

**BESCHERMING DOOR THIOLVERBINDINGEN
VAN IN VITRO GEKWEekte CELLEN
TEGEN
DE INVLOED VAN RÖNTGENSTRALING**

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT
TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
DR. J. DANKMEIJER, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE, TEN OVERSTAAN VAN EEN
COMMISSIE UIT DE SENAAT TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 15 DECEMBER 1965 TE 15 UUR**

DOOR

ANTOINE JOSEPH VERGROESEN

**GEBOREN TE WELTEVREDEN, NEDERLANDS OOST-INDIË
(THANS DJAKARTA, INDONESIA)
IN 1928**

Promotor: Prof. Dr. J.A. Cohen

ERRATA

<u>Pag.</u>		<u>Staat</u>	<u>Moet zijn</u>
2	r. 4 v.o.	theoriën	theorieën
5	r. 17 v.b.	PH	pH
6	r. 3 v.o.	Dewey, 1963	Dewey, 1963a
8		(formule)	$pK = pH + \log \frac{\epsilon_b - \epsilon_t}{\epsilon_b - \epsilon_z} + \frac{0,505\sqrt{I}}{1+1,6\sqrt{I}},$
8	r. 23 v.b.	extintie	extinctie
9	r. 8 v.o.	waar in	waarin
11	r. 2 v.o.	bestralings	bestraling
12	Tabel 3	geente	geënte
12	Voetnoot	(s.d. $\sqrt{\quad}$ etc.	(s.d. = $\sqrt{\quad}$ etc.)
15	Tabel 4, r. 4	een niveau	één rij
19	onder figuur	FIGUUR 10	FIGUUR 4
22	r. 13 v.b.	Dewey, 1963	Dewey, 1963a
33	r. 3 v.b.	1956	1957
37	r. 3 onder figuur 14	Tx ₁	T ₁ v
40	r. 1 v.o.	vermeld	vermeldt
45	r. 20 v.b.	theoriën	theorieën
47	r. 19 v.b.	punt 2	punt b
47	r. 15 v.o.	zuurstof.Zouden	zuurstof zouden
51	r. 10 v.b.	prophylatic	prophylactic
51	r. 21 v.b.	an	a
51	r. 2 v.o.	an	and

A.J. Vergroesen : Bescherming door thiolverbindingen van in vitro gekweekte cellen tegen de invloed van röntgenstraling.

STELLINGEN

1. De aard van het voedingsvet kan het atherosclerotische proces bij de mens beïnvloeden.
H.J. Thomasson : Ned.Tijdschrift v. Geneesk. 107, 1963, 593-597.
2. Een totale aplasie van de kleine hersenen is geen absoluut beletsel voor het aanleren van een redelijk goede motoriek.
A. Tennstedt : Zbl.allg. Path. 107, 1965, 301-309
3. Het is nodig de Nederlandse bevolking naast de voorlichting over de bescherming tegen de effecten van nucleaire wapens tevens richtlijnen te geven betreffende de bescherming tegen biologische en chemische strijdmiddelen.
4. Een acute weefselbeschadiging kan de autotransplantatie van een menselijke kankercelsuspensie bevorderen.
A. Vaitkevicius et al. : Cancer 18, 1965, 665-670
5. Het regeneratievermogen van reptielen en amfibieën is in belangrijke mate afhankelijk van het aantal zenuwvezels in het beschadigde gebied.
J. Zika en M. Singer : Anat.Rec. 152, 1965, 137-140
6. De opvatting dat het fibrotische proces, zoals dit waargenomen kan worden bij serotonine producerende tumoren, veroorzaakt wordt door een stimulering van de mestcellen is aan bedenkingen onderhevig.
G. Chomette et al. : Ann. d'Anat.pathol. 10, 1965, 61-74.
7. Het is noodzakelijk te achten dat in Nederland op korte termijn normen worden gesteld voor de beoordeling van de invaliditeit ten gevolge van lawaaidoofheid.
H.A.E. van Dishoeck. Ned.Tijdschrift v.Geneesk. 98, 1954, 1342-1347.
H.A.E. van Leeuwen. Tijdschrift v.Soc.Geneesk. 36, 1958, 623- 631.
8. Door alleen proefdieren te gebruiken bij het onderzoek naar de mogelijke stralingsbeschermende werking van chemische verbindingen worden onvoldoende gegevens verkregen.
R.Koch : 1957, Advances in Radiobiology. Edit. G.C. de Hevesy et al. ,
London, Oliver and Boyd, 170- 173.
Z.M. Bacq en P. Alexander : 1961, Fundamentals of Radiobiology 2nd Edit.
London, Pergamon Press.
9. De giftigheid van de thiolverbindingen maakt het onmogelijk deze verbindingen te gebruiken om de mens tegen een totale lichaamsbestraling te beschermen.
10. Het verdient aanbeveling nader te onderzoeken of door lokale toepassing van thiolverbindingen in voldoende hoge concentraties de gezonde weefsels beschermd kunnen worden tijdens radiotherapeutische ingrepen.
J.L. Ambrus et al. : Cancer Research 25, 1965, 609-623

Aan mijn ouders

INHOUD

Hoofdstuk I	INLEIDING	1
Hoofdstuk II	MATERIAAL EN METHODEN	3
II. 1	Herkomst en kweekmethode van de gebruikte cellijnen	3
II. 2	Bepaling van het kolonievormende vermogen	4
II. 3	Bescherming van de cellen tijdens de bestraling	6
II. 4	Variaties van de temperatuur	8
II. 5	Bestraling	9
II. 6	Bepaling van de overleving	9
II. 7	Berekening van de overlevingspercentages en de dosisreductiefactoren	9
Hoofdstuk III	DE STRALINGSGEVOELIGHEID VAN VERSCHILLENDE CELLIJNEN	11
III. 1.	Inleiding	11
III. 2.	Bepaling van de stralingsgevoeligheid	12
III. 3.	Invloed van de pH en temperatuur op de stralingsgevoeligheid	15
III. 4.	Samenvatting	16
Hoofdstuk IV	DE INVLOED VAN ZUURSTOF OP DE STRALINGS-GEVOELIGHEID	17
IV. 1.	Inleiding	17
IV. 2.	Bepaling van de grootte van het zuurstofeffect	18
IV. 3.	De invloed van de pH op het zuurstofeffect	20
IV. 4.	Samenvatting	22
Hoofdstuk V	DE TOXICITEIT VAN THIOLVERBINDINGEN	23
V. 1.	Inleiding	23
V. 2.	De invloed van de concentratie op de toxiciteit	24
V. 3.	De invloed van de pH op de toxiciteit	27
V. 4.	De invloed van enkele andere factoren op de toxiciteit	28
V. 5.	Discussie en samenvatting	30
Hoofdstuk VI	DE BESCHERMENDE WERKING VAN THIOL-VERBINDINGEN	32
VI. 1.	Inleiding	32
VI. 2.	De invloed van de concentratie op de beschermende werking van aminothiolverbindingen	33
VI. 3.	De invloed van de pH op de beschermende werking van amino-thiolverbindingen	37
VI. 4.	De invloed van de temperatuur op de beschermende werking van cysteamine	38
VI. 5.	De beschermende werking van enkele andere thiolverbindingen	39
VI. 6.	Samenvatting	42
Hoofdstuk VII	BESPREKING VAN DE RESULTATEN	43

Hoofdstuk VII	BESPREKING VAN DE RESULTATEN	43
	SAMENVATTING	49
	SUMMARY	51
	LITERATUUR	59

Hoofdstuk I

INLEIDING

De mogelijkheid om levende organismen te beschermen tegen ioniserende straling werd voor het eerst bij muizen aangetoond door Patt et al. (1949) en Bacq et al. (1951). Er ontstond al spoedig grote belangstelling voor dit onderwerp en in tal van laboratoria werd met behulp van zeer uiteenlopende proefopstellingen en met een grote verscheidenheid van stoffen getracht een inzicht te verkrijgen in de aard en de mogelijkheden van deze bescherming. Als een van de belangrijkste toepassingen van de chemische bescherming wordt gezien, het voorkomen van de dood van een bestraald individu ten gevolge van aplasie van het beenmerg of denudatie van het darmslijmvlies. Beide ziektebeelden worden veroorzaakt door het te kort schieten van de verschillende cellen in de noodzakelijke proliferatieprocessen. Als een andere mogelijke toepassing kan voorts gedacht worden aan het gebruik van stralingsbeschermende verbindingen bij de radiotherapie van maligne gezwellen. De stoffen moeten dan zodanig toegepast kunnen worden, dat de normale weefsels om het gezwel minder stralingsgevoelig worden gemaakt, terwijl het gezwel niet of althans in mindere mate beschermd wordt.

Sinds 1950 is over de beïnvloeding van de stralingsgevoeligheid van de weefsels door toediening van chemische verbindingen een zeer groot aantal publikaties verschenen. Daar er een aantal uitstekende recente overzichtsartikelen bestaan over dit onderwerp (Pihl en Eldjarn, 1957, 1958; van Bekkum en Brocades Zaalberg, 1960; Gray, 1960; Doherty, 1960; Bacq en Alexander, 1961; Koch et al., 1961; Shapiro, 1964; Bacq, 1965, en anderen) zal in dit proefschrift geen poging worden gedaan een volledig overzicht van de reeds verschenen publikaties te geven. Uit de literatuurgegevens blijkt, dat de verbindingen wat betreft de aard van de beschermende werking verdeeld kunnen worden in twee groepen:

a. Een groep stoffen, die alleen in het intacte dier bescherming bieden. Hiertoe behoren o. a. de biologische aminen, die door farmacologische effecten op de bloeddorstroming van de weefsels een hypoxie veroorzaken van de te beschermen cellen.

b. Een groep verbindingen, die ook bescherming bieden onder omstandigheden, dat geen farmacologische effecten kunnen optreden en daardoor o. a. gefsoleerde cellen tegen stralingsschade kunnen beschermen.

De bestudering van de tweede groep verbindingen vormde het onderwerp van het in dit proefschrift beschreven onderzoek, waarbij de keuze van de in aanmerking komende stoffen beperkt bleef tot een groep thiolverbindingen. Met het onderzoek werd getracht een bijdrage te leveren tot een beter inzicht in de aard van de cellulaire bescherming, o. a. door een verband te leggen tussen de chemische structuur van de thiolverbindingen en de mate van bescherming die werd geboden.

Bij de keuze van een proefopstelling werden de volgende punten in overweging genomen:

a. De stralingsschade en de bescherming daartegen moest tot uitdrukking komen in de beïnvloeding van het vermogen tot proliferatie van de cellen.

b. Het systeem mocht niet beïnvloed worden door farmacologische effecten van de thiolverbindingen op het extracellulaire milieu.

c. De opstelling moest geschikt zijn om een groot aantal verbindingen in sterk uiteenlopende concentraties te kunnen onderzoeken, zonder dat de toxiciteit van de stoffen de reproduceerbaarheid van de resultaten belangrijk zou beïnvloeden.

d. Bij voorkeur zou de stralingsdosering, nodig voor het waarnemen van een effect op het proliferatieve vermogen van de cellen, vergelijkbaar moeten zijn met de doses, nodig voor het veroorzaken van de dood bij zoogdieren.

De gestelde eisen leidden tot de keus van de door Puck et al. (1955, 1957) ontwikkelde kweektechniek van gefsoleerde zoogdiercellen. Bij de toepassing van deze methode wordt *in vitro* het proliferatieve vermogen van een cel, gehecht aan een vaste onderlaag bepaald, waarbij als criterium wordt gebruikt de vorming van een kolonie na enige dagen kweken door de cel en zijn nakomelingen. De stralingsgevoeligheid van de cellen komt tot uitdrukking in een vermindering van het aantal cellen, dat na bestraling nog tot kolonievorming in staat is. Doordat de cellen hecht aan de onderlaag vastgegroeid zijn, kunnen verschillende oplossingen op de cellen gebracht worden en vervolgens worden uitgewassen. Hierdoor kan ook de incubatieduur nauwkeurig geregeld worden.

In hoofdstuk II wordt aangegeven op welke wijze de boven beschreven techniek door ons werd toegepast en welke materialen bij het onderzoek werden gebruikt. In het daaropvolgende hoofdstuk wordt een beschrijving gegeven van de stralingsgevoeligheid van de cellijnen, waarmee de verschillende experimenten werden uitgevoerd. Hoofdstuk IV geeft de resultaten weer van het onderzoek naar de stralingsgevoeligheid van de cellen onder anoxische omstandigheden. Dit onderzoek was nodig, omdat een mogelijke verklaring van de werking van thiolverbindingen berust op de door oxydatie van deze stoffen veroorzaakte hypoxie van het extracellulaire milieu. Daar reeds geringe hoeveelheden zuurstof de stralingsgevoeligheid sterk beïnvloeden, was het nodig een techniek te gebruiken, die een zo volledig mogelijke anoxie van het milieu teweegbracht. In hoofdstuk V wordt het onderzoek beschreven naar de toxiciteit van de gebruikte thiolverbindingen. Bij het bestuderen van de literatuurgegevens was namelijk reeds bekend geworden, dat de toxiciteit van deze stoffen voor cellen in weefselkweek nog groter was dan de toxiciteit voor zoogdieren. In hoofdstuk VI worden de resultaten vermeld van de bescherming van bestraalde cellen door de verschillende thiolverbindingen. Hierbij werd de invloed van variaties in concentratie en chemische structuur van de verbindingen, alsmede van de zuurgraad en de temperatuur van het medium op de mate van de stralingsbescherming nagegaan. Bij dit onderzoek werd als werkhypothese gepostuleerd, dat niet de concentratie van de SH-groepen, doch die van de thiolaatgroepen bepalend is voor de mate van stralingsbescherming. In het laatste hoofdstuk wordt naar aanleiding van de resultaten nader ingegaan op de juistheid van deze veronderstelling. Tevens worden de verschillende theorieën, die door andere onderzoekers werden opgesteld om de beschermende werking van thiolverbindingen te verklaren, getoetst aan de hand van de eigen resultaten.

Hoofdstuk II

MATERIAAL EN METHODEN

II.1. Herkomst en kweekmethode van de gebruikte cellijnen.

Voor het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd een cellijn gebruikt, die door van der Veen et al. (1958) uit een menselijke nier werd gefsoleerd. Deze heteroploide cellijn, T-cellijn genaamd, bleekde voor ons doel geschikte eigenschappen te bezitten en wordt sinds 1958 op het Medisch Biologisch Laboratorium van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO gekweekt. De T-cellen hechten zich goed aan een onderlaag van glas of Melinex* en vormen onder bepaalde omstandigheden compacte kolonies. Gedurende het onderzoek werden enige malen kolonies, elk gevormd door de nakomelingen van één cel, gefsoleerd op de door Marcus et al. (1956) beschreven wijze. De cellen, behorende tot deze sublijnen van de T-cellijn, bleken meer gelijkvormige kolonies te vormen dan de oorspronkelijke lijn. Na een periode van voortgezette kweek werd een gedeelte van de sublijnen ingevroren en bewaard bij -196°C (zie Bootsma, 1965).

De cellen werden gekweekt in een medium, bestaande uit de fysiologische zoutoplossing volgens Hanks, waarin 6 % gefnactiveerd kalverserum en 0,5 % lactalbumine-hydrolysaat ** aanwezig waren. Per liter medium werden tevens 100 000 I.E. natrium-penicilline G en 100 µgr streptomycine-base toegevoegd. De samenstellende bestanddelen werden gesteriliseerd door passage van een glasfilter ***. Het volledige kweekmedium werd bij 40°C gedurende maximaal een week bewaard en eerst kort voor het gebruik opgewarmd tot kamertemperatuur.

De cellen werden op glas gekweekt in flessen, afgesloten met een stop van siliconrubber, tot de bodem vrijwel geheel volgegroeid was. In dit stadium van de kweek werden de cellen door behandeling gedurende 8 tot 10 minuten bij 37°C met een 0,05% trypsine-oplossing **** van het glas verwijderd. De losgemaakte cellen werden in een monocellulaire suspensie gebracht door de vloeistof ongeveer 10 maal in een pipet op te zuigen en deze vervolgens krachtig tegen de bodem van de fles uit te blazen. Het aantal cellen in de suspensie werd bepaald in een telkamer volgens Bürker. Hierbij werd tevens het aantal cellen gecontroleerd dat klompjes van twee of meer cellen vormde.

Onder normale omstandigheden bleek minder dan 2% van de cellen in klompjes te liggen, waarvan een gedeelte bestond uit zich delende cellen. Aanvankelijk werd ook het percentage dode cellen bepaald, waarbij als criterium werd gebruikt de door Schrek (1943) beschreven kleurbaarheid van de cel in een 0,1 % eosine-oplossing. Indien de culturen om de 3 tot 4 dagen werden overgeënt, bevonden de cellen zich bij overenting nog in de logaritmische groeifase en bleek het percentage dode cellen verwaarloosbaar te zijn. In de later verrichte experimenten werd dit percentage daarom nog slechts incidenteel bepaald. Teneinde bij het overenten een voldoende celopbrengst te verkrijgen, werden de flessen elk met ongeveer 1 miljoen cellen geënt, waarna 10 ml kweekmedium per fles van 200 ml werd ingebracht. De flessen werden na enting bij 37°C gefnubeerd. De cellen hechtten zich binnen enige uren aan de bodem.

* Melinex- synoniem Mylar-, polyethyleen terephthalaat, I.C.I., Engeland.

** Nutr. Bioch. Corp., U.S.A.

*** Seale-Glas G.M.B.H., O-Duitsland, type M, fictieve poriën wijde volgens Bechhold 1,7 - 1,0 µ

**** Nutr. Bioch. Corp., U.S.A.

Het bleek niet nodig tussentijds het medium te verversen en de gesloten flessen bevatten voldoende zuurstof en koolzuur om een goede oxygenatie en zuurgraad van het medium te waarborgen.

II. 2. Bepaling van het kolonievormende vermogen.

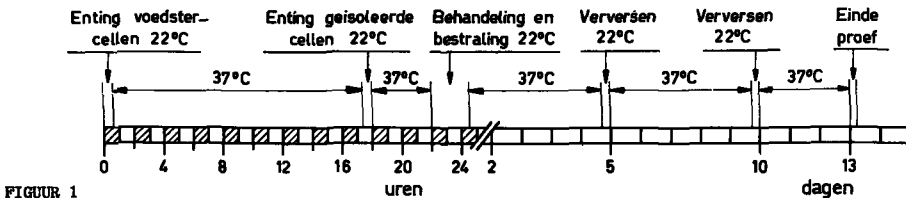
Als criterium voor de overleving van de cellen na bestraling werd gebruik gemaakt van het vermogen van geïsoleerde cellen tot onbeperkte proliferatie. Puck et al. (1957) toonden aan, dat het mogelijk is geïsoleerde cellen op een onderlaag te laten groeien zodanig, dat na een voldoende lange kweekperiode het aantal nakomelingen van elke cel zo groot is geworden, dat de gevormde kolonies macroscopisch zichtbaar zijn. De kolonievorming door geïsoleerde T-cellen treedt slechts in geringe mate op, tenzij de serumconcentratie in het medium wordt verhoogd tot ongeveer 30 %, of gebruik wordt gemaakt van een voldoende aantal voedstercellen. Dit zijn cellen, die na blootstelling aan een hoge stralingsdosis niet meer tot celdeling in staat zijn, doch zich nog wel aan een onderlaag kunnen hechten. Zij conditioneren het medium zodanig, dat de geïsoleerde en wel tot deling in staat zijnde cellen nu voldoende steun ontvangen, om de eerste moeilijke periode na de enting te kunnen doorstaan. De tweede methode om het percentage kolonievormende cellen te vergroten werd door ons verkozen. Het was gewenst de serumconcentratie in het medium zo laag mogelijk te houden, daar de te onderzoeken thiolverbindingen met de serumeiwitten kunnen reageren.

Het kolonievormende vermogen van de T-cellen werd onderzocht door enting in gemodificeerde Petri-schaaltjes. Deze schaaltes werden ontworpen door Barendsen en Beusker (1960) en bestonden uit een 2 cm hoge glazen ring met een diameter van ongeveer 4,5 cm, waarvan de onderzijde afgesloten was met een 25 micron dik vlies van Melinex, dat daaraan met warmhardende Araldite* bevestigd werd. De schaaltes waren afgedekt met glazen dekseltjes. Het gebruik van Melinex als onderlaag bood enige voordelen boven glas. Melinex geeft in tegenstelling tot glas bij bestraling een secundaire elektronenstraling gelijk aan die van het medium, waardoor een nauwkeuriger dosimetrie mogelijk is (Morkovin en Feldman, 1959). De bodem van Melinex is voorts vlakker dan de bodem van de gebruikelijke glazen Petri-schaaltjes. Hierdoor kon een meer homogene verdeling van de opgebrachte celsuspensie worden verkregen. In deze schaaltes werden de cellen gekweekt met 4 ml kweekmedium en 150000 voedstercellen per schaalte. De suspensie van de voedstercellen werd vóór de enting met 4000 rad bestraald.

Voor het onderzoek naar het kolonievormende vermogen van de T-cellen na bestraling onder anoxische omstandigheden werden grotere schalen gebruikt. Deze bestonden uit een 3,5 cm hoge glazen ring met een diameter van ruim 8,5 cm, die voorzien was van 2 ongeveer 3 cm lange glazen in- en uitlaatbuisjes, afgesloten met een gesteriliseerde watteprop. De boven- en onderzijde van de ring waren afgesloten met een vlies van Melinex. Het inlaatbuisje was onder een zodanige hoek aangebracht, dat een instromend gasmengsel in de schalen ging wervelen. Het uitlaatbuisje werd behalve voor afvoer van het gasmengsel, tevens gebruikt om de celsuspensie en andere vloeistoffen in te brengen en af te zuigen. Daar het bodemoppervlak van deze schalen ongeveer 4 maal groter is dan dat van de in de vorige alinea beschreven schaaltes, werden 600000 voedstercellen in 16 ml medium per schaal opgebracht om een vergelijkbaar aantal cellen per eenheid van bodemoppervlakte te verkrijgen.

* Araldite-epoxyhars, Ciba, Zwitserland.

Het gebruikte tijdschema werd in alle experimenten zo constant mogelijk gehouden en wordt schematisch weergegeven in figuur 1. De cel-suspensies werden gemaakt op de wijze als beschreven in II.1., waarna verdunningen werden gemaakt, die per ml zoveel cellen bevatten, dat na toevoeging van 1 ml per schaal-tje na 13 dagen kweken bij 37°C een



FIGUUR 1

Schema, aangevende de tijdstippen, waarop de cellen werden geënt, behandeling en bestraling plaats vonden en het medium werd verversd. Tevens is aangegeven bij welke temperatuur werd gewerkt. De temperatuur van 37°C is nauwkeurig op 0,1°C, de temperatuur van 22°C is nauwkeurig op 2°C.

opbrengst van ongeveer 100 kolonies per schaal-tje verwacht kon worden. Indien de gebruikte stralingsdosis het nodig maakte hiertoe 50000 of meer cellen per schaal-tje te enten, werd het aantal voedstercellen met een gelijk aantal verminderd. De T-cellen hechtten zich bij 37°C binnen 4 uren zo vast aan de onderlaag, dat zij niet meer door verwisseling van het medium verwijderd werden. In het grotere type schalen werd 4 ml suspensie per schaal opgebracht. Bij gebruik van de kleine schaal-tjes werden gedurende het gehele experiment steeds een viertal tegelijk en op dezelfde wijze behandeld.

Daar de kweekschal-tjes niet gasdicht afgesloten waren, was het nodig de kweekkasten regelmatig met CO₂ te doorstromen, om een stijging van de PH van het medium door een verlies aan CO₂ te voorkomen. De kasten konden zodanig afgesloten worden, dat een doorstroming één tot tweemaal daags gedurende 10 minuten met een mengsel van ongeveer 2 % CO₂ in met waterdamp verzadigde lucht, voldoende was om de pH van het medium op $7,3 \pm 0,2$ te houden. Bij een verblijf van de schaal-tjes buiten de kweekkast liep de pH binnen een paar uur langzaam op van ongeveer 7,3 tot ongeveer 8,0. In de loop van het onderzoek bleek, dat deze stijging invloed had op de bescherming door thiolverbindingen. In de periode kort vóór en tijdens de bestraling werden de cellen daarom gefnucubeerd in een medium, waarin de zoutoplossing volgens Hanks was vervangen door de met fosfaat gebufferde zoutoplossing, ontwikkeld door Dulbecco en Voght en beschreven door Parker (1961). De pH van dit medium bleef constant en kon door wijziging in de verhouding van de verschillende fosfaten, ingesteld worden op waarden tussen 6,9 en 7,7. In een aantal experimenten werd de invloed van een pH van 6,3 of 8,3 nagegaan. De gewenste pH werd bereikt door toevoeging van HCl of NaOH aan het met fosfaat gebufferde medium met een pH van respectievelijk 6,9 en 7,7. Sinds 1965 werd gedurende de gehele kweekperiode het met fosfaat gebufferde medium, ingesteld op pH 7,4 gebruikt, daar inmiddels was gebleken dat de celoverleving niet beïnvloed werd, indien de met bicarbonaat gebufferde zoutoplossing tijdens de gehele kweekduur door deze oplossing werd vervangen. Het periodieke doorstromen van de kweekkasten met CO₂ was niet meer nodig en de zuurgraad van het medium bleef goed constant (pH 7,3 tot 7,4).

