck, T.T., "Studies of the life cycle of mammalian cells", Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, volume 24, (1964).
8. Price, D.J. and Timson, J., "Temporal variation in mitotic index of phytohaemagglutinin stimulated human lymphocytes", Acta Haematologica, Volume 46, (1971), pp. 321 - 325.
9. Tubiana, M., "The kinetics of tumor cell proliferation and radiotherapy", British Journal of Radiology, volume 44, (1971), pp. 325 - 347.
10. Sinclair, W.S., "Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro", Radiation Research, volume 33, (1968), pp. 620 - 643.

11. Bertalanfly, F.D., "Tritiated thymidine versus colchicine technique in the study of cell population cytodynamics", Laboratory Investigation, volume 13, number 8, (1964), pp. 871 - 886.
12. Whitmore, G.F., Till, J.E. and Gulyas, S., "Radiation induced mitotic delay in L-cells", Radiation Research, volume 30, (1967), pp. 155 - 171.
13. Conard, R.A., "Quantitative study of radiation effects in phytohaemagglutinin-stimulated leukocyte cultures", International Journal of Radiation Biology, volume 16, number 2, (1969), pp. 157 - 165.
14. Ilbery, P.L.T., Rickinson, A.B. and Thrum, C.E., "Blood lymphocyte replicating ability as a measurement of radiation dosage", British Journal of Radiology, volume 44, (1971), pp. 834 - 840.
15. Biberfeld, P., "Morphogenesis in blood lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin (PHA)", Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, section A, supplement number 223, (1971).
16. Tolmach, L.J., Weiss, B.G. and Hopwood, L.E., "Ionizing radiations and the cell cycle", Federation Proceedings, volume 30, number 6, (1971), pp. 1742 - 1751.
17. Doida, Y and Okada, S., "Radiation induced mitotic delay in cultured mammalian cells (L5178Y)", Radiation Research, volume 38, (1969), pp. 513 - 529.
18. Stearner, S.P. and Tyler, S.A., "Radiation mortality in the mouse: Model of kinetics of injury accumulation", Radiation Research, volume 20, (1963), pp. 613 - 630.
19. Mak, S., and Till, J.E., "The effects of X-rays on the progress of L-cells through the cell cycle", Radiation Research, volume 20, (1963), pp. 600 - 613.

20. Sinclair, W.K. and Morton, R.A., "X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells", Radiation Research, volume 29, (1966), pp. 450 - 474.
21. Elkind, M.M. and Kano, E., "Radiation induced age-response changes in Chinese hamster cells. Evidence for a new form of damage and its repair", International Journal of Radiation Biology, volume 19, number 6, (1971), pp. 547 - 560.
22. Dewey, W.C., Humphrey, M. and Jones, B.A., "Relationship between radiation induced mitotic delay and doubling-time of cells", International Journal of Radiation Biology, volume 8, number 6, (1964), p. 605.
23. Newcombe, H.B., "The genetic effects of ionizing radiations", Advances in Genetics, volume 16, (1971), pp. 239 - 303.
24. Bartalos, M. and Baramki, A.B., "Medical Cytogenetics", The Williams and Wilkins Company, Baltimore, (1967), pp. 55 - 70.
25. Taylor, J.H., "Molecular Genetics. Part I", Academic Press, New York, (1963), pp. 96 - 108.
26. Whitehouse, H.L.K., "Towards an understanding of the mechanism of heredity", Edward Arnold Ltd., London, (1968), pp. 181 - 202.
27. De Grouchy, J., Ebling F.J.G., and Henderson, I.W., "Human Genetics", Excerpta medica. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, (1972), pp. 41 - 67.
28. Hoskins, G.C., "Electron microscopic observations of human chromosomes isolated by micrurgy", Nature, number 5002, September 11, 1965.

