

**Autoradiographische Modelluntersuchungen an der Maus
zum Einfluss einer achtwöchigen 50 Hz Magnetfeld-Exposition
auf DNA-Reparatur und mitochondriale DNA-Synthese
von Tubulusepithelzellen der Niere**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Sepideh Salimi
aus Teheran (Iran)

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr

Herr Professor
Dr.-Ing. Jiri Silny

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Gewidmet meinen geliebten Eltern

Inhalt

1	Einleitung	- 1 -
2	Material und Methoden	- 5 -
2.1	Versuchstiere	- 5 -
2.2	Radioaktive Substanz	- 5 -
2.3	Tierversuche	- 6 -
2.3.1	Magnetfeld-Exposition	- 6 -
2.3.2	Injektion von ³ H-Thymidin	- 10 -
2.3.3	Narkotisierung der Versuchstiere und Perfusionsfixation	- 10 -
2.3.4	Organentnahme und Weiterbehandlung	- 11 -
2.4	Herstellung der histologischen Präparate	- 12 -
2.4.1	Einbettung in Paraplast	- 12 -
2.4.2	Herstellung histologischer Schnitte	- 12 -
2.4.3	Färbung der histologischen Schnitte	- 13 -
2.5	Herstellung der Autoradiogramme	- 14 -
2.5.1	Dunkelkammer	- 14 -
2.5.2	Aufbringen der Fotoemulsion nach der Dipping-Methode	- 14 -
2.5.3	Exposition der Autoradiogramme	- 15 -
2.5.4	Entwicklung und Fixation	- 15 -
2.5.5	Gegenfärbung des Cytoplasmas und Eindeckelung	- 16 -
2.6	Auswertung der Autoradiogramme	- 16 -
2.6.1	Verwendetes Mikroskop und Computerprogramm	- 16 -
2.6.2	Untersuchte Zellarten und Kriterien der Auswertung	- 16 -
2.7	Korrekturverfahren	- 17 -
2.7.1	Nulleffekt der Autoradiogramme	- 17 -
2.7.2	Korrektur des Nulleffekts	- 17 -
2.7.3	³ H-β-Selbstabsorption	- 19 -
2.7.4	Normierung der Silberkornzahlen	- 19 -
2.8	Statistische Analysen	- 20 -
3	Ergebnisse	- 21 -
3.1	Charakteristika der erhaltenen Autoradiogramme	- 21 -
3.2	Relative Häufigkeitsverteilungen	- 24 -
3.2.1	Proximaler Tubulus	- 24 -
3.2.2	Distaler Tubulus	- 24 -
3.3	Nulleffekt	- 31 -
3.4	Messwerte und ihre Streubreite für Epithelzellen des proximalen Tubulus	- 31 -
3.4.1	Ausmaß der Zellkernmarkierungen	- 31 -
3.4.2	Ausmaß der Markierungen des Cytoplasmas	- 36 -
3.5	Messwerte und ihre Streubreite für Epithelzellen des distalen Tubulus	- 40 -
3.5.1	Ausmaß der Zellkernmarkierungen	- 40 -
3.5.2	Ausmaß der Markierungen des Cytoplasmas	- 44 -
4	Diskussion	- 48 -
4.1	Validität und generelle Bedeutung der Messwerte	- 48 -
4.1.1	Einfluss der Expositionsbedingungen	- 48 -
4.1.2	Bedeutung der Messwerte	- 48 -
4.1.3	Vergleich der Messwerte mit Daten der Literatur	- 49 -
4.2	Einfluss der Magnetfeldstärke auf UDS und Zellmetabolismus	- 51 -
4.2.1	UDS	- 51 -
4.2.2	Zellmetabolismus	- 53 -

4.3 Einfluss des Zeitpunktes der ³ H-Thymidin-Injektion auf UDS & Zellmetabolismus	- 54 -
4.4 Einfluss der Streubreite der Messwerte auf die Aussagen zu UDS und Zellmetabolismus	- 54 -
5 Zusammenfassung	- 56 -
6 Literaturverzeichnis.....	- 58 -
7 Anhang	- 59 -
7.1 Charakteristika und Messergebnissen – Proximaler Tubulus	- 59 -
7.2 Charakteristika und Messergebnissen – Distaler Tubulus	- 59 -

1 Einleitung

Der menschliche Körper ist in seiner Umwelt oftmals Belastungen ausgesetzt, die mit seinen fünf Sinnen nicht zu erfassen sind. Dazu gehören unter anderen elektromagnetische Felder, die aus der Wechselwirkung elektrischer Felder und magnetischer Felder resultieren.

Ein rein elektrisches Feld entsteht stets dort, wo aufgrund getrennter Ladungsträger eine Potentialdifferenz, d. h. eine elektrische Spannung mit der Einheit Volt [V], vorhanden ist. Findet mit der Zeit eine Änderung der Polarität (+/-) statt, liegt ein elektrisches Wechselfeld vor, ansonsten ein statisches Feld. Ein statisches elektrisches Feld ergibt sich bereits natürlicherweise infolge der Potentialdifferenz zwischen dem Erdboden und der elektrisch gut leitfähigen Ionosphäre (Feldstärke von ca. 130 V/m bis ca. 270 V/m).

Im Gegensatz zum elektrischen Feld entsteht ein magnetisches Feld nur dort, wo elektrische Ladungen bewegt werden, d. h. wo ein elektrischer Strom fließt. Die magnetische Flussdichte, die in „Tesla“ (T) gemessen wird, liegt für das natürlich existierende statische Erdmagnetfeld zwischen 30 und 60 μT . Beim gleichzeitigen Vorliegen elektrischer und magnetischer Felder kann ihre Wechselwirkung so stark sein (insbesondere für Frequenzen ≥ 30 kHz), dass sie nicht mehr voneinander gesondert betrachtet werden können und somit ein elektromagnetisches Feld besteht. Elektromagnetische Felder werden unterteilt in einen niederfrequenten Bereich (Frequenzen bis etwa 100 kHz; darunter fallen z. B. Bahnstromanlagen, die mit 16 $\frac{2}{3}$ Hz betrieben werden, und elektrische Geräte und Elektroinstallation im Haushalt, für die ein 50 Hz–Strom (Europa) bzw. 60 Hz–Strom (USA) gilt), und in einen hochfrequenten Bereich (Frequenzen ab ca. 100 kHz bis ca. 300 GHz, z. B. für Rundfunk, TV und Mobilfunk). Es ist anzumerken, dass im Gegensatz zu ionisierender UV-, Röntgen- oder Gammastrahlung selbst das Energieniveau hochfrequenter elektromagnetischer Felder von etwa 300 GHz zu niedrig ist, um die Bindungen zwischen Atomen und Molekülen im Körper aufzulösen. Vielmehr liegt der Einfluss elektromagnetischer Felder zum einen in der direkten Einwirkung auf den Körper (z. B. Reizwirkung oder Wärmewirkung) und zum anderen indirekt durch Induktion von Strömen oder Spannungen. Da der menschliche Körper selbst ein bioelektrisches System darstellt, können so beispielsweise durch niederfrequente magnetische Wechselfelder elektrische Wirbelströme induziert werden, die zu unterschiedlichen Stromdichten im Körper führen. Dabei hängt die Stärke der induzierten Ströme insbesondere von der Frequenz, der magnetischen Flussdichte und der Ausdehnung des Feldes sowie der Fläche des durchdrungenen Körperquerschnitts ab. Für weitere Details siehe z. B. Silny (2002).

Über viele Jahre hinweg haben sich Wissenschaftler mit der Erforschung möglicher gesundheitlicher Risiken einer langfristigen Magnetfeld-Exposition auseinandergesetzt. So glaubte man, einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Aufenthalt unter Hochspannungsleitungen und anderen Quellen niederfrequenter magnetischer Exposition und einer erhöhten Inzidenz an Leukämie im Kindesalter festgestellt zu haben (BioInitiative Report (2007, Kap. 11)). Ebenso soll es Anzeichen für einen Zusammenhang von niederfrequenter Magnetfeld-Exposition und dem Auftreten anderen Krebserkrankungen in der Kindheit sowie für einen möglichen Zusammenhang zwischen hochfrequenter Magnetfeld-Exposition (z. B. durch langjährige Handy-Nutzung oder der Nutzung schnurloser Telefone) und dem Auftreten von Gehirntumoren oder Akustikusneurinomen geben (BioInitiative Report (2007, Kap. 9 und 10)). Allerdings wird beim Lesen der zugrunde liegenden Literatur schnell klar, dass hier vielfach widersprüchliche Daten ohne kritische Würdigung ihrer wissenschaftlichen Güte herangezogen wurden. Auch lassen die zusammengestellten Ergebnisse keinen übereinstimmenden Wirkungsmechanismus erkennen.

Wenn es um die bisher publizierten Befunde zu Schäden an der DNA nach einer Magnetfeld (MF)– Exposition von 50 bzw. 60 Hz geht (sog. „Extremely Low Frequency“ – Bereich; siehe dazu auch BioInitiative Report (2007, Kap. 6)), stößt man immer wieder – insbesondere durch Arbeiten von Lai und Singh (1997a,b; 2004) auf die mögliche Bedeutung sog. „freier Radikale“ (Review: z. B. Halliwell und Aruoma, 1991). Bekanntlich erzeugen diese freien Radikale, die selbst nur mit unzureichender Genauigkeit direkt zu messen sind, DNA-Einzelstrang (SSB) und -Doppelstrangbrüche (DSB). Die in der Literatur gängige Messmethode für SSB und DSB ist die sog. „Comet – Assay“ (single – cell gel electrophoresis; zur Übersicht siehe z. B. Olive, 1998), der an isolierten Zellkernen – z. B. nach Homogenisierung eines Gewebes – durchgeführt wird. Eine kritische Diskussion zu dieser Methode findet sich z. B. bei Schmitz et al. (2004).

Ausgehend von Arbeiten von Iseki und Mori (1985) sowie Iseki (1986) gewinnt in den letzten Jahren immer mehr die Methodik der „in situ nick translation“ (ISNT) eine Bedeutung zur Darstellung von DNA–Schäden. Hierbei lassen sich SSB unter Zuhilfenahme des Enzyms DNA-Polymerase I darstellen. Falls ein anderes Enzym gewählt wird, d. h. die terminale Desoxynucleotidyl–Transferase, werden DSB nachweisbar (sog. „in situ tailing reaction“, ISTR). Sowohl für ISNT als auch ISTR kann man zu (semi)quantitativen, zellartspezifischen Ergebnissen zum Gehalt an SSB bzw. DSB im Zellkern–Anschnittsvolumen kommen, wenn man zur Visualisierung der molekularbiologischen Abläufe ³H–markiertes

Thymidintriphosphat mit einer nachfolgenden Autoradiographie benutzt (Iseki, 1986; Rohde, 1999; Korr et al., 2001; Schmitz et al., 2004; Rutten et al., 2007; Brasnjevic et al., 2008). ISNT–Untersuchungen nach einer MF–Exposition bei Mäusen wurden bisher an verschiedenen Zellarten von Gehirn (Freuding, 2004; Born, 2009), Niere (Freuding, 2004; Demmler, 2008) und Leber (Rahimyar, 2009) vorgenommen.

Eine indirekte Methode zum Nachweis von DNA–Schäden leitet sich von einer stattgefundenen DNA–Reparatur ab: Seit ca. 1964 ist bekannt, dass DNA–Schäden meist unmittelbar nach ihrer Entstehung repariert wurden, wobei es zur Exzision von Nukleotiden aus dem Bereich der Bruchstelle und deren Neusynthese kommt (Setlow und Carrier, 1964; Boyce und Howard–Flambers, 1964; Pettijohn und Hanawalt, 1964). Diese Neusynthese – sie wird „unscheduled DNA synthesis“ (UDS) genannt (Djordjevic und Tolmach, 1967) im Gegensatz zur „scheduled DNA synthesis“ während der S–Phase vor einer Mitose (Howard und Pelc, 1951) – kann durch eine Injektion von ^3H –Thymidin (TdR), der spezifischen Vorläufersubstanz einer DNA–Synthese (Übersichten: z. B. Feinendegen, 1967; Schultze, 1969), über eine nachfolgende Autoradiographie sichtbar und sogar quantifizierbar gemacht werden (siehe Cleaver und Thomas, 1981; Korr und Schultze, 1989; Korr et al., 1989). Es sei angemerkt, dass es nach Injektion von ^3H –TdR und langen autoradiographischen Belichtungszeiten von etlichen Monaten a) für die Zellkerne zu zwei unterschiedlich stark markierten Populationen kommt (d. h. sehr stark markierte Zellkerne = S–Phasezellen) und nur schwach markierte Zellkerne, die eine UDS repräsentieren und b) auch eine cytoplasmatische Markierung zu erkennen ist. Diese cytoplasmatische Markierung kennzeichnet neu synthetisierte mitochondriale (mt) DNA im Verlauf einer Vermehrung von Mitochondrien infolge gesteigerten Energiebedarfs der Zelle; eine Reparatur der mtDNA steckt wahrscheinlich nicht dahinter (siehe Korr et al., 1997; 1998).

Die Problematik, ob es infolge einer MF–Exposition mit 50 Hz tatsächlich zu DNA–Schäden kommt, wurde in einem Pilotexperiment 1998 mit Hilfe von ISNT– und UDS–Untersuchungen detailliert analysiert (Schmitz et al., 2004): Adulte Mäuse wurden dabei für acht Wochen kontinuierlich einer Exposition von 1,5 mT ausgesetzt bzw. zur Kontrolle nur scheinexponiert. Mit beiden Methoden übereinstimmend fanden sich dabei DNA–Strangbrüche im Gehirn, d. h. in Epithelzellen des Plexus choroideus des IV. Ventrikels. Für die Niere ergaben sich widersprüchliche Befunde: Während in einer Teilstudie für proximale Tubulusepithelzellen des Nierencortex mit Hilfe der UDS dort nach MF–Exposition DNA–Schäden nachgewiesen wurden (Keller, 2003), konnte das in einer zweiten Analyse weder mit

UDS- noch ISNT-Methodik bestätigt werden (Freuding, 2004). Es war deshalb ein wesentliches Ziel eines 2003 durchgeführten neuen Experiments, hier für Klarheit zu sorgen. Darüber hinaus sollte zum einen geklärt werden, ob evtl. Hinweise auf Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Erzeugungen von DNA-Schäden vorliegen. Zum anderen galt es, eine Antwort zu finden auf die Frage, welche Konsequenzen evtl. nachgewiesene DNA-Schäden hätten. Wegen des enormen Arbeitsaufwands derartiger Untersuchungen beschränkt sich die vorliegende Arbeit auf UDS-Untersuchungen an proximalen und distalen Tubulusepithelzellen im Cortex renalis der adulten Maus nach einer achtwöchigen MF-Exposition mit 0,1 mT (d. h. der bisherige Grenzwert in der 26. Verordnung des Bundes – Immissionsschutzgesetzes von 1996) oder 1 mT.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiergruppe, bestehend aus 80 sieben Monate alten, männlichen Mäusen des Aufzuchtstammes Hannover: NMRI, wurde im Alter von ungefähr sechs Wochen von der Fa. Charles River Lab., Sulzfeld übernommen. Im Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikum der RWTH Aachen (damaliger Direktor Prof. Dr. W. Küpper†) wurden diese unter folgenden Kriterien gehalten:

- Unterbringung von jeweils fünf Mäusen in einem Typ II-Makrolonkäfig (Bodenfläche 350 cm²)
- SPF: Spezifische pathogenfreie Haltung in vollklimatisierten Räumen (Tagestemperatur: 22°C; Nachttemperatur: 20°C; Luftfeuchtigkeit: 60°C)
- Automatischer Beleuchtungswechsel im zwölfstündigen Rhythmus
- Fütterung mit dem Pressfutter Altromin® und Wasser *ad libitum*

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche waren vom Regierungspräsidium Köln als zuständige Behörde genehmigt.

2.2 Radioaktive Substanz

Die radioaktive Substanz ³H-Thymidin (³H-TdR) wurde 14 Tage vor der ersten Injektion von der Firma American Radiolabeled Chemicals Inc. St. Louis, MO, USA bezogen und zur Markierung der DNA-Reparatursynthese verwendet. Ihre spezifische Aktivität betrug 2,25 TBq bei einer Konzentration von 74 MBq/ml.