II. 3. Bescherming van de cellen tijdens de bestraling.

Drie mogelijkheden om de cellen minder stralingsgevoelig te maken werden onderzocht:

- a. Anoxisch maken van het medium.
- b. Incubatie met verschillende thiolverbindingen.
- c. Incubatie met verschillende thiolverbindingen onder anoxische omstandigheden.

De beschermende behandeling werd als regel aangevangen 10 minuten voor het begin van de bestraling en steeds voortgezet tijdens de bestraling. Zoals in II. 2. werd vermeld, werd tijdens deze behandeling steeds het met fosfaat gebufferde medium gebruikt. Na de bestraling werd het medium afgezogen en vervangen door een gelijke hoeveelheid normaal medium. Deze wasprocedure werd tweemaal herhaald.

De invloed van een anoxisch milieu op de overleving na röntgenbestraling werd onderzocht door gezuiverde N_2 te leiden over cellen, die geënt waren in het grote type kweeschaal. Het gas werd van de laatste sporen O_2 gezuiverd door passage van een kolom, gevuld met de B. T. S. * katalysator. Door een glazen systeem, waarin opgenomen een met water gevulde wasfles, werd de gasstroom door het inlaatbuisje in de kweeschaal geleid. Het gebruik van rubber werd zoveel mogelijk beperkt, daar dit materiaal vrij sterk doorlaatbaar is voor O_2 . Tenzij anders vermeld, werd 400 ml N_2 per minuut door de schalen geleid. Het O_2 -gehalte van het uitstromende gasmengsel is afhankelijk van de nog niet verdrongen lucht in de gesloten kweeschaal en de O_2 die nog in het medium opgelost is. Indien het medium tot een rest van minder dan 0,5 ml werd afgezogen, werd bereikt dat na 10 minuten doorstroming de O_2 -concentratie van het uitstromende gasmengsel, gemeten met een "Hersch cell" (Hersch, 1960) **, minder dan drie delen O_2 per miljoen bedroeg. Bij een tweede serie metingen *** met de "Hersch cell" onder dezelfde omstandigheden, werd in tabel 1 vermelde O_2 concentraties gevonden. Bij een derde reeks metingen *** met de "Hersch cell" werd 4 ml medium in de schalen gelaten tijdens de N_2 -overleiding. Zoals te verwachten was duurde het nu langer, voordat de O_2 uit het medium verdreven was. Na 10 minuten werden in het uitstromende gasmengsel nog 30 delen O_2 per miljoen gemeten. Volgens de beschikbare literatuurgegevens (o. a. Howard-Flanders en Alper, 1957; Dewey, 1963) zou deze O_2 -concentratie laag genoeg zijn om dezelfde stralingsgevoeligheid als onder anoxie te veroorzaken.

Tabel 1. De zuurstofconcentratie in het gasmengsel, komende uit een kweeschaal gevuld met 0,5 ml medium en doostroomd met 400 ml stikstof per minuut, gemeten met een "Hersch cell" op verschillende tijden na aanvang van de doorstroming.

Doorstromingstijd (min)	Gemeten stroom in "Hersch cell" (μ A)	Zuurstofconcentratie (delen per miljoen)
3	25	100
5	9	10
7	4	5
10	1	< 1
15	1	< 1

* B. T. S. katalysator, Bad. Anil. u. Soda Ges., Duitsland.

** Deze "Hersch cell" meting werd in 1961 verricht door Dr. A. A. van Soestbergen.

*** Deze metingen werden uitgevoerd door de Heer A. L. M. Roos.

Tabel 2. Overzicht van de gebruikte thiolverbindingen

Thiolverbinding	Structuurformule	Afleveringsvorm	Afkomstig van
Cysteamine (β mercapto-ethylamine)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	1. Réceptan- 10 % cysteamine in neutraal reagerende bufferoplossing, 2 ml per gesteriliseerde ampul. 2. Lambrateene- idem 3. Cysteamine.HCl - kristallen	Labaz., België Bracco Ind.Chem., Italië Calif.Corp.Biochem.Res., U.S.A.
Cysteine	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CH NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	1. l-cysteine.HCl - kristallen 2. l-cysteine.HCl - kristallen 3. d-cysteine.HCl - kristallen 4. d-cysteine.HCl - kristallen	Hoffman La Roche, Zwitserland Brit.Drug Houses, Engeland Nutr.Bioch.Corp., U.S.A. Fluka, Zwitserland
S, 2-aminoethylisothiuronium (AET)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{HN}=\text{C NH}_2 \end{array}$	1. AET Br.HBr - kristallen 2. AET Cl.HCl - kristallen	Dr.D.G.Doherty, Oak Ridge Nat.Lab. U.S.A. Idem
Homocysteine	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	d-l-homocysteine.HCl - kristallen	Nutr.Bloch.Corp., U.S.A.
Glutathion	$\begin{array}{c} \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{O} \quad \text{CH}_2 \quad \text{O} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{COOH SH} \quad \text{CH NH}_2 \\ \quad \quad \quad \text{COOH} \end{array}$	l-glutathion.HCl - kristallen	Fluka, Zwitserland
Penicillamine (β mercapto-d-l-valine)	$\begin{array}{c} \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SH} \\ \\ \text{CHNH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	1. d-l-penicillamine - kristallen 2. beracilline (d penicillaminum.HCl - kristallen)	Aldrich Chem.Corp., U.S.A. Mycopharm, Nederland
2-dimethylaminoethaanthiol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CHN}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$	2-dimethylaminoethaanthiol.HCl - kristallen	Fluka, Zwitserland
2-diethylaminoethaanthiol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CH N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \end{array}$	2-diethylaminoethaanthiol.HCl - kristallen	Light, Engeland
Thioglycol (β mercaptoethanol)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	thioglycol - vloeistof	Light, Engeland
Hydroxycysteine (α hydroxy- β mercapto-propionzuur)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	hydroxycysteine.Na - kristallen	Centraal Chem.Lab. van de Staatsmijnen.
Thioglycolzuur	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	thioglycolzuur - vloeistof	Brit.Drug Houses, Engeland

De thiolverbindingen, die in ons onderzoek gebruikt werden, zijn vermeld in tabel 2. Bij bepalingen van het biologische effect van cysteamine, cysteine en S-2-aminoethylisothiuronium(AET) konden geen waarneembare verschillen aangetoond worden tussen monsters van een bepaalde verbinding, afkomstig van verschillende bronnen. Alle oplossingen werden kort voor het gebruik gemaakt en zonodig met steriele NaOH- en HCl-oplossingen op de gewenste pH ingesteld. De verbindingen werden aseptisch afgewogen of afgemeten en in de met fosfaat gebufferde kweekvloeistof opgelost, zonder de oplossing hierna te steriliseren. Moeilijk controleerbare verliezen bij filtratie door een bacteriefilter of verhitting werden hierdoor voorkomen. De gewenste cysteamine-concentraties werden bereid door verdunning van de steriele 10 %-oplossingen, die in de handel verkrijgbaar zijn. De pK-waarden van de thiolgroepen van de thiolverbindingen werden bepaald met de door Albert en Sergeant (1962) beschreven methode*. De extinctie van de thiolaatgroepen werd spectrofotometrisch gemeten bij 236 mμ. De basisoplossing bestond uit 0,1 M KCL, 0,001 M NaCN. Door toevoeging van NaCN werd oxydatie van de thiolverbindingen voorkomen. De pK werd vervolgens berekend met de formule:

$$pK = pH + \log \frac{\epsilon_b - \epsilon_t}{\epsilon_b - \epsilon_z} + \frac{0,505\sqrt{I}}{1+1,6\sqrt{I}}, \text{ waarin}$$

ϵ_b = extinctie van de volledig gedissocieerde thiolgroep ($\epsilon_{\max}$).

ϵ_z = extinctie van de ongedissocieerde thiolgroep ($\epsilon_{\min}$).

ϵ_t = extinctie bij verschillende pH-waarden.

$$\frac{0,505\sqrt{I}}{1+1,6\sqrt{I}} = 0,106 \text{ (I = ionensterkte).}$$

De op deze wijze bepaalde pK-waarden zijn vermeld in de tabellen 12, 15 en 17 en stemmen redelijk overeen met de door Irving et al. (1964) vermelde pK-waarden van cysteamine, thioglycol en thioglycolzuur.

Het effect van een behandeling met een thiolverbinding onder anoxische omstandigheden werd onderzocht met behulp van dezelfde opstelling, als beschreven in deze paragraaf. Na het verwijderen van de kweekvloeistof werd deze dan echter vervangen door 4 ml van de oplossing van de thiolverbinding. Direct hierna ving de N₂-overleiding aan.

II. 4. Variaties van de temperatuur.

Zoals blijkt uit het in figuur 1 weergegeven schema werden de beschermende behandelingen en de bestraling van de cellen bij kamertemperatuur (22 ± 2°C) uitgevoerd. In enkele experimenten echter werd de werking van cysteamine onderzocht bij 20°C of 37°C. In het eerste geval werden de cysteamine-oplossingen eerst afgekoeld tot 0°C en de schaaltes direct na het opbrengen van de cysteamine-oplossing op smeltend ijs geplaatst. Na 10 minuten incubatie werden de schaaltes op het tevoren gekoelde hard-board van de bestralingsopstelling geplaatst, doch tijdens de ongeveer 5 minuten durende bestraling niet op andere wijze gekoeld. Tijdens de bestraling steeg de temperatuur van het medium tot ongeveer 7°C. Na afloop werd de gebruikelijke wasprocedure bij kamertemperatuur uitgevoerd. De incubatie met cysteamine bij 37°C werd als volgt uitgevoerd: De cysteamine-oplossing werd in een waterbad tot 37°C

* Deze metingen werden verricht door Dr. A. W. Kaandorp, Chemisch Laboratorium RVO-TNO.

verwarmd en de schaaltes werden vóór en na het opbrengen van de cysteamine-oplossing inde kweekkast gehouden bij 37°C tot direct vóór de aanvang van de bestraling. Tijdens de bestraling daalde de temperatuur van het medium met ongeveer 10°C. De daaropvolgende wasproedure werd bij kamertemperatuur uitgevoerd.

II. 5. Bestraling.

De röntgenbestraling werd uitgevoerd met een Philips therapie-apparaat, type 11645. De röntgenbuis werd bedreven met 250 kV constante spanning. De stroomsterkte was 15 mA. De afstand tussen het focus van de buis en de bodem van het schaalte bedroeg 27 cm. Een filter van ongeveer 1,5 mm Cu werd gebruikt, dat in het midden dikker was dan aan de randen, waardoor de doseringssnelheid in een vlak loodrecht op de stralenbundel homogeen was. De schaaltes werden geplaatst op een onderlaag van 13 cm dik hard-board en van boven bestraald. De doseringssnelheid ter plaatse van de bodem van de schaaltes werd gemeten met een Baldwin Ionex dosimeter en bedroeg 200 r per minuut. De dosis werd uitgedrukt in rad, waarbij een gemeten dosis van 1 r equivalent was met een dosis van 0,96 rad, geabsorbeerd in de cellen (Hine en Brownell 1956).

II. 6. Bepaling van de overleving.

Op de 13e dag na enting werden de culturen gefixeerd met Bouin's vloeistof en gekleurd met hematoxiline volgens Mayer. Hoewel de celkolonies dan eenvoudig macroscopisch te tellen waren, werd toch gebruik gemaakt van een stereo-microscoop met 16-malige vergroting. Hiermede was een directe controle van het aantal en het uiterlijk van de cellen per kolonie mogelijk. Dit was voornamelijk nodig na het geven van een hoge stralingsdosis, daar de weinige cellen die dan nog tot kolonievorming in staat zijn, vaak kolonies van een afwijkende structuur vormden. In tegenstelling tot de compacte bouw van de kolonies gevormd door niet of weinig bestraalde cellen, zijn deze vaak meer diffuus uitgegroeid en bevatten soms 1 of 2 reuscellen. Bij een oppervlakkige macroscopische beoordeling zouden deze kolonies meegeteld kunnen worden, terwijl het feitelijke aantal cellen minder dan 50 bedroeg, welk aantal als de ondergrens van een geslaagde kolonievorming werd aangenomen.

II. 7. Berekening van de overlevingspercentages en de dosisreductiefactoren.

Het gemiddelde aantal kolonies in de schaaltes werd beïnvloed door de tel- en verdunningsfouten, gemaakt bij het bereiden van de verdunningen van de, in het betreffende experiment gebruikte, celsuspensie. Bij de berekening van de overlevingspercentages werd daarom uitgegaan van het percentage cellen, dat tot kolonievorming in staat was in de onbehandelde schaaltes, die in elk experiment aanwezig waren. De toxiciteit van de thiolverbindingen en anoxie of van een combinatie van beide werd in ieder experiment, waar in het beschermende effect van die behandeling werd onderzocht, bepaald. In de praktijk bleek deze meestal gering te zijn. Indien de toxiciteit van een bepaalde behandeling de overleving reduceerde tot minder dan 50% van de controles, werd de behandeling ongeschikt geacht om in onze opstelling gebruikt te worden. De overleving na bestraling werd berekend als een percentage van de overleving van de onbestraalde culturen, die overigens aan dezelfde behandeling onderworpen waren geweest.

De mate van bescherming, waargenomen na bestraling van de behandelde cellen, werd uitgedrukt in de dosisreductiefactor (DRF). Deze DRF is het getal, dat bij eenzelfde overlevingspercentage, de relatie aangeeft tussen de stralingsdoses van de behandelde ende onbehandelde cellen. Bij de berekening van de DRF werd gebruik gemaakt van de dosismortaliteitscurve, die het verband aangeeft tussen een bepaalde dosis röntgenstraling, uitgedrukt in rad en het daarbij behorende percentage cellen, dat nog tot kolonievorming in staat is.

Zoals in hoofdstuk III wordt aangegeven, heeft deze curve op half-logaritmische schaal uitgezet, een gebogen vorm in het gebied tussen 100 % en 10 % overleving en verloopt zij verder min of meer recht. De vorm van de curve is bij overlevingen lager dan 0,1 % minder nauwkeurig bekend, door de grote statistische spreiding in dat gebied.

Indien de DRF werd berekend op verschillende overlevingsniveaus, bleek deze niet geheel constant te zijn. In hoofdstuk III zal getracht worden hiervoor een verklaring te geven. De dosisreductiefactoren, vermeld in de resultaten van de in de hoofdstukken IV en VI beschreven experimenten, werden steeds berekend als het gemiddelde van de dosisreductiefactoren van de verschillende experimenteel bepaalde punten in het gebied tussen 20 en 0,1 % overleving.

Hoofdstuk III

DE STRALINGSGEVOELIGHEID VAN VERSCHILLENDE CELLIJNEN

III. 1. Inleiding

Om de beschermende werking van chemische verbindingen en anoxie te kunnen onderzoeken, was het noodzakelijk eerst gegevens te verzamelen over de stralingsgevoeligheid van de cellen onder normale omstandigheden. Hiertoe werd de mortaliteit na bestraling bepaald op een aantal punten in het overlevingsgebied tussen 100 en 0,01 %. Met behulp van deze punten werd de dosismortaliteitscurve geconstrueerd. Omdat in de loop van het onderzoek gebruik gemaakt werd van een aantal sublijnen vande oorspronkelijke T-celstam, en deze sublijnen ten dele in stralingsgevoeligheid van elkaar bleken te verschillen, werd het vermogen tot kolonievorming van de onbestraalde en bestraalde cellen van iedere sublijn afzonderlijk bepaald. Tijdens een reeks van experimenten werd regelmatig nagegaan of de stralingsgevoeligheid niet veranderde. De resultaten betreffende de bescherming tegen bestraling werden steeds berekend op de met dezelfde sublijn verkregen controlewaarden (II. 7.).

Het is bekend dat de stralingsgevoeligheid van cellen sterk afhankelijk is van de omstandigheden waaronder wordt gewerkt. Zo werd door Stapleton (1960) aangetoond, dat de overleving van *E. coli* in grote mate beïnvloed kon worden door de kweekomstandigheden zowel vóór, als tijdens en na de bestraling. Ook bij zoogdiercellen werd een invloed van de kweekomstandigheden op de overleving waargenomen. Berry (1964) beschreef verschillen in de vorm van de overlevingscurve van Hela-S3 cellen, wanneer het kweekmedium 6 dagen na bestraling al of niet werd vervangen. Ludovici et al. (1961) toonden in dit verband een belangrijke invloed aan van het stadium van de groeifase, waarin de cellen verkeerden tijdens de bestraling. Han et al. (1964) konden deze waarnemingen bevestigen bij een cellijn, afkomstig van een cultuur van muizebindweefsel.

Het verband tussen stralingsgevoeligheid en temperatuur werd onderzocht door Belli en Bonte (1963). Deze auteurs namen bij Hela-cellen een duidelijke toename van de stralingsgevoeligheid waar, indien de cellen bij hogere temperaturen werden bestraald. Barendsen en Walter (1964) vonden daarentegen, bij bestraling van T-cellen afkomstig van dezelfde celstam als door ons werd gebruikt, een vermindering van de stralingsgevoeligheid indien de cellen bij 37°C in plaats van bij kamertemperatuur werden bestraald. Voorts vonden zij ook een duidelijk invloed van de tijd, verlopen tussen enting en bestraling van de cellen, op de overleving.

Om de invloed van deze variabelen op de overlevings-resultaten zoveel mogelijk te beperken, werd steeds onder de gestandaardiseerde condities gewerkt, die in hoofdstuk II werden beschreven.

Aangezien de beschermende werking van enige thiolverbindingen ook onderzocht werd bij verschillende pH's en temperaturen van het medium, werd de invloed van deze variabelen ook op de stralingsgevoeligheid van de overigens onbehandelde cellen bestudeerd.

In dit hoofdstuk zullen nu achtereenvolgens worden besproken:

- a. Het vermogen tot kolonievorming van bestraalde en onbestraalde cellen afkomstig van verschillende sublijnen (III. 2.).
- b. De invloed van variaties in pH en temperatuur van het medium kort voor en tijdens de bestralings op de stralingsgevoeligheid (III. 3.).

III. 2. Bepaling van de stralingsgevoeligheid.

Het percentage cellen van de verschillende sublijnen, dat tot kolonievorming in staat was, is weergegeven in tabel 3. Hieruit blijkt, dat in alle cellijnen onder onze proefomstandigheden, een groot percentage van de cellen kolonies vormde. Het is aannemelijk te achten, dat een belangrijk gedeelte van de aangegeven standaardafwijkingen veroorzaakt werd door tel- en verdunningsfouten, gemaakt bij het bereiden van de celsuspensies.

Tabel 3. Het vermogen tot kolonievorming van onbestraalde cellen van de verschillende cellijnen.

Cellijn	Periode van de experimenten	Aantal bepalingen	Gemiddeld aantal kolonies per 100 geente cellen (*s.d.)
Tc ₁	7/7/' 61 - 9/4/' 62	61	98,9 ± 8,3
Tc ₂	13/4/' 62 - 12/2/' 63	23	97,7 ± 8,0
T ₁ v	26/2/' 63 - 3/8/' 63	24	89,2 ± 6,5
T ₁ va	28/8/' 63 - 29/4/' 64	32	99,5 ± 9,0
T ₁ vb	16/6/' 64 - 28/8/' 64	6	106,0 ± 6,5
T ₁ vc	19/2/' 65 - 11/4/' 65	15	97,5 ± 7,6

In 20 experimenten werd onderzocht of de wasprocedure, waaraan de cellen werden onderworpen, een aantoonbaar verlies aan cellen ten gevolge had. De gemiddelde overleving zonder wassen bleek 102,8 % (s.d. * 8,9) te bedragen, na wassen bedroeg deze 98,9 % (s.d. 8,3), zodat geconcludeerd mag worden, dat het wassende overleving niet belangrijk beïnvloedde.

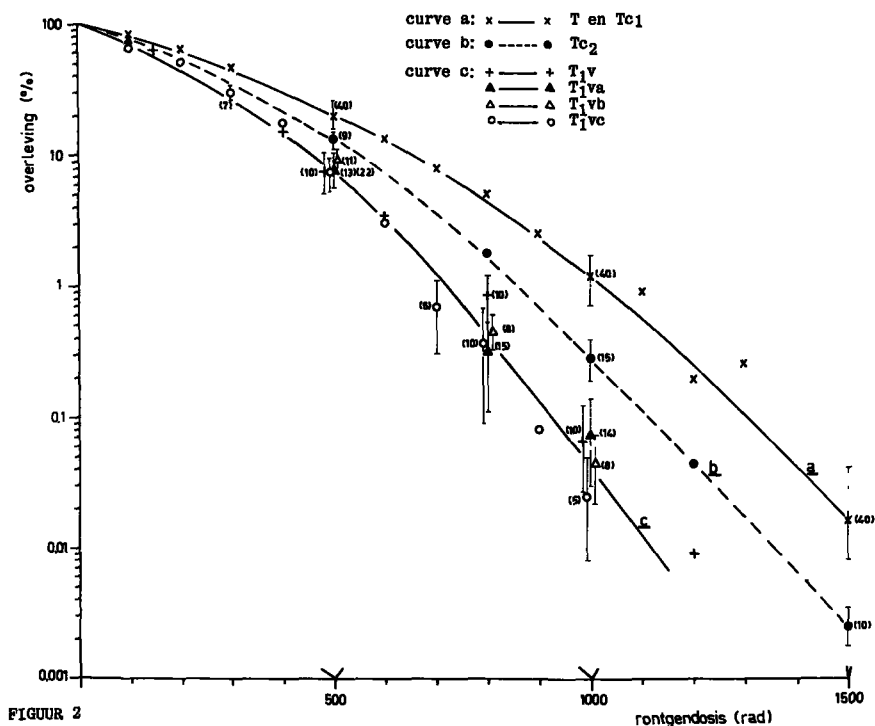
De stralingsgevoeligheid van de oorspronkelijke T-celstam welke werd gebruikt, voordat de in dit proefschrift beschreven onderzoeken werden verricht, werd reeds vermeld door Barendsen et al. (1960) en Vos et al. (1962). Uit deze - zeer polymorfe - stam werd een sublijn gefsoleerd volgens de methode van Marcus et al. (1956). De cellen van deze sublijn bleken meer gelijkvormig te zijn, wat tot uiting kwam in het uniforme uiterlijk van de door deze cellen gevormde kolonies. De stralingsgevoeligheid van deze Tc₁-lijn bleek niet aantoonbaar af te wijken van de voordien gebruikte T-lijnen wordt weergegeven door curve a van figuur 2. Daar de overleving van de Tc₁-cellen door de uniforme kolonies eenvoudiger te beoordelen was, werden zij vanaf begin 1961 voor de experimenten gebruikt.

Gedurende maart 1962 bleken de Tc₁-cellen duidelijk stralingsgevoeliger te zijn geworden. Deze veranderde cellijn werd Tc₂ genoemd. De stralingsgevoeligheid van deze cellen wordt weergegeven door curve b van figuur 2. In de loop van 1962 bleek voorts, dat de kweken besmet waren met PPLO (Pleuro Pneumonia Like Organisms, ondergebracht in de orde Mycoplasmatales). Hoewel PPLO vaak in weefselkweken worden waargenomen en niet met zekerheid bekend is of dit van invloed is op de gevoeligheid voor bestraling, werd het toch wenselijk geacht de experimenten voort te zetten met een PPLO-vrije stam. Hiertoe werden begin 1963 een uit de Tc-lijn gefsoleerde sublijn (T₁v) met kanamycine bevruid van de PPLO-infectie (zie ook Bootsma, 1965). Hierna werd een grote hoeveelheid van deze cellen diepgevroren en bewaard (Vos en Kaalen, 1962), met uitzondering van een gedeelte waarmee de stralingsgevoeligheid van de T₁v-lijn werd bepaald.