29. Evans, H.J., "Molecular architecture of human chromosomes", British Medical Bulletin, (1973), pp. 196 - 202.
30. Yu, C.K., "Structure of chromosomes visualized by scanning electron microscopy", Canadian Journal of Genetics and Cytology, volume 13, (1971), pp. 690 - 696.
31. Report of the United Nations Scientific Committee on the effects of atomic radiation", Twenty-fourth session, supplement number 13 (A/7613), December, (1969).
32. Migeon, B.R., and Merz, T., "Artefactual chromatid aberrations in untreated and X-ray treated human lymphocytes", Nature, number 4952, September 26, 1964, pp. 1395 - 1396.
33. Johansen, I., "X-ray-induced single-strand breaks in intracellular D.N.A. in the presence of N-oxyis", International Journal of Radiation Biology, volume 22, number 2, (1972), pp. 178 - 188.
34. Lampert, F., "Coiled supercoiled D.N.A. in critical point dried and thin sectioned human chromosome fibers", Nature New Biology, volume 234, December 8, (1971), pp. 187 - 188.
35. Buckton, K.E., "Chromosome investigations on lymphocytes from irradiated patients: Effects of time in culture", Nature, volume 202, May 16, (1964), pp. 714 - 715.
36. Glass, B., "The study of gene and chromosome mutations in human and other mammalian cell cultures", Testimony in Hearings before the Subcommittee on Research, Development and Radiation of the Joint Committee on Atomic Energy, Congress of the United States, part 1, (1962), pp. 341-349.
37. Stevenson, A.C. and Patel, C., "Effects of chlorambucil on human chromosomes", Mutation Research, volume 18, (1973), pp. 333 - 351.

38. Hsu, L.Y., Strauss, L and Hirschhorn, K., "Chromosome abnormality in offspring of L.S.D. user", *Journal of the American Medical Association*, volume 211, number 6, February 9, (1970), pp. 987 - 989.
39. Meisner, L.F. and Inhorn, S.L., "Chemically-induced chromosome changes in human cells in vitro", *Acta Cytologica*, volume 16, number 1, (1972), pp. 41 - 47.
40. Dishotsky, N.I., Loughman, W.D., Mogar, R.E. and Lipscomb, W.R., "L.S.D. and Genetic damage", *Science*, volume 172, number 3982, April 30, (1971), pp. 431 - 440.
41. Shaw, M.W., "Human chromosome damage by chemical agents", (1970), pp. 409 - 432.
42. Nichols, W.W., Levan, A., Coriell, L.L., Goldner, H. and Ahlström, C.G., "Chromosome abnormalities in vitro in human leukocytes associated with Schmidt-Ruppin Rous Sarcoma virus", *Science*, volume 146, number 3641, October 9, (1964), pp. 248 - 250.
43. Shapiro L.R., Graves, Z.R. and Hirschhorn, K., "Oral contraceptives and in vivo cytogenetic studies", *Obstetrics and Gynaecology*, volume 39, number 2, (1972), pp. 190 - 192.
44. Levitan, M. and Montagu, A., "Textbook of human genetics", Oxford University Press, New York, (1971), pp. 61 - 137.
45. Fetner, R.H. and Porter, E.D., "Multipolar mitosis in the K.B. (Eagle) human cell line and its increased frequency as a function of 250 kV X-irradiation", *Experimental Cell Research*, volume 37 (1965), pp. 429 - 439.
46. Levine, H., "Clinical Cytogenetics", Little, Brown and Company, Boston, (1971), pp. 1 - 89.
47. Warren, S. and Meisner, L., "Chromosomal changes in leukocytes of patients receiving irradiation therapy",

Journal of the American Medical Association, volume 193, (1968), pp. 351 - 358.