Ihre radiochemische Reinheit wurde nicht erneut überprüft, da frühere Untersuchungen (vgl. Rogers, 1979) gezeigt hatten, dass bei einer Lagerungstemperatur von ca. 4°C und einem Verbrauch spätestens vier Wochen nach Anlieferung keine nennenswerte Verunreinigung durch Radiolyse stattfindet.

2.3 Tierversuche

2.3.1 Magnetfeld-Exposition

Die kontinuierliche Magnetfeld-Exposition ohne SPF-Haltung verlief über acht Wochen (23.9.–18.11.2003) in einem separaten fensterlosen Tierversuchsraum, in dem die Umwelteinflüsse mit einer Temperatur von 22°C bis 24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% weitgehend konstant gehalten wurden. In einem zwölfstündigen Rhythmus zwischen 8.00 Uhr morgens und 20.00 Uhr abends wurde der Versuchsraum mit einer Stärke von 450 Lux durch Leuchtstoffröhren beleuchtet.

Durch zwei horizontal ausgerichtete Helmholtz-Spulenarrangements, bestehend aus je zwei Spulen, wurden magnetische 50 Hz-Felder erzeugt. Die Spulen hatten einen Durchmesser von 74 cm und einen mittleren Abstand von 37 cm zueinander. Sie wurden über zwei separate Regeltransformatoren (Philips Typ 2422) aus dem Netz versorgt, wobei die Einstellung des Stroms vor der Exposition bei einer gleichzeitigen Messung der magnetischen Flussdichte in der Mitte der Helmholtz-Spulenarrangements erfolgte. Eine schematische Darstellung der Spulenarrangements kann man Abbildung 2.1 entnehmen.

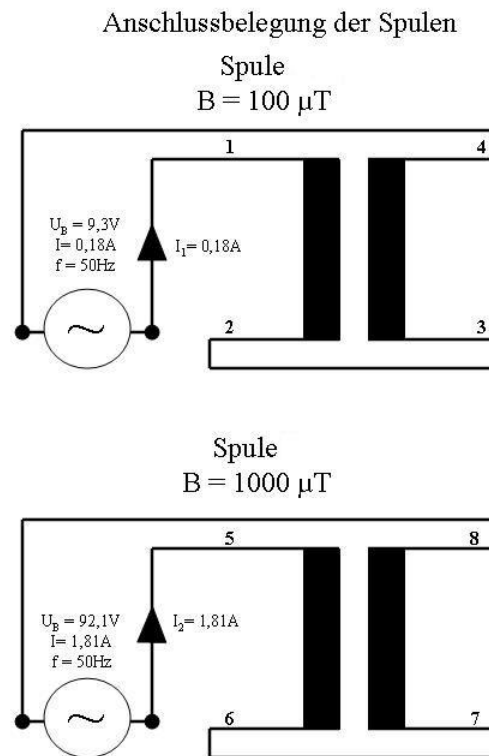


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Spulenarrangements

Für die erste Spulenordnung wurde eine magnetische Flussdichte von 1000 μT festgelegt, in der zweiten eine von 100 μT (Feldmessgerät EM200 mit Sonde M400, Fa. Symann & Trebbau, Hannover, Deutschland). Diese Einstellungen wurden täglich über ein Ampèremeter kontrolliert und falls erforderlich nachjustiert.

Mit Hilfe eines Gaußmeters (Modell 912, RLF Industries, USA) wurde eine Flussdichte des magnetischen Erdfeldes im Versuchsraum von 47 μT gemessen.

In jeder Helmholtz-Spulenordnung befanden sich sechs Käfige, für die sich durch Einzelmessungen folgende Werte der magnetischen Flussdichte ergaben (siehe auch Abb. 2.2 und 2.3):

Spulenordnung 1 (vgl. Abb. 2.2):

Käfig Nr. 1: 1,0625 mT

Käfig Nr. 2: 1,0175 mT

Käfig Nr. 3: 1,0450 mT

Käfig Nr. 4: 1,0300 mT

Käfig Nr. 5: 1,0375 mT

Käfig Nr. 6: 1,0375 mT

⇒ Arithmetisches Mittel = 1,03833 mT

Spulenordnung 2 (vgl. Abb. 2.3):

Käfig Nr. 1: 0,1053 mT

Käfig Nr. 2: 0,1050 mT

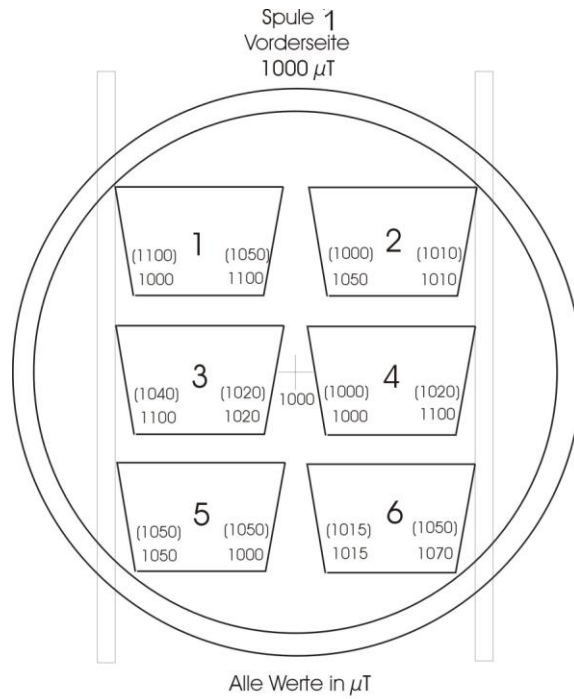
Käfig Nr. 3: 0,1055 mT

Käfig Nr. 4: 0,1085 mT

Käfig Nr. 5: 0,1045 mT

Käfig Nr. 6: 0,1053 mT

⇒ Arithmetisches Mittel = 0,10567 mT



Gemessen mit EM 2000

Filter: 2Hz bis 500 kHz

Einstellungen des Trenntrafos: 92,1 V, 50Hz, 1,81A

Beschaltung der Spulen: Anschluss 6 ist mit Anschluss 7 verbunden
Anschluss 5 und Anschluss 8 sind an den Trenntrafo
angeschlossen (siehe Skizze)

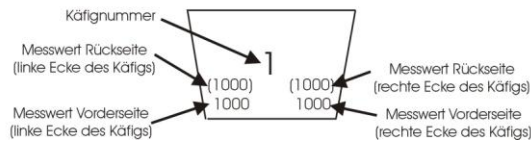


Abbildung 2-2: Magnetfeldmessungen an der Spulenordnung I
Gemessen mit EM 2000, Filter: 2 Hz bis 500 kHz; Einstellungen des Trenntrafos: 92,1 V, 50 Hz, 81 A
Beschaltung der Spulen: Anschluss 6 ist mit Anschluss 7 verbunden, Anschluss 5 und sind an den Trenntrafo angeschlossen

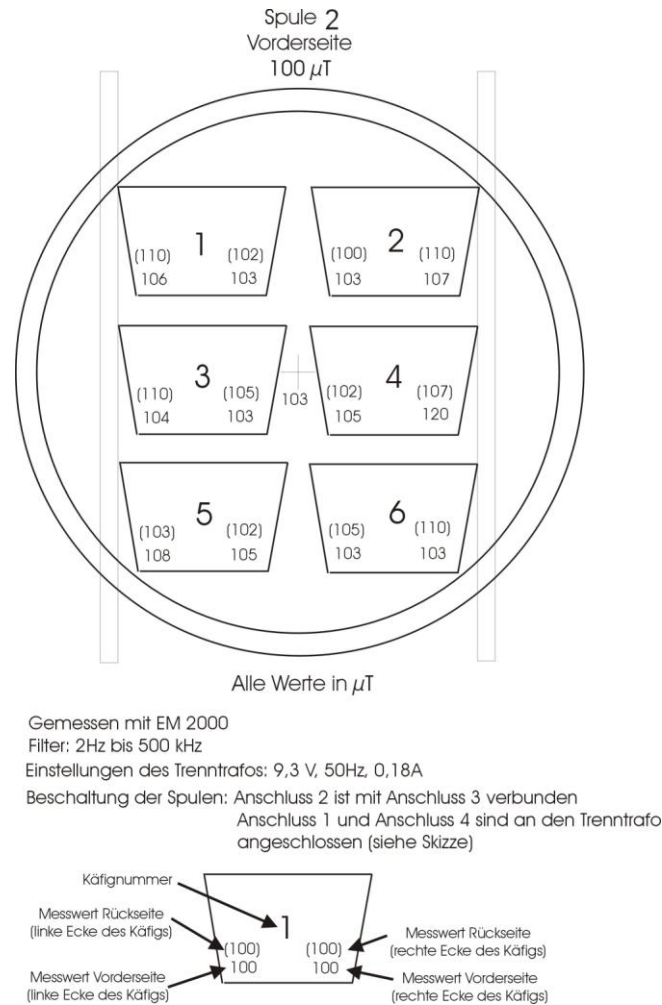


Abbildung 2-3: Magnetfeldmessung an der Spulenanordnung II
Gemessen mit EM 2000, Filter: 2 Hz bis 500 kHz; Einstellungen des Trenntrafos: 92,1 V, 50 Hz, 1,81 A
Beschaltung der Spulen: Anschluss 2 ist mit Anschluss 3 verbunden, Anschluss 1 und 4 sind an den Trenntrafo angeschlossen

In den sechs metallfreien Kunststoffkäfigen der Helmholtz-Spulenordnungen befanden sich je 5 Mäuse; demnach waren in jeder der zwei Spulenordnungen 30 Mäuse untergebracht (siehe Abb. 2.4).

Dabei wurden die dreißig Tiere der ersten Helmholtz-Spulenordnung der Gruppe I zugeteilt, die der zweiten Spulenordnung der Gruppe II, und 20 Mäuse in vier Käfigen, die nicht in einer Helmholtz-Spulenordnung exponiert wurden, dienten als Kontrolle (Gruppe III).

Sowohl die Spulen als auch die Käfige der Kontrolltiere standen auf Holztischen, wobei der Tisch mit den Kontrolltieren drei Meter von denen der Magnetfeld-exponierten Tiere entfernt war.

Alle vier Tage fand eine Reinigung der Käfige statt, wobei es zu einer kurzen Unterbrechung der Magnetfeld-Exposition kam.



Abbildung 2-4: Versuchsanordnung

2.3.2 Injektion von ^3H -Thymidin

Im Alter von neun Monaten wurden die Tiere nach Abschalten des Magnetfeldes entweder sofort (Untergruppe A), 24 Stunden (Untergruppe B) oder sieben Tage später (Untergruppe C) in das Isotopenlabor des Instituts für Anatomie der RWTH Aachen gebracht.

Innerhalb von ca. 5 min wurde den Mäusen 555 kBq ^3H -Thymidin (^3H -TdR) pro Gramm Körpergewicht zur späteren Messung der nukleären DNA-Reparatursynthese intraperitoneal injiziert.

Die TdR-Lösung wurde mit NaCl auf eine 0,9 %-ige Lösung verdünnt, um einer Reizung des Peritoneums vorzubeugen.

2.3.3 Narkotisierung der Versuchstiere und Perfusionsfixation

Durch eine intraperitoneale Injektion von 0,005 ml pro g Körpergewicht einer 10%igen wässrigen Chloralhydratlösung erfolgte jeweils 115 Minuten nach Gabe der ^3H -TdR-Lösung die Narkotisierung. Drei Minuten später war in der Regel der Cornealreflex erloschen.

Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, erfolgte mit Hilfe einer Schere die Durchtrennung von Bauchwand, Diaphragma und Perikard. Anschließend wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt, über die die nachfolgend aufgeführten Perfusionslösungen mit einer 30 ml-Record-Spritze manuell unter konstant gehaltenem Druck innerhalb von drei bis vier Minuten nacheinander injiziert wurden. Um den Durchfluss der Lösungen durch den gesamten Kreislauf zu ermöglichen, wurde die Vena cava inferior durchtrennt. Die Perfusionsfixation führte zum Tod der Versuchstiere.

Nachfolgend sind die Perfusionslösungen und ihre Zusammensetzung aufgeführt; dabei diente die erste Lösung zur Ausspülung des Blutes.

- 20 ml Thomadex® mit NaCl
- 20 ml Formalinlösung 1
(1 Teil Stammlösung¹; 9 Teile 0,9 %-ige NaCl-Lösung; pH=7,2)
- 20 ml Formalinlösung 2
(1 Teil Stammlösung¹; 4 Teile 0,9 %-ige NaCl-Lösung; pH=7,2; zu 99 Teilen dieser Mischung; 1 Teil 96 %-iger Eisessig)
- 20 ml Formalinlösung 3
(1 Teil Stammlösung¹; 4 Teile 0,9 %-ige NaCl-Lösung; pH=7,2)

¹= Herstellung der Stammlösung:

- 80 g Paraformaldehyd werden in 200 ml Aqua dest. gelöst
- Erhitzen auf 92°C – 95°C
- Zugabe von 3 Tropfen 10 %-iger NaCl-Lösung
- Abkühlung

2.3.4 Organentnahme und Weiterbehandlung

Nach der Perfusionsfixation wurden den Versuchstieren zur Weiterverarbeitung folgende Organe entnommen:

- Lebervorderlappen
- Niere (meist links)
- Milz
- Gehirn

Nach der Entnahme wurden die Organe für zwei Wochen in der Formalinlösung 3 (s. oben) nachfixiert und anschließend in 70 %-igen Ethanol bei 4°C für einige Wochen bis zu maximal neun Monaten aufbewahrt.

2.4 Herstellung der histologischen Präparate

2.4.1 Einbettung in Paraplast

Durch eine sechsstündige Wässerung unter fließendem Leitungswasser wurde zunächst das durch die Fixation in den Organen enthaltene Formalin vollständig entfernt. Dieses hätte ansonsten zu einer Chemographie (d. h. Silberkornentstehung durch eine chemische Reaktion) geführt.

Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanol- und Acetonreihe dehydriert (s. Tabelle 2.1), so dass im nächsten Schritt das Gewebe vom flüssigen Paraplast vollständig durchdrungen werden konnte.

Tabelle 2.1: Arbeitsschritte vor der Paraplast-Einbettung

ARBEITSSCHRITT	EINWIRKZEIT
1. 70 %-iges Ethanol	1 h
2. 96 %-iges Ethanol	1 h
3. 96 %-iges Ethanol	1 h
4. 100 %-iges Ethanol	1 h
5. 100 %-iges Ethanol	1 h
6. 100 %-iges Ethanol	1 h
7. Ethanol/Aceton 1:1	1 h
8. Aceton	1 h

An die Dehydrierung anknüpfend wurden die Organe für ca. drei Stunden (bis keine Blasen mehr aufstiegen) in flüssiges Paraplast (Schmelzpunkt bei 60°C) eingelegt, daraufhin in frisches, acetonfreies Paraplast übergebracht und erneut für 15 Stunden inkubiert.

2.4.2 Herstellung histologischer Schnitte

Drei µm dicke Paraffinschnitte wurden hergestellt mit Hilfe eines motorbetriebenen Mikrotoms „Leica RM 2005“ (Fa. Leica, Nussloch) und Glasmessern vom Ralph-Typ, welche mittels eines „LKB 2078 Histo Knife Maker“ (Fa. LKB, Bromma, Schweden) selbst angefertigt wurden.

Die vorgereinigten Glasobjektträger (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland) wurden zunächst mit 3-Aminopropyltriethoxysilan beschichtet und mit Aqua bidest. befeuchtet, um eine bessere Haftung zu erzielen. Dann erst wurden die Schnitte aufgelegt.