* s.d. standaarddeviatie (s.d.)

$$\sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}}$$

Deze wordt weergegeven door curve c van figuur 2 en bleek duidelijk toegenomen te zijn, in vergelijking met die van de Tc_1 - en de Tc_2 -cellen. Na enige tijd bleek de T_{1v} -lijn wederom met PPLO besmet te zijn en begin 1964 werd daarom een gedeelte van de T_{1v} -lijn ontdood (T_{1va}) en gebruikt tot juni 1964. Vervolgens werd twee andere sublijnen ontdood en gebruikt (van juni tot september 1964 de T_{1vb} -lijn en na februari 1965, de T_{1vc} -lijn). Hoewel de drie laatstgenoemde lijnen ingevroren zijn geweest in tegenstelling tot de T_{1v} -lijn, verschillen de stralingsgevoeligheden van deze cellen onderling niet significant, zoals blijkt uit de gegevens weergegeven in figuur 2.



FIGUUR 2

Dosismortaliteitscurven van de onbehandelde controles, behorende tot verschillende sublijnen van de T-cel lijn.

Het aantal experimenten, waarop de standaardafwijking werd berekend, is tussen () aangegeven.

Waaraan de toeneming van de stralingsgevoeligheid sinds 1962 is toe te schrijven, is niet duidelijk geworden. Daar in onze experimenten de dosisreductiefactor (DRF) steeds berekend werd op de in dezelfde periode bestraalde controlegroepen en onafhankelijk bleek te zijn van de absolute stralingsgevoeligheid van de cellen, werd niet nader op dit probleem ingegaan. Bij een verdere bestudering van figuur 2 blijken voorts de op deze wijze geconstrueerde overlevingscurven in goede overeenstemming te zijn, met wat algemeen gevonden wordt na blootstelling van zoogdiercellen in vitro en in vivo aan röntgenstraling (Puck et al., 1957; Hewitt en Wilson, 1959; Elkind en Sutton, 1960; Dewey, 1960 e.a.). Deze curven worden gekarakteriseerd door een

betrekkelijk vlak verloop bij lage doseringen, waarna zij duidelijk steiler gaan verlopen bij hogere doseringen. Hierdoor vertonen de curven in het begin een typische schouder, waarna zij veelal een rechtlijnig verloop krijgen. De helling van het rechte gedeelte van de curve wordt gekarakteriseerd door de D_0 — de dosis, die nodig is om de overleving van de cellen in dit gebied tot 37 % ($1/e$) te reduceren —. De D_0 ligt voor de meeste zoogdiercellen tussen 100 en 160 rad. Het is gebruikelijk de overlevingscurven verder te karakteriseren door het rechte gedeelte te extrapoleren naar de ordinaat, waar het gevonden veelvoud van de 100 % overleving als extrapolatiegetal n wordt aangeduid. De waarde van n ligt gewoonlijk tussen 1,5 en 10. Door Puck et al. (1957) en anderen werd aangenomen dat n bepaald wordt door het aantal treffers dat een cel moet ontvangen, voordat de overleving wordt beïnvloed. Daar curve a van figuur 2 geen duidelijk rechtlijnig gedeelte bezit, is de D_0 slechts bij benadering te berekenen op ongeveer 170 rad. De D_0 van curve b bedraagt ongeveer 160 rad en van curve c ongeveer 90 rad. Voor de curven a en b van figuur 2 is n , wegens het ontbreken van een recht gedeelte niet te bepalen, voor curve c bedraagt n ongeveer 12.

Barendsen (1964) bepaalde experimenteel de overlevingscurven van T-cellen bij verschillende soorten ioniserende straling. Hij kwam op grond van deze waarnemingen tot de conclusie, dat een gedeelte van de schade, aangericht door 250 kV-röntgenstraling of andere ioniserende stralingen met een lage gemiddelde LET*, veroorzaakt wordt door passage van stralingen met een LET tussen 20 en 100 keV/ μ weefsel. De effectiviteit van deze deeltjes in het veroorzaken van biologische schade is groot en resulteert in een overlevingscurve met n naderend tot 1. Het aandeel van deze dicht ioniserende deeltjes in de totale stralingsschade, veroorzaakt door 250 kV-röntgenstraling, is niet nauwkeurig bekend, doch volgens Barendsen voldoende groot om voornamelijk verantwoordelijk gesteld te mogen worden voor de helling van het eerste gedeelte van dosismortaliteitscurve. Het grootste gedeelte van de ioniserende deeltjes van harde röntgenstraling heeft echter een LET van minder dan 20 keV/ μ weefsel. De schade aangericht door deze deeltjes, blijkt hersteld te kunnen worden, indien binnen de daarvoor benodigde periode niet nog meer deeltjes hun energie in het beschadigde gebied afgeven. Bij lagere LET-waarden kan het aantal primaire deeltjes, nodig voor een voldoende cumulatieve beschadiging, oplopen tot 10 of meer. Bij hogere stralingsdoseringen gaat dit type beschadiging domineren en geeft aanleiding tot het tweede, steil verloopende gedeelte van de overlevingscurve. Door fractionering van de stralingsdosis kan deze schade belangrijk verminderd worden en vormt als zodanig een interessant probleem voor de radiotherapie (Fowler en Stern, 1963). Ook voor chromosoom-aberraties werden waarnemingen gedaan, die grotendeels parallel liepen met het bovenstaande (Evans, 1962). Er bestaan trouwens meerdere argumenten voor de veronderstelling, dat het meest stralingsgevoelige gedeelte van de cel in het chromosomale materiaal gezocht moet worden. Fowler (1964) toonde aan, dat curven van het type van curve a van figuur 2 mathematisch beschreven kunnen worden door aante nemen, dat n afhankelijk is van de LET-waarde. In de baan van één deeltje loopt de LET sterk uiteen en voor dergelijke curven zou het extrapolatiegetal 5 het meest voorkomen, doch verder van 1 tot 10 variëren. Ook Oliver en Shepstone (1964), Bacq en Alexander (1961) en anderen menen, dat aan het experimenteel gevonden extrapolatiegetal n geen exacte betekenis mag worden toegekend, gezien de grote variabiliteit van dit getal.

* LET, linear energy transfer, de energie (keV) afgegeven per baaneenheid (μ weefsel) door passage van een ioniserend deeltje.

Bovenstaande overwegingen vormen mogelijk een verklaring voor het feit, dat zoals in de volgende hoofdstukken zal blijken, de waarden van de berekende dosisreductiefactoren afhankelijk bleken te zijn van het overlevingspercentage, waarbij deze berekend werden. Alper (1963), Barendsen (1964) en anderen toonden immers aan dat de bescherming van cellen door anoxie of cysteamine tegen straling met een hoge LET (alpha deeltjes en neutronen) veel minder was dan tegen 250 kV-röntgenstraling. Berekening van de DRF bij hoge overlevingspercentages, waar de bijdrage aan de schade door elektronen met een lage LET mogelijk slechts gering is, zou om deze reden lagere waarden kunnen opleveren, dan berekening van de DRF bij een lage overleving, waar de schade wél voornamelijk door deze wordt veroorzaakt.

III. 3. Invloed van de pH en temperatuur op de stralingsgevoeligheid.

In een grote reeks van proeven bleek geen significant verschil te bestaan in de overleving na incubatie van de cellen gedurende 20 tot 30 minuten in met fosfaat gebufferde media met pH's variërend van 6,3 tot 8,3 (zie II. 2.). In 9 experimenten werd tevens de stralingsgevoeligheid bepaald na 10 minuten incubatie bij pH 6,3 of pH 8,3 en werd deze vergeleken met de gevoeligheid bij pH 7,3 (zie tabel 4). Er werd geen verschil gevonden na bestraling bij pH 6,3 doch wel een geringe toeneming van de overleving na bestraling bij pH 8,3. Bij toepassing van de Sign-test (Tate en Clelland, 1959) bleek dit verschil significant te zijn op het 20 % niveau. Bij de berekeningen van de DRF konden deze verschillen echter geen belangrijke invloed uitoefenen.

Tabel 4. Invloed van de pH op de stralingsgevoeligheid van T₁va- en T₁v-cellen. Het medium met de te onderzoeken pH werd 10 minuten voor de bestraling opgebracht en direct na de bestraling door het normale medium vervangen. De overlevingspercentages op een niveau hebben betrekking op hetzelfde experiment.

Dosis (rad)	Percentage overleving na bestraling bij pH		
	6,3	7,3	8,3
500	8,1	5,6	10,4
	19,4	17,6	11,0
800	0,35	0,42	0,46
	2,24	3,15	2,63
	0,22	0,22	0,32
	0,28	-	0,42
900	0,23	0,18	0,19
1000	0,003	0,02	0,03
	0,29	0,39	0,40

Zoals in II. 2. vermeld is, werden vrijwel alle bestralingen bij kamertemperatuur (22 + 2°C) uitgevoerd. Verlaging van de temperatuur tot ongeveer 2°C gedurende 20 tot 30 minuten (zie II. 4.) had in 5 experimenten noch bij de onbestraalde noch bij de bestraalde culturen een waarneembare invloed op de overleving, in vergelijking met de bij kamertemperatuur behandelde culturen. (Zie ook fig. 15). In 7 experimenten waarbij de cellen bij 37°C werden bestraald, bleek ook deze temperatuurvariatie geen effect op de overleving te hebben. De waarnemingen van Belli en Bonte (1963) en Barendsen en Walter (1964) die wel een, overigens met elkaar in tegenspraak zijnde, invloed van de temperatuur op de overleving na bestraling aantoonde, konden dus niet door ons bevestigd worden.

III. 4. Samenvatting.

In dit hoofdstuk werd aangetoond, dat gedurende de periode waarover onze onderzoeken zich uitstrekten, de stralingsgevoeligheid tweemaal sprongsgewijze toenam. Eensluitende verklaring kon hiervoor niet gevonden worden. Het bleek mogelijk de sublijnen, wat betreft de stralingsgevoeligheid in 3 groepen in te delen, waarbij in elke groep de reproduceerbaarheid voor ons doel voldoende groot was. In III. 2. werd nader ingegaan op de interpretatie van de dosismortaliteitscurven en de invloed van de vorm daarvan op de berekening van de DRF. Verhoging van de pH van het medium tot 8,3 verminderde in zeer geringe mate de stralingsgevoeligheid in vergelijking met die bij pH 7,3 of 6,3. Geen invloed op de overleving nabestraling kon aangetoond worden van variaties in de temperatuur tussen 2°C en 37°C.

Hoofdstuk IV

DE INVLOED VAN ZUURSTOF OP DE STRALINGSGEVOELIGHEID

IV.1. Inleiding.

Een sensibilisering voor röntgenstraling door de aanwezigheid van zuurstof is aangetoond voor vrijwel alle biologische systemen. De onderzochte objecten lopen uiteen van enzympreparaten, DNA-moleculen, bacteriofagen, bacteriën en andere micro-organismen, worteltopjes van *Vicia faba*, gefsoleerde zoogdiercellen tot intacte proefdierentoe. In verband met de zeer grote hoeveelheid literatuur over dit onderwerp wordt hiervoor verwezen naar enkele goede overzichtsartikelen (Stapleton, 1960; Gray, 1960 en 1961; Bacq en Alexander, 1961).

Uit de verrichte onderzoeken blijkt de aanwezigheid van zuurstof tijdens de bestraling essentieel te zijn voor het sensibiliseringsproces, en beïnvloedt blootstelling van het object aan zuurstof alleen vóór of na de bestraling de gevoeligheid niet. In bijna alle gevallen bleek de aanwezigheid van zuurstof het bestralingseffect te wijzigen, zonder de vorm van de dosismortaliteitscurve (DMC) te veranderen.

Howard-Flanders (1960) en Howard-Flanders et al. (1963) toonden in een bacteriofaag-systeem aan, dat het sensibiliserende effect van zuurstof alleen waar te nemen was, indien in het medium thiolgroepen aanwezig waren. Deze experimenten kunnen niet in ons in vitro systeem herhaald worden wegens het intracellulaire thiolgehalte; de theoretische implicaties van deze onderzoeken van Howard-Flanders zijn echter ook voor ons werk van belang en in hoofdstuk VII zal dan ook nader op dit werk worden ingegaan.

De aanwezigheid van zuurstof vergroot voornamelijk het effect van gamma- en röntgenstraling en blijkt slechts een geringe invloed te hebben op de uitwerking van dicht ioniserende stralingen (Howard-Flanders en Alper, 1957; en anderen).

De hoeveelheid zuurstof, die nodig was om het zuurstofeffect in volle omvang te doen optreden bleek bijzonder gering te zijn. Een systematisch onderzoek over dit onderwerp werd verricht door Howard-Flanders en Alper (1957) bij verschillende bacteriesoorten, door Evans en Neary (1959) bij *Tradescantia*, door Dewey (1960, 1963a, 1963b) bij in vitro gekweekte levercellen en bij *Serratia marcescens*, en door Deschner en Gray (1959) bij in vitro en in vivo bestraalde Ehrlich ascitestumorcellen. Hierbij werd gevonden, dat de zuurstofconcentraties die de stralingsgevoeligheid deden verdubbelen, in vergelijking tot die onder anoxische omstandigheden, lagen tussen 4 en $19 \mu\text{mol/l}$ ($1 \mu\text{mol/l} = 22,4$ delen per miljoen) *. De zeer lage zuurstofconcentraties, die reeds een duidelijk effect hebben, bemoeilijken het bepalen van de stralingsgevoeligheid onder anoxie. Zeer hoge eisen moesten gesteld worden aan het zuurstofvrij maken van de in de handel verkrijgbare stikstof en andere gasmengsels. Ook het voorkomen van zuurstofpenetraties in de bestralingsopstelling kan grote problemen opleveren. Zo toonden Dewey en Gray (1961) aan, dat rubber slangen voldoende zuurstof kunnen doorlaten om het doorstromende gasmengsel ontoelaatbaar te verontreinigen. Glas, nylon en ook Melinex bleken dit nadeel niet te bezitten.

Inde hierna te beschrijven experimenten werd de in II.3. beschreven opstelling gebruikt. Bij enige controles met een "Hersch cell" (Hersch, 1960) bleek het uitstromende gasmengsel minder dan 1 tot 30 delen zuurstof per miljoen te bevatten (tabel 1).

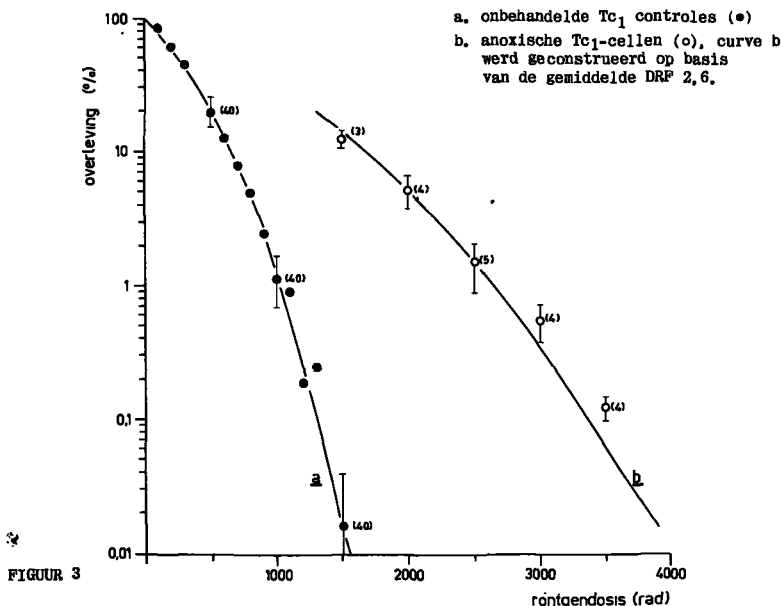
* Ter vergelijking diene, dat bij kamertemperatuur uit lucht met 21 % zuurstof $270 \mu\text{mol}$ zuurstof per liter water opgelost wordt.

In dit hoofdstuk zullen besproken worden de invloed van de volgende factoren op de bescherming van de cellen door een met stikstof opgewekte anoxie:

- a. de gebruikte sublijn, de hoeveelheid resterende kweekvloeistof op de cellen en de tijdsduur van de stikstofoverleiding (IV. 2.),
- b. de pH van de kweekvloeistof (IV. 3.).

IV. 2. Bepaling van de grootte van het zuurstofeffect.

In de eerste reeks experimenten werd het onder II. 1. beschreven met natriumbicarbonaat gebufferde kweekmedium gebruikt, waardoor de pH van het vloeistoflaagje op de cellen tijdens de 15 tot 25 minuten durende stikstofoverleiding geleidelijk steeg van ongeveer 7,4 tot ongeveer 8,0. De stroomsnelheid van de overgeleide stikstof bedroeg 400 ml per minuut en de kweekvloeistof werd kort tevoren afgezogen tot een rest van minder dan 0,5 ml (zie ook II. 3.). De vermindering van de stralingsgevoeligheid van de Tc₁-lijn, indien de bestraling 10 minuten na aanvang van de stikstofoverleiding werd begonnen, werd reeds eerder beschreven (Vergroesen et al. 1962, 1963) en wordt weergegeven in figuur 3. De DRF bedroeg in deze proeven 2,6 en was in goede overeenstemming met wat op grond van de literatuurgegevens verwacht mocht worden (zie Gray, 1960). Deze grondige blootstelling aan de stikstofstroom bleek echter vrij schadelijk te zijn voor de cellen. Bij 13 experimenten bedroeg de gemiddelde overleving van de onbestraalde anoxische controles 76,8 % (s.d. 13,5) van de niet behandelde controles.



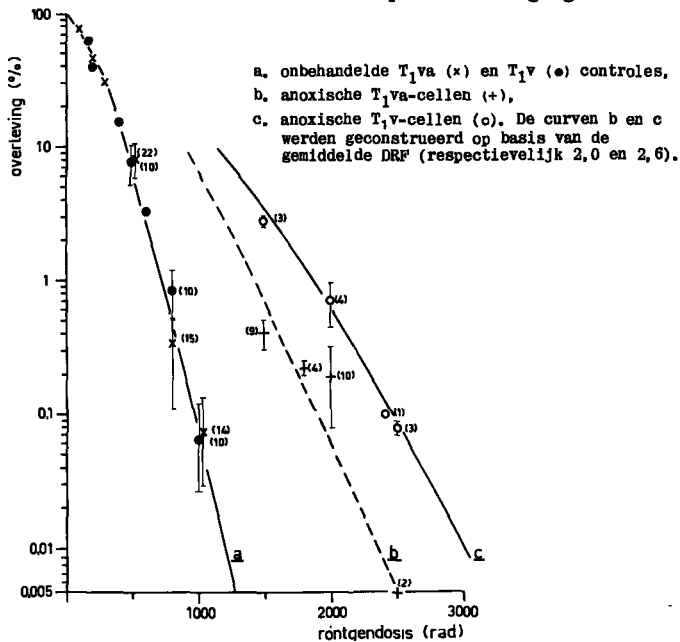
FIGUUR 3

Dosismortaliteitscurven van de Tc₁-sublijn, bestraald onder lucht en onder anoxische omstandigheden.

De stikstofoverleiding (400 ml/minuut) begon 10 minuten voor aanvang der bestraling. De kweekbakjes waren gevuld met minder dan 0,5 ml met bicarbonaat gebufferd medium. Het aantal experimenten, waarop de standaardafwijking werd berekend, is tussen () aangegeven.

In een volgende reeks van proeven werd tijdens de stikstofoverleiding de kweekvloeistof vervangen door 4 ml van een met fosfaten gebufferd medium (II. 2.). De pH van het medium bleef nu constant

tijdens de behandeling en door de toeneming van het vloeistoflaagje boven de cellen werd getracht de schadelijke invloed van de gasstroom te beperken, voor zover deze berustte op een uitdroging van de cellen.



FIGUUR 4

De dosismortaliteitscurven van T₁va en T₁v-cellen, bestraald onder lucht en onder anoxische omstandigheden.

De stikstofoverleiding (400 ml/minuut) begon 10 minuten voor aanvang der bestraling. De kweekbakjes waren gevuld met 4 ml met fosfaat gebufferd medium (pH 7,3).

Het aantal experimenten waarop de standaardafwijking werd berekend, is tussen () aangegeven.

De tijdsduur en mate van de stikstofoverleiding bleven ongewijzigd (II.3.). In figuur 4 wordt de vermindering van de stralingsgevoeligheid van de T₁va- en T₁v-cellen onder invloed van de anoxische omstandigheden getoond. De gemiddelde DRF voor de T₁va-cellen bedroeg 2,0, voor de T₁v-cellen 2,6. Bij 24 onbestraalde anoxische controles van de T₁va-lijn bedroeg de gemiddelde overleving 95,1 % (s.d. 8,8), voor 6 overeenkomstige controles van de T₁v-lijn bedroeg deze 62 % (s.d. 23,6). Het geringe aantal experimenten en de grote spreiding van de resultaten, die ook duidelijk tot uiting kwam bij de onbestraalde anoxische controles, gaven aanleiding om aan de resultaten verkregen bij de T₁v-lijn niet teveel waarde te hechten. Ook bij de T₁vb- en de T₁vc-lijnen werden dosisreductiefactoren van respectievelijk 2,1 (6 waarnemingen) en 1,7 (3 waarnemingen) gevonden, indien tijdens de stikstofoverleiding 4 ml vloeistof op de cellen werd gelaten. Het ligt daarom meer voor de hand deze verlaging van de DRF aan een onvoldoende hypoxie van het medium toe te schrijven ten gevolge van de grotere hoeveelheid vloeistof, dan aan een verschillende mate van zuurstof-effect bij de diverse cellijnen. Verdere steun voor de juistheid van eerstgenoemde mogelijkheid werd gevonden in een aantal experimenten uitgevoerd bij de T₁vc-lijn, waarbij de hoeveelheid bovenstaande vloeistof werd gevarieerd van 0,5 tot 4 ml, zie tabel 5.

Tabel 5. Het effect van verschillende hoeveelheden kweekmedium op de overleving van Tjvc-cellen, uitgedrukt in de DRF, na bestraling onder een stikstofstroom van 400 ml/minuut, aangevangen 10 minuten voor bestraling.

Experiment nummer	Hoeveelheid kweekmedium (ml)	DRF
1	0,5	2,5
	2	2,5
	4	2,1
2	0,5	2,8
	2	2,6
3	0,5	2,7
	2	2,4
4	1	2,4
	2	2,6
5	1	2,0
	4	1,5

Een zekere tegenstelling tot laatstgenoemde resultaten vormen echter de gegevens, vervat in tabel 6. Een verlenging van de tijdsduur van de stikstofoverstroming voordat de bestraling werd begonnen zou, indien 4 ml vloeistof op de cellen was gelaten, in een versterking van de hypoxie moeten resulteren. Uit tabel 6 blijkt echter dat verlenging van de stikstofoverleiding niet duidelijk tot een hogere DRF leidde. Er werd geen verder onderzoek verricht om tot een verklaring voor deze tegenstrijdige resultaten te komen.

Tabel 6. Het effect van de duur van de stikstofoverleiding (400 ml/minuut) op de overleving van Tjva-cellen na bestraling, uitgedrukt in de DRF. In de schaaltes was steeds 4 ml kweekmedium aanwezig.

Experiment nummer	Tijdsduur stikstofoverleiding voor bestraling (minuten)	DRF
1	10	2,0
	20	2,3
2	10	2,4
	20	2,2
	30	2,2
3	10	2,2
	20	2,2
	30	1,9

IV. 3. De invloed van de pH op het zuurstofeffect.

Daar de beschermende werking van thiolverbindingen onder anoxische omstandigheden ook bij verschillende pH's werd onderzocht (VI.3.), was het nodig ook de invloed van de pH van het medium te bepalen op de beschermende werking van anoxie alleen. In de literatuur konden over dit onderwerp geen gegevens worden gevonden. Zoals in III. 3. werd beschreven bleken variaties in de pH tussen 6,3 en 8,3 geen duidelijke invloed op de DMC van de controle- culturen uit te oefenen.

Alle hierna vermelde dosisreductiefactoren werden daarom berekend op de DMC, bepaald bij pH 7,3. Uit de gegevens vermeld in tabel 7, blijkt dat, met uitzondering van experiment 8, het beschermende effect van de stikstofoverleiding bij pH 6,3 steeds wat minder is dan bij pH 8,3.