48. Sasaki, M.S. and Norman, A., "Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes", *Nature*, volume 214, number 5087, April 29, (1967), pp. 502 - 503.
49. Tough, I.M., Buckton, K.E., Baikie, A.G. and Court-Brown, W.M., "Chromosome-aberrations following partial- and whole-body X-irradiation in man. Dose response relationships", *Human Radiation Cytogenetics*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, (1967), pp. 122-135.
50. Visveldt, J., "Radiation-induced chromosome aberrations", *Acta Radiobiologica Therapy Physics Biology*, volume 2, (1964), pp. 95 - 108.
51. Nowell, P.C., Hungerford, D.A. and Cole, L.J., "Chromosome changes following irradiation in mammals", *Annals of the New York Academy of Sciences*, volume 114, March 31, (1964), pp. 252 - 257.
52. Norman, A., Ottoman, R.E., Sasaki, M. and Veomett, R.C. "The frequency of dicentrics in human leukocytes irradiated in vivo and in vitro", *Radiology*, volume 83, number 1, (1964), pp. 108 - 110.
53. Doida, Y., Tsutomu, S. and Horikawa, M., "Studies on some radiation-induced chromosome aberrations in man", *Radiation Research*, volume 26, (1965), pp. 69 - 83.
54. Buckton, K.E., Langlands, A.O., Smith, P.G., Woodcock, G.E. and Looby, P.C., "Further studies on chromosome aberration production after whole-body irradiation in man." *International Journal of Radiation Biology*, volume 19, number 4, (1971), pp. 369 - 378.

55. Howard, A. and Pelc, S.R., "Synthesis of D.N.A. in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage", *Heredity*, volume 6, (1952), pp. 261-273.
56. Awa, A.A., Bloom A.D., Yoshida, M.C., Neriishi, S., and Archer, P.G., "Cytogenetic study of the offspring of atomic bomb survivors", *Nature*, volume 218, number 5139, April 27, (1968), pp. 367 - 368.
57. Bloom, A.D., Neriishi, S. and Archer, P.G., "Cytogenetics of the in-utero exposed of Hiroshima and Nagasaki", *The Lancet*, July 10, (1968), pp. 10 - 12.
58. Ishimaru, T., Hoshino, T., Ichimaru, M., Okada, H., Tomiyasu, T., Tsuchimoto, T and Yamamoto, T., "Leukemia in atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1 October 1950 to 30 September 1966", *Radiation Research*, volume 45, (1971), pp. 216 - 233.
59. Awa, A.A., Honda, T., Sofuni, T., Neriishi, S., Yoshida, M.C. and Matsui, T., "Chromosome-aberration frequency in cultured blood-cells in relation to radiation dose of A-bomb survivors", *The Lancet*, October 23, (1971), pp. 903 - 905.
60. San Roman, C. and Bobrow, M., "The sites of radiation induced breakage in human lymphocyte chromosomes, determined by quinacrine fluorescence", *Mutation Research*, volume 18, (1973), pp. 325 - 331.
61. Chernay, P.R., Kardon, N.B., Hsu, L.Y., Shapiro, L.R., Beratis, N.G., Kerr, J. and Hirschhorn, K., "A differential technique for chromosome identification and its comparison with fluorescence technique", *Clinical Genetics*, volume 3, (1972), pp. 347 - 356.

62. Cervenka, J., Thorn, H.L. and Gorlin, R.J., "Structural basis of banding pattern of human chromosomes", *Cytogenetics and Cell Genetics*, volume 12, (1973), pp. 81 - 86.
63. Kelly, S. and Brown, C.D., "Chromosome aberrations as a biological dosimeter", *American Journal of Public Health*, volume 55, (1968), pp. 1419 - 1429.
64. Schrek, R., Leithold, S.L. and Friedman, I.A., "Radiosensitivity of normal and leukemic lymphocytes in vitro and in vivo", *Proceedings of the IX congress of the International Society of Haematology*, volume 3, (1963), pp. 421 - 428.
65. Kasakura, S. and Lowenstein, L., "The factors affecting the strength of "one way" simulation with irradiated leukocytes in mixed leukocyte cultures", *The Journal of Immunology*, volume 101, number 1, (1968), pp. 12 - 17.
66. Lindgren, I. and Raekallio, J., "The effect of irradiation on the cultured human leukocytes with special reference to the survival after large doses, *Beiträge pathologica et Anatomica*, volume 135, (1967), pp. 427 - 435.
67. Bora, K.C. and Soper, L., "Influence of temperature on the induction and repair of radiation-induced aberrations in the human chromosome", *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, volume 13, (1971), pp. 364 - 368.
68. Hall, E.J., "The effect of hypoxia on the repair of sublethal radiation damage in cultured mammalian cells", *Radiation Research*, volume 49, (1972), pp. 405 - 415.
69. Liniecki, J., Bajerska, A. and Andryszek, C., "Chromosomal aberrations in human lymphocytes irradiated in vitro from donors (males and females) of varying age."