Nachdem die Präparate auf einer Heizplatte bei 38-42°C gestreckt worden waren, wurde das überflüssige Aqua bidest. mittels eines Papierstreifens abgesaugt. Zum Abschluss wurden die Präparate 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

2.4.3 Färbung der histologischen Schnitte

Die getrockneten Schnitte wurden jeweils 3 min mit Xylol entparaffiniert, um so chemographische Effekte zu minimieren. Anschließend folgte die Dehydrierung mittels absteigender Äthylalkoholreihe (siehe Tabelle 2.2). Dabei wurde jede Lösung zweimal erneuert:

Tabelle 2.2: Arbeitsschritte zur Dehydrierung von Paraffinschnitten

LÖSUNG	EINWIRKZEIT
1. Xylol P.A.	3 * 10 min
2. 99 %-iger Isopropylalkohol	3 * 10 min
3. 96 %-iges Ethanol	3 * 10 min
4. 70 %-iges Ethanol	3 * 10 min
5. Aqua bidest.	3 * 10 min

Die darauf folgende Färbung der Zellkerne nach der Feulgen-Methode beinhaltet die nachstehenden Arbeitsschritte (vgl. Korr, 1981):

- Hydrolyse der Schnitte in 1 n HCl bei 60°C zur Freilegung der Aldehydgruppen der Nucleotide
- Beendigung der Hydrolyse durch Abspülen mit Aqua bidest.
- Einlegen der Schnitte in Schiffssches Reagenz für 1-2 Stunden, zusammengesetzt aus:
 - 12.5 g Pararosanilin
 - 875 ml Aqua bidest.
 - 175 ml 1 n HCl
 - 12,5 g K₂SO₄ (Kaliumdisulfid)
- Eintauchen in lauwarmes Leitungswasser
- 3-4 maliges Wässern mit Aqua bidest.

2.5 Herstellung der Autoradiogramme

2.5.1 Dunkelkammer

Die Methode der Autoradiographie dient zum Nachweis bzw. zur Visualisierung und Messung von Radioaktivität. Hierbei wird eine fotografische Filmschicht verwendet, die jedoch auch durch andere Einflüsse, wie z. B. Licht und chemische Einwirkungen, geschwärzt werden kann. Daher ist es notwendig, dass die Autoradiogramme in einer Dunkelkammer hergestellt werden, die folgende Kriterien erfüllen sollte:

- Konstante Raumbedingungen, d. h. 20 °C Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit 55-65%
- Absolute Lichtundurchlässigkeit der Tür
- Keine Installation von Leuchtstoffröhren, da diese auch nach dem Ausschalten noch Licht emittieren können
- Vermeidung von Staub aufwirbelnden Belüftungen
- Abdichtung aller elektrischen Geräte gegen elektrische Blitze
- Gründliche Wartung der Wasserabflüsse zur Vermeidung der Entstehung von H₂S-Gas

2.5.2 Aufbringen der Fotoemulsion nach der Dipping-Methode

Als Fotoemulsion diente die Emulsion K2 (Fa. Ilford, Essex, U.K.) in Gelform. Die erforderliche Menge wurde mit Hilfe einer Balkenwaage abgewogen und in einem Wasserbad bei 42 °C geschmolzen.

Anschließend fand eine Verdünnung der Emulsion mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:1 statt.

Die verdünnte Emulsion wurde mit einem Glasstab verrührt, wobei keine Blasen und kein Kontakt zur Gefäßwand entstanden, und schließlich wurde die verdünnte Emulsion durch eine doppelte Mullage filtriert.

Beim Dipping wurden die Objektträger der Reihe nach in die Emulsion getaucht, nach einigen Sekunden langsam herausgezogen und schließlich in aufrechter Stellung staubgeschützt ca. eine Stunde lang getrocknet.

Bei allen Arbeitsschritten war es erforderlich, jeglichen Kontakt der Emulsion mit Metallpinzetten oder den Fingern zu unterlassen, um so das Entstehen unspezifischer Silberkörner (=Nulleffekt) zu vermeiden.

2.5.3 Exposition der Autoradiogramme

In einem lichtundurchlässigen Expositions Kästchen aus Kunststoff wurden die Objektträger 250 Tage lang im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Durch Zugabe eines Trocknungsmittels, das auch zugleich als Farbindikator diente („Indicating Drierite“; Fa. Aldrich Chemical Company, Milwaukee / Wisconsin, USA), konnte evtl. noch vorhandene Feuchtigkeit abgefangen werden.

2.5.4 Entwicklung und Fixation

Nach Ablauf der Expositionszeit mussten die Expositions Kästchen zur Temperaturadaption aus dem Kühlschrank genommen und für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert werden. Danach wurden die Objektträger für vier Minuten in einen frisch angesetzten, filtrierten und auf 18°C temperierten Amidol-Entwickler befördert, in der die Objektträger zur besseren Durchmischung der Lösung und Benetzung mit einer elektrischen Wippe bewegt wurden.

Der Amidol-Entwickler setzte sich zusammen aus:

- 1,35 g Amidol (4-Hydroxy-m-Phenylendiammonium-Dichlorid)
- 5,4 g Na₂SO₃ sicc.
- 2,4 ml 10 %-iges KBr
- 300 ml Aqua bidest.

Nach Beendigung der Entwicklung wurden die Präparate kurz mit Aqua bidest. abgespült und zehn Minuten mit 30 %-iger Natriumthiosulfatlösung fixiert. Nach weiterem 20-minütigen Wässern zur rückstandslosen Beseitigung der Fixationslösung wurden die Präparate staubgeschützt luftgetrocknet.

2.5.5 Gegenfärbung des Cytoplasmas und Eindeckelung

Die Gegenfärbung des Cytoplasmas erfolgte durch:

- einminütiges Eintauchen der getrockneten Autoradiogramme in eine Lösung von 1 g Lichtgrün in 100 ml Aqua bidest.
- zweiminütige Wässerung
- Trocknung für einige Minuten
- Eindeckelung mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt) und Deckgläschen

2.6 Auswertung der Autoradiogramme

2.6.1 Verwendetes Mikroskop und Computerprogramm

Zur Auswertung der Autoradiogramme wurde ein Mikroskop vom Typ „Diaplan“ (Fa. Leitz, Wetzlar) benutzt. Insgesamt wurde durch die Kombination eines Ölimmersionsobjektivs mit 100-facher Vergrößerung mit einem 12,5-fachen Okular eine 1250-fache Primär-Vergrößerung erreicht.

Das mikroskopische Bild wurde per digitaler TBK-Mikroskop-Kamera auf einen Bildschirm übertragen, um so die Silberkornzahlen und die Größe der Kern- und Cytoplasmaflächen bestimmen zu können. Dabei wurde zur Aufnahme und Dokumentation der mikroskopischen Bilder sowie zur Ausmessung der zu bestimmenden Flächen das Computerprogramm „Diskus“ (Fa. Carl H. Hilgers, Königswinter) benutzt.

2.6.2 Untersuchte Zellarten und Kriterien der Auswertung

Es wurden Epithelzellkerne und Cytoplasmaflächen der proximalen und distalen Tubuli aus dem Bereich der Nierenrinde ausgewertet. Durch Form und Größe konnten die verschiedenen Zellarten sicher differenziert werden.

In jedem Präparat wurden jeweils 100 Zellkerne und Cytoplasmaflächen pro Zellart ausgewertet. Dabei wurden die jeweiligen Zellkernprojektionsflächen und die jeweiligen Cytoplasmaprojektionsflächen, nach Fixierung des mikroskopischen Bilds am Computer in einer Schärfeebene, durch Umrahmen mit Hilfe der Computermaus automatisch ausgerechnet. Die Silberkornzahlen der Zellkerne und der Zytoplasmen wurden direkt am Mikroskop in den verschiedenen Schärfeebenen gezählt und summiert.

Zellkerne, die keine Silberkörner aufwiesen, wurden ebenfalls erfasst, wobei hingegen Zellkerne mit sehr intensiver, fast homogener Schwärzung bei der Auszählung nicht berücksichtigt wurden, da sie proliferierende Zellen in der S-Phase darstellten. Aufgrund von möglichen Überstrahlungseffekten wurden Zellen in direkter Nachbarschaft zu diesen S-Phase-Zellen auch nicht registriert.

2.7 Korrekturverfahren

2.7.1 Nulleffekt der Autoradiogramme

In den meisten Präparaten treten neben den spezifisch erzeugten Silberkörnern auch einige Silberkörner auf, die nicht auf die Emission von β -Strahlung des $^3\text{H-TdR}$ zurückzuführen sind. Mögliche Ursachen dafür sind z. B.:

- Störfaktoren bei der Autoradiogrammherstellung (z. B. Licht, Luftfeuchtigkeit,...)
- Fehlerhafte Verarbeitung der $^3\text{H-TdR}$ oder der Fotoemulsion
- Chemographie (Einwirken chemischer Substanzen, z. B. durch freie SH-Gruppen bei Hautkontakt)

Die Gesamtheit solcher unspezifisch entstandenen Silberkörner wird als „Background“ oder „Nulleffekt“ bezeichnet.

Im Allgemeinen wurden die Autoradiogramme vor den Analysen auf die Stärke des Nulleffekts überprüft, in dem man die Anzahl der Silberkörner über gewebehaltigen und gewebefreien Flächen miteinander verglichen hat. Wenn dabei über den gewebefreien Flächen die Markierung recht stark war, wurden diese Präparate zur Analyse nicht herangezogen.

Auf statistischem Niveau muss der „Nulleffekt“ trotzdem berücksichtigt werden; das wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.7.2 Korrektur des Nulleffekts

Die allgemeinen Verfahren zur Nulleffekt-Korrektur, auf die diese Arbeit basiert, stützen sich auf die Gesetzmäßigkeiten einer Poisson-Verteilung. Dabei gilt die Poisson-Verteilung sowohl im Hinblick auf die Silberkörner, die durch radioaktiven Zerfall entstanden sind, als auch auf diejenigen, die infolge des Nulleffekts hervorgegangen sind (vgl. Koburg und Maurer, 1962; England und Rogers, 1970)

Entsprechend dieser Verteilungsannahme treten mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit Zellen auf, bei denen zwar der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in nukleäre und/oder mitochondriale DNA erfolgt ist, aber dennoch keine Silberkörner erkennbar sind. Diese Wahrscheinlichkeit nimmt mit zunehmender mittlerer Silberkornzahl ab.

Die Nulleffekt-Korrektur erfolgte grundsätzlich mittels folgender Formel (Stillström, 1963; Stillström, 1965):

$$X = 1 / PL \cdot (X_m - X_k)$$

X: Mittlere korrigierte Kornzahl pro Zellkernprojektionsfläche (oder Cytoplasmaprojektionsfläche)

x_m : gemessene mittlere Silberkornzahl eines Tieres mit $^3\text{H-TdR}$ -Injektion

x_k : gemessene mittlere Silberkornzahl eines Tieres ohne $^3\text{H-TdR}$ -Injektion (Nulleffekt)

PL: Wahrscheinlichkeit echter Markierung

Die zuletzt angeführte Größe PL wurde bei Vorliegen mittlerer Silberkornzahlen von $x \geq 2,5$ wie folgt bestimmt (May, 1991):

$$PL = 1 - p_m(0) / p_k(0)$$

$p_m(0)$: Anteil der Zellen ohne Silberkörner im Versuchstier nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion

$p_k(0)$: Anteil der Zellen ohne Silberkörner im inaktiven Versuchstier

In Übereinstimmung mit Schmidt (1990) und Oldenkott (1991; vgl. auch Korr et al., 1989) wurden zum einen diejenigen Messwerte von weiteren Berechnungen ausgeschlossen, bei denen $p_m(0) \leq p_k(0)$ war, zum anderen auch die Ergebnisse, bei denen die Differenz der Silberkornsummen von jeweils 100 Zellen von Versuchs- und Kontrolltier ≤ 15 Silberkörner betrug.

Bei mittleren Silberkornzahlen von $x < 2,5$ wurde die Größe PL nach dem Verfahren von Korr und Schmidt berechnet (Korr & Schmidt, 1988, 1989).

Dabei ergaben sich Schwierigkeiten bei der computermäßigen Berechnung von PL (=PL*), wenn die Häufigkeitsverteilung der Silberkörner mehr als ein Maximum aufweist. Die berechneten PL*-Werte lassen sich dabei auf der Grundlage von theoretischen Überlegungen von Schmidt (1990) überprüfen, in dem man von ableitbaren Zusammenhängen zwischen $p_m(0)$, $p_k(0)$ und PL* ausgeht; es sollte stets gelten:

$$PL^* \geq 1 - [p_m(0) / p_k(0)]$$

Wenn diese Bedingung nicht erfüllt war, musste der Zählwert gleichfalls unberücksichtigt bleiben.

In denjenigen Fällen, in denen $p_m(0) \leq 10$ war, wurde als Alternativlösung, d. h. unter Inkaufnahme einer geringen, aber noch durchaus vernachlässigbaren Ungenauigkeit, eine Korrektur mit der oben angegebenen Formel von May (1991) durchgeführt.

Letztlich ist noch hinzuzufügen, dass es im Falle von $p_m(0) / p_k(0) > 0,7$ vorkommt, dass $PL^* = 1,0$ berechnet wird, obgleich es bei einem hohen Wert von $p_m(0)$ unlogisch ist, dass alle diese Zellen markiert sind. In diesen Fällen ist anzunehmen, dass die Anzahl der ausgezählten Zellen zu gering war. Schmidt, der Besagtes 1990 detailliert aufzeigte, schlug vor, solche falsch-korrigierten Silberkornzahlen nicht weiter zu berücksichtigen. Unter Annahme der von Schmidt (1990) aufgestellten Detailbedingungen wurde in der vorliegenden Untersuchung ebenso vorgegangen, d. h. diese Daten wurden von weiterführenden Berechnungen ausgeschlossen.

2.7.3 ³H-β-Selbstabsorption

Das Auftreffen von β-Teilchen auf die Fotoemulsion ist abhängig von der Massendichte des Gewebes. Um unterschiedliche Massendichten zu berücksichtigen, verwendet man sogenannte ³H-β-Selbstabsorptionskoeffizienten (SAK; vgl. Mauer und Primbsch, 1964; Korr, 1985). Vergleichbare SAK für die hier untersuchten Zellarten der Mäuseniere liegen in der Literatur nicht vor. Daher wurde auf die Berücksichtigung der ³H-β-Selbstabsorption verzichtet.

2.7.4 Normierung der Silberkornzahlen

Um einen direkten Vergleich von Silberkornzahlen bei diploiden Zellen mit unterschiedlichen Kernflächen ziehen zu können, bediente man sich eines Normierungsverfahrens (Schmitz, 1994), welches von den Zellkernprojektionsflächen der untersuchten Zellen ausgeht und einen Bezug der DNA-Markierung auf eine einheitliche DNA-Menge pro Schnittvolumen herstellt. Da weder die DNA-Menge pro Mitochondrium noch die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle konstant ist, wurden die Markierungen des Cytoplasmas nicht normiert. Diese Daten beziehen sich auf die Dichte der mittleren Silberkornzahl pro Cytoplasmaprojektionsfläche.

2.8 Statistische Analysen

Bei den statistischen Analysen wurden von allen Messwerten [Zellkernprojektionsflächen (KF), korrigierte plus normierte Silberkornzahlen der Zellkerne ($KK_{norm.}$), cytoplasmatische Silberkorndichten (Dichte)] Mittelwerte und deren Fehler pro Tiergruppe (A I bis C III) ermittelt.

Die Methode der einfaktoriellen Varianzanalyse („generalized linear model“) ermöglichte den Vergleich der Tiergruppen untereinander, wobei Dosis (V_1) und Zeitpunkt der 3H -TdR-Injektion (V_2) als feste Faktoren angesehen wurden. Die abhängigen Variablen wurden als sogenannte Kovarianten einzeln getestet. Dazu gehörten die spezifische Expositionsbox (V_4), das Gewicht der Versuchstiere (V_3), die Zellkernprojektionsfläche (V_5), korrigierte plus normierte Silberkornzahl (V_6) und die cytoplasmatische Dichte (V_7).

Die einfaktorielle Varianzanalyse wurde mit Hilfe des Programms SPSS (Version 12.01 für Windows, SPSS, Chicago, IL/ USA) ausgeführt und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. C. Schmitz / Department of Psychiatry and Neuropsychology, University of Maastricht, bewerkstelligt. Ein Effekt wurde dann als signifikant erachtet, wenn $p < 0,05$ vorlag.

Anschließend erfolgte zum paarweisen Vergleich ein sog. post hoc t-Test unter Berücksichtigung einer Bonferroni-Korrektur (Programm: GraphPad Prism® Version 3.0 für Windows, Fa. GraphPad Software, San Diego, California, USA), wobei sich hier das Signifikanzniveau wegen $\alpha = p/n$ (n = Anzahl der zu vergleichenden Paare) verkleinerte.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der erhaltenen Autoradiogramme

In den Abbildungen 3-1, 3-2 und 3-3 sind Ausschnitte aus histologischen Präparaten der Niere nach erfolgter Magnetfeld-Exposition zu sehen.