Tabel 7. Het effect van de stikstofoverleiding (400 ml/minuut) op de overleving van verschillende cellijnen na bestraling, uitgedrukt in de DRF, bij verschillende pH. De bestraling werd begonnen 10 minuten na aanvang van de stikstofoverleiding. Bij de experimenten 1-7 was 4 ml vloeistof op de cellen aanwezig, bij de experimenten 8 - 10 2 ml.

Experiment nummer	Cellijn	pH van het kweekmedium	DRF
1	T ₁ v	6,3	2,4
		7,3	2,4
		8,3	2,6
2	T ₁ va	6,3	2,2
		8,3	2,3
3	T ₁ va	6,3	2,4
		7,3	2,5
		8,3	2,7
4	T ₁ va	7,3	2,0
		8,3	2,1
5	T ₁ va	6,3	2,5
		7,3	2,6
		8,3	2,8
6	T ₁ va	6,3	1,9
		7,3	2,0
		8,3	2,0
7	T ₁ va	7,3	1,7
		8,3	1,8
8	T ₁ vc	6,3	2,7
		8,3	2,6
9	T ₁ vc	7,3	2,6
		8,3	2,9
10	T ₁ vc	6,3	2,4
		8,3	2,5

De dosisreductiefactoren gevonden bij pH 7,3 lagen steeds tussen de beide uiterste waarden in. De onderlinge verschillen in DRF zijn gering en liggen binnen de experimentele variaties. Bij toepassing van de Sign-test (Tate en Clelland, 1959) bleekde overleving na anoxische behandeling bij pH 8,3 op het 5 % niveau significant beter te zijn dan bij pH 6,3. Het verschil in DRF tussen pH 7,3 en 6,3 bleek nog niet significant te zijn op het 20 % niveau.

IV. 4. Samenvatting.

Onder onze experimentele omstandigheden kon een anoxische bescherming van de cellen tegen bestraling waargenomen worden, waarbij de maximale DRF 2,6 bedroeg. Deze waarde is in goede overeenstemming met verschillende literatuurgegevens. Zie ook uit het door Gray (1960) gegeven overzicht dat, wanneer het verlies aan proliferatievermogen van zoogdiercellen door röntgen- of gammastraling als criterium werd gebruikt, deze DRF ongeveer 2,5 bedraagt. Ook voor tal van andere systemen bleek de DRF door anoxie gemiddeld 2,5 tot 3,0 te bedragen, hoewel ook belangrijke hogere en lagere waarden beschreven werden, die in dezelfde experimentele opstellingen konden optreden onder invloed van variaties in temperatuur, kweekomstandigheden en dergelijke (Stapleton, 1960; Dewey, 1963). Wanneer in onze experimenten een minder volledige anoxie van het milieu werd opgewekt, ten gevolge van een vergroting van het op de cellen staande vloeistoflaagje, daalde de DRF tot omstreeks 2,1. Hoewel onder deze omstandigheden bij een meting met de "Hersch cell" (II. 3.) een daling van de zuurstofconcentratie in het uitstromende gasmengsel tot ongeveer $1 \mu\text{mol/l}$ werd waargenomen, kan de zuurstofconcentratie in de directe omgeving van de cel hoger zijn geweest. Deze daling van de DRF kan dan hierdoor redelijk verklaard worden, daar de zuurstofconcentraties nodig voor een verdubbeling van de stralingsgevoeligheid onder anoxie, liggen tussen 4 en $19 \mu\text{mol/l}$ (zie IV.1.). Niet in overeenstemming met deze verklaring zijn de resultaten van het onderzoek waarbij, door een verlenging van de tijdsduur van de stikstofoverleiding een verdere verlaging van de zuurstofconcentratie werd bereikt, zonder dat dit duidelijk in een hogere DRF resulteerde (tabel 6). Op grond van de resultaten, verkregen na de anoxische bescherming van de T_1 cellijn (figuur 4), is voorts niet uit te sluiten, dat de verschillende cellijnen in verschillende mate reageren op de door stikstofoverleiding opgewekte anoxie. Uit tabel 7 blijkt tevens dat, ook bij gebruik van dezelfde cellijn (T_1 va), soms (zie de experimenten 3 en 5) een belangrijk hogere DRF ten gevolge van anoxie kan worden waargenomen dan in andere experimenten. Een verklaring hiervoor werd niet gevonden. Tenslotte werd een geringe invloed waargenomen van de pH van de kweekvloeistof op de mate van de anoxische bescherming, waarbij een stijging van de pH tot 8,3 de overleving vergrootte, doch een daling van de pH van 7,3 tot 6,3 de overleving niet beïnvloedde.

Hoofdstuk V.

DE TOXICITEIT VAN THIOLVERBINDINGEN

V.1. Inleiding.

De grote toxiciteit van de thiolverbindingen, die voor chemische stralingsbescherming gebruikt worden, vormt het probleem voor de praktische toepassing bij mens en dier. De effectieve dosering ligt altijd dicht onder de letale dosering (van Bekkum en Nieuwerkerk, 1963). Bij gebruik van cysteamine bedraagt de effectieve dosering voor de muis ongeveer 150 mg/kg bij een LD₅₀ van ongeveer 350 mg/kg. Bij zoogdieren domineren de acute farmacologische effecten - voornamelijk hypotensie en krampen van cerebrale oorsprong (di Stefano et al., 1963; Hulse, 1963; Bacq, 1965) - het ziektebeeld bij de letale en subletale doseringen. De hoeveelheden die deze toxische verschijnselen geven, variëren met het proefdier en de wijze van toediening (Benson et al., 1961). Lagere doseringen, die gedurende langere tijd toegediend worden en meestal geen beschermende effect hebben, kunnen onder andere aanleiding geven tot groeiremming (Benson et al., 1961; Andrews et al., 1964). Naar de oorzaken van deze verschijnselen is feitelijk nog geen systematisch onderzoek verricht. Het toxische effect van verschillende thiolverbindingen op het cellulaire niveau werd wel uitvoeriger onderzocht. De cytologische veranderingen die beschreven zijn, hebben voornamelijk betrekking op de celdeling en het optreden van chromosoomaberraties.

Reeds Rapkine (1930) wees erop dat het normale verloop van de celdeling een invloed ondergaat van de thiolconcentratie in de cel. Door Mazia (1953, 1961) en Brachet (1960) werd gepostuleerd dat de structuur van het mitotische apparaat in belangrijke mate afhankelijk is van het evenwicht tussen -SH- en -SS-groepen. Niet alleen stoffen die een blokkerende werking op de -SH-groepen hebben, zoals N-ethylmaleimide, diverse kwik- en jodiumverbindingen en dergelijke, doch ook stoffen die de -SS-groepen beïnvloeden kunnen de celdeling verstoren. Daar tot de laatste categorie stoffen alle thiol- en disulfideverbindingen behoren (Pihl en Eldjarn, 1957), zou een nadelig effect van deze substanties op de celdeling verwacht mogen worden. Chèvremont en Chèvremont (1953) bestudeerden de uitwerking van 0,125 tot 12,5 mM cysteamine op in vitro gekweekte kipfibrblasten en -myoblasten. Reeds de laagste concentraties veroorzaakten gestoorde celdelingen, chromosoomaberraties en celdood. De hogere concentraties gaven een duidelijke groeiremming. Deze waarnemingen werden bevestigd door Oftedal et al. (1958) en Brachet en Miraux-Jonkheere (1962). Fotakis (1963) en Srinivasan et al. (1964) beschreven een duidelijke remming van de mitose van in vitro gekweekte cellen door verschillende concentraties thioglycol. Ook Jackson en Lindahl-Kiersling (1964) namen een sterke beïnvloeding van de mitose van in vitro gekweekte leucocyten waar door 1,3 mM thioglycol en overeenkomstige concentraties cysteamine en β -mercapto-pyruvaat.

Naast de beïnvloeding van de celdeling werd ook een aantal andere effecten van thiolverbindingen beschreven. Kirrmann (1964) beschreef een daling van het zuurstofverbruik in weefselkweeken van embryonale weefsels van de kip door cysteamine; du Vigneaud et al. (1957) namen een remming van de transaminase-activiteit in de rattelever waar na toediening van l-penicillamine aan het dieet van de rat. De remming kon opgeheven worden door toediening van pyridoxine en pyridoxal-fosfaat. Deze waarneming werd bevestigd door Mardashev en Semina

(1961) en overeenkomstige resultaten werden verkregen na het geven van l-cysteïne en dl-homocysteïne. Laatstgenoemde onderzoekers verklaarden hun resultaten door aan te nemen, dat er een thiazolidineringsstructuur gevormd werd tussen het coferment pyridoxalfosfaat en de thiolverbinding. Ook de Marco et al. (1965) verklaarden een waargenomen tijdelijke remming van plasmamonoamine-oxydase door cysteamine, met de vorming van een thiazolidinering tussen cysteamine en pyridoxalfosfaat. Braunstein (1960) gaf een overzicht van de enzymsystemen, waarvan dit coferment deel uitmaakt. Deze vervullen een grote verscheidenheid van catalytische functies, vooral bij de biochemische transformaties van aminozuren en het verloop van de stikstofwisseling. Volgens deze auteur zijn alle pyridoxinederivaten goed bestand tegen oxydatie, doch vormen met l-amino-2-thiolverbindingen, zoals l-cysteïne, irreversibele thiazolidinederivaten. Voorts kunnen de NH_2 -groepen reversibele Schiff'se basen vormen.

Na een uitgebreide literatuurstudie kwam Therkelsen (1960) tot de conclusie dat de toxiciteit van thiol- en disulfideverbindingen in vitro voornamelijk veroorzaakt wordt door de vorming van gemengde disulfiden, waardoor grote groepen enzymen hun werkzaamheid verliezen. In het algemeen werd een concentratie van 1 mM als de ondergrens voor de toxiciteit gevonden. Door toevoeging van pyridoxalfosfaat (Mardashev en Semina, 1961) kan de toxiciteit van thiolverbindingen verminderd worden. Merkwaardigerwijze kan deze toxiciteit ook verminderd worden onder invloed van hogere concentraties van andere thiolverbindingen, zoals glutathion (Therkelsen, 1958) en cysteïne (Morgan en Morton, 1957).

Omtrent de toxiciteit van cysteamine, l-cysteïne en AET in het door ons gebruikte weefselkweekstelsel werden reeds mededelingen gedaan door Vos et al. (1962). Genoemde verbindingen bleken de overleving niet te beïnvloeden na een incubatie gedurende 20 tot 30 minuten met concentraties lager dan ongeveer 0,1 mM of concentraties tussen ongeveer 2 en 64 mM. Concentraties tussen 0,1 en 2 mM evenals concentraties hoger dan 64 of 128 mM bleken echter toxisch te zijn. Cystine en cystamine bleken de opvallende toxiciteit bij concentraties tussen 0,1 en 2 mM niet te vertonen. In dezelfde publikatie werd voorts vermeld, dat cysteamine in het laatstgenoemde concentratiegebied niet toxisch was, indien overmaat van een andere thiolverbinding (l-cysteïne) werd toegevoegd of de incubatie onder uitsluiting van zuurstof werd uitgevoerd.

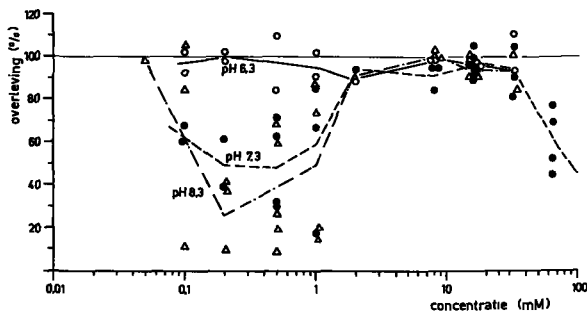
In dit hoofdstuk zullen nu de resultaten vermeld worden van een voortgezet onderzoek naar de invloed van verschillende thiolverbindingen op de overleving en de beïnvloeding van de toxiciteit door variaties in de pH en toevoeging van joodazijnzuur, KCN, serum, pyridoxalfosfaat of natriumthiosulfaat.

Achtereenvolgens zullen besproken worden:

- a. De invloed van verschillende concentraties (V.2.).
- b. Het effect van pH variaties tussen 6,3 en 8,3 (V.3.).
- c. Enige andere mogelijkheden om de toxiciteit te beïnvloeden (V.4.).

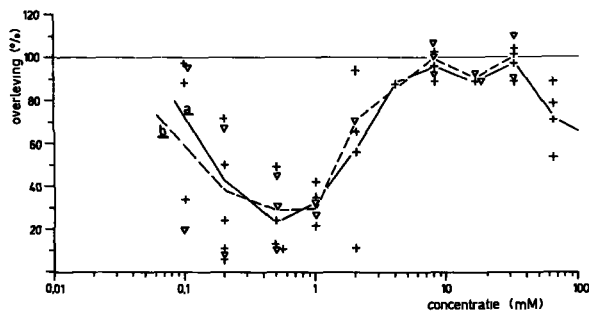
V.2. De invloed van de concentratie op de toxiciteit.

De beïnvloeding van de overleving door verschillende concentraties van de door ons gebruikte thiolverbindingen werd steeds bepaald door de cellen gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur te incuberen met een thiolooplossing in met fosfaat gebufferd medium bij pH 7,3. De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in de figuren 5, 6, 7



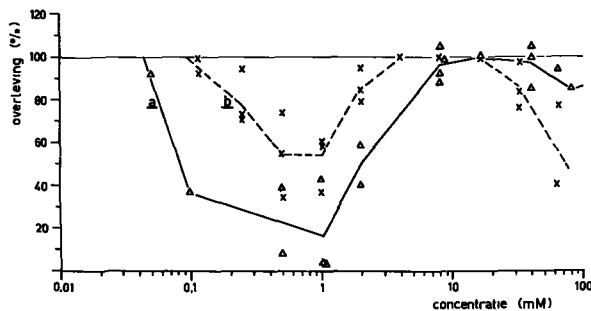
FIGUUR 5

Overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met verschillende concentraties cysteamine bij pH 6,3 (○), pH 7,3 (●) en pH 8,3 (△). De lijnen werden getrokken door de gemiddelden van de verschillende bepalingen bij één concentratie en pH.



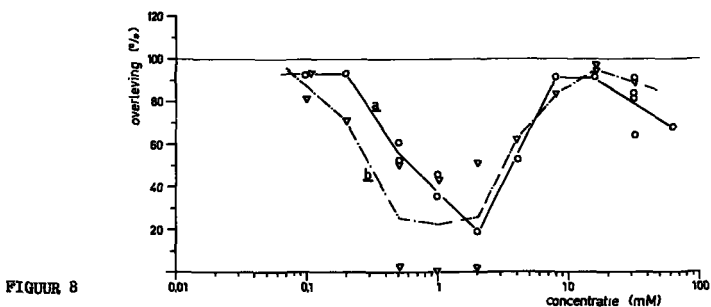
FIGUUR 6

Overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met verschillende concentraties l-cysteïne (+) en d-cysteïne (▽) bij pH 7,3. De lijnen a en b werden getrokken door de gemiddelden van de verschillende bepalingen bij één concentratie van respectievelijk l-cysteïne en d-cysteïne.



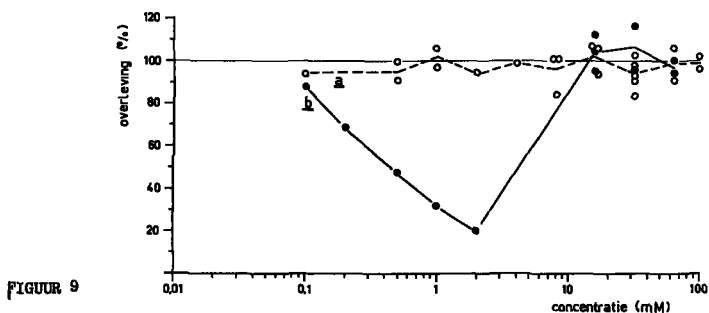
FIGUUR 7

Overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met verschillende concentraties l-glutathion (△) en AET (x) bij pH 7,3. De lijnen a en b werden getrokken door het gemiddelden van de verschillende bepalingen bij één concentratie van respectievelijk l-glutathion en AET



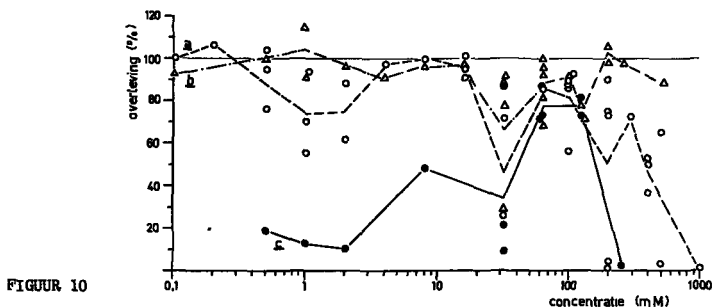
FIGUUR 8

Overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met verschillende concentraties dimethylaminoethanethiol (o) en diethylaminoethanethiol (v) bij pH 7,3. De lijnen a en b werden getrokken door de gemiddelden van de verschillende bepalingen bij één concentratie van respectievelijk dimethyl- en diethylaminoethanethiol.



FIGUUR 9

Overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met verschillende concentraties homocysteïne (•) en penicillamine (o) bij pH 7,3. De lijnen a en b werden getrokken door de gemiddelden van de verschillende bepalingen bij één concentratie van respectievelijk penicillamine en homocysteïne.



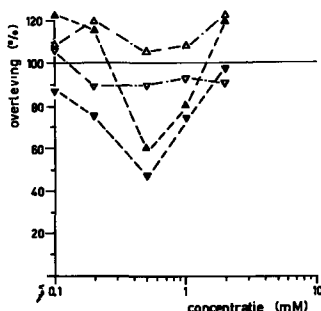
FIGUUR 10

Overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met verschillende concentraties thio glycol (o), hydroxy-cysteïne (•) en thio glycolzuur (Δ) bij pH 7,3. De lijnen a, b en c werden getrokken door de gemiddelden van de verschillende bepalingen bij één concentratie van respectievelijk thio glycol, thio glycolzuur en hydroxy-cysteïne.

8, 9 en 10. Opvallend zijn de sterk op elkaar lijkende toxiciteitspatronen van de aminothiolverbindingen, met als uitzondering penicillamine (figuur 9), dat de overleving niet bleek te beïnvloeden bij concentraties tussen 0,1 tot 256 mM. In het concentratiegebied van 0,1 tot ongeveer 2 mM bleken de overlevingspercentages van experiment tot experiment sterk te variëren (figuur 5 en 6), doch het gemiddelde lag steeds lager dan op grond van de toxiciteit van hogere concentraties van dezelfde verbindingen verwacht kon worden. De grote spreiding in deze resultaten werd reeds eerder beschreven door Vos et al. (1962) en doet vermoeden, dat kleine variaties in de kweekomstandigheden of de juiste thiolconcentratie tijdens de incubatieperiode, hiervoor verantwoordelijk gesteld moeten worden. Concentraties van 4 tot 64 mM waren vrijwel niet schadelijk. Ook de spreiding in de resultaten was in dit gebied slechts gering. Stijging van de concentraties boven 64 mM beïnvloedde de overleving weer nadelig. Uit figuur 8 blijkt, dat vervanging van de NH_2 -groep van cysteamine door $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$ - of $\text{N}-(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ -groepen de toxiciteit niet beïnvloedde. De toxiciteit van twee thiolverbindingen, waarin de NH_2 -groepen van cysteamine en cysteine waren vervangen door OH-groepen (thioglycol en hydroxycysteïne) wordt weergegeven in figuur 10. Het hydroxycysteïne en, in mindere mate, ook thioglycol geven eveneens een slechte overleving in het concentratiegebied tussen 0,1 en 1 mM. Mogelijk is hier ook de tweede toeneming van de toxiciteit bij 32 mM een reëel verschijnsel. Daar slechts een gering aantal waarnemingen met hydroxycysteïne gedaan kon worden, zijn bij de interpretatie van deze resultaten wel enige reserves gewenst. Thioglycolzuur, dat ook werd onderzocht, bleek bij concentraties tussen 0,1 tot 200 mM niet schadelijk te zijn.

V.3. De invloed van de pH op de toxiciteit.

De beïnvloeding van de toxiciteit door pH-verschillen tijdens de incubatie werd nagegaan bij cysteamine, d- en l-cysteïne en thioglycol.

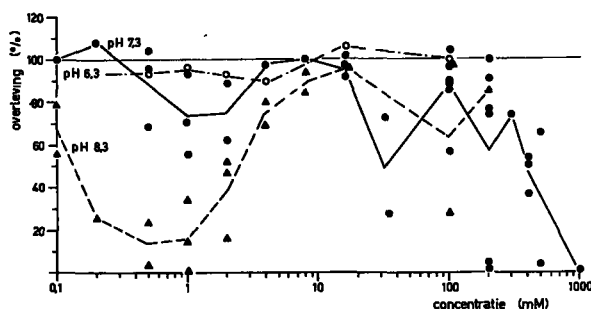


FIGUUR 11

Invloed van de pH op de overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met enige concentraties d- en l-cysteïne:

d-cysteïne bij pH 6,3 (v) en 8,3 (▼), l-cysteïne bij pH 6,3 (Δ) en 8,3 (▲).

Uit de resultaten weergegeven in de figuren 5, 11 en 12 kan de gevolgtrekking gemaakt worden, dat bij de 3 eerstgenoemde verbindingen een verhoging van de pH van 7,3 tot 8,3 geenszins effect had op de in V.2. beschreven toxische verschijnselen. Van thioglycol bleek echter bij pH 8,3 de toxiciteit in het 0,1 tot 2,0 mM concentratie-gebied zeer duidelijk toegenomen te zijn. Verlaging van de pH tot 6,3 had bij deze vier verbindingen een volkomen verdwijning van de toxiciteit bij de onderzochte concentraties ten gevolge.



FIGUUR 12

Overlevingspercentages na incubatie gedurende 20 minuten met verschillende concentraties thio glycol bij pH 6,3 (o), 7,3 (•) en 8,3 (Δ). De lijnen zijn getrokken door de gemiddelden van de verschillende bepalingen bij één concentratie en pH.

V.4. De invloed van enkele andere factoren op de toxiciteit.

In enige experimenten werd getracht aanvullende gegevens te verkrijgen betreffende de modificatie van de toxische effecten van een 20 minuten durende incubatie met 0,1 tot 1,0 mM cysteamine bij pH 8,3.

Van joodazijnzuur is bekend, dat het snel reageert met extra- en intracellulaire -SH-groepen (Bacq en Alexander p. 487, 1961). Een incubatie van de cellen gedurende 20 minuten met concentraties tot 1 mM joodazijnzuur bleek goed verdragen te worden. In tabel 8 zijn de resultaten gegeven van 2 proeven, waarbij de cellen aan een mengsel van 0,5 of 1 mM cysteamine met respectievelijk 0,5 en 1 mM joodazijnzuur werden blootgesteld. Tevens werd nagegaan of een vers bereide cysteamine-oplossing mogelijk minder toxisch was dan een oplossing die 20 tot 25 minuten oud was waardoor, zeker bij pH 8,3,

Tabel 8. De invloed van een toevoeging van 0,5 en 1 mM joodazijnzuur op de overleving na 20 minuten incubatie met 0,5 en 1 mM cysteamine (vers bereid of 20-25 minuten oud) bij pH 8,3.

Experiment nummer	Samenstelling incubatievloeistof (pH 8,3)	Overlevingspercentage
1	0,5 mM cysteamine (vers)	9,5
	0,5 mM cysteamine (25 minuten oud)	9,8
	1,0 mM joodazijnzuur (vers)	67,3
	0,5 mM cysteamine (vers) + 1 mM joodazijnzuur	5,9
	0,5 mM cysteamine (25 minuten oud) + 1 mM joodazijnzuur	7,4
2	0,5 mM cysteamine (vers)	59,7
	0,5 mM cysteamine (20 minuten oud)	28,5
	1,0 mM cysteamine (vers)	73,2
	1,0 mM cysteamine (20 minuten oud)	62,7
	0,5 mM joodazijnzuur	112,5
	1,0 mM joodazijnzuur	101,0
	0,5 mM cysteamine (20 minuten oud) + 0,5 mM joodazijnzuur	33,7
	1,0 mM cysteamine (20 minuten oud) + 1 mM joodazijnzuur	46,2

een aantal oxydatieprodukten van cysteamine ontstaan zijn. In experiment 1 bleek de vers bereide cysteamine-oplossing reeds maximaal toxisch te zijn. Deze toxiciteit werd niet duidelijk beïnvloed door veroudering of door toevoeging van 1 mM joodazijnzuur. In het tweede experiment waren de vers bereide 0,5 en 1 mM cysteamine-oplossing betrekkelijk weinig schadelijk, doch door veroudering nam de toxiciteit duidelijk toe. Ook nu beïnvloedde toevoeging van 0,5 of 1 mM joodazijnzuur de cysteaminetoxiciteit niet.