International Journal of Radiation Biology, volume 19, number 4, (1971), pp. 349 - 360.

70. Clemenger, J.F. and Scott, D., "In vitro and in vivo sensitivity of cultured blood lymphocytes to radiation induction of chromosome aberrations", *Nature New Biology*, volume 234, December 1, (1971), p. 154.
71. Field, E.O., Sharpe, H.B.A., Dawson, K.B., Andersen, V., Killman, S.A. and Weeke, E., "Turnover rate of normal blood lymphocytes and exchangeable pool size in man, calculated from analysis of chromosomal aberrations sustained during extracorporeal irradiation of the blood", *Blood*, volume 39, number 1, January, (1972), pp. 39 - 54.
72. Higurashi, M. and Conen, P., "In vitro chromosomal radiosensitivity in Fanconi's anemia", *Blood*, volume 38, number 3, September, (1971), pp. 336 - 343.
73. Higurashi, M. and Conen, P.E., "In vitro chromosomal radiosensitivity in 'chromosomal breakage syndromes' ", *Cancer*, August, (1973), pp. 380 - 383.
74. Chiduna, A.P., "A study of the radiosensitivity of chromosomes in normal persons and in cases of Down's disease", *GENETIKA*, Volume 6, number 6, (1968), pp. 99 - 110.
75. Mauersberger, B., Krüger, K. und Cerny, M., Beziehungen zwischen karyotyp und Strahlen-empfindlichkeit bei zellin in vitro", *Acta Biologica et Medica Germanica*, Band 15, Heft 1/2, (1965), pp. 164 - 171.
76. Hungerford, D.A., Donnelly, A.J., Nowell, P.C. and Beck, S., *American Journal of human Genetics*, volume 11, (1959), p, 215.
77. Fliedner, T.M., Cronkite, E.P., Bond, V.P., Rubini, J.R. and Andrew, G., *Acta Haematologica*, volume 22, (1959), p. 65.

78. Verleger, H., "Fisika, Deel I", Aurora Drukkers, Pretoria, (1960), pp. 334 - 363.
79. Botha, J.C., Haddad, D.M. and Minnaar P.C., The characteristics and dosimetry of a Mevatron VI and a Mevatron VIII linear accelerator", D. Phil. thesis, (1974).
80. Behrens, C.F., King, F.R. and Carpender, J.W.J., "Atomic Medicine, 5th Edition", The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1969), pp. 91 - 144.
81. Setlow, R.B. and Pollard, E.C., "Molecular Biophysics", Addison Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, (1964), pp. 306 - 347.
82. Johns, H.E. and Cunningham, J.R., "The Physics of Radiology, 3rd Edition", Charles C. Thomas, Publishers, Springfield, Illinois, (1969), pp. 196 - 201.
83. National Commission on Radiation Protection, Report Number 39, January 15, (1971).
84. Neary, G.J., "Chromosome aberrations and the theory of RBE", General Considerations. International Journal of Radiation Biology, volume 9, number 5, (1965), pp. 477 - 502.
85. Knock, F.E., "Anticancer Agents", Charles C. Thomas Publishers, Springfield, Illinois, (1967).
86. Cline, M.J., "Cancer Chemotherapy, volume 1", W.B. Saunders Company, Philadelphia, (1971).
87. Ansfield, F.J., "Chemotherapy of malignant neoplasms. 2nd Edition", Charles C. Thomas Publishers, Springfield, Illinois, (1973).
88. Wheatley, D.N., Mueller, G.C. and Kajiwara, K., "Antimitotic activity of Bleomycin: Time of action in the

mammalian cell cycle", British Journal of Cancer, volume 29, (1974), p. 117.

89. Court-Brown, W.M., Jacobs, P.A. and Tough, I.M., "Problems encountered in understanding population cytogenetic surveys", Human Radiation Cytogenetics, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, (1967), pp. 114 - 121.