Abbildung 3-1 zeigt die Anschnitte mehrerer proximaler Tubuli im Nierencortex. Unter Anwendung des Computerprogramms „Diskus“ (Fa. Carl Hilgers, Königswinter) wurden Zellkern und Cytoplasma umfahren und ihre Flächen dadurch automatisch ausgemessen.

Da die Grenzlinien zwischen den einzelnen Zellen der proximalen Tubuli zum Teil nicht sichtbar waren, wurde in diesem Fall in der Mitte zwischen zwei Zellen eine künstliche Grenze für das Cytoplasma geschaffen. Da nicht die absoluten Kornzahlen im Cytoplasma, sondern die Silberkorndichten (d. h. Silberkornzahl/entsprechende Cytoplasmaprojektionsfläche) in die Auswertung einfließen, hat dieses Prozedere keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Es ist eine deutliche Markierung mit Silberkörnern sowohl über Zellkernen als auch über dem Cytoplasma festzustellen, während im Lumen der proximalen Tubuli und in den gewebefreien Abschnitten des Präparates keine Markierungen zu erkennen sind.

In Abbildung 3-2 sind mehrere Anschnitte von distalen Tubuli im Nierencortex zu sehen. Auch hier sind die Cytoplasmagrenzen nicht eindeutig sichtbar und wurden wiederum willkürlich festgelegt. In Abbildung 3-3 ist ein Ausschnitt zu sehen, auf dem ein außerordentlich stark markierter Zellkern angeschnitten ist. Solch eine Zellkernmarkierung entsteht dann, wenn sich eine proliferierende Zelle in der S-Phase befindet. Da die überaus starke Markierung sich auch auf Nachbarzellen ausdehnt, wurden diese ebenfalls nicht ausgewertet.

Ebenso auffällig in diesem Anschnitt ist die gleichmäßige Markierung mit Silberkörnern über gewebehaltigen und gewebefreien Flächen. Diese Gegebenheit lässt auf einen erhöhten Background schließen und führte zwingend zum Ausschluss dieses und ähnlicher Präparate für die weitere Auswertung.

Lineare Regressionsanalysen von eigenen und gleichartigen Messwerten der Literatur wurden ebenfalls mit Hilfe des Computer-Programms „GraphPad Prism“, Version 3.0 durchgeführt; alle $p < 0.05$ wurden wiederum als signifikant bewertet.

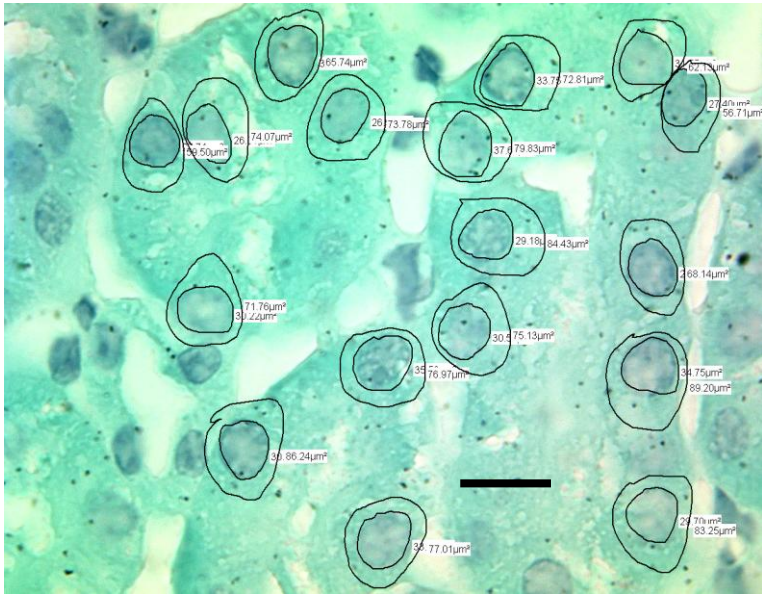


Abbildung 3-1

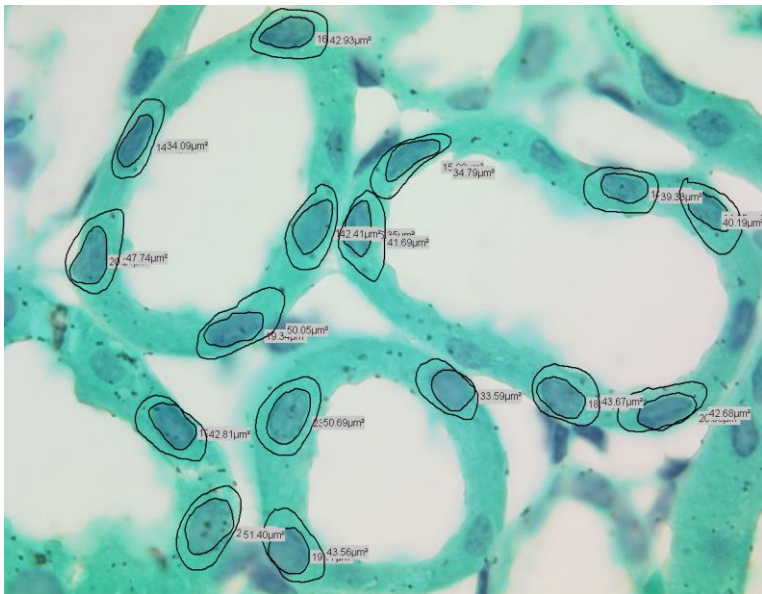


Abbildung 3-2

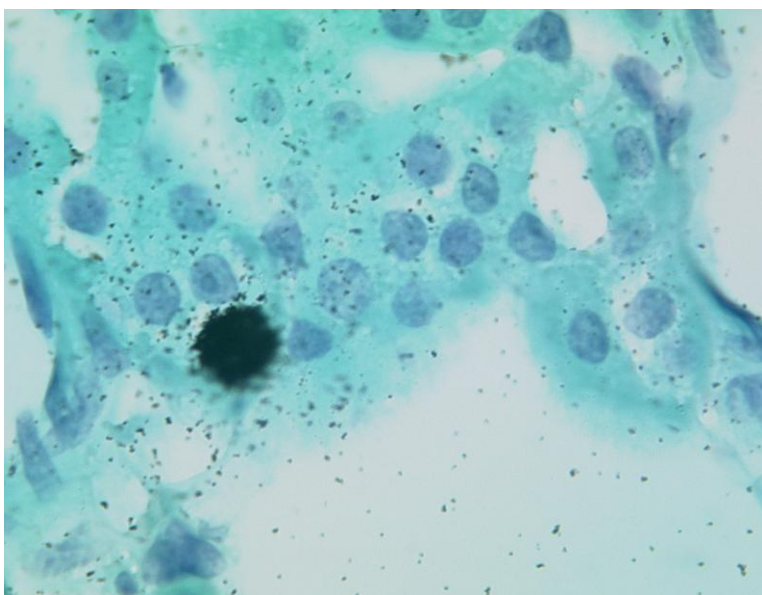


Abbildung 3-3

Zu Abbildung 3-1:

Ausschnitt eines Autoradiogramms aus dem Nierencortex einer Maus, die über acht Wochen mit einem Magnetfeld von 1 mT exponiert worden war und der 5 min nach Abschalten des Magnetfelds $^3\text{H-TdR}$ injiziert wurde (Gruppe A I). Hervorgehoben sind Cytoplasma und Zellkerne von Epithelzellen proximaler Tubuli. Die Balkenlänge entspricht 10 μm .

Autoradiographische Expositionszeit: 250 Tage

Zu Abbildung 3-2:

Ausschnitt eines Autoradiogramms aus dem Nierencortex einer Maus, die über acht Wochen mit einem Magnetfeld von 0,1 mT exponiert worden war und der 5 min nach Abschalten des Magnetfelds $^3\text{H-TdR}$ injiziert wurde (Gruppe A II). Hervorgehoben sind Cytoplasma und Zellkerne von Epithelzellen distaler Tubuli.

Autoradiographische Expositionszeit: 250 Tage

Zu Abbildung 3-3:

Ausschnitt eines Nieren-Autoradiogramms aus dem Cortex einer Maus, die über acht Wochen mit einem Magnetfeld von 1 mT exponiert worden war und der 5 min nach Abschalten des Magnetfelds $^3\text{H-TdR}$ injiziert wurde.

Der stark markierte Zellkern gehört zu einer proliferierenden Epithelzelle des proximalen Tubulus in der S-Phase.

Autoradiographische Expositionszeit: 250 Tage

3.2 Relative Häufigkeitsverteilungen

3.2.1 Proximaler Tubulus

In den Abbildungen 3-4 bis 3-6 sind jeweils Diagramme von kumulativen Häufigkeiten der Silberkornmarkierungen von Zellkern und Cytoplasma der untersuchten proximalen Tubuli zu sehen. Um eine spezielle Anschauung der Abhängigkeit vom Zeitpunkt der $^3\text{H-TdR}$ -Injektion zu erzielen, wurden die Graphen nach Expositionsgruppen angeordnet.

Bei näherer Betrachtung der Diagramme lassen sich im Vergleich der Versuchstiergruppen generell keine auffälligen Links- oder Rechtsverschiebungen der Graphen feststellen. Ebenso wenig ist eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der $^3\text{H-TdR}$ -Injektion zu erkennen. Der sehr ähnliche Kurvenverlauf in den Graphen für Zellkern und Cytoplasma lässt darauf schließen, dass auch die Streubreiten für Zellkernmarkierung und Cytoplasmamarkierung ähnlich sind.

Auffällig sind jedoch einzelne Graphen, in denen die Kurvenverläufe bestimmter Tieren durch eine Rechtsverschiebung ins Auge fallen. Am ausgeprägtesten ist dieser Sachverhalt im Graphen „Proximaler Tubulus Gruppe A I“ und im Graphen „Proximaler Tubulus Gruppe C III“ zu sehen. Derartige Summationskurven, die wegen ihrer Rechtsverschiebung abweichen, gehörten zu den Tieren Nr. 18-03 und 95-03. Auch die Graphen der zugehörigen Cytoplasmamarkierungen weisen gleiche auffallende Rechtsverschiebungen auf. Da die Vermutung eines Artefakts vorliegt, wurden diese Werte aus den weiterführenden Berechnungen (z. B. Mittelwertbildung) ausgeschlossen.

3.2.2 Distaler Tubulus

In den Abbildungen 3-7 bis 3-9 sind jeweils sechs bzw. vier Diagramme zu kumulativen Häufigkeiten der Silberkornmarkierungen von Zellkern und Cytoplasma der untersuchten distalen Tubuli zu sehen. Auch hier wurden die Graphen nach Expositionsgruppen angeordnet, um eine spezielle Anschauung der Abhängigkeit vom Zeitpunkt der $^3\text{H-TdR}$ -Injektion zu erzielen.

Bei der Gegenüberstellung der Versuchstiergruppen sind keine auffälligen Links- oder Rechtsverschiebungen festzustellen. Ebenso wenig ist eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der $^3\text{H-TdR}$ -Injektion zu erkennen. Der sehr ähnliche Kurvenverlauf in den Zellkerngraphen und den Cytoplasmagraphen lässt wiederum darauf schließen, dass auch die Streubreite von Zellkernmarkierung und Cytoplasmamarkierung ähnlich ist.

Es gab keine Graphen, in denen Häufigkeitsverteilungen zu einzelnen Versuchstieren stärker abwichen. Das galt insbesondere auch für die Tiere Nr. 18-03 und 95-03 (s. oben), so dass diese Messwerte für den distalen Tubulus weiterverwertbar waren.

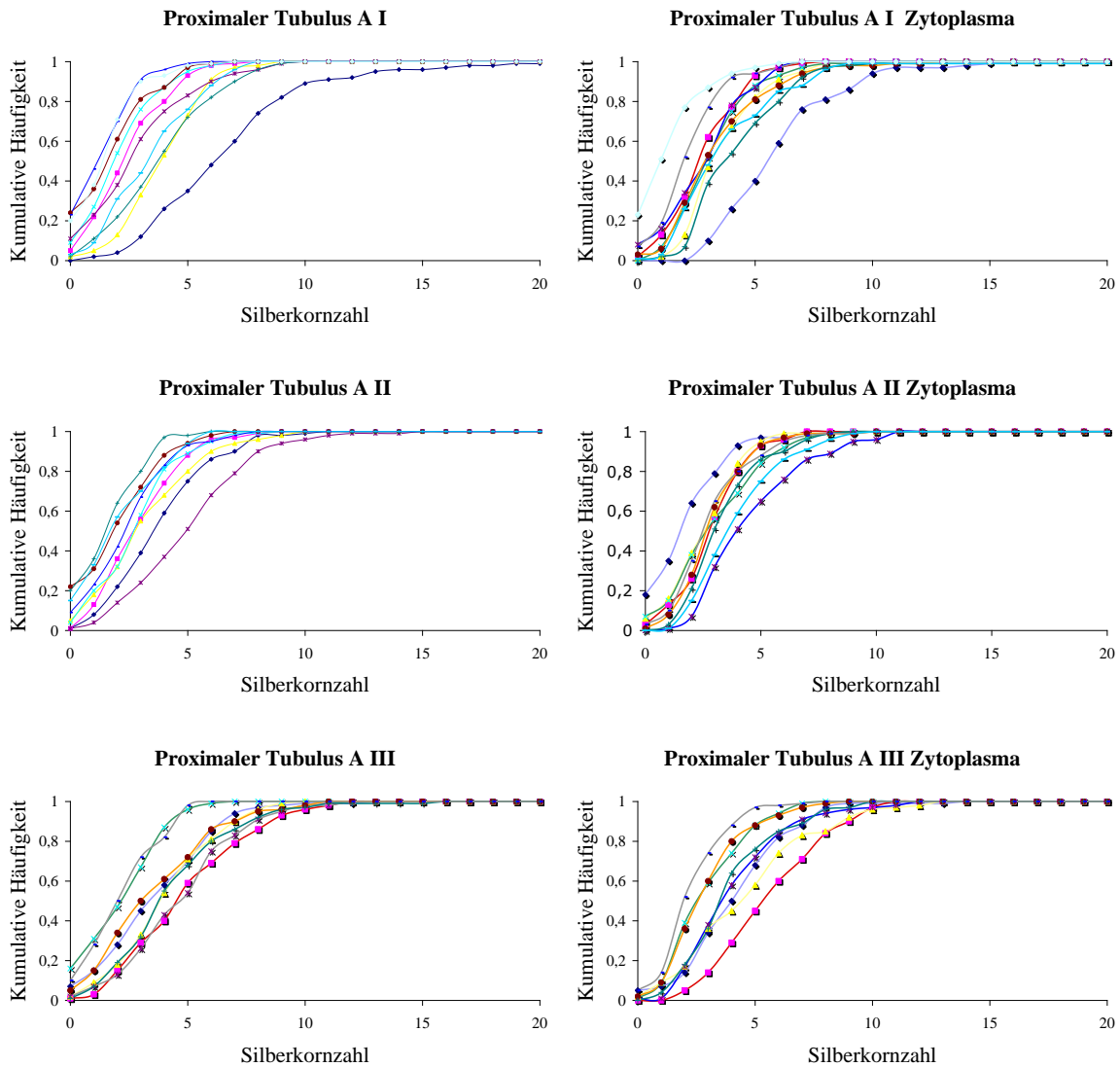


Abbildung 3-4: Relative kumulative Häufigkeitsverteilungen für Silberkornmarkierungen im UDS-Versuch für Kern und Cytoplasma proximaler Tubuluszellen der Gruppe A, d. h. Injektion von $^3\text{H-TdR}$ 5 min nach Abschalten des MF.

I-III: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) bzw. 0 mT (III).