Daar van KCN bekend is, dat reeds geringe concentraties de oxydatie van thiolverbindingen verhinderen en zelfs in staat zijn cystine tot cysteine te reduceren (Tkachuk, 1964), werd in een derde en vierde proef nagegaan wat het effect van 1 mM KCN was op de toxiciteit van lage- toxische - concentraties cysteamine. Van KCN was reeds bekend, dat het in ons systeem in deze concentraties de overleving niet beïnvloedde (van der Meer et al., 1962). De resultaten van deze experimenten zijn vervat in tabel 9 en demonstreren fraai het verdwijnen van de toxiciteit van deze cysteamine-concentraties onder invloed van het toegevoegde KCN.

Tabel 9. Invloed van 1 mM KCN op de overleving na 20 minuten incubatie met verschillende concentraties cysteamine (pH 8,3)

Experiment nummer	Cysteamine concentratie (mM)	Overlevingspercentage	
		zonder	met 1 mM KCN
3	0,05	98,0	90,0
	0,1	106,0	110,2
	0,5	8,2	110,6
	1,0	8,8	101,0
4	0,2	38,4	91,0
	0,5	26,4	100,1
	1,0	19,7	98,5

Gezien het reducerende vermogen van $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ kon verwacht worden, dat ook deze stof mogelijk de toxiciteit van cysteamine zou opheffen. Integenstelling tot CN kan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ niet in de cel doordringen (Connors et al., 1964), en kan het dus alleen de extracellulaire oxydatie van cysteamine beïnvloeden. Uit tabel 10 blijkt dat concentraties van 1 tot 10 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ geen duidelijk effect hebben op de toxiciteit van 0,5 mM cysteamine.

Cysteamine gaat zeer snel gemengde disulfidebindingen aan met eiwitten (Pihl en Eldjarn, 1957). Verhoging van het serumgehalte van de normaal gebruikte 6 % tot 50 % zal daarom het gehalte aan vrij cysteamine verminderen. Uit tabel 10 blijkt de overleving door aanwezigheid van een hoge serumconcentratie inderdaad enigermate verbeterd te worden.

Een duidelijke vermindering van de toxiciteit bleek tenslotte te kunnen worden verkregen door toevoeging van 2 mM pyridoxalfosfaat bij een oplossing van 0,5 mM cysteamine. Pyridoxalfosfaat kan in de cel worden opgenomen en is in staat snel een thiazolidine verbinding met cysteamine aan te gaan (Braunstein, 1960; Mardashev en Semina, 1961). Ook werd beschreven dat pyridoxalfosfaat, gegeven na een blootstelling aan thiolverbindingen, de toxiciteit kan verminderen (du Vigneaud et al., 1957). Het werd daarom door ons ook na de cysteaminebehandeling aan de cellen toegediend. Het beschermende effect

bleek onder deze omstandigheden verdwenen te zijn (zie tabel 10), zodat waarschijnlijk niet van een hersteleffect gesproken mag worden.

Tabel 10. Invloed van respectievelijk 1 en 10 mM natriumthiosulfaat, 50 % kalverserum en 2 mM pyridoxalfosfaat op de overleving na 20 minuten incubatie met 0,5 mM cysteamine.

Experiment nummer	Samenstelling incubatie vloeistof	pH	Overlevingspercentage
3	0,5 mM cysteamine	8,3	8,2
	1,0 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	8,3	102,0
	0,5 mM cysteamine + 1,0 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	8,3	14,2
	10,0 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	8,3	99,0
	0,5 mM cysteamine + 10,0 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	8,3	16,6
4	0,5 mM cysteamine	8,3	26,4
	0,5 mM cysteamine + 50 % kalverserum	8,3	44,5
	10,0 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	8,3	96,1
	0,5 mM cysteamine + 10,0 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	8,3	18,7
5	0,5 mM cysteamine	7,3	31,5
	2,0 mM pyridoxal	7,3	99
	0,5 mM cysteamine + 2,0 mM pyridoxal	7,3	76,5
	0,5 mM cysteamine 3x wassen, 2,0 mM pyridoxal	7,3	34,5

V.5. Discussie en samenvatting.

Uit de bovenvermelde resultaten blijkt dat de toxiciteit van de onderzochte thiolverbindingen op het cellulaire niveau belangrijk gereduceerd kan worden door de cellen slechts 20 tot 40 minuten met deze stoffen te incuberen en daarna driemaal te wassen. Het is dan mogelijk concentraties tot 100 à 500 mM te gebruiken zonder dat de daling van de overleving een te grote omvang krijgt. Het zal waarschijnlijk mogelijk zijn nog hogere concentraties toe te passen door de wasprocedure vaker uit te voeren. Zwenk et al. (1965) konden namelijk met behulp van ^{35}S -cysteamine en ^{35}S -cysteïne aantonen, dat na driemaal wassen nog een vrij grote hoeveelheid ^{35}S -gemerkt materiaal in de T-cellen aanwezig was, welke hoeveelheid door herhaald wassen nog verminderd kon worden.

Zeer opvallend is de toxiciteit van vrijwel alle thiolverbindingen bij pH 7,3 tot 8,3 in het concentratiegebied van 0,1 tot 1 à 2 mM. De uitzonderingen in onze reeks werden gevormd door penicillamine en thioglycolzuur. Hoewel dit nog niet werd nagegaan, worden deze verbindingen mogelijk onvoldoende in de cel opgenomen. De afwezigheid van dit toxische effect kan echter ook veroorzaakt worden door de hoge pK-waarden van de thiolgroep van deze verbindingen (zie tabel 12 en 17). Hierdoor is de reactiviteit van deze thiolverbindingen bij pH 7,3 tot 8,3 slechts gering en zullen bijvoorbeeld de in de volgende alinea besproken oxydatieproducten vrijwel niet gevormd worden.

Het verdwijnen van de toxische verschijnselen bij concentraties van 0,1 tot 2 mM van de andere onderzochte thiolverbindingen door verlaging van de pH tot 6,3 (figuur 4, 10 en 11), door toevoeging van KCN (tabel 9), door gelijktijdige anoxie, of door toediening van een overmaat van een andere thiolverbinding (Vos et al., 1962), kan de

gedachte doen gaan in de richting van de mogelijke invloed van oxydatieprodukten. Onder de vier genoemde omstandigheden kan geen oxydatie optreden. Een verdere steun voor deze mogelijkheid wordt geleverd door de waarneming, dat bij thioglycol (pK-waarde ongeveer 9,6) de toxiciteit wel duidelijk toeneemt door verhoging van de pH van het medium van 7,3 tot 8,3 (figuur 12) in tegenstelling tot de toxiciteit van cysteamine (pK-waarde ongeveer 8,5) en cysteine (pK-waarde ongeveer 8,9), die nauwelijks beïnvloed wordt door deze pH-verhoging (figuur 5 en 11). Ook de mogelijke toename van de toxiciteit door het toepassen van een niet vers bereide, dus gedeeltelijk ontlede cysteamine-oplossingen (tabel 8) wijst in deze richting.

Het is onbekend aan welke afbraakprodukten van de thiolverbindingen gedacht moet worden bij het zoeken naar de feitelijke oorzaak van de toxiciteit. Het zijn kennelijk niet de disulfiden van deze verbindingen, daar cystamine en cystine niet schadelijk zijn in deze concentraties (Vos et al., 1962; Eaton en Scala, 1964).

De afwezigheid van een toxisch effect, optredend tijdens het uitwassen van hogere thiolconcentraties, waarbij uiteraard ook gedurende korte tijd de beschreven kritische concentraties moeten bestaan, doet vermoeden dat voor een schadelijk effect een voldoende lange reactietijd voorwaarde is.

Daar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ niet door de cellen opgenomen wordt (Connors et al., 1964) en dus alleen extracellulair door zijn reducerende eigenschappen de oxydatie van cysteamine kan beïnvloeden, kan het ontbreken van enig effect op de toxiciteit van cysteamine (tabel 10) misschien verklaard worden, doordat de toxische afbraakprodukten eerst intracellulair gevormd worden.

Over de vermindering van de toxiciteit door verhoging van de serum-concentratie (tabel 10) zijn onvoldoende experimentele gegevens bekend om hieruit conclusies te mogen trekken. Eaton en Scala (1964) vermeldde echter ook een vermindering van de toxische werking van cysteine op ascitestumorcellen in vitro door toevoeging van kalverse² rum aan het medium. Wellicht wordt door de verhoging van de serumconcentratie meer van de thiolverbindingen extracellulair gebonden, waardoor de effectieve concentratie verlaagd wordt.

In het eerder vermelde onderzoek van Zwenk et al. (1965) met door ³⁵S-gemerkte cysteamine werd ook de concentratie van de aan eiwit gebonden en niet aan eiwit gebonden ³⁵S-gemerkte celfracties in relatie tot de cysteamine concentratie in de incubatievloeistof bestudeerd. De concentraties van beide fracties bleken regelmatig te verminderen indien met minder cysteamine werd gefocubeerd, met als opvallende uitzondering een duidelijke stijging van de niet aan eiwit gebonden ³⁵S-fractie na incubatie met 0,5 mM cysteamine. Een verklaring hiervoor werd niet gevonden, doch een samenhang met de bij deze concentratie beschreven cellulaire toxiciteit lijkt te bestaan.

Voorlopig kan echter geen verdere verklaring van de waargenomen toxische verschijnselen gegeven worden. Voor het hierna te beschrijven onderzoek naar het stralingsbeschermende vermogen van de thiolverbindingen was het echter voldoende te weten dat:

- Concentraties van 4 tot 100 à 200 mM geen invloed op de kolonievorming uitoefenen, mits de incubatie niet langer dan 20 tot 40 minuten duurt en daarna voldoende gewassen wordt.
- Het niet mogelijk is, zonder speciale voorzorgen, het beschermende effect van concentraties tussen 0,1 en 2 mM te bestuderen, daar deze concentraties onder de gebruikte omstandigheden zeer cytotoxisch zijn en deze toxiciteit niet door uitwassen te voorkomen is.

Hoofdstuk VI

DE BESCHERMENDE WERKING VAN THIOLVERBINDINGEN

VI.1. Inleiding.

In hoofdstuk I werd reeds gesteld, dat bij de bestudering van de beschermende werking van thiolverbindingen het onderzoek zodanig gericht moest zijn dat farmacologische effecten konden worden uitgesloten. Daar de gebruikte thiolverbindingen allen gekenmerkt zijn door een duidelijke en slecht controleerbare farmacologische werking (zie V.1.), zullen hierdoor bij gebruik van proefdieren moeilijkheden te verwachten zijn. Ook om deze reden werd daarom bij ons onderzoek gebruik gemaakt van gefsoleerde zoogdiercellen. Om de verhouding tussen effectieve en toxische dosering te kunnen bepalen is het gebruik van proefdieren uiteraard wel nodig. Een aantal onderzoekers (Koch en Hagen, 1956; Langendorff en Koch, 1956; Koch, 1957; Doherty et al., 1957; Bradford et al., 1961; Jacobus en Daquisto, 1961; van Bekkum en Nieuwerkerk, 1963; en anderen) heeft op deze wijze getracht met derivaten van cysteamine en cysteine gunstiger resultaten te behalen, dan met cysteamine verkregen kunnen worden. Met dit onderzoek werden echter geen verbindingen gevonden die duidelijk beter werkten dan cysteamine. Ook was geender resultaten beter dan waargenomen kon worden na bestraling van dieren onder hypoxische omstandigheden. Dit gaf aanleiding tot de opvatting van verschillende auteurs, dat de beschermende werking van de thiolverbindingen toegeschreven moet worden aan anoxie, opgewekt in de te beschermen weefsels (zie o.a. Gray, 1955, 1961). Door vander Meer et al. (1961, 1962, 1963) en van der Meer en van Bekkum (1962) kon echter worden aangetoond, dat verschillende amino-thiolverbindingen, in tegenstelling tot de pressoraminen, dimethylsulfoxide, cyaniden en dergelijke, een onvoldoende daling van de zuurstofspanning in milt en beenmerg veroorzaakten, om daaraan de beschermende werking te kunnen toeschrijven.

In het algemeen wordt wel aangenomen dat er een duidelijke relatie bestaat tussen de chemische structuur en de beschermende werking van de verschillende thiolverbindingen. De meest actieve verbindingen bevatten een vrije -SH-groep aan het ene einde en een sterk basische amino- of guanidine-groep aan het andere einde van een onvertakte, 2 of 3 koolstofatomen tellende keten. Doherty (1960) wees erop, dat de ionisatieconstante pK van de thiolgroep door de nabijheid van de basische groep wordt verlaagd. Hierdoor zal in het fysiologische pH-gebied een redelijke hoeveelheid van de thiolmoleculen gefoniseerd zijn. De aminogroepen kunnen tevens farmacologische effecten veroorzaken. De beschermende activiteit van deze verbindingen neemt duidelijk af of verdwijnt geheel, wanneer de koolstofketen tot 4 of 5 atomen wordt verlengd en wanneer de waterstof van de thiolgroep wordt vervangen, bijvoorbeeld door een methylgroep. Koch (1957) en Bacq en Alexander (1961) vermeldde een grote reeks thiolverbindingen die inactief zijn of zelfs sensibiliserend zouden werken voor bestraling. Tot deze laatste groep zouden homocysteïne, isocysteïne, penicillamine, methylcysteïne, thioglycol, thioazijnzuur en anderen behoren. De beschermende werking werd in deze gevallen in het dierexperiment bepaald. Van verschillende van deze verbindingen werd echter in andere proefopstellingen wel een beschermende werking aangetoond (Grant en Vos, 1962; Hollaender en Stapleton, 1956b; Dewey, 1963b).

De thiolverbindingen blijken in het algemeen alleen de stralings-effecten te kunnen beïnvloeden, indien zij tijdens de bestraling aanwezig zijn. Künkel et al. (1956) beschreven echter een beschermend effect van cysteine, gegeven na bestraling van Glis glis tijdens een winterslaap. Deze resultaten konden echter niet bevestigd worden door Smith (1960) in een vergelijkbaar onderzoek bij de *Citellus tridecemlineatus*. Ook Val'dshteyn (1963) nam een beschermend effect waar van cysteamine, indien dit gegeven werd na bestraling van *E. coli* B en B/r en bestraling en toevoeging van cysteamine plaatsvonden in afwezigheid van zuurstof.

Door Morkovin en Puck (1958) werd voor het eerst bij geïsoleerde zoogdiercellen de beschermende werking van AET aangetoond. Ook Bases (1959) en Kelley en Wheeler (1961) konden in eenzelfde proefopstelling een beschermend effect van enkele amino-thiolverbindingen demonstreren. Oftedal et al. (1958) namen daarentegen in een kipefibroblastenkweek geen beschermend effect van cysteine en cysteamine waar. Daar geene dezer onderzoekers de beschermende stof na het bestralen verwijderde en de cellen hierdoor langdurig aan de verbinding werden blootgesteld, konden slechts lage doseringen gebruikt worden. Door Vos et al. (1962) werd echter aangetoond, dat ook hoge doseringen in de door Puck en Marcus (1955) ontwikkelde kweektechniek konden worden toegepast als de thiolverbindingen na de bestraling grondig werden uitgewassen. Enige mededelingen over dit onderzoek werden reeds gedaan door Vergroesen et al. (1961, 1962, 1963, 1964) en door Vos et al. (1962). Op grond van deze resultaten werd als werkhypothese aangenomen, dat de mate van de beschermende werking van verschillende thiolverbindingen eerder afhankelijk is van de concentratie aan thiolaat-groepen in het medium, dan van de totale thiol-concentratie. De juistheid van deze veronderstelling kon onderzocht worden door gebruik te maken van thiolverbindingen met uiteenlopende pK-waarden van de thiolgroepen. Verder kon door variatie van de pH van het medium de verhouding tussen thiolaat- en thiolgroepen bij één concentratie van een bepaalde thiolverbinding beïnvloed worden. Tenslotte werd de invloed nagegaan van verschillen in temperatuur tijdens de incubatieperiode voor de bestraling, daar uit de literatuur gevens bekend waren, dat hierdoor de cellulaire opname althans bij bacteriën, beïnvloed kon worden (Stapleton, 1960).

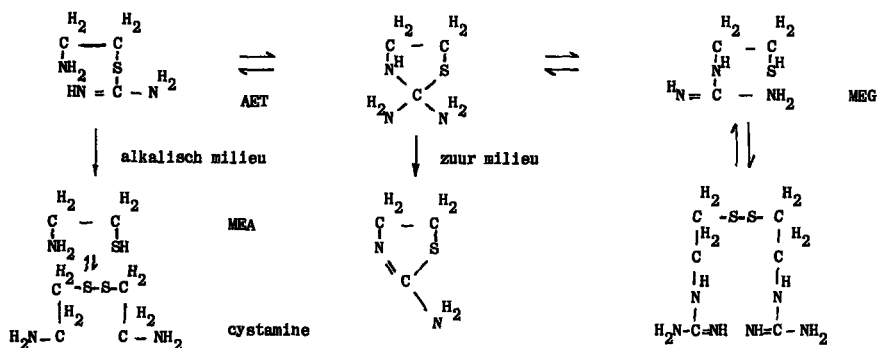
In dit hoofdstuk zullen achtereenvolgens de volgende onderwerpen behandeld worden:

- a. De invloed van de concentratie op de beschermende werking van cysteamine, d- en l-cysteïne, AET, l-glutathion, homocysteïne en penicillamine (VI. 2.).
- b. De invloed van de pH op de beschermende werking van enkele aminothiolverbindingen (VI. 3.).
- c. De invloed van de temperatuur op de beschermende werking van cysteamine (VI. 4.).
- d. Uitbreiding van het onderzoek met enkele thiolverbindingen, welke geen NH_2 -groepen bevatten (VI. 5.).

VI. 2. De invloed van de concentratie op de beschermende werking van aminothiolverbindingen.

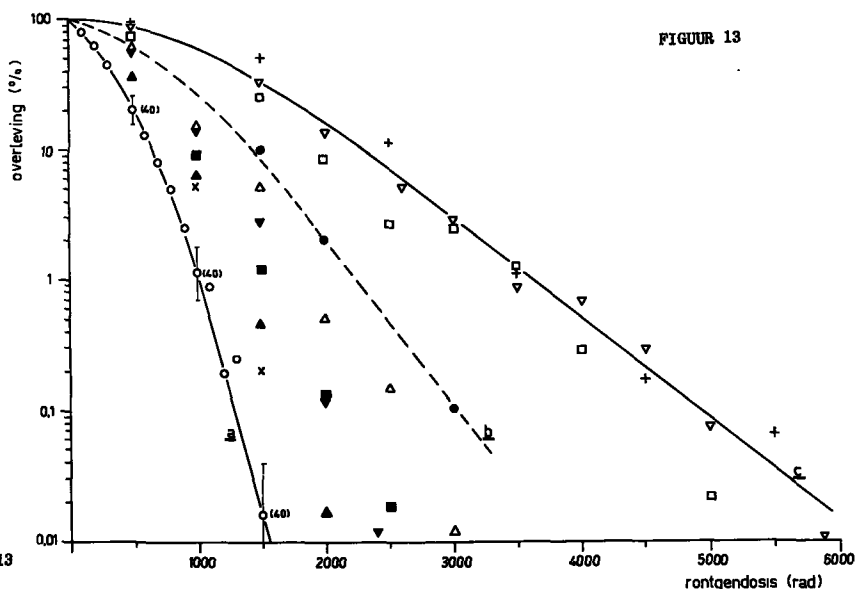
De verbetering van het beschermende effect van cysteamine, l-cysteïne en AET door verhoging van de concentratie werd reeds eerder beschreven door Vos et al. (1962). Enkele resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in figuur 13. Verhoging van de cysteamineconcentratie boven 32 mM bleek het beschermende effect niet meer te

kunnen vergroten en ook met de hoogste toegepaste concentratie van l-cysteïne (128 mM) kon geengrotere DRF verkregen worden dan ongeveer 3,7. Bij T-cellen was de maximaal te verkrijgen DRF met AET belangrijk lager dan met cysteamine, namelijk ongeveer 2,7. Van AET is bekend, dat het zelf niet werkzaam is doch bij neutraliseren kan overgaan in verbindingen, die een vrije -SH-groep bezitten. Volgens Doherty et al. (1957) kunnen de volgende reacties optreden:



Van de 6 mogelijke reactieproducten zijn slechts MEA (cysteamine) en MEG thiolverbindingen. Afhankelijk van de wijze van oplossen van het AET-HBr zout en de noodzakelijke neutralisering van de oplossing tot een fysiologische pH zullen zich verschillende evenwichten kunnen instellen. Daar hierdoor de interpretatie van de resultaten uitermate wordt bemoeilijkt, werd AET niet meer in het verdere onderzoek betrokken.

In de bovenvermelde reeks experimenten werd de incubatieduur gevarieerd tussen 10 en 30 minuten. De invloed van deze variabele op de bescherming door thiolverbindingen is onvoldoende nagegaan. Om deze mogelijke invloed uit te schakelen werd daardoor de incubatieduur op 10 minuten vastgesteld. Tevens werd in de boven omschreven experimenten een met bicarbonaat gebufferde kweekvloei-stof gebruikt, waardoor de pH van het milieu tijdens de proef geleidelijk opliep van 7,4 tot ongeveer 8,0. Omdat in het verdere onderzoek bleek, dat de pH een duidelijke invloed had op de werking van de amino-thiolverbindingen, werd in de volgende experimenten opnieuw het verband bepaald tussen concentratie en effect van cysteamine en l-cysteïne doch nu bij een constante pH (7,3 - 7,4). Tevens werden de volgende amino-thiolverbindingen mede in het onderzoek betrokken: d-cysteïne, homocysteïne, l-glutathion en penicillamine. De eerstgenoemde stof werd onderzocht om de invloed van de gewijzigde sterische configuratie in vergelijking tot l-cysteïne na te kunnen gaan. De andere verbindingen hebben hogere pK-waarden van de thiolgroepen dan cysteamine en daardoor bij pH 7,3 een lagere thiolaatconcentratie. Homocysteïne en penicillamine werden tevens onderzocht, omdat Koch (1957) en Bacq en Alexander (1961) geen beschermende werking van deze verbindingen konden waarnemen, terwijl deze op grond van onze werkhypothese wel, zij het in geringere mate dan van cysteamine, te verwachten was. De dosisreductiefactoren, verkregen met de verschillende concentraties van genoemde stoffen, werden berekend op de wijze als beschreven in II. 7., en zijn vermeld in tabel 11.



Overlevingspercentages van cellen, bestraald na een 10 tot 30 minuten durende incubatie met verschillende concentraties cysteamine (4 mM Δ , 16 mM $\square$, 32 mM ∇), l-cysteïne (4 mM Δ , 16 mM ∇ , 128 mM $\times$) en AET (4 mM $\times$, 16 mM $\blacksquare$, 128 mM $\bullet$): de pH liep tijdens de experimenten op van 7,4 tot ongeveer 8,0.

curve a: onbehandelde cellen $\circ$ — $\circ$ curve b: cellen behandeld met 128 mM AET $\bullet$ --- $\bullet$
curve c: cellen behandeld met 32 mM cysteamine ∇ — ∇

Tabel 11. Dosisreductiefactoren, verkregen na 10 minuten incubatie met verschillende concentraties van een aantal amino-thiolverbindingen. De incubatie werd bij pH 7,3 uitgevoerd.