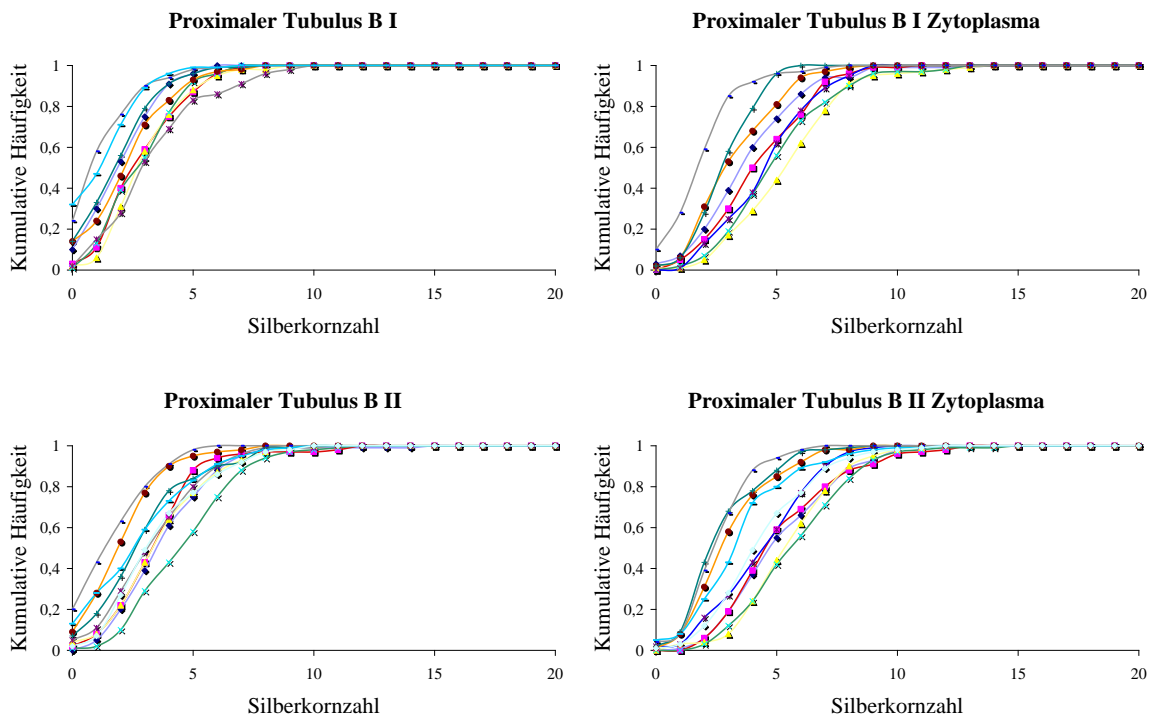


Abbildung 3-5: Relative kumulative Häufigkeitsverteilungen für Silberkornmarkierungen im UDS-Versuch für Kern und Cytoplasma proximaler Tubuluszellen der Gruppe B, d. h. Injektion von $^3\text{H-TdR}$ 24 h nach Abschalten des MF.

I-III: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) bzw. 0 mT (III).

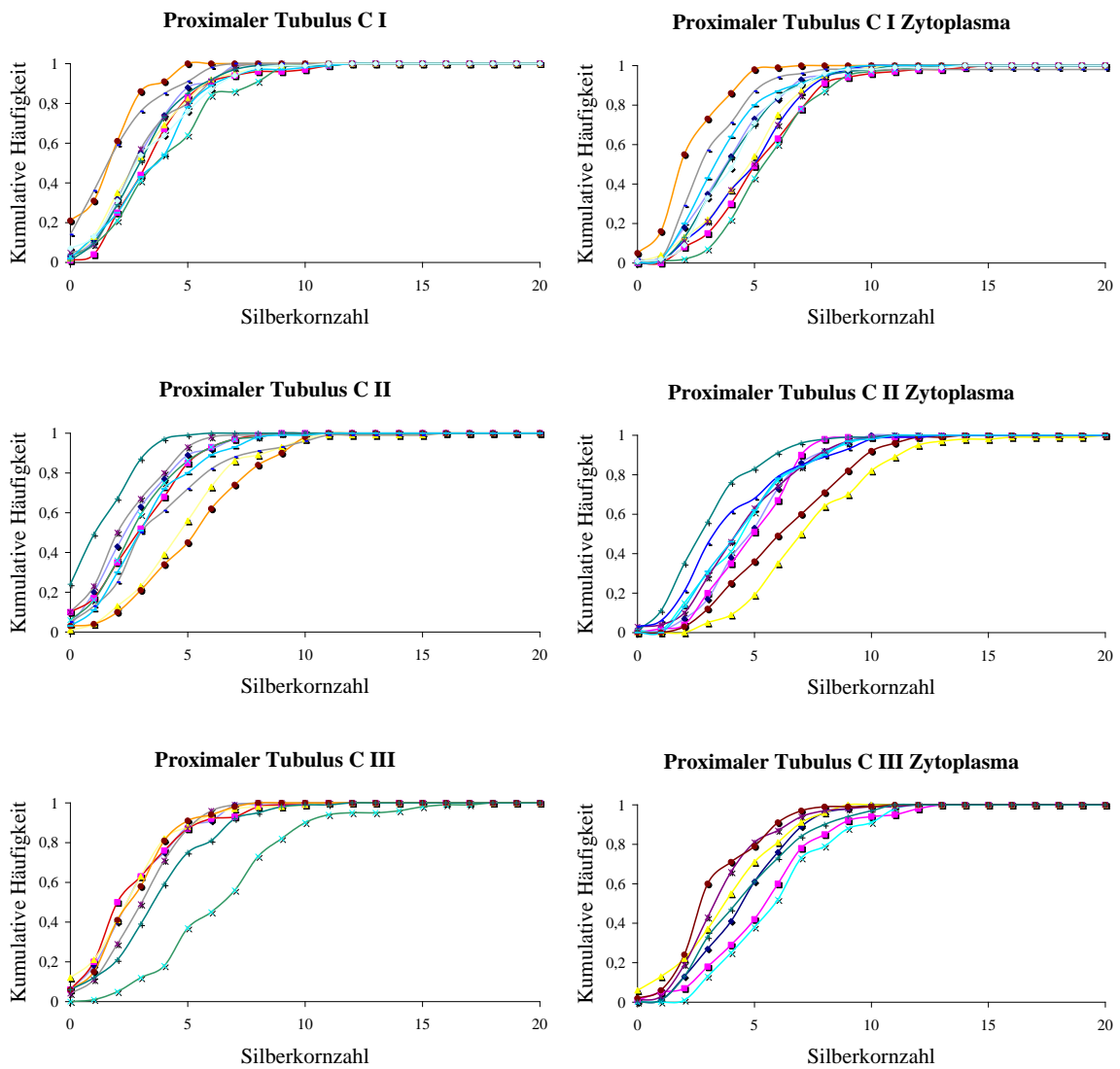


Abbildung 3-6: Relative kumulative Häufigkeitsverteilungen für Silberkornmarkierungen im UDS-Versuch für Kern und Cytoplasma proximaler Tubuluszellen der Gruppe C, d. h. Injektion von $^3\text{H-TdR}$ 7 d nach Abschalten des MF.

I-III: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) bzw. 0 mT (III).

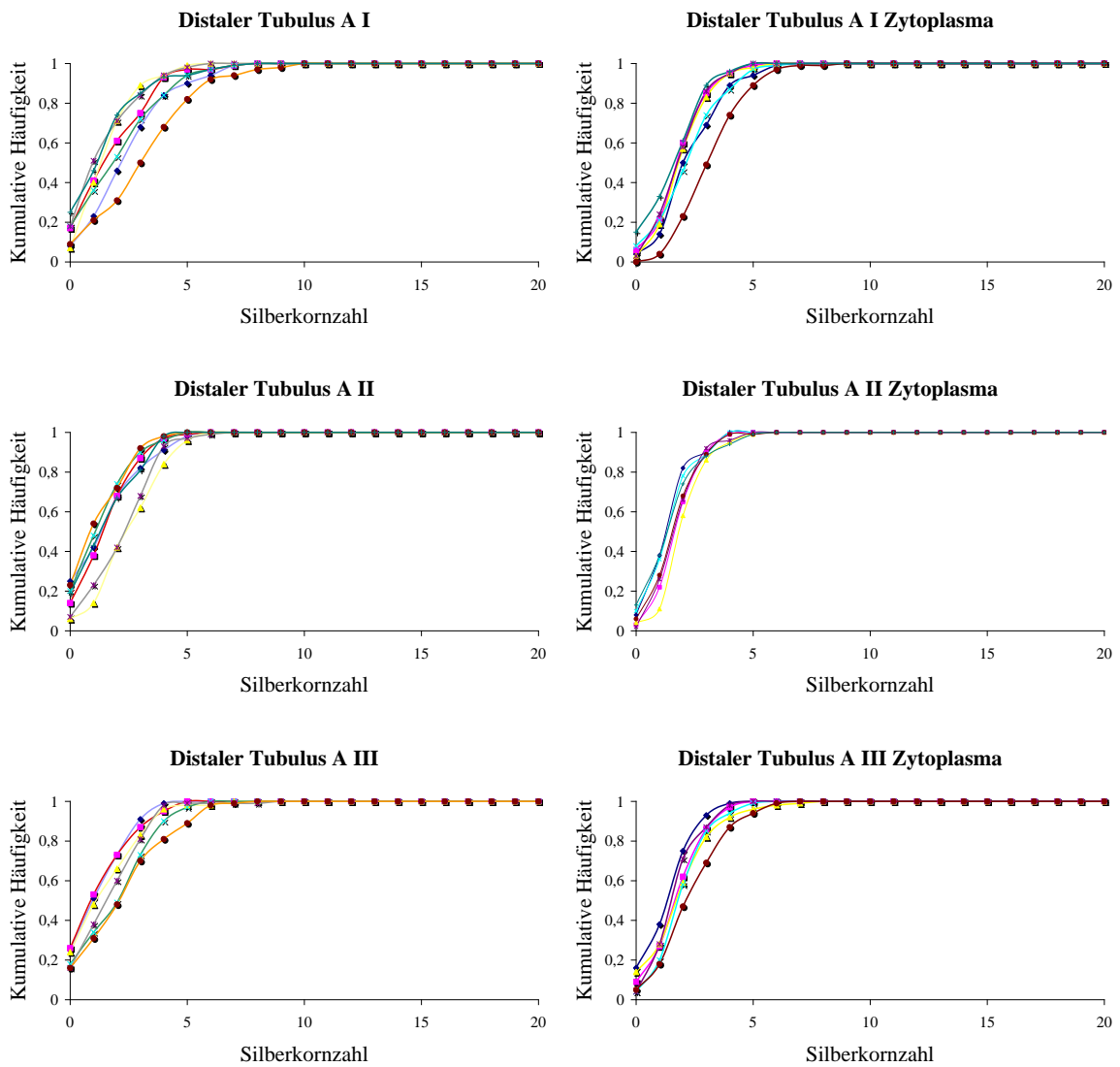


Abbildung 3-7: Relative kumulative Häufigkeitsverteilungen für Silberkornmarkierungen im UDS-Versuch für Kern und Cytoplasma distaler Tubuluszellen der Gruppe A, d. h. Injektion von $^3\text{H-TdR}$ 5 min nach Abschalten des MF.

I-III: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) bzw. 0 mT (III).

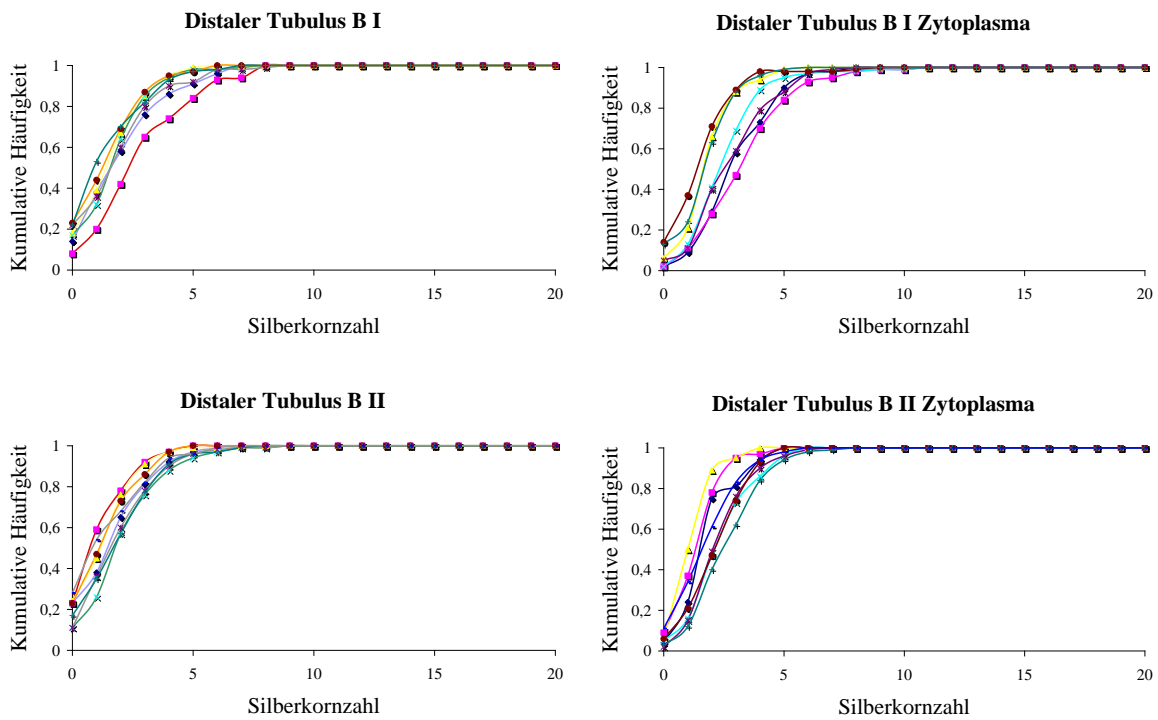


Abbildung 3-8: Relative kumulative Häufigkeitsverteilungen für Silberkornmarkierungen im UDS-Versuch für Kern und Cytoplasma distaler Tubuluszellen der Gruppe B, d. h. Injektion von $^3\text{H-TdR}$ 24 h nach Abschalten des MF.

I-III: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) bzw. 0 mT (III).

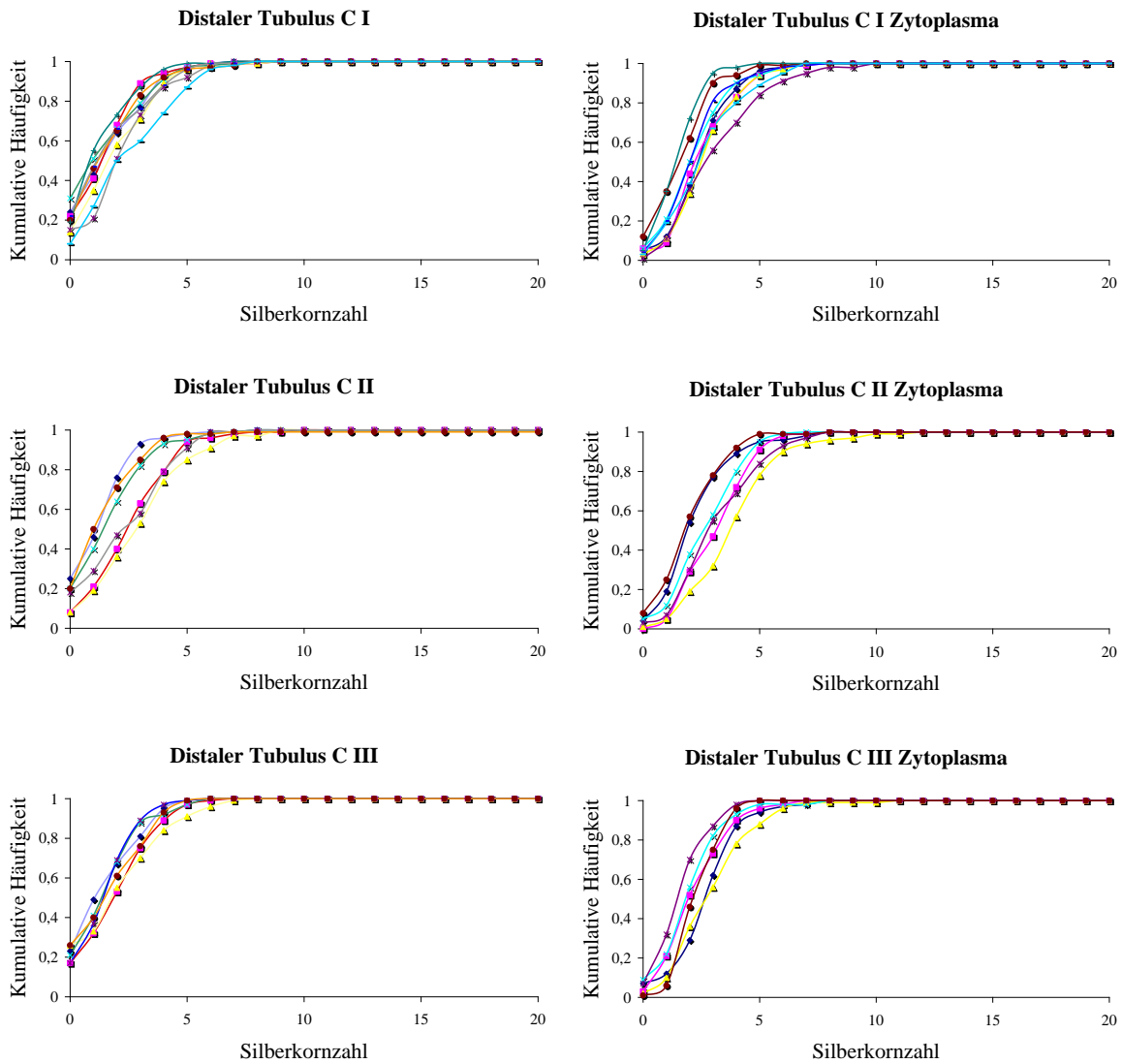


Abbildung 3-9: Relative kumulative Häufigkeitsverteilungen für Silberkornmarkierungen im UDS-Versuch für Kern und Cytoplasma distaler Tubuluszellen der Gruppe C, d. h. Injektion von ^3H -TdR 7 d nach Abschalten des MF.

I-III: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) bzw. 0 mT (III).

3.3 Nulleffekt

In den Tabellen 3-1 und 3-2 wird eine Übersicht der Charakteristika und Messergebnisse der zu untersuchenden Zellarten (proximale Tubuli, distale Tubuli) von fünf inaktiven, das heißt nicht mit $^3\text{H-TdR}$ injizierten, Versuchstieren gegeben. Es wurden jeweils acht Autoradiogramme pro Zellart aus unterschiedlichen Expositions Kästchen ausgewertet.

Tabelle 3-1 beinhaltet die Ergebnisse für die Zellen der proximalen Tubuli. Demnach betrug die Silberkornzahl über dem Zellkern im Mittel nur 0,11 Silberkörner / Kern; die Silberkorndichte des Cytoplasmas war im Mittel $0,0038 \text{ Körner}/\mu\text{m}^2$. Charakteristika und Messergebnisse der Zellen der distalen Tubuli sind in Tabelle 3-2 wiedergegeben. Auch hier waren die ermittelten Mittelwerte von Silberkornzahlen pro Zellkern mit 0,07 und der Silberkorndichte des Cytoplasmas mit $0,0027 \text{ Körner}/\mu\text{m}^2$ ebenfalls sehr gering.

3.4 Messwerte und ihre Streubreite für Epithelzellen des proximalen Tubulus

3.4.1 Ausmaß der Zellkernmarkierungen

In Tabelle A3-3 (siehe Anhang) sind sämtliche Charakteristika der Versuchstiere (Gewicht und Expositionsgruppenzugehörigkeit) sowie die Messergebnisse (korrigierte Silberkornzahlen der Zellkerne und Silberkorndichten des Cytoplasmas) proximaler Tubuluszellen zusammengestellt.

Alles in allem ist es jedoch nicht möglich, anhand der Tabelle Aussagen über Abweichungen und Auffälligkeiten der Versuchstiere und –Gruppen zu treffen. Zu diesem Zweck ist eine genauere Auswertung und Verarbeitung der Ergebnisse notwendig.

Mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse wurden die Versuchstiergruppen untereinander verglichen und geprüft, ob gewisse Faktoren einen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Zellkernmarkierung oder die Größe der Zellkernfläche ausgeübt haben (Tabelle 3-4a). Hierbei zeigten sich keine Signifikanzen.

Tabelle 3-1: Charakteristika zu den inaktiven Versuchstieren sowie Messergebnisse proximaler Tubuluszellen (Niere)

VT-Nr.:	Gew. (g)	ARG-S.	Schn. Nr.	KK	pk(0)	KF(μm^3)	KZ	pk(0)	ZF	Dichte
67/03	47	P1	2a	0,16	83	24,99	0,18	76	39,35	0,0046
67/03	47	P3	12a	0,17	88	29,10	0,26	86	50,52	0,0051
68/03	44	P2	10a	0,26	80	30,55	0,67	65	49,39	0,0136
70/03	45	R1	2a	0,06	95	26,37	0,07	93	46,87	0,0015
70/03	45	R2	6a	0,02	97	25,71	0,08	92	43,97	0,0018
70/03	45	R3	10a	0,06	94	21,96	0,05	94	41,88	0,0012
70/03	45	R4	9a	0,03	97	25,47	0,03	95	41,57	0,0007
70/03	45	R7	5a	0,13	90	26,93	0,10	93	45,47	0,0022
			MW:	0,11					MW:	0,0038

Tabelle 3-2: Charakteristika zu den inaktiven Versuchstieren sowie Messergebnisse distaler Tubuluszellen (Niere)

VT-Nr.:	Gew. (g)	ARG-S.	Schn. Nr.	KK	pk(0)	KF(μm^3)	KC	pk(0)	ZF	Dichte
67/03	47	P1	2a	0,13	93	20,60	0,18	93	32,91	0,0055
67/03	47	P3	12a	0,15	88	20,17	0,07	85	37,42	0,0019
68/03	44	P2	10a	0,07	87	20,06	0,36	84	39,50	0,0091
70/03	45	R1	2a	0,07	96	17,09	0,01	98	35,06	0,0003
70/03	45	R2	6a	0,01	93	15,86	0,00	100	32,38	0,0000
70/03	45	R3	10a	0,03	97	15,23	0,04	97	29,96	0,0013
70/03	45	R4	9a	0,05	96	15,06	0,04	95	32,36	0,0012
70/03	45	R7	5a	0,08	93	15,72	0,06	95	31,12	0,0019
			MW:	0,07					MW:	0,0027

VT-Nr.: Versuchstiernummer; **Gew. (g):** Gewicht im Gramm; **ARG-S.:** ARG-Serie;
Schn.-Nr.: Schnitt-Nummer; **KK:** Silberkörnchen über dem Zellkern; **pk(0):** Häufigkeit von Zellkernen bzw. Cytoplasmaprojektionsflächen mit Null Silberkörnchen; **KF:** Zellkernprojektionsfläche; **KZ:** Silberkörnchen über dem Cytoplasma; **ZF:** Cytoplasmaprojektionsfläche; **Dichte:** KZ/ZF

Tabelle 3-4a: Einfaktorielle Varianzanalyse zur Signifikanzbestimmung der Ergebnisse für proximale Tubuluszellen

Dependent Variable: Kernfläche

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	115,336(a)	9	12,815	1,477	,177
Intercept	831,634	1	831,634	95,836	,000
Tiergewicht / g	12,993	1	12,993	1,497	,226
ARG Serie	26,820	1	26,820	3,091	,084
Zeitpunkt	23,137	2	11,569	1,333	,271
Dosis	17,200	2	8,600	,991	,377
Zeitpunkt * Dosis	30,863	3	10,288	1,186	,323
Error	529,337	61	8,678		
Total	66451,693	71			
Corrected Total	644,673	70			

a R Squared = ,179 (Adjusted R Squared = ,058)

Dependent Variable: KKnormiert

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	161,426(a)	9	17,936	1,731	,101
Intercept	85,437	1	85,437	8,246	,006
Tiergewicht / g	,025	1	,025	,002	,961
ARG Serie	,119	1	,119	,011	,915
Zeitpunkt	8,958	2	4,479	,432	,651
Dosis	52,915	2	26,458	2,554	,086
Zeitpunkt * Dosis	72,751	3	24,250	2,341	,082
Error	631,999	61	10,361		
Total	10580,829	71			
Corrected Total	793,425	70			

a R Squared = ,203 (Adjusted R Squared = ,086)

Zeitpunkt: Zeitpunkt der ³HTdR Injektion nach Abschalten des MF (Gruppen A, B, C)

Dosis: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III).

Die in Englisch aufgeführten Begriffe sind der SPSS-Berechnung entnommen und wurden der Vollständigkeit wegen aufgeführt.

**Tabelle 3-4b: Post-hoc t-Tests zum Vergleich der Versuchstiergruppen
(Proximaler Tubulus/Zellkern)**

Das mittels Bonferroni-Korrektur adjustierte Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05/14 = 0,0036$

Kernfläche			KK _{norm}	
GRUPPEN	MITTELWERT	p	MITTELWERT	p
A I	29.00 ± 0.80 N=9	0,9690	10.33 ± 1.04 N=9	0,9008
A II	28.94 ± 1.26 N=10		10.56 ± 1.39 N=10	
A I	29.00 ± 0.80 N=9	0,0132	10.33 ± 1.04 N=9	0,0168
A III	32.22 ± 0.82 N=8		14.48 ± 1.14 N=8	
A I	29.00 ± 0.80 N=9	0,2837	10.33 ± 1.04 N=9	0,4760
B I	30.19 ± 0.71 N=9		09.42 ± 0.69 N=9	
A I	29.00 ± 0.80 N=9	0,3636	10.33 ± 1.04 N=9	0,1728
C I	30.56 ± 1.40 N=10		12.14 ± 0.76 N=10	
A II	28.94 ± 1.26 N=10	0,0560	10.56 ± 1.39 N=10	0,0515
A III	32.22 ± 0.82 N=8		14.48 ± 1.14 N=8	
A II	28.94 ± 1.26 N=10	0,2668	10.56 ± 1.39 N=10	0,2762
B II	30.60 ± 0.71 N=10		12.34 ± 0.76 N=10	
A II	28.94 ± 1.26 N=10	0,1024	10.56 ± 1.39 N=10	0,2334
C II	31.57 ± 0.78 N=9		13.05 ± 1.46 N=9	
A III	32.22 ± 0.82 N=8	0,3798	14.48 ± 1.14 N=8	0,1214
C III	31.00 ± 1.10 N=6		12.03 ± 0.72 N=6	
B I	30.19 ± 0.71 N=9	0,6891	09.42 ± 0.69 N=9	0,0119
B II	30.60 ± 0.71 N=10		12.34 ± 0.76 N=10	
B I	30.19 ± 0.71 N=9	0,8242	09.42 ± 0.69 N=9	0,0178
C I	30.56 ± 1.40 N=10		12.14 ± 0.76 N=10	
B II	30.60 ± 0.71 N=10	0,3700	12.34 ± 0.76 N=10	0,6604
C II	31.57 ± 0.78 N=9		13.05 ± 1.46 N=9	
C I	30.56 ± 1.40 N=10	0,5493	12.14 ± 0.76 N=10	0,5775
C II	31.57 ± 0.78 N=9		13.05 ± 1.46 N=9	
C I	30.56 ± 1.40 N=10	0,8283	12.14 ± 0.76 N=10	0,9257
C III	31.00 ± 1.10 N=6		12.03 ± 0.72 N=6	
C II	31.57 ± 0.78 N=9	0,6717	13.05 ± 1.46 N=9	0,6021
C III	31.00 ± 1.10 N=6		12.03 ± 0.72 N=6	

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

In den Tabellen 3-5 und 3-6 sind die Streubreiten der gemessenen Zellkernflächen und korrigierten Silberkornzahlen für proximale Tubuluszellen der jeweiligen Versuchstiergruppen zusammengestellt. Hierbei wurde die ermittelte Standardabweichung S_D relativiert, d. h. zum entsprechenden arithmetischen Mittel in Bezug gesetzt.

Für die Zellkernflächen ergab sich ein Streubreitenintervall, das von 7,07 bis 14,51% reichte; damit fällt ihre Spanne insgesamt gering aus, während die Streubreite der Silberkornzahlen über dem Zellkern (KK_{norm}) deutlich höher ist und im Bereich zwischen etwa 14,36 % und 39,27 % liegt.

Die Zellkernflächen der Gruppen ohne Magnetfeld-Exposition (A III und C III) fallen mit 7,21% und 8,67% gegenüber einem Mittelwert von 9,72% (berechnet für alle Magnetfeld-exponierten Mäuse) geringer aus. Im Hinblick auf die Zellkernmarkierung gilt dies auch für C III, wo eine minimale Streubreite von 14,36% vorliegt, während A III mit einem Wert von 22,15% nahe am arithmetischen Mittel aller Magnetfeld-exponierten Tiere von 26,44% liegt. Die interindividuellen Schwankungen der Zellkernmarkierung der Versuchstiergruppe A I und A II, die das 3H -TdR 5 min nach Abschalten des Magnetfelds erhalten haben, sind dagegen auffallend stark. Sie liegen mit 29,30% und 39,27% über dem Durchschnitt. Auch Versuchstiergruppe C II weist für die Kornzahlen im Zellkern eine extrem hohe Streubreite auf (32,00%), wohingegen C I, d. h. die Gruppe, die in der ersten Spulenordnung mit 1 mT exponiert und erst 7 d später getötet wurde, mit 18,54% nach der Kontrollgruppe die geringste Streubreite aufweist.

Die Versuchstiergruppe B, die 24 Stunden nach der Magnetfeld-Exposition das 3H -TdR injiziert bekam, weist gegenüber den anderen Versuchstiergruppen A und C sowohl geringe Schwankungen im Bereich der Kernflächen als auch im Bereich der Zellkernmarkierung auf.

Zusammengefasst ist zu sagen, dass sich jedoch keine klaren Zusammenhänge für das Ausmaß der Streuung zwischen den Versuchstieren und der Magnetfeldstärke feststellen lassen.

Tabelle 3-5: Streubreite der Ergebnisse für die Zellkernprojektionsflächen (KF) proximaler Tubuluszellen

TIERGUPPEN								
KF	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	29,00	28,94	32,22	30,19	30,60	30,56	31,57	31,00
MAX	33,04	33,21	35,04	33,84	34,61	37,80	35,06	33,20
MIN	24,38	22,92	27,87	26,46	26,78	24,84	28,42	26,54
S _D abs.	2,39	3,98	2,32	2,13	2,25	4,43	2,33	2,69
S _D (%)	8,23	13,74	7,21	7,07	7,34	14,51	7,39	8,67

Tabelle 3-6: Streubreite der Ergebnisse für die korrigierten Silberkornzahlen (KK_{korr.}) der Zellkerne proximaler Tubuluszellen

TIERGRUPPEN								
KK _{korr.}	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	3,11	3,17	4,21	2,83	3,66	3,59	3,81	3,55
MAX	4,30	5,41	5,30	3,60	4,85	4,47	5,87	4,55
MIN	1,93	0,72	2,76	1,78	2,31	2,41	1,99	3,17
S _D abs.	0,91	1,24	0,93	0,57	0,71	0,67	1,22	0,51
S _D (%)	29,30	39,27	22,15	20,14	19,32	18,54	32,00	14,36

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

3.4.2 Ausmaß der Markierungen des Cytoplasmas

Mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse wurden wiederum die Versuchstiergruppen untereinander verglichen und geprüft, ob gewisse Faktoren einen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Zellkernmarkierung oder die Größe der Zellkernfläche ausgeübt haben. Hierbei zeigte sich in Bezug auf die cytoplasmatische Silberkorndichte ein signifikanter Einfluss des Zeitpunkts der ³H-TdR-Injektion nach Abschalten des Magnetfeldes (siehe Tabelle 3-7a).

Im nachfolgenden post hoc t-Test konnte diese Signifikanz aber nicht bestätigt werden (siehe Tabelle 3-7b).

Tabelle 3-7a: Einfaktorielle Varianzanalyse zur Signifikanzbestimmung der Ergebnisse für proximale Tubuluszellen

Dependent Variable: Dichte Cytoplasma

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,007(a)	9	,001	2,421	,020
Intercept	,003	1	,003	10,410	,002
Gewicht	,000	1	,000	,388	,536
ARGSerie	1,538E-06	1	1,538E-06	,005	,944
Zeitpunkt	,004	2	,002	6,711	,002
Dosis	,001	2	,001	1,721	,187
Zeitpunkt * Dosis	,001	3	,000	,736	,535
Error	,019	61	,000		
Total	,537	71			
Corrected Total	,026	70			

a R Squared = ,263 (Adjusted R Squared = ,155)

Zeitpunkt: Zeitpunkt der ³HTdR Injektion nach Abschalten des MF (Gruppen A,B,C)

Dosis: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III).