Amino-thiolverbinding	DRF bij verschillende concentraties (mM)						
	8	16	32	40	64	80	100
cysteamine	3,0	3,5	4,3	-	4,8	-	-
l-cysteine	1,7	3,2	3,3	-	4,4	-	-
d-cysteine	1,4	2,8	3,1	-	-	-	-
homocysteine	-	1,5	1,7	-	2,0	-	-
l-glutathion	1,1	1,2	1,5	1,6	1,6	1,7	2,0
penicillamine	1,1	1,2	1,2	-	1,5	-	1,6

Uit de resultaten van dit onderzoek kan geconcludeerd worden, dat verhoging van de concentratie bij gelijkblijvende incubatieduur, pH en temperatuur, bij alle onderzochte verbindingen leidt tot een vergroting van de DRF. De hoogste DRF, welke met cysteamine en cysteïne kon worden bereikt, bedroeg ongeveer 4,5. Bij de andere verbindingen kon de DRF van 4,5 niet verkregen worden, tenzij zeer hoge door de cellen nauwelijks te verdragen, concentraties werden gebruikt. Opvallend is de geringere werking van d-cysteïne in vergelijking met equimolaire concentraties van l-cysteïne. Hoewel het verschil kwantitatief

niet groot was, bleek dat er een gering effect van de sterische structuur op de bescherming moet bestaan. Overeenkomstige waarnemingen werden gedaan door Devik (1954). Patt (1955) nam echter geen verschil in beschermende werking waar tussen d- en l-cysteïne bij bestraalde muizen. Bij vergelijking van de gegevens, vermeld in de tabellen 11 en 12, blijken de verschillen in beschermend effect van equimolaire concentraties van de onderzochte verbindingen in goede overeenstemming met de veronderstelling, dat de beschermende werking niet bepaald wordt door de concentratie van de SH-groepen, doch door de concentratie van de thiolaat-groepen. Een uitzondering op de regel werd gevormd door l - glutathion.

Tabel 12. pK-waarden van de thiolgroepen en thiolaatconcentraties bij pH 7,4 van enige amino-thiolverbindingen.

Amino-thiolverbinding	pK	%S ⁻ bij pH 7,4 (bij benadering)
cysteamine	8,5 ± 0,14	7,4
cysteïne	8,9 ± 0,20	3,0
glutathion	9,3 ± 0,07	1,2
homocysteïne	9,7 ± 0,21	0,4
penicillamine	10,8 ± 0,08	0,04

Reeds eerder werd beschreven, dat onder bepaalde omstandigheden de verlaging van de zuurstofspanning van het medium door oxydatie van cysteamine belangrijk tot de bescherming kan bijdragen (Vergroesen et al. 1963). Behandeling van de cellen in een gesloten, geheel met cysteamineoplossing gevuld, kweekbakje resulteerde in een veel grotere overleving dan werd gevonden onder de normaal gebruikte incubatieomstandigheden, waarbij een 2 tot 3 mm dik vloeistoflaagje in open contact met lucht stond. Cysteamine en cysteïne zullen bij gelijke pH meer aan oxydatie onderhevig zijn, dan de thiolverbindingen met een hogere pK-waarde. De verschillen in werkzaamheid van deze stoffen kunnen daarom ook verklaard worden door verschillen in de mate van hypoxie in het medium. In een reeks van experimenten werd daarom getracht de mogelijke invloed van de oxydatie uit te schakelen, door tijdens de incubatie het gehele extra-cellulaire milieu anoxisch

Tabel 13. Dosisreductiefactoren, verkregen na incubatie gedurende 10 minuten bij pH 7,3 onder anoxische omstandigheden met verschillende concentraties van enige amino-thiolverbindingen. Tijdens de stikstofoverlading werd 4 ml oplossing in de kweekschalen gelaten. De DRF ten gevolge van anoxie zonder thiolverbinding bedroeg ongeveer 2,1.

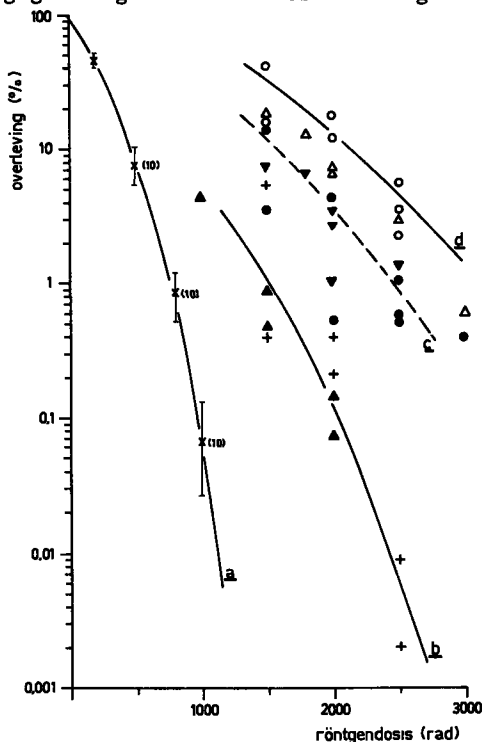
Verbinding	DRF bij verschillende concentraties (mM) onder anoxie				
	8	16	32	64	100
cysteamine	4,1	4,5	4,7	-	-
l-cysteïne	3,5	4,0	4,5	-	-
d-cysteïne	3,2	3,3	4,0	-	-
homocysteïne	3,4	3,7	3,7	3,8	-
l-glutathion	-	2,7	2,8	-	-
penicillamine	-	2,7	3,1	2,8	3,8

te maken door het overleiden van stikstof. De resultaten van het onderzoek naar de beschermende werking van enkele amino-thiolverbindingen bij pH 7,3 onder anoxische omstandigheden zijn weergegeven in tabel 13. De verschillen in beschermende werking van equimolaire concentraties bleken dus ook onder anoxie te blijven bestaan, hoewel de verschillen tussen de verbindingen wel geringer zijn dan bij een normale zuurstofspanning in het kweekmedium.

VI.3. De invloed van de pH op de beschermende werking van amino-thiolverbindingen.

Indien de verschillen in beschermende werking van equimolaire concentraties van de amino-thiolverbindingen inderdaad zouden berusten op verschillen in de bereikte concentratie van de $-S^-$ -ionen in de incubatievloeistof, dan zou door variatie van de pH bij constante concentratie van elk dezer verbindingen soortgelijke verschillen in beschermend effect waargenomen moeten worden.

In hoofdstuk III is beschreven dat, de cellen in staat zijn pH-variaties tussen 6,3 en 8,3 gedurende tenminste 30 minuten te doorstaan, zonder dat veranderingen in het kolonievormende vermogen of in de stralingsgevoeligheid konden worden waargenomen. De resultaten



FIGUUR 14

Invloed van de pH van het medium op de overleving na bestraling en incubatie met 16 mM cysteïne (pH 6,3 : +, pH 7,3 : •, pH 8,3 : o) en 32 mM l-cysteïne (pH 6,3 : Δ, pH 7,3 : ▽, pH 8,3 : Δ). De DMC a geeft de stralingsgevoeligheid weer van de gebruikte sublijn T₁ (x). Het aantal experimenten, waarop de standaardafwijking werd berekend is tussen () aangegeven. De curven b, c en d geven bij benadering de stralingsgevoeligheid weer na incubatie bij respectievelijk pH 6,3, 7,3 en 8,3 met 16 mM cysteïne of 32 mM l-cysteïne.

van een voorbehandeling van de cellen met 16 mM cysteamine en 32 mM l-cysteïne bij pH 6,3, 7,3 en 8,3 (zie II.2) zijn weergegeven in figuur 14. De dosisreductiefactoren, verkregen na behandeling met 16 mM cysteamine bij pH 6,3, 7,3 of 8,3 bedroegen respectievelijk 2,3, 3,5 en 4,8; ook voor 32 mM l-cysteïne werden, onder invloed van de pH, variaties in de DRF gevonden van gelijke grootte-orde.

Op grond van dezelfde overwegingen als in VI.2 naar voren werden gebracht, werd het voorgaande experiment met cysteamine onder anoxische omstandigheden herhaald. In tabel 14 zijn de resultaten weergegeven van een anoxische behandeling met 8 of 16 mM cysteamine bij verschillende pH. Hoewel de verschillen niet groot zijn, blijken zij bij toepassing van de "Sign-test" (Tate en Clelland, 1959) significant te zijn op het 5% niveau. Zij kunnen niet verklaard worden door de invloed van de pH op de overleving na bestraling onder anoxie, daar in IV.3. werd aangetoond, dat deze invloed voor zover aanwezig, zeer gering is.

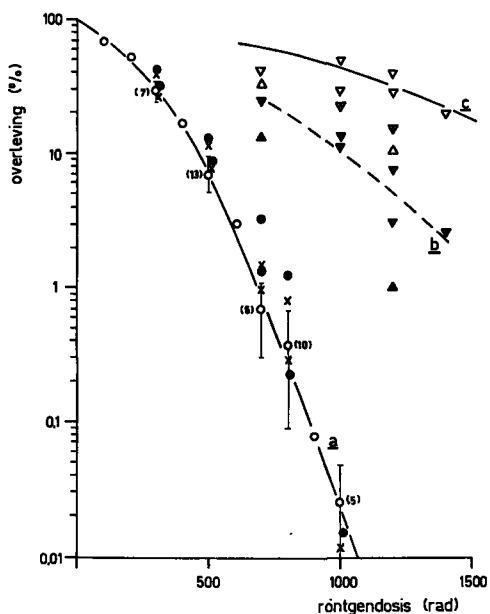
Tabel 14. Invloed van de pH van het medium op de stralingsgevoeligheid van T₁v- en T₁va-cellen na een incubatie met 8 en 16 mM cysteamine onder anoxische omstandigheden.

Experiment nummer	Cysteamine-concentratie (mM)	Röntgendosis (rad)	Overleving (%) na bestraling bij pH			
			6,3	6,9	7,3	7,9 8,3
1	8	1700	8,6	13,8		26,1 26,0
		2000	7,9	8,5		10,0 11,8
2	8	2000	7,1		9,1	9,8
3	8	2400	2,7		3,4	4,9
4	8	1800	8,7		8,8	15,8
5	16	2000	10,5		17,0	19,3
6	16	1800	11,3		12,9	17,2
		2400	3,4			7,6

VI. 4. De invloed van de temperatuur op de beschermende werking van cysteamine.

Door Kohn en Gunter (1959) werd beschreven dat E. coli B/r belangrijk minder door cysteïne tegen röntgenstraling werd beschermd, indien de temperatuur tijdens de incubatieperiode werd verlaagd van 22°C tot 0,1°C. De temperatuurdaling als zodanig beïnvloedde de stralingsgevoeligheid niet. Ook Stapleton (1960) vond bij E. coli B/r een duidelijke invloed van de temperatuur op de beschermende werking van een thiolverbinding. Cysteamine bleek in zijn experimenten ongeveer 10 maal effectiever te zijn bij 37°C dan bij 0-4°C. Hij concludeerde op grond van deze gegevens tot het bestaan van een actief biochemisch proces, noodzakelijk voor de opname in de cel en/of de interactie tussen de beschermende stof en de gevoelige plaatsen in de cel. Grayevskii et al. (1964) beschreven overeenkomstige resultaten bij Ehrlich ascitestumorcellen. De invloed van de temperatuur op de werking van cysteamine bleek ook in ons systeem duidelijk aantoonbaar en werd bepaald op de manier beschreven in II. 4. In figuur 15 zijn de resultaten weergegeven van een 10 minuten durende incubatie met 8 en 16 mM cysteamine bij pH 7,3 en 2°C of 37°C. Zoals in III. 3. werd

vermeld hebben deze temperatuurverschillen geen duidelijke invloed op de overleving van de onbehandelde cellen. Zo er al een verschil bestaat, is de overleving na bestraling bij 2°C beter dan bij 37°C.



FIGUUR 15

Invloed van de temperatuur van het medium op de overleving na bestraling en incubatie bij pH 7,3 met cysteamine in de concentraties van 0 mM (2°C ○, 22°C ◊, 37°C ×), 8 mM (2°C ▲, 37°C △) of 16 mM (2°C ▼, 22°C ▽, 37°C ▾). De DMC **a** geeft de stralingsgevoeligheid weer van de gebruikte sublijn T₁vc (○). De curven **b** en **c** geven bij benadering de stralingsgevoeligheid van de cellen weef na een incubatie met 16 mM cysteamine bij respectievelijk 2°C en 37°C. Het aantal experimenten, waarop de standaardafwijking werd berekend, is tussen () aangegeven.

Het beschermende effect van cysteamine uitgedrukt in de DRF is echter bij 37°C bijna tweemaal groter dan bij 2°C. Bij het bespreken van de resultaten in het volgende hoofdstuk zal nader op de betekenis van deze gegevens worden ingegaan.

VI. 5. De beschermende werking van enkele andere thiolverbindingen.

De in VI. 2. en VI. 3. beschreven resultaten bleken in overeenstemming te zijn met onze werkhypothese, dat de beschermende werking van de amino-thiolverbindingen afhankelijk is van de bereikte thiolaat-concentratie in het medium. In het volgende onderzoek werd nagegaan of deze veronderstelling ook geldt voor die thiolverbindingen, waarbij de NH₂-groep vervangen is door andere groepen.

In dit onderzoek werden betrokken:

a. dimethylaminoethaanthiol	(pK-waarde	8,0 ± 0,1)
b. diethylaminoethaanthiol	(" " "	8,0 ± 0,03)
c. thioglycol	(" " "	9,6 ± 0,03)
d. hydroxycysteïne	(" " "	10,3 ± 0,6)
e. thiolglycolzuur	(" " "	10,7 ± 0,1)

De resultaten van een 10 minuten durende incubatie bij pH 7,3 met de onder a. en b. genoemde verbindingen zijn vermeld in tabel 15. Ter vergelijking zijn tevens de dosisreductiefactoren bijgevoegd, verkregen na incubatie met cysteamine onder overeenkomstige omstandigheden.

Tabel 15. Dosisreductiefactoren, verkregen na incubatie gedurende 10 minuten bij pH 7,3 met 16 en 32 mM dimethyl- en diethylaminoethaanthiol. Ter vergelijking zijn tevens de overeenkomstige waarden voor cysteamine vermeld.

Thiolverbinding	pK-waarde thiolgroep	Dosisreductiefactor bij verschillende concentraties (mM)		
		16	32	64
dimethylaminoethaanthiol	$8,0 \pm 0,10$	-	2,3	3,4
diethylaminoethaanthiol	$8,0 \pm 0,03$	2,2	2,5	-
cysteamine	$8,5 \pm 0,14$	3,5	4,3	4,8

Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden, dat vervanging van de NH_2 -groep door $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ - of $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ -groepen, een belangrijke vermindering van het beschermend vermogen geeft. Op grond van de pK-waarden werd juist het tegenovergestelde verwacht. De mogelijkheid bestaat, dat het betrekkelijk geringe beschermende effect van dimethyl- (en diethyl-) aminoethaanthiol toe te schrijven is aan een trager verlopende cellulaire opname, dan bij cysteamine. De cellulaire opname is in dat geval mogelijk te vergroten door een verlenging van de incubatieduur. Daar beide verbindingen bij pH 7,3 aan een niet verwaarloosbare oxydatie onderworpen zijn, werd dit effect onder anoxie nagegaan. Hoewel nog lang niet een met cysteamine vergelijkbare DRF werd verkregen blijkt uit tabel 16, dat een verlenging van de incubatieduur wel resulteerde in een verbetering van de beschermende werking.

Tabel 16. Invloed van de incubatieduur op de DRF, verkregen na een behandeling met 16 mM cysteamine en dimethylaminoethaanthiol bij pH 7,3 onder gelijktijdige anoxie.

Thiolverbinding	Incubatieduur (min)	Dosisreductiefactoren	
		anoxie	16 mM + anoxie
dimethylaminoethaanthiol	10	2,0	2,5
	15	2,0	2,9
idem	10	2,2	2,2
	20	2,2	2,5
cysteamine	10	2,2	4,7
	20	2,2	4,6
	30	2,2	4,8

Op grond hiervan kan mogelijk geconcludeerd worden, dat dimethylaminoethaanthiol moeilijker door de cel wordt opgenomen dan de andere thiolverbindingen. Opgemerkt dient hier nog te worden, dat de bovenvermelde pK-waarde van diethylaminoethaanthiol mogelijk onjuist is. Hoewel deze pK op dezelfde wijze werd bepaald als van de andere verbindingen, vermeld Hagen (1957) enige gegevens, die doen vermoeden

dat genoemde pK in feite hoger is dan van cysteamine en cysteine. Hagen bepaalde namelijk de oxydatiesnelheid van cysteamine, cysteine, diethylaminoethaanthiol en thioglycolzuur, die onder zijn omstandigheden 25, 4, 17, 3, 13, 7 en 1,8 mm³ O₂ per uur bedroeg. Daar de oxydatiesnelheid onder andere afhankelijk is van de pK-waarde van de thiolgroep, zou op grond van deze gegevens de waargenomen bescherming door diethylaminoethaanthiol wel gecorreleerd zijn met de pK-waarde.

Een verhoging van de pK-waarde door vervanging van de NH₂-groep van cysteamine en cysteine door -OH (thioglycol, respectievelijk hydroxycysteïne) resulteerde eveneens in een vermindering van het beschermende effect in vergelijking tot de analoge aminothiolverbindingen (tabel 17).

Tabel 17. Dosisreductiefactoren, verkregen na incubatie gedurende 10 minuten bij pH 7,3, met verschillende concentraties van thioglycol, hydroxycysteïne en thioglycolzuur. Ter vergelijking zijn de overeenkomstige waarden voor homocysteïne bijgevoegd.

Thiolverbinding	pK-waarde thiolgroep	Dosisreductiefactoren bij verschillende concentraties (mM)			
		16	32	64	100 200
homocysteïne	9,7 ± 0,21	1,5	1,7	2,0	- -
thioglycol	9,6 ± 0,03	1,5	1,7	2,4	2,9 4,6
hydroxycysteïne	10,3 ± 0,6	-	1,2	1,4	1,7 2,3
thioglycolzuur	10,7 ± 0,10	-	1,2	1,4	1,5 1,9

Ook bij thioglycolzuur bleek de beschermende werking niet geheel te verdwijnen, hoewel hogere concentraties nodig waren om een duidelijk effect te boeken (tabel 17). Binnen deze groep thiolverbindingen bleek de werkhypothese betreffende de invloed van de pK-waarde dus van kracht te blijven.

Tabel 18. Dosisreductiefactoren, verkregen na incubatie gedurende 10 minuten onder anoxische omstandigheden bij pH 7,3 met verschillende concentraties van de vermelde thiolverbindingen. Voor cysteamine en l-glutathion werden de gemiddelde waarden gegeven van een groter aantal experimenten (zie tabel 11).

Thiolverbinding	Dosisreductiefactoren bij verschillende concentraties (mM) onder anoxie			
	0	16	32	64
dimethylaminoethaanthiol	2,0	2,5	3,0	2,9
diethylaminoethaanthiol	2,2	2,2	-	-
cysteamine (gemiddelde)	2,5	4,5	4,7	-
l-glutathion (gemiddelde)	2,5	2,7	2,8	-
thioglycol (1e exp.)	2,5	-	3,8	-
.. (2e exp.)	2,2	-	3,7	4,3
hydroxycysteïne (1e exp.)	2,2	-	3,0	2,7
.. (2e exp.)	1,7	2,6	2,8	-
thioglycolzuur (1e exp.)	2,1	-	2,7	-
.. (2e exp.)	2,3	-	2,6	2,7
.. (3e exp.)	2,2	-	2,5	-

Om dezelfde redenen, als vermeld in VI.2., werden boven beschreven experimenten herhaald onder anoxische omstandigheden. De resultaten, verkregen bij enkele experimenten, zijn samengevat in tabel 18. Ter vergelijking zijn tevens de dosisreductiefactoren vermeld, die verkregen werden na bestraling onder anoxie in hetzelfde experiment, waarin het effect van de gecombineerde behandeling werd nagegaan. Alle onderzochte thiolverbindingen oleken een, zij het soms geringe, verbetering van de DRF te geven, in vergelijking tot de DRF ten gevolge van anoxie alleen.

VI.6. Samenvatting.

De resultaten van de experimenten, die in dit hoofdstuk werden beschreven, kunnen als volgt worden samengevat:

1. Verhoging van de concentratie van de thiolverbindingen leidde in het onderzochte concentratiegebied tot een vergroting van de DRF.
2. Binnende groep van amino-thiolverbindingen bleek bij equimolaire concentraties een lagere pK-waarde van de thiolgroep gecorreleerd te zijn met een hogere beschermingsgraad, met uitzondering van l-glutathion.
3. d-Cysteine beschermde minder dan l-cysteine in gelijke concentraties, waardoor het bestaan van een sterische factor aannemelijk werd gemaakt.
4. Een verhoging van de temperatuur tijdens de incubatie met cysteamine van 22°C tot 37°C resulteerde in een verbetering van de beschermende werking. Een verlaging van de temperatuur tot 20°C verminderde daarentegen het beschermende effect van cysteamine.
5. Bij vervanging van de -NH₂-groep van cysteamine door -N(CH₃)₂ of -N(C₂H₅)₂ bleek, ondanks de lagere pK-waarden, de beschermende werking van deze verbindingen minder te zijn dan van cysteamine. Dit resultaat kan wellicht in hoofdzaak toegeschreven worden aan een trager verlopende opname in de cel van het dime-thyl- of diethylaminoethaanthiol.
6. Een verhoging van de pH van het medium, tijdens de incubatie met een der onderzochte thiolverbindingen, leidde steeds tot een duidelijke verbetering van het beschermende effect, terwijl een daling van de pH in een lagere DRF resulteerde.
7. Alle onderzochte thiolverbindingen bleken bij gebruik onder anoxische omstandigheden een verbetering te geven van het beschermende effect, dat met anoxie alleen verkregen kon worden. De invloed van de pK-waarde van deze stoffen en van de pH van het medium op de mate van de stralingsbescherming bleef, zij het in mindere mate, ook onder anoxische omstandigheden duidelijk waarneembaar.

Hoofdstuk VII

BESPREKING VAN DE RESULTATEN

De resultaten betreffende de stralingsbescherming door thiolverbindingen zullen thans beoordeeld worden in verband met de in hoofdstuk I vermelde werkhypothese waarin werd gepostuleerd, dat de beschermende werking van een thiolverbinding gecorreleerd is met de thiolaatconcentratie in het medium. Uit de resultaten vermeld in hoofdstuk VI blijkt dat in het algemeen een verhoging van de extracellulaire thiolaatconcentratie resulteert in een verbetering van de beschermende werking van een thiolverbinding. Indien aangenomen wordt dat er een rechtstreeks verband bestaat tussen de extra- en intracellulaire thiolaatconcentratie zou hieruit geconcludeerd kunnen worden dat de beschermende werking door de thiolaatgroepen wordt uitgeoefend. Het is echter niet uitgesloten dat de beschermende werking toegeschreven moet worden aan de intracellulaire thiogroepen, wanneer aangenomen wordt dat de extracellulaire thiolaatconcentratie een invloed heeft op de cellulaire opname van de thiolverbindingen. Om een keus tussen beide mogelijkheden te kunnen maken is het nodig om een inzicht te verkrijgen in de relatie tussen de extra- en intracellulaire thiol- en thiolaatconcentraties. Bezien wij nu in dit verband de verkregen resultaten, dan komen de volgende punten naar voren:

1. Een verhoging van de concentratie van de thiolverbindingen in de incubatievloeistof veroorzaakt een toeneming van de beschermende werking. Wij hebben niet onderzocht of een verhoging van de extracellulaire concentratie gecorreleerd is met een verhoging van de intracellulaire concentratie. Door Révész en Bergstrand (1963) werd echter aangetoond dat de intracellulaire, niet aan eiwit gebonden, thiolconcentratie van Ehrlich ascitestumorcellen inderdaad een functie is van de extracellulaire cysteamineconcentratie. De intracellulaire toename bleek echter wel achter te blijven bij een extracellulaire stijging van de thiolconcentratie. Révész en Bergstrand vonden hierbij een duidelijke correlatie tussen de toename van de DRF, die door ons werd waargenomen en de stijging van de intracellulaire thiolconcentratie bij toepassing van dezelfde cysteamineconcentraties. Door Zwenk et al. (1965) werden overeenkomstige waarnemingen gedaan bij de T-celijn. Hoewel deze gegevens dus wel in overeenstemming zijn met wat op grond van onze hypothese verwacht zou mogen worden, geven zij geen informatie omtrent de vraag of het de intracellulaire thiolaat- dan wel de thiolconcentratie is, die van belang is voor de beschermende werking.
2. Een verhoging van de temperatuur tijdens de incubatie tot 37°C resulteerde in een duidelijke verbetering van de beschermende werking van cysteamine in vergelijking tot de resultaten na incubatie bij 22°C. Een verlaging van de temperatuur tot 20°C verminderde daarentegen het beschermende effect. Ook de invloed van verschillende temperaturen op de cellulaire opname van ^{35}S -cysteamine werd door Zwenk et al. (1965) nagegaan. Bij 20°C bleek minder ^{35}S -gemerkt materiaal door de cellen opgenomen te worden, dan bij 22°C, terwijl bij 37°C duidelijk meer werd opgenomen. De invloed van de temperatuur op de mate van de stralingsbescherming is op grond van deze gegevens dus mogelijk geheel te verklaren als een invloed van de temperatuur op de cellulaire opname van thiolverbindingen.