Die in Englisch aufgeführten Begriffe sind der SPSS-Berechnung entnommen und wurden der Vollständigkeit wegen aufgeführt.

Das für $p < 0,05$ signifikante Ergebnis ist dunkel hervorgehoben.

Tabelle 3-7b: Post-hoc t-Tests für cytoplasmatische Markierungen (Dichte) der Versuchstiergruppen (Proximaler Tubulus)

Das mittels Bonferroni-Korrektur adjustierte Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05/14 = 0,0036$

	Dichte			Dichte	
	MITTELWERT	p	GRUPPEN	MITTELWERT	p
A I	0.0739 ± 0.0059 N=9	0,0846	A III	0.0808 ± 0.0080 N=8	0,2992
A II	0.0755 ± 0.0056 N=10		C III	0.0919 ± 0.0050 N=6	
A I	0.0739 ± 0.0059 N=9	0,4938	B I	0.0753 ± 0.0055 N=9	0,0752
A III	0.0808 ± 0.0080 N=8		B II	0.0889 ± 0.0048 N=10	
A I	0.0739 ± 0.0059 N=9	0,8587	B I	0.0753 ± 0.0055 N=9	0,0324
B I	0.0753 ± 0.0055 N=9		C I	0.0916 ± 0.0044 N=10	
A I	0.0739 ± 0.0059 N=9	0,0258	B II	0.0889 ± 0.0048 N=10	0,1195
C I	0.0916 ± 0.0044 N=10		C II	0.1027 ± 0.0071 N=9	
A II	0.0755 ± 0.0056 N=10	0,5873	C I	0.0916 ± 0.0044 N=10	0,193
A III	0.0808 ± 0.0080 N=8		C II	0.1027 ± 0.0071 N=9	
A II	0.0755 ± 0.0056 N=10	0,0817	C I	0.0916 ± 0.0044 N=10	0,9689
B II	0.0889 ± 0.0048 N=10		C III	0.0919 ± 0.0050 N=6	
A II	0.0755 ± 0.0056 N=10	0,0075	C II	0.1027 ± 0.0071 N=9	0,2839
C II	0.1027 ± 0.0071 N=9		C III	0.0919 ± 0.0050 N=6	

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

Während in Bezug auf die analysierten Cytoplasmaflächen die Einzelwerte pro Tier – wenn man vom Tier Nr. 41/03 der Gruppe A III absieht – meist im Bereich von etwa 10,00% um den Mittelwert aller Tiere schwanken, sind die Streubreiten der Silberkorndichten auffällig größer.

Betrachtet man hier die Mittelwerte getrennt nach Magnetfeld-exponierten (20,40%) und nicht exponierten Tieren (20,70%), ist kein Einfluss der Magnetfeld-Exposition festzustellen (siehe Tab. 3-8 und 3-9).

Tabelle 3-8: Streubreite der Ergebnisse für Cytoplasmaprojektionsflächen (ZF) der proximalen Tubuluszellen

TIERGRUPPEN								
ZF	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	47,73	46,45	54,26	50,83	48,75	50,09	51,32	50,25
MAX	58,83	59,90	82,15	54,28	53,02	55,99	56,17	55,72
MIN	40,21	39,92	45,57	44,86	43,82	43,93	45,46	45,40
S _D abs.	5,31	5,41	12,36	3,66	3,07	3,81	3,88	4,63
S _D (%)	11,12	11,64	22,77	7,21	6,31	7,61	7,57	9,22

Tabelle 3-9: Streubreite der Ergebnisse für cytoplasmatische Silberkorndichten proximaler Tubuluszellen

TIERGRUPPEN								
DICHTE	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	0,0739	0,0755	0,0808	0,0754	0,0890	0,0916	0,1027	0,0919
MAX	0,1069	0,1018	0,0994	0,0984	0,1075	0,1152	0,1365	0,1106
MIN	0,0574	0,0401	0,0400	0,0493	0,0647	0,0631	0,0726	0,0814
S _D abs.	0,0176	0,0177	0,0227	0,0165	0,0149	0,0140	0,0214	0,0121
S _D (%)	23,88	23,47	28,06	21,89	16,73	15,25	20,85	13,21

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

3.5 Messwerte und ihre Streubreite für Epithelzellen des distalen Tubulus

3.5.1 Ausmaß der Zellkernmarkierungen

In Tabelle A3-10 (siehe Anhang) sind die gängigen Charakteristika der Versuchstiere (Gewicht und Expositionsgruppenzugehörigkeit) sowie die Messergebnisse (mittlere korrigierte Silberkornzahlen der Zellkerne und die Silberkorndichte des Cytoplasmas) distaler Tubuluszellen zusammengefasst.

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich, dass keine Abhängigkeit der Anzahl der nukleären Silberkörner oder der Kernfläche vom Zeitpunkt der $^3\text{H-TdR}$ -Injektion (V_2) vorliegt (s. Tab. 3-11a). Ein Einfluss des Gewichts der Versuchstiere (V_3) konnte ausgeschlossen werden, und auch die lange Belichtungszeit hat nicht durch Fading-Effekte die Ergebnisse beeinflusst.

Bei der Signifikanzermittlung im post-hoc t-Test unter Berücksichtigung einer Bonferroni-Korrektur (s. Tab. 11b) zur genaueren Charakterisierung der Einflüsse auf die Zellkernmarkierung konnten ebenfalls keine signifikanten Abhängigkeiten festgestellt werden.

Tabelle 3-11a: Einfaktorielle Varianzanalyse zur Signifikanzbestimmung der Ergebnisse für distale Tubuluszellen

Dependent Variable: Kernfläche

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	22,734(a)	9	2,526	1,229	,295
Intercept	246,219	1	246,219	119,794	,000
Gewicht	,422	1	,422	,205	,652
ARGSerie	4,665	1	4,665	2,269	,137
Zeitpunkt	6,719	2	3,359	1,634	,203
Dosis	9,198	2	4,599	2,238	,115
Zeitpunkt * Dosis	6,227	3	2,076	1,010	,395
Error	125,377	61	2,055		
Total	28683,873	71			
Corrected Total	148,111	70			

a R Squared = ,153 (Adjusted R Squared = ,029)

Dependent Variable: KKnormiert

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	18,986(a)	9	2,110	,703	,704
Intercept	27,351	1	27,351	9,110	,004
Gewicht	,038	1	,038	,013	,911
ARGSerie	1,655	1	1,655	,551	,461
Zeitpunkt	12,291	2	6,145	2,047	,138
Dosis	5,619	2	2,809	,936	,398
Zeitpunkt * Dosis	4,542	3	1,514	,504	,681
Error	183,130	61	3,002		
Total	3297,120	71			
Corrected Total	202,116	70			

a R Squared = ,094 (Adjusted R Squared = -,040)

Zeitpunkt: Zeitpunkt der ³HTdR Injektion nach Abschalten des MF (Gruppen A,B,C)

Dosis: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III).

Die in Englisch aufgeführten Begriffe sind der SPSS-Berechnung entnommen und wurden der Vollständigkeit wegen aufgeführt.

**Tabelle 3-11b: Post-hoc t-Test zum Vergleich der Versuchstiergruppen
(distaler Tubulus/Zellkern)**

Das mittels Bonferroni-Korrektur adjustierte Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05/14 = 0,0036$

Kernfläche			KK _{norm}	
GRUPPEN	MITTELWERT	p	MITTELWERT	p
A I	20.17 ± 0.62 N=8	0,4473	7.10± 0.71 N=8	0,2718
A II	19.48 ± 0.61 N=10		6.16 ± 0.47 N=10	
A I	20.17 ± 0.62 N=8	0,6766	7.10± 0.71 N=8	0,2139
A III	19.76 ± 0.71 N=8		5.86 ± 0.64 N=8	
A I	20.17 ± 0.62 N=8	0,2063	7.10± 0.71 N=8	0,3957
B I	21.11 ± 0.39 N=9		6.22 ± 0.70 N=9	
A I	20.17 ± 0.62 N=8	0,6461	7.10± 0.71 N=8	0,9855
C I	19.86 ± 0.30 N=10		7.11 ± 0.40 N=10	
A II	19.48 ± 0.61 N=10	0,7648	6.16 ± 0.47 N=10	0,7017
A III	19.76 ± 0.71 N=8		5.86 ± 0.64 N=8	
A II	19.48 ± 0.61 N=10	0,6838	6.16 ± 0.47 N=10	0,7472
B II	19.77 ± 0.36 N=10		6.36 ± 0.39 N=10	
A II	19.48 ± 0.61 N=10	0,5663	6.16 ± 0.47 N=10	0,1826
C II	19.90 ± 0.34 N=9		7.29 ± 0.68 N=9	
A III	19.76 ± 0.71 N=8	0,3940	5.86 ± 0.64 N=8	0,3562
C III	20.53 ± 0.46 N=7		6.73 ± 0.64 N=7	
B I	21.11 ± 0.39 N=9	0,0213	6.22 ± 0.70 N=9	0,8612
B II	19.77 ± 0.36 N=10		6.36 ± 0.39 N=10	
B I	21.11 ± 0.39 N=9	0,0196	6.22 ± 0.70 N=9	0,2750
C I	19.86 ± 0.30 N=10		7.11 ± 0.40 N=10	
B II	19.77 ± 0.36 N=10	0,8011	6.36 ± 0.39 N=10	0,2388
C II	19.90 ± 0.34 N=9		7.29 ± 0.68 N=9	
C I	19.86 ± 0.30 N=10	0,9339	7.11 ± 0.40 N=10	0,8133
C II	19.90 ± 0.34 N=9		7.29 ± 0.68 N=9	
C I	19.86 ± 0.30 N=10	0,2215	7.11 ± 0.40 N=10	0,6019
C III	20.53 ± 0.46 N=7		6.73 ± 0.64 N=7	
C II	19.90 ± 0.34 N=9	0,2746	7.29 ± 0.68 N=9	0,5652
C III	20.53 ± 0.46 N=7		6.73 ± 0.64 N=7	

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

Um einen differenzierteren Einblick zu gewinnen, wurden auch hier Streubreiten errechnet.

In Tabelle 3-12 und 3-13 sind diese Streubreiten der gemessenen Zellkernflächen und korrigierten Silberkornzahlen für distale Tubuluszellen der jeweiligen Versuchstiergruppen zusammengestellt. Es fällt auf, dass in Bezug auf die Kernflächen die Streubreite recht gering, d. h. im Bereich zwischen ca. 5-10% um den Gruppenmittelwert liegt.

Für die korrigierten Silberkornzahlen ist dagegen die Streubreite auffallend größer (ca. 18-33%). Eine Abhängigkeit von der Magnetfeld-Exposition war jedoch weder für die Kernfläche noch für KK_{norm} nachweisbar.

Tabelle 3-12: Streubreite der Ergebnisse für die Zellkernprojektionsfläche (KF) distaler Tubuluszellen

TIERGRUPPEN								
KF	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	20,17	19,48	19,76	21,11	19,77	19,86	19,90	20,53
MAX	22,06	22,39	22,61	22,84	21,69	20,88	21,84	22,20
MIN	16,38	16,52	17,39	18,95	17,95	18,28	18,54	19,14
S _D abs.	1,77	1,92	2,01	1,16	1,14	0,95	1,01	1,23
S _D (%)	8,76	9,85	10,15	5,51	5,75	4,80	5,08	5,98

Tabelle 3-13: Streubreite der Ergebnisse für die korrigierten Silberkornzahlen(KK_{korr.}) der Zellkerne distaler Tubuluszellen

TIERGRUPPEN								
KK _{korr.}	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	2,42	2,14	2,04	2,11	2,20	2,51	2,52	2,29
MAX	3,53	3,10	3,01	3,35	2,74	3,11	3,58	3,19
MIN	1,73	1,64	1,09	1,06	1,43	1,76	1,45	1,49
S _D abs.	0,64	0,51	0,65	0,72	0,42	0,41	0,72	0,55
S _D (%)	26,54	23,94	31,82	33,93	18,89	16,28	28,62	24,01

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

3.5.2 Ausmaß der Markierungen des Cytoplasmas

Eine einfaktorielle Varianzanalyse erbrachte einen signifikanten Einfluss sowohl des Zeitpunktes des ³H-TdR Injektion als auch – überraschenderweise – der spezifischen Expositionsboxen (Tab. 3-14a). Im nachfolgenden post hoc t-Test ergaben sich jedoch für beide Befunde keine Bestätigung (Tab. 3-14).

Tabelle 3-14a: Einfaktorielle Varianzanalyse zur Signifikanzbestimmung

Dependent Variable: Dichte Cytoplasma

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,009(a)	9	,001	2,685	,011
Intercept	,004	1	,004	11,799	,001
Gewicht	8,924E-05	1	8,924E-05	,240	,626
ARGSerie	,003	1	,003	6,906	,011
Zeitpunkt	,006	2	,003	8,309	,001
Dosis	,001	2	,001	1,747	,183
Zeitpunkt * Dosis	,001	3	,000	,719	,544
Error	,023	62	,000		
Total	,540	72			
Corrected Total	,032	71			

a R Squared = ,280 (Adjusted R Squared = ,176)

Zeitpunkt: Zeitpunkt der ³HTdR Injektion nach Abschalten des MF (Gruppen A,B,C)

Dosis: MF-Dosis, d. h. 1 mT (I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III).

Die in Englisch aufgeführten Begriffe sind der SPSS-Berechnung entnommen und wurden der Vollständigkeit wegen aufgeführt.

Das für $p < 0,05$ signifikante Ergebnis ist dunkel hervorgehoben.

Tabelle 3-14b: Post-hoc t-Tests für cytoplasmatische Markierungen (Dichte) der Versuchstiergruppen (Distaler Tubulus)

Das mittels Bonferroni-Korrektur adjustierte Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05/14 = 0,0036$

Dichte			Dichte		
GRUPPEN	MITTELWERT	p	GRUPPEN	MITTELWERT	p
A I	0.0787 ± 0.0060 N=9	0,7217	A III	0.0771 ± 0.0050 N=8	0,6595
A II	0.0764 ± 0.0031 N=10		C III	0.0816 ± 0,0090 N=7	
A I	0.0787 ± 0.0060 N=9	0,8366	B I	0.0790 ± 0.0084 N=9	0,9594
A III	0.0771 ± 0.0050 N=8		B II	0.0795 ± 0.0046 N=10	
A I	0.0787 ± 0.0060 N=9	0,9806	B I	0.0790 ± 0.0084 N=9	0,0935
B I	0.0790 ± 0.0084 N=9		C I	0.0980 ± 0.0068 N=10	
A I	0.0787 ± 0.0060 N=9	0,0493	B II	0.0795 ± 0.0046 N=10	0,0565
C I	0.0980 ± 0.0068 N=10		C II	0.1004 ± 0.0096 N=9	
A II	0.0764 ± 0.0031 N=10	0,9024	C I	0.0980 ± 0.0068 N=10	0,8373
A III	0.0771 ± 0.0050 N=8		C II	0.1004 ± 0.0096 N=9	
A II	0.0764 ± 0.0031 N=10	0,5818	C I	0.0980 ± 0.0068 N=10	0,1573
B II	0.0795 ± 0.0046 N=10		C III	0.0816 ± 0,0090 N=7	
A II	0.0764 ± 0.0031 N=10	0,0228	C II	0.1004 ± 0.0096 N=9	0,1831
C II	0.1004 ± 0.0096 N=9		C III	0.0816 ± 0,0090 N=7	

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

Zum Test, ob evtl. die Expositionsbedingungen einen Einfluss ausüben, wurden innerhalb von vier Versuchsgruppen jeweils die Ergebnisse von in unterschiedlichen Boxen exponierten Autoradiogrammen überprüft (Tab. 3-15a). Hierbei ergaben sich in der Tat signifikante Unterschiede, zum einen für die Kernflächen (KF) innerhalb der Gruppe A III, zum anderen in Hinblick auf die cytoplasmatische Silberkorndichte für Gruppe C I. Zu dieser Gruppe wurde ein weiterer t-Test zur Analyse der Komponenten „Silberkornzahl über dem Cytoplasma (KC)“ und „Cytoplasmaprojektionsfläche (CF)“, aus denen sich die cytoplasmatische Dichte ergibt, durchgeführt (Tab. 3-15b). Wie man sieht, war nur KC signifikant unterschieden, nicht aber CF.