3. De beschermende werking van thiolverbindingen werd vergroot door de pH van de incubatievloeistof te verhogen van 7,3 tot 8,3 en verminderd door een verlaging van de pH tot 6,3. Door deze pH-variëaties wordt de extracellulaire thiolaatconcentratie sterk beïnvloed. Dit gegeven levert een directe steun op voor de gestelde hypothese indien alleen de extracellulaire dissociatiegraad van de thiolverbinding in overweging wordt genomen. Daar geen directe intracellulaire pH-metingen mogelijk zijn, kan men echter slechts gissen naar de relatie tussen de extra- en intracellulaire pH. Hierdoor is het niet bekend of de dissociatiegraad van de intracellulaire thiolverbindingen in gelijke mate verandert, als die van de extracellulaire thiolverbindingen. Bij de reeds vermelde experimenten van Zwenk et al. (1965) werd ook de cellulaire opname van ³⁵S-cysteamine en ³⁵S-cysteïne in gelijke concentraties bij verschillende pH onderzocht. Bij pH 6,3 werd een belangrijk geringere cellulaire opname van met ³⁵S-gemerkt materiaal waargenomen dan bij pH 7,3 terwijl bij pH 8,3 de opname het grootst was. Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden, dat de opname van de thiolverbindingen door de cel afhankelijk is van de pH van het medium. Hiermede is echter niet uitgesloten dat variaties in de pH van de incubatievloeistof ook de dissociatie van de intracellulaire thiolgroepen kan beïnvloeden.
4. De beschermende werking van equimolaire concentraties van de verschillende thiolverbindingen was in het algemeen groter bij de stoffen met een lage pK-waarde van de thiolgroep dan bij verbindingen met een hoge pK-waarde. Daar de thiolaatconcentratie, onder overigens gelijke omstandigheden, bepaald wordt door de pK-waarde vormt dit gegeven een belangrijke steun voor de juistheid van de werkhypothese. De grotere beschermende werking van de verbindingen met een lage pK kan op intracellulair niveau op twee manieren verklaard worden:
 - a. De grotere beschermende werking berust op een vergrote cellulaire opname. Dit zou inhouden dat verbindingen met een lage pK-waarde beter door de cel opgenomen worden, mogelijk doordat de thiolverbindingen in de thiolaatvorm eerder de cellulaire membranen kunnen passeren. De in VI. 2. en VI. 5. beschreven geringe beschermende werking van l-glutathion, dimethyl- en diethylaminoethaanthiol, die kleiner was dan op grond van de respectievelijke pK-waarden verwacht werd, zou toegeschreven kunnen worden aan een bemoeilijkte cellulaire opname. Bij de reeds vermelde experimenten van Zwenk et al. werd de opname van met ³⁵S-gemerkt materiaal in de cellen bestudeerd na incubatie met gelijke concentraties ³⁵S-cysteamine, ³⁵S-l-cysteïne en ³⁵S-thioglycol. De hierbij waargenomen verschillen waren te gering om de conclusie te mogen trekken dat de verschillen in beschermend vermogen tussen deze verbindingen inderdaad zouden kunnen berusten op een verschil in cellulaire opname.
 - b. De verschillen in beschermende werking berusten niet op verschillen in cellulaire opname van de thiolverbindingen, doch op de verschillende thiolaatconcentraties die in de cellen zullen optreden na opname van gelijke hoeveelheden van de thiolverbindingen, afhankelijk van de pK-waarden van de respectievelijke thiolgroepen. Indien deze veronderstelling juist is kan geconcludeerd worden dat de beschermende werking van de thiolverbindingen uitgeoefend wordt door de gedissocieerde thiolgroepen. Daar de onder 4 a. vermelde experimentele resultaten van Zwenk et al. slechts indirecte gegevens verstrekken betreffende de feitelijke cellulaire opname van de verschillende thiolverbindingen zal nog een nader onderzoek verricht moeten worden betreffende deze opname.

Het voorgaande samenvattende kunnen de volgende voorlopige conclusies getrokken worden. De invloed, die de concentratie van de thiolverbinding, de temperatuur en de pH van het medium op de beschermende werking uitoefenden, kan geheel verklaard worden door de invloed die deze factoren op de cellulaire opname van de thiolverbindingen bleken te hebben. Indien de onder 4 a. vermelde gegevens van Zwenk et al. bevestigd kunnen worden, kan gesteld worden dat, althans wat betreft cysteamine, l-cysteïne en thioglycol, bij incubatie van de T-cellen met gelijke concentraties van deze verbindingen onder overigens gelijke omstandigheden vrijwel gelijke hoeveelheden hiervan door de cellen worden opgenomen. Op grond hiervan kan dan geconcludeerd worden dat de grote verschillen in beschermende werking van equimolaire concentraties van deze thiolverbindingen gecorreleerd zijn met de cellulaire thiolconcentraties en niet met de cellulaire thiolconcentraties.

In het volgende zal nagegaan worden in hoeverre het voorgaande het inzicht kan verruimen in de wijze waarop de thiolverbindingen hun beschermende werking uitoefenen. De in de literatuur beschreven verklaringen voor het beschermende effect van thiolverbindingen zijn voornamelijk gebaseerd op een viertal theoriën:

- a. Door oxydatie van de thiolverbindingen wordt anoxie veroorzaakt.
- b. Er worden gemengde disulfiden gevormd tussen de thiol- en disulfidegroepen van stralingsgevoelige moleculen en de beschermende verbindingen.
- c. Radicalen, gevormd door de ioniserende straling, worden onschadelijk gemaakt door de thiolverbindingen, voordat onherstelbare schade is aangericht.
- d. De thiolverbindingen treden als elektron-donors op, waardoor de reductiepotentiaal en daarmee de weerstand van de stralingsgevoelige moleculen toeneemt.

Ad a. Door Gray (1955, 1961), Marcovich (1957), van Bekkum en Brocades Zaalberg (1960) en van den Brenk (1963) werd de oxydatie van thiolverbindingen, leidende tot een daling van de intracellulaire zuurstofconcentratie als een mogelijke verklaring van de beschermende werking aangenomen. Zoals in hoofdstuk IV werd beschreven, is de maximaal bereikbare DRF door een zo volledig mogelijke anoxie van het extracellulaire milieu van de T-cellen 2,6. Ook in andere proefopstellingen werden overeenkomstige waarden gevonden bij bestraling onder anoxie. Uit de resultaten, vermeld in hoofdstuk VI, blijkt dat de dosisreductiefactoren bereikt bij toepassing van voldoende hoge concentraties van verschillende thiolverbindingen, belangrijk groter zijn (4,5 à 5,0). Hoewel hierdoor de factor oxydatie niet geheel uitgesloten wordt, wijst dit gegeven wel op het bestaan van andere factoren. Ook de beschermende werking van de thiolverbindingen bij pH 6,3 en onder anoxie, onder welke omstandigheden de factor oxydatie verwaarloosbaar klein geacht moet worden, kan als argument opgevat worden tegen deze verklaringsmogelijkheid. Soortgelijke waarnemingen werden gedaan door Kohn en Gunter (1959, 1960), Elias (1961) en Val'dshteyn (1963) bij *E. coli*. Uit onze experimenten is gebleken dat de verminderde beschermende werking van deze stoffen bij pH 6,3 in vergelijking tot die bij 7,3 geheel verklaard kan worden door de verminderde cellulaire opname bij pH 6,3. Van den Brenk (1963) heeft echter terecht opgemerkt, dat geen van de experimenten uitsluitend geeft over de invloed van de thiolverbindingen op de intracellulaire zuurstofconcentratie. Het is immers mogelijk dat ondanks een anoxie van het extracellulaire milieu geen volledige intracellulaire anoxie be-

reikt kan worden. De door de cel opgenomen thiolverbindingen zouden dan de intracellulaire zuurstofconcentratie nog verder kunnen doen dalen, met als gevolg een verbetering van de bescherming. Met deze veronderstelling zijn onze gegevens wel in overeenstemming te brengen, aangezien een hogere thiolaatconcentratie in de cel tot een verlaging van de zuurstofconcentratie zal kunnen leiden. Een argument tegen de stelling van van den Brenk wordt geleverd door de opvallend constante DRF ten gevolge van anoxie, die bij gebruik van zeer verschillende proefopstellingen werd gevonden (Gray, 1961). Het is namelijk moeilijk voorstelbaar hoe in deze verschillende systemen een gelijke hoeveelheid resterende zuurstof aanwezig zou kunnen blijven. Intracellulaire zuurstofmetingen zullen echter nodig zijn, voordat definitieve conclusies getrokken kunnen worden.

Ad b. Door Pihl en Eldjarn (1957, 1958) werd in een reeks biochemische experimenten een correlatie gevonden tussen de beschermende werking van verschillende thiol- en disulfideverbindingen en het vermogen van deze stoffen reversibele gemengde disulfidebindingen te vormen met de -SH- en -SS-groepen van de te beschermen moleculen. Deze gemengde disulfiden worden zeer snel - binnen een minuut - gevormd. Radicalen, gevormd in de naaste omgeving van het stralingsgevoelige molecuul, zullen volgens deze hypothese reageren met het gemengde disulfide. De -SS-binding wordt nu weer verbroken, waarbij het radicaal door het beschermende molecuul gebonden zal worden. Het beschermde molecuul herkrijgt dan zijn oude structuur. Indien het gevoelige molecuul zelf getroffen wordt verliest het een elektron. Door overdracht van een elektron vanuit de disulfidegroep zal een herstelproces plaatsvinden, terwijl de disulfidebinding verbroken zal worden. Hierbij moet aangenomen worden, dat de energie bij voorkeur door de beschermende helft van het molecuul wordt opgenomen en dat de thiolgroep van het getroffen molecuul weer gevormd wordt. Een krachtig argument tegen deze hypothese wordt echter geleverd door het feit, dat cystamine in verschillende cellulaire systemen geen beschermend effect heeft (Howard-Flanders en Alper, 1957; Vos et al., 1962; Nakken, 1965). Cystamine wordt in gelijke mate door de cellen opgenomen als cysteamine en is volgens Pihl en Eldjarn zeer goed in staat tot het vormen van gemengde disulfiden. Cystamine zal echter reageren met de thiolgroepen van eiwitten en peptiden, terwijl cysteamine en de andere thiolverbindingen ook met de disulfiden een reversibele uitwisseling kunnen aangaan. Mogelijk zijn de disulfidegroepen van de te beschermen moleculen echter gevoeliger voor bestraling dan de thiolgroepen. In dat geval zou deze hypothese toch een redelijke verklaring kunnen opleveren voor de beschermende werking van de thiolverbindingen, waarbij de pK-waarden van deze dan bepalend zijn voor de reactiviteit ten opzichte van de te beschermen moleculen en daardoor voor de mate van de te verkrijgen bescherming.

Ad c. Door Howard-Flanders (1960), Bacq en Alexander (1961), Bacq (1965), Nakken (1965) en anderen wordt aangenomen dat de beschermende werking van de thiolverbindingen berust op het onschadelijk maken van de door de bestraling opgewekte radicalen. De inactivering van de gevormde radicalen kan in principe op drie manieren plaatsvinden:

1. De radicalen gevormd bij de radiolysis van water, worden door de thiolverbindingen afgevangen, voordat zij de in het water opgeloste biologisch belangrijke moleculen langs indirecte weg beschadigen ("radical scavenging"). In verschillende radiochemische experimenten is aangetoond, dat de thiolverbindingen zeer goed in staat

zijn op deze wijze de stralingsschade te beperken (onder anderen Dale et al., 1949). De mogelijkheid ontbreekt echter om de bijdrage van deze vrije radicalen tot de waargenomen stralingsschade in complexe organismen te kunnen bepalen. Er bestaan ook onvoldoende experimentele gegevens die steun kunnen geven aan de hypothese dat thiolatgroepen beter tot "radical scavenging" in staat zijn, dan de ongedissocieerde thiolgroepen. Gezien de resultaten beschreven in dit proefschrift, zou dit verwacht mogen worden. Het bestaan van een grens, waarboven een verdere verhoging van de concentratie van een thiolverbinding niet meer resulteert in een verbetering van de DRF (Vos et al., 1962), kan erop wijzen dat, zo deze vorm van indirecte beschadiging intracellulair al een rol speelt, deze in het totaal van de biologische stralingsschade slechts een beperkt aandeel heeft.

2. Indien een stralingsgevoelig molecuul wordt getroffen, kan de door het molecuul opgenomen energie door een thiolverbinding worden overgenomen, voordat deze tot het ontstaan van een radicaal in het getroffen molecuul kan leiden ("energy transfer"). Hiertoe is het nodig dat de beschermende stof een binding met het stralingsgevoelige molecuul heeft aangegaan. De onder punt 2. besproken hypothese van Pihl en Eldjarn kan in feite als een bijzondere vorm van energie overdracht gezien worden. Experimentele steun voor deze hypothese werd voornamelijk verkregen met behulp van de paramagnetische resonantie technieken (Ormerod en Alexander, 1962, 1963; Henriksen et al., 1963, en anderen). Het is echter momenteel niet mogelijke resultaten van deze experimenten te gebruiken bij de verklaring van de beschermende werking van thiolverbindingen op het cellulaire niveau.

3. De door het getroffen molecuul opgenomen energie zou kunnen leiden tot het verlies van een waterstofatoom, waardoor een organisch radicaal gevormd wordt. Het molecuul kan in dit geval hersteld worden indien een beschermende thiolverbinding een waterstofatoom afgeeft, voordat het gevormde radicaal een onherstelbare reactie met de omgeving aangaat ("repair"). Deze hypothese werd door Howard-Flanders (1960) opgesteld ter verklaring van zijn experimenten betreffende de invloed van de zuurstofconcentratie op de stralingsbeschermende werking van thiolverbindingen bij bacteriofagen (T₂, wilde type). Een reactie tussen de radicalen, gevormd in het desoxyribonucleïnezuur (DNA) van de bacteriofaag, en zuurstof zou een onherstelbare beschadiging van het DNA-molecuul veroorzaken, tenzij de thiolverbinding, in competitie met zuurstof, het DNA-radicaal herstelt door het afgeven van een waterstofatoom. Volgens Howard-Flanders et al. (1963) zouden de thiolgroepen minder efficiënt werken dan zuurstof en eerst bij een ongeveer dertigmaal hogere concentratie van de thiolgroepen dan van zuurstof. Zouden beide met gelijke snelheid reageren met de DNA-radicalen. In de afwezigheid van thiolgroepen werd geen invloed van zuurstof op de stralingsgevoeligheid waargenomen. Dit werd verklaard door aan te nemen dat nu geen herstel door waterstofdonatie kon plaatsvinden, waardoor het DNA-radicaal blijft bestaan totdat een reactie met omgevende moleculen tot een irreversibele beschadiging heeft geleid. Deze herstel-hypothese werd ook door Bacq en Alexander (1961) en anderen gebruikt om de werking van thiolverbindingen te verklaren. Het aantrekkelijke van deze theorie is, dat hiermede tevens het zuurstofeffect verklaard kan worden. Onder anoxische omstandigheden kunnen de intracellulaire thiolverbindingen de stralingsgevoelige moleculen een zekere mate van bescherming bieden. Daar de intracellulaire thiolconcentratie betrekkelijk laag is, zal reeds een geringe toename van de zuurstofconcentratie de beschermende werking van de thiolverbindingen opheffen. De verschillen in

stralingsgevoeligheid van de verschillende celsoorten onder anoxische omstandigheden zouden dan, althans gedeeltelijk, verklaard kunnen worden door verschillen in het intracellulaire thiolgehalte. Experimentele steun hiervoor werd geleverd door Révész et al. (1963), Révész en Littbrand (1964) en Ueno et al. (1964).

De in hoofdstuk VI beschreven resultaten kunnen echter slechts ten dele verklaard worden met de hypothese van Howard-Flanders. De toeneming van de beschermende werking van de thiolverbindingen door een verhoging van de gebruikte concentratie en door een verhoging van de pH en temperatuur van het medium, is geheel te verklaren met de toeneming van het intracellulaire thiolgehalte en is in goede overeenstemming met bovengenoemde hypothese. Indien echter het gestelde onder punt 4 b. van deze discussie juist is, dan is bij een gelijke cellulaire opname van verschillende thiolverbindingen de beschermende werking van deze stoffen gecorreleerd met de bereikte intracellulaire thiolconcentratie. Dit gegeven nu is niet in overeenstemming met de veronderstelling van Howard-Flanders, dat het herstel van het getroffen molecuul berust op een waterstofdonatie door de thiolverbinding.

Ad d. Door Cohen et al. werd in 1957 gepostuleerd dat het stralingsgevoelige gedeelte van de cel gelokaliseerd is ergens in de oxydoreductie keten van de cellulaire stofwisseling. De gevoeligheid voor straling zou toenemen als deze moleculen in geoxydeerde toestand verkeren. In dit geval kunnen alle potentiële elektrondonors bescherming bieden door de toeneming van de reductiepotentiaal van het stralingsgevoelige gedeelte, terwijl alle elektronacceptors, zoals zuurstof, de stralingsgevoeligheid doen toenemen. Hoewel er onvoldoende experimentele gegevens bestaan om te kunnen stellen dat de oxydoreductie keten het meest stralingsgevoelige systeem in de cel is, biedt deze theorie in meer algemene zin een goede verklaring voor de met ons onderzoek verkregen resultaten. Door de - tijdelijke - reductie van bepaalde groepen van stralingsgevoelige moleculen - bijvoorbeeld -SS-groepen wordt een toestand verkregen waarin deze getroffen kunnen worden door een ioniserend deeltje zonder dat zij door het verlies van een elektron onherstelbaar beschadigd zullen worden. In het geval van de tot -SH gereduceerde -SS-groepen is nu immers te verwachten dat de getroffen -SH-groep via het gevormde -S radicaal met de andere -SH-groep zal reageren onder vorming van de oorspronkelijk aanwezige -SS-binding. Deze hypothese geeft, evenals de onder c.3. vermelde hypothese van Howard-Flanders, een verklaring voor het zuurstof-effect. Ook de resultaten van het in hoofdstuk VI beschreven onderzoek zijn in overeenstemming met bovenvermelde hypothese, daar een verhoging van het intracellulaire thiolgehalte onder invloed van concentratie, pH en temperatuur tot een vergroting van het aantal potentiële elektrondonors leidt, waarmee de toeneming van de beschermingsgraad goed gecorreleerd is. Indien het onder punt 4 b. van deze discussie gestelde juist zou zijn, dan vormt ook de invloed, die de pK-waarde van de thiolgroep op de beschermende werking bleek uit te oefenen, een krachtig argument voor de door Cohen et al. gepostuleerde hypothese. Bij een overigens gelijk thiolgehalte in de cel zal immers de mate, waarin de thiolgroepen gedissocieerd zijn tot thiolaatgroepen, de elektronen-afgifte aan de te beschermen moleculen bepalen. Daar gezien de in hoofdstuk VI beschreven resultaten, de bereikbare DRF door incubatie met thiolverbindingen niet onbeperkt groot is (zie ook Hollaender en Stapleton, 1956a; Vos et al., 1962) kan geconcludeerd worden dat, indien deze hypothese juist is, slechts een beperkte bescherming van de stralingsgevoelige moleculen mogelijk is door een vergroting van de reductiepotentiaal.

SAMENVATTING

De doelstelling van dit onderzoek was het verkrijgen van een beter begrip van de invloed van thiolverbindingen op de gevoeligheid van zoogdiercellen voor röntgenbestraling. Als hypothese werd gesteld dat de beschermende werking van de thiolverbindingen afhankelijk is van de thiolaat- en niet van de thiolconcentratie in de beschermende oplossing. De juistheid van deze veronderstelling werd onderzocht door de beschermende werking te vergelijken van een tiental thiolverbindingen, waarvan de pK-waarden van de thiolgroepen varieerden van 8,0 tot 10,8 en door de pH van een bepaalde thioloplossing te variëren tussen 6,3 en 8,3. Het proliferatieve vermogen na bestraling van gefsoleerde cellen, behorende tot een lijn van menselijke niercellen, werd als criterium gebruikt voor het stralingsbeschermende effect van de profylactische behandelingen. De cellen werden gekweekt volgens de "voedstercellentechniek", ontwikkeld door Puck et al. (1955, 1957).

De bij het onderzoek gebruikte materialen en methoden zijn beschreven in hoofdstuk II. Er werd zorg voor gedragen de experimentele omstandigheden zo constant mogelijk te houden, vooral met betrekking tot de pH van het medium en de methode die gebruikt werd voor het verkrijgen van anoxische cellen. De mate van de beschermende werking werd tot uitdrukking gebracht in het gemiddelde van de dosisreductiefactoren, verkregen bij de verschillende overlevingsniveaus.

In hoofdstuk III zijn de verschillen in de stralingsgevoeligheid beschreven van de cellen, behorende tot de verschillende sublijnen van de oorspronkelijke cellijn. De stralingsgevoeligheid van de cellen werd niet beïnvloed door variaties in de temperatuur tijdens de bestraling tussen 20°C en 37°C. Een verlaging van de pH van het medium van 7,3 tot 6,3 had eveneens geen invloed op de overleving na bestraling doch een verhoging van de pH tot 8,3 veroorzaakte mogelijk een geringe toename van de stralingsweerstand.

Door de cellen onder anoxische omstandigheden te bestralen werden dosisreductiefactoren van omstreeks 2,6 verkregen welke in goede overeenstemming zijn met de in de literatuur vermelde waarden (hoofdstuk IV). In een aantal experimenten werden lagere dosisreductiefactoren verkregen, mogelijk als gevolg van een minder volledige anoxie van het medium doordat in deze gevallen een grotere hoeveelheid medium op de cellen was gelaten. De mogelijkheid kon echter niet uitgesloten worden dat deze lagere waarden een gevolg zijn van een afname van de mate waarin de in deze experimenten gebruikte sublijnen door anoxie beschermd konden worden. Een toename van de pH van het medium tot 8,3 tijdens de anoxische behandeling van de cellen veroorzaakte een geringe toename van de stralingsweerstand van de cellen, vergeleken met de resultaten van een anoxische behandeling bij pH 7,3 of 6,3.

In hoofdstuk V wordt het onderzoek beschreven naar de toxiciteit van de thiolverbindingen in relatie tot enige variabelen. De incubatieperiode werd beperkt tot 20 - 40 minuten door de cellen na deze periode driemaal te wassen. Onder deze omstandigheden hadden concentraties lager dan 0,1 mM en tussen 2 tot ongeveer 100 mM geen invloed op het proliferatieve vermogen van de cellen. De thiolverbindingen, met uitzondering van thioglycolzuur en penicillamine, bleken echter zeer toxisch te zijn bij concentraties tussen 0,1 en 2,0 mM. Deze opvallende toxiciteit kon voorkomen worden door de incubatie uit te voeren onder anoxische omstandigheden, door de pH van de oplossing te verlagen tot 6,3 of door toevoeging van respectievelijk KCN, kalverserum, pyridoxalfosfaat of een overmaat van een andere thiolverbinding aan de oplossing, doch niet door toevoeging van $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. De schadelijke werking van de thiolverbindingen bij deze concentraties kan mogelijk het gevolg zijn van een irreversibele intracellulaire reactie van een bepaald oxydatieproduct van deze verbindingen met bepaalde bestanddelen.

De stralingsbeschermende werking van de thiolverbindingen is beschreven in hoofdstuk VI. Bij dit onderzoek werd een goede correlatie gevonden tussen de mate van het stralingsbeschermende effect en de thiolaatconcentraties in het medium. Deze correlatie werd ook gevonden na incubatie van de cellen met verschillende thiolverbindingen onder anoxische omstandigheden. Dimethyl- en diethylaminoethaanthiol en l-glutathion boden echter minder bescherming dan verwacht kon worden op grond van de pK-waarden van hun thiolgroepen. Een verklaring kan mogelijk gevonden worden in een vertraagde cellulaire opname, zoals deze aangetoond kon worden voor eerstgenoemde verbinding. Tevens bleek d-cysteïne minder te beschermen dan equimolaire concentraties l-cysteïne. Mogelijk werd dit ook veroorzaakt door een verminderde cellulaire opname als een gevolg van de sterische configuratie. Een verhoging van de temperatuur gedurende de profylactische incubatie van 22°C tot 37°C resulteerde in een belangrijk beter beschermende werking van cysteamine. Een verlaging van de temperatuur tot 20°C veroorzaakte daarentegen lagere dosisreductiefactoren dan verkregen werden bij 22°C.

In hoofdstuk VII werden deze resultaten besproken in betrekking tot de in dit proefschrift voorgestelde hypothese. Er bleken echter slechts weinig gegevens bekend te zijn betreffende de relatie tussen de extra- en intracellulaire thiolconcentraties. Uit de resultaten van onderzoeken, verricht door Révész en Bergstrand (1963) en Zwenk et al. (1965) kon de conclusie getrokken worden dat de verbetering van de beschermende werking van de thiolverbindingen, veroorzaakt door een toeneming van respectievelijk de concentratie, de pH of de temperatuur, zoals deze in onze experimenten werd waargenomen, verklaard zou kunnen worden door een toename van de intracellulaire thiolconcentratie. Door het onderzoek van Zwenk et al. (1965) werd echter aangetoond dat de verschillen in cellulaire opname van thiolgroepen door incubatie met equimolaire concentraties van verschillende thiolverbindingen slechts gering is. De grote verschillen in beschermende werking van equimolaire concentraties van deze verbindingen kunnen daarom niet verklaard worden door verschillen in de intracellulaire thiolconcentraties, doch blijken in goede overeenstemming te zijn met de verschillen in intracellulaire thiolaatconcentraties, veroorzaakt door de verschillende pK-waarden van de respectievelijke thiolgroepen. Indien deze voorlopige resultaten van Zwenk et al. (1965) bevestigd kunnen worden, kan de conclusie worden getrokken dat de beschermende werking van de thiolverbindingen wordt uitgeoefend door de gedissocieerde vorm van de thiolgroep. Indien deze conclusie juist blijkt te zijn kan een goede verklaring voor de wijze waarop de thiolverbindingen hun beschermende werking uitoefenen gevonden worden in een door Cohen et al. in 1957 voorgestelde hypothese.

SUMMARY

The purpose of this study was to obtain a better understanding of the influence of thiol compounds on the sensitivity of mammalian cells for x-irradiation. The hypothesis was postulated that the protective activity of the thiol compounds depends on the thiolate and not on the thiol concentration of the protective solution. This hypothesis was tested with the aid of ten thiol compounds with pK values of their thiol groups varying from 8.0 to 10.8 and by varying the pH of a certain thiol solution between 6.3 and 8.3. The proliferative capacity after irradiation of isolated cells, belonging to an established cell-line of human kidney cells, was used as a parameter for the radioprotective activity of the prophylactic treatments. The cells were plated with the feederlayer technique, developed by Puck et al. (1955, 1957).

The materials and methods used in our experiments are described in chapter II. Care was taken to keep the experimental conditions constant, especially those concerning the pH of the medium and the method used for the obtaining of anoxic cells. The amount of radioprotective action was expressed as the mean of the dose reduction factors, obtained at the different survival levels.

In chapter III the differences are described in the radiosensitivity of the cells, belonging to several sublines of the original cell line. No influence on the radiosensitivity could be demonstrated neither of variations of the temperature between 20°C and 37°C nor of a decrease of the pH of the culture medium from 7.3 to 6.3 during irradiation. An increase of the pH during irradiation to 8.3 might cause a slight improvement of the radioresistance.

By irradiating the cells under nitrogen-induced anoxic conditions dose reduction factors of about 2.6 were obtained, which are in good agreement with the values mentioned in the literature (chapter IV). In some experiments lower dose reduction factors were acquired. These might be the result of a less complete anoxia of the medium caused by an increase of the remaining fluid layer on the cells in these experiments. It could not be excluded however that these lower dose reduction factors resulted from a decrease of the amount, to which the cells of the sublines used in these experiments could be protected by anoxia. An increase of the pH of the medium to 8.3 during the anoxic treatment of the cells caused a slightly increased radioresistance of the cells as compared with the results of an anoxic treatment at pH 7.3 or 6.3.

The toxicity of the thiol compounds was investigated in relation to several variables (chapter V). The incubation period was limited to 20 - 40 minutes by washing the cells three times after this period. Under these conditions concentrations lower than 0.1 mM and between 2 to about 100 mM had no influence on the proliferative capacity of the cells. The thiol compounds, with the exception of thioglycolic acid and penicillamin, appeared to be very toxic however at concentrations between 0.1 and 2.0 mM. This striking toxicity could be prevented by incubation under anoxic conditions, by a decrease of the pH to 6.3 or by addition respectively of KCN, bovine serum, pyridoxalphosphate or an excess of another thiol compound, but not by the addition of $Na_2S_2O_3$ to the solution. The toxic action of the thiol compounds at these concentrations might be caused by an irreversible intracellular reaction of a specific oxidationproduct of these compounds with some cellular constituent.

The radioprotective action of the thiol compounds is described in chapter VI. In this investigation a good correlation was found between the amount of the radioprotective effect and the thiolate concentrations of the medium. This correlation was also found after incubation of the cells with different thiol compounds under anoxic conditions. Dimethyl- and diethylaminoethanethiol and l-glutathion however offered less protection than could be expected

on account of the pK-values of their thiol groups. An explanation might be found in a delayed cellular uptake as could be demonstrated for the first mentioned compound. Besides it was shown that d-cysteine protected less than equimolar concentrations of l-cysteine, possibly also by a reduced cellular uptake of d-cysteine as a result of the steric configuration. Finally it appeared that an increase of the temperature during the prophylactic incubation from 22°C to 37°C resulted in a much better protective action of cysteamine. A reduction of the temperature to 2°C caused on the other hand lower dose reduction factors than were obtained at 22°C.

In chapter VII these results were analysed with regard to the hypothesis, postulated in this thesis. It appeared however that there are only a few data known about the relation between the extra- and intracellular thiol concentrations. From the results of investigations performed by Révész and Bergstrand (1963) and Zwenk et al. (1965) the conclusion could be made that the increase of the radioprotective activity of the thiol compounds, caused by an increase either of the concentration or of the pH and the temperature of the medium, as was observed in our experiments, might be explained by an increase of the intracellular thiol concentrations. By the investigations of Zwenk et al. (1965) it was demonstrated however that the differences in cellular uptake of the thiol groups by incubation with equimolar concentrations of different thiol compounds are only slight. The great differences in radioprotective activity of equimolar concentrations of these compounds can therefore not be explained by the differences in the intracellular thiol concentrations but appear to be in good correlation with the differences in intracellular thiolate concentrations, caused by the different pK-values of the respective thiol groups. If these preliminary results of Zwenk et al. can be confirmed the conclusion might be drawn that the protective action of the thiol compounds is performed by the dissociated form of the thiol group. If this conclusion turns out to be correct a good explanation for the radioprotective mechanism of the thiol compounds might be found in a hypothesis suggested by Cohen et al. in 1957.

Curriculum Vitae

Na het verkrijgen van het diploma H.B.S.-B aan de Rijks-H.B.S. te 's-Hertogenbosch werd ik in 1945 ingeschreven als student in de Faculteit der Geneeskunde aan de Gemeenteuniversiteit te Amsterdam.

In 1948 legde ik het candidaatsexamen af en werd op 1 september van dat jaar aangesteld, aanvankelijk als student-assistent, later als assistent bij de afdeling embryologie onder leiding van Dr. H.A.L. Trampusch van het Anatomisch-Embryologisch Laboratorium (directeur: Prof. Dr. M.W. Woerdeman), welke functie ik met enige onderbrekingen tot oktober 1954 vervulde.

Het doctoraal-examen werd afgelegd in 1951, gevolgd door het arts-examen in 1954.

Op 15 november 1954 volgde mijn benoeming tot luitenant ter zee arts bij de Koninklijke Marine. In verband met mijn militaire werkzaamheden werd ik in 1958 voor enige dagen per week gedetacheerd bij het Medisch Biologisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie T.N.O. te Rijswijk (Z.H.) onder leiding van Prof. Dr. J.A. Cohen. Het onderzoek, waarvan de resultaten in dit proefschrift zijn neergelegd, werd verricht op de radiobiologische afdeling onder leiding van Dr. O. Vos. Het werd ook na de beëindiging van mijn dienstverband bij de Koninklijke Marine in november 1964 voortgezet, nu in dienst van de Rijksverdedigingsorganisatie T.N.O.

Graag wil ik van deze gelegenheid gebruik maken mijn dank te betuigen aan allen, die het mij mogelijk hebben gemaakt dit onderzoek te voltooien. De Schouten bij nacht arts W.A. Borgeld, T.A. de Haan en C. Mets dank ik voor het vertrouwen dat zij mij hebben willen schenken. Voorts dank ik mijn promotor Prof. Dr. J.A. Cohen voor de grote belangstelling die hij voor het onderzoek toonde, alsook Dr. O. Vos voor de vele waardevolle adviezen, die ik gedurende onze jarenlange nauwe samenwerking van hem heb ontvangen. Zijn opmerkingen ten aanzien van de redactie van het manuscript heb ik op hoge prijs gesteld. Het is niet doenlijk de namen te noemen van de vele andere medewerkers op het M.B.L. die mij in de loop der tijd met raad en daad hebben bijgestaan. De aangename onderlinge samenwerking, zo kenmerkend voor dit laboratorium, heb ik steeds bijzonder gewaardeerd. Mej. L. Budke ben ik zeer erkentelijk voor de voortreffelijke hulp die zij mij bij de experimenten heeft verleend. Mej. J.C. Sterk was verantwoordelijk voor de nauwkeurige uitvoering van de röntgenbestralingen. De zorg voor het glaswerk, een belangrijke factor bij de weefselkweekexperimenten, was in goede handen bij Mevr. J.P. Swets en Mej. M. van der Spek. De heren H.E. Groot Bramel en J.J. Weber en hun medewerkers dank ik voor de verzorging van de figuren en Mej. G. Landwier voor het typen van het manuscript.

Tenslotte dank ik het bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie T.N.O. voor de toestemming tot publikatie van dit onderzoek.

LITERATUUR

- Albert, A., Serjeant, E.P., 1962, Ionization constants of acids and bases, Methuen, London.
- Alper, T., 1963, *Brit.J.Radiol.* 36, 97-101.
- Andrews, H.L., Peterson, D.C., Jacobus, D.P., 1964, *Radiat.Res.* 23, 13-18.
- Bacq, Z.M., 1965, Chemical protection against ionizing radiation, Springfield, C.C. Thomas.
- Bacq, Z.M., Hervé, A., Lecomte, J., Fischer, P., Blavier, J., Dechamps, G., Lebihan, H., Rayet, P., 1951, *Arch.Int.Physiol.* 59, 442.
- Bacq, Z.M., Alexander, P., 1961, Fundamentals of Radiobiology 2nd Edit. London, Pergamon Press.
- Barendsen, G.W., 1964, *Ann.N.Y.Acad.Sciences* 114, 96-114.
- Barendsen, G.W., Beusker, T.L.J., 1960, *Radiat.Res.* 13, 832-840.
- Barendsen, G.W., Beusker, T.L.J., Vergroesen, A.J., Budke, L., 1960, *Radiat.Res.* 13, 841-849.
- Barendsen, G.W., Walter, H.M.D., 1964, *Radiat.Res.* 21, 314-329.
- Bases, R.E., 1959, *Cancer Res.* 19, 311-315.
- Bekkum, D.W. van, Brocades Zaalberg, O., 1960, Symposium on the immediate and low level effects of ionizing radiation, Edit. A.A.Buzatti-Traverso, London, Taylor and Francis, 155-166.
- Bekkum, D.W. van, Nieuwerkerk, H.T.M., 1963, *Int.J.Rad.Biol.* 7, 473-479.
- Belli, J.A., Bonte, F.J., 1963, *Radiat.Res.* 18, 272-276.
- Benson, R.E., Michaelson, S.M., Downs, W.L., Maynard, E.A., Scott, J.K., Hodge, H.C., Howland, J.W., 1961, *Radiat.Res.* 15, 561-572.
- Berry, R.J., 1964, *Brit.J.Radiol.* 37, 948-951.
- Bootsma, D., 1965, Dissertatie, Leiden.
- Brachet, J., 1960, *Nature* 186, 194-199.
- Brachet, J., Miraux-Jonckheere, A., 1962, *Exptl.Cell.Res.* 27, 539-547.
- Bradford, R.H., Shapira, R., Doherty, D.G., 1961, *Int.J.Rad.Biol.* 3, 595-608.
- Braunstein, A.E., 1960, *The Enzymes* vol.2. Edit. Ch. Boyer et al., London, Acad.Press, 113-184.
- Brenk, H.A.S. van den, 1963, *J.Coll.Radiol.Austr.* 7, 222-226.
- Chèvremont, S., Chèvremont, M., 1953, *C.R.Sc.Soc.Biol.*, 147, 164-166.
- Cohen, J.A., Vos, O., Bekkum, D.W. van, 1957, *Advances in Radiobiology*, Edit. G.C. de Hevesy et al., London, Oliver and Boyd, 134-146.
- Connors, T.A., Jeney, A., Jones, M., 1964, *Biochem.Pharmac.* 13, 1545-1550.
- Dale, W.M., Davies, J.V., Meredith, W.J., 1949, *Brit.J. Cancer*, 3, 31-41.
- Deschner, E.E., Gray, L.H., 1959, *Radiat.Res.* 11, 115-146.
- Devik, F., 1954, *Brit.J.Radiol.* 27, 463-466.
- Dewey, D.L., 1960, *Nature* 186, 780-782.
- Dewey, D.L., 1963a, *Radiat.Res.* 19, 64-87.
- Dewey, D.L., 1963b, *Int.J.Rad.Biol.* 7, 151-154.
- Dewey, D.L., Gray, L.H., 1961, *J.Polarograph. Soc.* 7, 1-11.
- Doherty, D.G., Burnett, W.T., Shapira, R., 1957, *Radiat.Res.* 7, 13-21.
- Doherty, D.G., 1960, *Radiation Protection and Recovery*, Edit. A. Hollaender, Oxford, Pergamon Press, 45-86.
- Eaton, M.D., Scala, A.R., 1964, *Exptl.Cell Res.* 33, 481-494.
- Elkind, M.M., Sutton, H., 1960, *Radiat.Res.* 13, 556-593.
- Elias, C.A., 1961, *Radiat.Res.* 15, 632-640.
- Evans, H.J., 1962, *Int.Rev.Cytology* 13, 221-321.
- Evans, H.J., Neary, G.J., 1959, *Radiat.Res.* 11, 636-641.
- Fotakis, N.S., 1963, *Exptl.Cell Res.* 30, 600-602.
- Fowler, J.F., 1964, *Phys.Med.Biol.* 9, 177-188.
- Fowler, J.F., Stern, B.E., 1963, *Brit.J.Radiol.* 36, 163-173.
- Grant, G.A., Vos, O., 1962, *Int.J.Rad.Biol.* 5, 413-425.
- Gray, L.H., 1955, *Progress in Radiobiology*, Edit. J.S. Mitchell et al., London, Oliver and Boyd, 267-278.
- Gray, L.H., 1960, *Proc.Conference on Research on the Radiotherapy of Cancer*, *Am.Cancer.Soc.*, 70- 97.
- Gray, L.H., 1961, *The initial effects of ionizing radiation on cells*, Edit. R.Harris, London, Acad. Press, 21-44.
- Grayevskii, E.Ya., Konstantinova, M.M., Nekrasova, I.V., Tarasenko, A.G., 1964, *Zh.Obshch.Biol.* 25, 298-301.
- Hagen, U., 1957, *Advances in Radiobiology*, Edit. G.C. de Hevesy et al., London, Oliver and Boyd, 187-191.

- Han, A., Militić, B., Petrović, D., Jović, D., 1964, *Int. J. Rad. Biol.* 8, 201-211.
- Henriksen, T., Sanner, T., Pihl, A., 1963, *Radiat. Res.* 18, 163-176.
- Hersch, P.A., 1960, *Analyt. Chem.* 32, 1030.
- Hewitt, H.B., Wilson, C.W., 1959, *Brit. J. Cancer*, 13, 69-75.
- Hine, G.J., Brownell, G.L., 1956, *Radiation Dosimetry*, New York, Acad. Press, 904.
- Hollaender, A., Stapleton, G.H., 1956a, *Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiation and Cell Metabolism*, Edit. G.E.W. Wolstenholme and C.M. O' Connor. London, Churchill, 120.
- Hollaender, A., Stapleton, G.E. 1956b, *Peaceful uses of atomic energy*, 11, 311-314.
- Howard-Flanders, P., 1960, *Nature* 186, 485-487.
- Howard-Flanders, P., Alper, T., 1957, *Radiat. Res.* 7, 518-540.
- Howard-Flanders, P., Levin, J., Theriot, L., 1963, *Radiat. Res.* 18, 593-606.
- Hulse, E.V., 1963, *Intern. J. Rad. Biol.* 6, 323-329.
- Irving, R.J., Nelander, L., Wadsö, L., 1964, *Acta Chem. Scand.* 18, 769-787.
- Jackson, J.F., Lindahl-Kiersling, K., 1964, *Exptl. Cell Res.* 34, 515-524.
- Jacobus, D.P., Dacquist, M.P., 1961, *Military Med.* 126, 698-700.
- Kelley, G.G., Wheeler, G.P., 1961, *Radiat. Res.* 14, 174-183.
- Kirrmann, J.M., 1964, *C.R.Sc. Acad. Sci.*, 258, 4379-4381.
- Koch, R., 1957, *Advances in Radiobiology*, Edit. G.C. de Hevesy et al., London, Oliver and Boyd, 170-173.
- Koch, R., Hagen, U., 1956, *Progress in Radiobiology*, Edit. J.S. Mitchell et al. London, Oliver and Boyd, 246-248.
- Koch, R., Langendorff, H., Melching, H.J., 1961, *Chemotherapia* 3, 153-175.
- Kohn, H.I., Gunter, S.E., 1959, *Radiat. Res.* 11, 732-744.
- Kohn, H.I., Gunter, S.E., 1960, *Radiat. Res.* 13, 250-255.
- Künkel, H.A., Hohne, G., Maass, H., 1957, *Advances in Radiobiology*, Edit. G.C. de Hevesy et al., London, Oliver and Boyd, 176-180.
- Langendorff, H., Koch, R., 1956, *Strahlenther.* 99, 567-576.
- Ludovici, P.P., Pock, R.A., Christian, R.T., Miller, N.F., 1961, *Radiat. Res.* 14, 131-140.
- Marco, C. de, Coletta, M., Bombardieri, G., 1965, *Nature* 205, 176.
- Marcovich, H., 1957, *Annales de l'Institut Pasteur* 93, 456.
- Marcus, P.L., Cieciora, S.J., Puck, T.T., 1956, *J. Exptl. Med.* 104, 615-627.
- Mardashev, S.R., Semina, L.A., 1961, *Biochemistry* 26, 27-34.
- Mazia, D., 1953, *Glutathion Symposium*, Edit. S. Colowich, New York, Acad. Press, 209-228.
- Mazia, D., 1961, *Biological Structure and Function II*, Edit. T.W. Goodwin and O. Lindberg, London, Acad. Press 473-496.
- Meer, C. van der, Valkenburg, P.W., Remmelts, M., 1961, *Nature* 189, 588-589.
- Meer, C. van der, Bekkum, D.W. van, 1962, *Int. J. Rad. Biol.* 4, 105-110.
- Meer, C. van der, Brocades Zaalberg, O., Vos, O., Vergroesen, A.J., Bekkum, D.W. van, 1962, *Int. J. Rad. Biol.* 4, 311-319.
- Meer, C. van der, Valkenburg, P.W., Remmelts, M., 1963, *Int. J. Rad. Biol.* 6, 151-155.
- Morgan, J.F., Morton, H.J., 1957, *Can. J. Biochem. and Physiol.* 35, 785-794.
- Morkovin, D., Feldman, A., 1959, *Brit. J. Radiol.* 32, 282.
- Morkovin, D., Puck, T.T., 1958, *Radiat. Res.* 9, 155-156.
- Nakken, K.F., 1965, *Current Topics in Radiation Research vol. 1*, Edit. Ebert and Howard, Amsterdam, North-Holland Publish. Comp., 49-92.
- Oftedal, P., Oftebro, R., Eker, R., 1958, *Avhandlingar u.a.d. Norske Videnskaps Akademi i Oslo: I Mat-Naturv. Klasse* 3, 225-244.
- Oliver, R., Shepstone, B.J., 1964, *Phys. Med. Biol.* 9, 167-175.
- Ormerod, M.G., Alexander, P., 1962, *Nature* 193, 291.
- Ormerod, M.G., Alexander, P., 1963, *Radiat. Res.* 18, 495-509.
- Parker, R.C., 1961, *Methods of Tissue Culture*, 3rd ed., New York, P.H. Hoeber Inc., 58.
- Patt, H.M., 1955, *Radiobiology Symposium*, Edit. Z.M. Bacq and P. Alexander, London, Butterworth, 105-109.
- Patt, H.M., Tyree, E.P., Straube, R.L., Smith, D.E., 1949, *Science* 110, 213.
- Pihl, A., Eldjarn, L., 1957, *Advances in Radiobiology*, Edit. G.C. de Hevesy et al. London, Oliver and Boyd, 147-159.

- Pihl, A., Eldjarn, L., 1958, *Pharmalogical Reviews*, 10, 437- 474.
- Puck, T.T., Marcus, P.I., 1955, *Proc.Nat.Acad.Sci.* 41, 432- 437.
- Puck, T.T., Morkovin, D., Marcus, P.I., Cieciura, S.J., 1957, *J.Exptl.Med.* 106, 485-500.
- Rapkin, L., 1930, *C.R.Sc.Acad.Sci.* 191, 871-874.
- Révész, L., Bergstrand, H., 1963, *Nature* 200, 594-595.
- Révész, L., Bergstrand, H., Modig, H., 1963, *Nature* 198, 1275-1277.
- Révész, L., Littbrand, B., 1964, *Nature* 203, 742-744.
- Schrek, R., 1943, *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.* 54, 283-285.
- Shapiro, B., 1964, *The Medical Clinics of North America*, Edit. H.F. Conn, London, Saunders, 48, 547-561.
- Smith, D.E., 1960, *Radiat.Res.* 12, 79- 80.
- Srinivasan, P.R., Brunfaut, M., Errera, M., 1964, *Exptl.Cell.Res.* 34, 61-70.
- Stapleton, G.E., 1960, *Radiation Protection and Recovery*, Edit. A. Hollaender, London, Pergamon Press, 87- 116.
- Stefano, V. di, Korn, P.S., Leary, D.E., 1963, *Radiat.Res.* 18, 177- 185.
- Tate, M.W., Clelland, R.C. , 1959, *Nonparametric and Shortcut Statistics*, Danville, Ill. U.S.A., Interstate printers and publishers Inc., 100-101.
- Therkelsen, A.J., 1958, *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 42, 201-215.
- Therkelsen, A.J., 1960, *Thesis Aarhus Universitet, Odense, Andelsbogtrykkeriet.*
- Tkachuk, R., 1964, *Can. J. Bioch.* 42, 1509-1513.
- Ueno, Y., Horikawa, M., Aoyama, T., Sugahara, T., 1964, *Folia Biol. (Praha)* 10, 39-44.
- Val'dshteyn, E.A., 1963, *Reaction of cells to the effects of extreme conditions*, Moscow-Leningrad, 126- 133.
- Veen, J. van der, Bots, L., Mes, A., 1958, *Arch.Ges.Virusforschung* 8, 230-238.
- Vergroesen, A.J., Budke, L., Vos, O., 1961, *Int.J.Rad.Biol.* 3, 330.
- Vergroesen, A.J., Budke, L., Vos, O., 1962, *Nature* 194, 100-101.
- Vergroesen, A.J., Budke, L., Vos, O., 1963, *Int.J.Rad.Biol.* 6, 117-126.
- Vergroesen, A.J., Budke, L., Cohen, J.A., 1964, *Nature* 204, 246-247.
- Vigneaud, V. du, Kuchinskas, E.J., Horvath, A., 1957, *Arch.Biochem.and Bioph.* 69, 130-137.
- Vos, O., Budke, L., Vergroesen, A.J., 1962, *Int.J.Rad.Biol.* 5, 543-557.
- Vos, O., Kaalen, M.C.A.C., 1962, *Int.J.Rad.Biol.* 5, 609-621.
- Zwenk, H., Vergroesen, A.J., Vos, O., 1965, publikatie in voorbereiding.