Tabelle 3-15a: t-Tests zum Einfluss der ARG-Serie (Tests innerhalb der Versuchsgruppen A, B, C für jeweils $n \geq 3$ Versuchstiere)

		KF		KK_{norm}	
GRUPPEN	ARG-SERIE	MW	p	MW	p
A I	P 2	19.10 ± 1.362 N=3	0,2082	6.900 ± 1.085 N=3	0,3569
	R 4	21.26 ± 0.4709 N=3	ns	8.537 ± 1.139 N=3	ns
A III	P 1	21.46 ± 0.5066 N=4	0,0021	5.090 ± 0.6781 N=4	0,2533
	R 1	18.07 ± 0.4163 N=4	*	6.630 ± 1.013 N=4	ns
B II	P 2	20.31 ± 0.4238 N=5	0,1458	6.308 ± 0.6947 N=5	0,8987
	R 2	19.24 ± 0.5096 N=5	ns	6.416 ± 0.4399 N=5	ns
C I	P 3	19.56 ± 0.4289 N=5	0,3402	7.484 ± 0.3941 N=5	0,3772
	R 4	20.17 ± 0.4217 N=5	ns	6.736 ± 0.6963 N=5	ns

		Cytoplasmat. Dichte	
GRUPPEN	ARG-SERIE	MW	p
A I	P 2	0.06657 ± 0.003268 N=3	0,329
	R 4	0.0861 ± 0.01728 N=3	ns
A III	P 1	0.07035 ± 0.007584 N=4	0,1993
	R 1	0.0838 ± 0.005427 N=4	ns
B II	P 2	0.07702 ± 0.007833 N=5	0,6213
	R 2	0.08192 ± 0.005439 N=5	ns
C I	P 3	0.1131 ± 0.003913 N=5	0,0135
	R 4	0.0829 ± 0.008745 N=5	*

Tabelle 3-15b: t-Test zum Einfluss der ARG-Serie (Teilanalyse innerhalb der Versuchsgruppe C I)

		KC		CF	
GRUPPEN	ARG-SERIE	MW	p	MW	p
C I	P 3	3.100 ± 0.1632 N=5	0,0252	27.67 ± 0.6065 N=5	0,3165
	R 4	2.340 ± 0.2234 N=5	*	28.41 ± 0.3267 N=5	ns

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben; **ns:** nicht signifikant

Die Tabellen 3-16 und 3-17 demonstrieren die Streubreiten der Ergebnisse der Cytoplasmaflächen und der relativen Silberkorndichten im Cytoplasma distaler Tubuluszellen. Hierbei fällt die recht hohe Streubreite für die Silberkorndichte ins Auge (ca. 23%). Sie beträgt dagegen nur ca. 10% für die Cytoplasmafläche. Ein Einfluss der Magnetfeld-Exposition war wiederum nicht festzustellen.

Tabelle 3-16: Streubreite der Ergebnisse für Cytoplasmaflächen distaler Tubuluszellen

TIERGRUPPEN								
ZF	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	32,45	26,56	26,38	30,40	29,43	27,87	32,03	33,23
MAX	38,53	29,00	31,52	32,49	35,25	29,02	36,83	37,65
MIN	27,24	21,37	24,17	27,72	21,53	25,40	27,17	27,96
S _D abs.	3,37	2,35	2,38	1,65	5,42	1,02	3,44	4,01
S _D (%)	10,39	8,83	9,02	5,44	18,43	3,65	10,72	12,07

Tabelle 3-15: Streubreite der Ergebnisse für die cytoplasmatische Silberkorndichte distaler Tubuluszellen

TIERGRUPPEN								
Dichte	A I	A II	A III	B I	BII	C I	C II	C III
MW	0,0787	0,0764	0,0771	0,0790	0,0795	0,0980	0,1003	0,0816
MAX	0,1201	0,0933	0,0936	0,1140	0,0950	0,1216	0,1502	0,1135
MIN	0,0620	0,0657	0,0512	0,0467	0,0576	0,0660	0,0649	0,0521
S _D abs.	0,0179	0,0098	0,0142	0,0253	0,0144	0,0214	0,0288	0,0239
S _D (%)	22,70	12,87	18,39	32,01	18,17	21,83	28,70	29,26

A, B, C: Zeitpunkt der Injektion von ³HTdR, d. h. 5 min (A), 24 h (B) oder 7 d (C) nach Abschalten des MF

I – III: MF-Dosis, d. h. 1 mT(I), 0,1 mT (II) oder 0 mT (III)

4 Diskussion

4.1 Validität und generelle Bedeutung der Messwerte

4.1.1 Einfluss der Expositionsbedingungen

Eine unerwartete Signifikanz resultierte aus der Univarianzanalyse zum Ausmaß der Cytoplasmamarkierung im distalen Tubulus hinsichtlich der ARG-Serie (s. Tabelle 3-14a). Ein Ergebnis dieser Art könnte zu der Schlussfolgerung führen, dass die Werte untereinander nicht mehr uneingeschränkt vergleichbar wären, da es den Verdacht auf Fading oder auf andere Artefakte aufkommen lässt.

Im zugehörigen post hoc t-Test (Tabelle 3-14b) ergab sich zwar für dieses Ergebnis keine Bestätigung; ohne Bonferroni-Korrektur jedoch wären die Ergebnisse der Gruppe A I gegenüber C I signifikant.

Bei genauerer Untersuchung zum Einfluss der Expositionsbedingungen mit Hilfe von t-Tests (s. Tabelle 3-15a) fand sich hinsichtlich der cytoplasmatischen Dichte der Gruppe C I eine Signifikanz beim Vergleich von Untergruppen, die in unterschiedlichen Boxen exponiert waren. Auffällig sind da die Werte der Expositionsbox P 3, die eine deutlich höhere Markierung aufwiesen als in Box R 4. Eine anschließende Teilanalyse (Tabelle 3-15b) zeigte, dass die Signifikanz auf eine erhöhte Kornzahl im Cytoplasma zurückzuführen ist und nicht auf eine eventuell verkleinerte Cytoplasmafläche. Da allerdings bei der Auswertung der Zellkerne keine Signifikanzen resultierten, ist von einer überstarken Background-Markierung abzusehen, da sonst beide Messwerte (KK_{norm} plus cytoplasmatische Dichte) betroffen sein müssten. Es sei angemerkt, dass auch in den kumulativen Häufigkeitsverteilungen dieser Gruppen keine Auffälligkeiten erkennbar waren.

Das alles spricht dafür, dass in der vorliegenden Untersuchung artefizielle Beeinflussungen der Messwerte keine Rolle gespielt haben.

4.1.2 Bedeutung der Messwerte

KK_{norm}: Die der Herstellung der Autoradiogramme vorausgegangene Feulgen-Hydrolyse gewährleistet die Eradikation aller säurelöslichen und damit unspezifisch markierten Stoffwechselprodukte. Aufgrund dessen und der Spezifität des Einbaus von ^3H -TdR in die DNA entsprechen die gezählten Silberkörner – vom korrigierten Nulleffekt abgesehen – somit ^3H -DNA (vgl. Korr und Schultze, 1989).

Nach einer langen Exposition der Autoradiogramme von mehreren Monaten kann man nach Applikation der hier verwendeten Dosis von $^3\text{H-TdR}$ im Prinzip zwei unterschiedlich markierte Arten von Zellkernen beobachten. Eine überaus starke, fast homogene Markierung des Zellkerns charakterisiert S-Phase-Zellen, bei denen der Einbau von $^3\text{H-TdR}$ in die DNA zu deren Reduplikation während der S-Phase, d. h. vor der Mitose, stattgefunden hatte.

Eine schwache Markierung resultierte dagegen aus einer sogenannten „unscheduled DNA synthesis (UDS)“ im Rahmen einer DNA-Exzisions-Reparatur (Djordjevic und Tolmach, 1967). Da die UDS stets nach einer DNA-Schädigung eintritt (meist infolge einer Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen) und andererseits die Autoradiographie linear arbeitet (d. h. mehr Silberkörner bei mehr DNA-Schäden; vgl. Korr et al., 1989), spiegelt die Silberkornzahl die Summe der reparierten DNA-Schäden wider. Durch eine Normierung der Zellkernmarkierung auf eine einheitliche DNA-Menge des Schnittvolumens (Schmitz, 1994) ist ein direkter Vergleich der Werte untereinander sowie mit denen der Literatur möglich.

KF: Unter der Voraussetzung, dass der Zellkern die Form einer Kugel hat, ist die Zellkernprojektionsfläche ein indirektes, grobes Maß für das Zellkernvolumen. Durch Volumenänderungen können Aussagen über den Zellmetabolismus getroffen werden. Werden z. B. Zellkerne unter Behandlung größer, deutet dies auf eine verstärkte metabolische Aktivität hin (vgl. Schmitz, 1994).

Es ist anzumerken, dass die Fläche des Cytoplasmas dagegen mehr als Kontrolle dafür diene, ob für die Dichteberechnungen ähnlich große Flächen zugrunde lagen.

CD: Vom Nulleffekt abgesehen, spiegeln auch hier die Silberkörner $^3\text{H-DNA}$ wider. Da Mitochondrien als einzige Organelle außerhalb des Zellkerns DNA enthalten, muss die cytoplasmatische Markierung als Einbau von $^3\text{H-TdR}$ in die mitochondriale DNA – also als $^3\text{H-mtDNA}$ - gewertet werden. Demzufolge deuten mehr Silberkörner auf eine Vermehrung des Gehalts an Mitochondrien bzw. mehr mtDNA und somit auf eine gesteigerte metabolische Aktivität hin. Zu Einzelheiten siehe z. B. Korr et al. (1997, 1998, 2001).

4.1.3 Vergleich der Messwerte mit Daten der Literatur

Beim Vergleich der Messwerte der proximalen Tubuluszellen mit den Ergebnissen früherer Arbeiten stechen vor allem die hohen Werte von Keller (2003) und Freuding (2004) hervor, während die Werte von Sommer (1998) und Demmler (2008) in einem ähnlichen Bereich liegen wie die der vorliegenden Arbeit.

Beim distalen Tubulus fallen erneut die Messergebnisse Freudings sehr hoch aus. Auffällig niedrig dagegen sind die Werte der vorliegenden Arbeit. Die Zellkernprojektionsflächen, die

von Sommer (1998) und von Demmler (2008) publiziert wurden, liegen wiederum in einer ähnlichen Größenordnung.

Es ist anzumerken, dass für die in Tabelle 4-1 und 4-2 zusammengestellten Daten gilt, dass auf gleiches Alter der Tiere geachtet, die gleiche Methodik angewandt und – abgesehen von der Arbeit Sommers (1998; siehe dazu Bosse, 2009) – die gleiche Menge an Radioaktivität appliziert wurde. Einflüsse auf die unterschiedlichen Silberkornzahlen dürften darin begründet sein, dass sich kleinere Unterschiede bei der Herstellung der Autoradiogramme ergeben haben. Beispielsweise können sich durch geringe Temperaturabweichungen der Glasobjektträger (sie lagerten bis 1 h vor dem Dippen im Kühlschrank bei 4° C; vgl. Kap. 2.5) Unterschiede in der Schichtdicke der autoradiographischen Films einstellen, die schließlich zu unterschiedlichen Silberkornzahlen führen.

Zusammenfassend für Tabelle 4-1 und 4-2 gilt, dass im Generellen erklärbare Größenordnungen der Messwerte vorliegen, wodurch die Daten als valide angesehen werden können.

Tabelle 4-1: Vergleich der Silberkornzahlen und Silberkorndichten proximaler Tubuli unbehandelter Kontrolltiere mit entsprechenden Werten der Literatur

Zellart	Literatur	Lokalisat.	Versuch	KKnorm	KF	Dichte
Prox. Tubul.	EK	Cortex renalis	UDS	142,66	42,88	1,4372
Prox. Tubul.	TF	Cortex renalis	UDS	90,02	45,12	0,4074
Prox. Tubul.	SS	Cortex renalis	UDS	14,48	32,22	0,0808
Prox. Tubul.	DS	Cortex renalis	UDS	12,77	30,87	0,199
Prox. Tubul.	TF	Cortex renalis	ISNT	-	42,52	-
Prox. Tubul.	MD	Cortex renalis	ISNT	-	37,62	-

Tabelle 4-2: Vergleich der Silberkornzahlen und Silberkorndichten distaler Tubuli unbehandelter Kontrolltiere mit entsprechenden Werten der Literatur

Zellart	Literatur	Lokalisat.	Versuch	KKnorm	KF	Dichte
Dist. Tubul.	TF	Cortex renalis	UDS	51,13	36,03	0,3245
Dist. Tubul.	SS	Cortex renalis	UDS	5,86	19,76	0,0771
Dist. Tubul.	DS	Cortex renalis	UDS	12,24	30,31	0,196
Dist. Tubul.	TF	Cortex renalis	ISNT	-	37,24	-
Dist. Tubul.	MD	Cortex renalis	ISNT	-	27,91	-

EK: Keller (2003) **TF:** Freuding (2004) **SS:** vorliegende Arbeit **DS:** Sommer (1998) **MD:** Demmler (2008); **KF:** Zellkernprojektionsfläche; **KKnorm:** normierte Silberkornzahlen über dem Zellkern

4.2 Einfluss der Magnetfeldstärke auf UDS und Zellmetabolismus

4.2.1 UDS

Proximaler Tubulus: Bei der Auswertung der Ergebnisse ließen sich in der Univarianzanalyse bezüglich des Parameters KK_{norm} keine Signifikanzen feststellen. Dieses Ergebnis stimmt mit Freuding (2004) überein (Mittelwert der Magnetfeld-exponierten Epithelzellen: $91,10 \pm 5,34$; Mittelwert der Kontrollen: $90,02 \pm 5,48$; $p=0,896$). Dagegen lag bei Keller (2003) ein signifikanter Anstieg der Werte der Magnetfeld-exponierten Tiere vor.

Da bei der Herstellung der Autoradiogramme im Allgemeinen die gleichen Bedingungen vorherrschten, sind die Daten der vorliegenden Arbeit direkt mit denen von Keller (2003) und Freuding (2004) vergleichbar und können somit einer näheren Untersuchung in Hinblick auf Dosiseffekte unterzogen werden. Aufgrund der jedoch recht unterschiedlichen Silberkornzahlen wurden keine absoluten Werte von KK_{norm} verwendet. Stattdessen wurden Quotienten aus den Einzelwerten und den Mittelwerten der nicht exponierten Tiere, d. h. relative Werte gebildet, die einen Vergleich verschiedener Untersucher eher erlauben. Sowohl die gebildeten Quotienten der vorliegenden Arbeit als auch die von Keller und Freuding wurden als Funktion der Magnetfeldstärke als Punktwolke dargestellt und eine lineare Regressionsgerade berechnet (s. Abb. 4-1a). Es wird deutlich, dass bei zunehmender Magnetfeldstärke auch das Ausmaß an UDS mit einer von Null signifikanten Steigung größer wird.

Distaler Tubulus: In der Univarianzanalyse ließen sich hier abermals in Übereinstimmung mit Freuding (2004) keine Signifikanzen erkennen. Es ist anzumerken, dass zu diesem Tubulusabschnitt keine Werte von Keller (2003) vorliegen.

In der zugehörigen Dosis-Wirkungs-Kurve ist die Steigung zwar positiv; jedoch aber nicht signifikant von Null unterschieden (s. Abb. 4-1b).

Korrespondierende Werte zum Ausmaß der UDS lassen sich mit Hilfe der sog. „in situ nick translation“ (ISNT)-Methodik erhalten (Iseki u. Mori, 1985; Iseki, 1986; siehe auch Rohde, 1999; Freuding, 2004; Schmitz et al., 2004; Brasnjevic et al., 2008). Während es im Falle der UDS um das semiquantitative Erfassen der nukleären DNA-Reparatur geht, wird mit Hilfe der ISNT der (relative) Gehalt von (derzeit) unreparierten (vorwiegend) DNA-Einzelstrangbrüchen im Anschnittvolumen der Zellkerne erfasst. Wenn nach einer DNA-Schädigung keine unreparierten DNA-Schäden zurückbleiben, sollten sich die Werte für UDS und ISNT entsprechen.

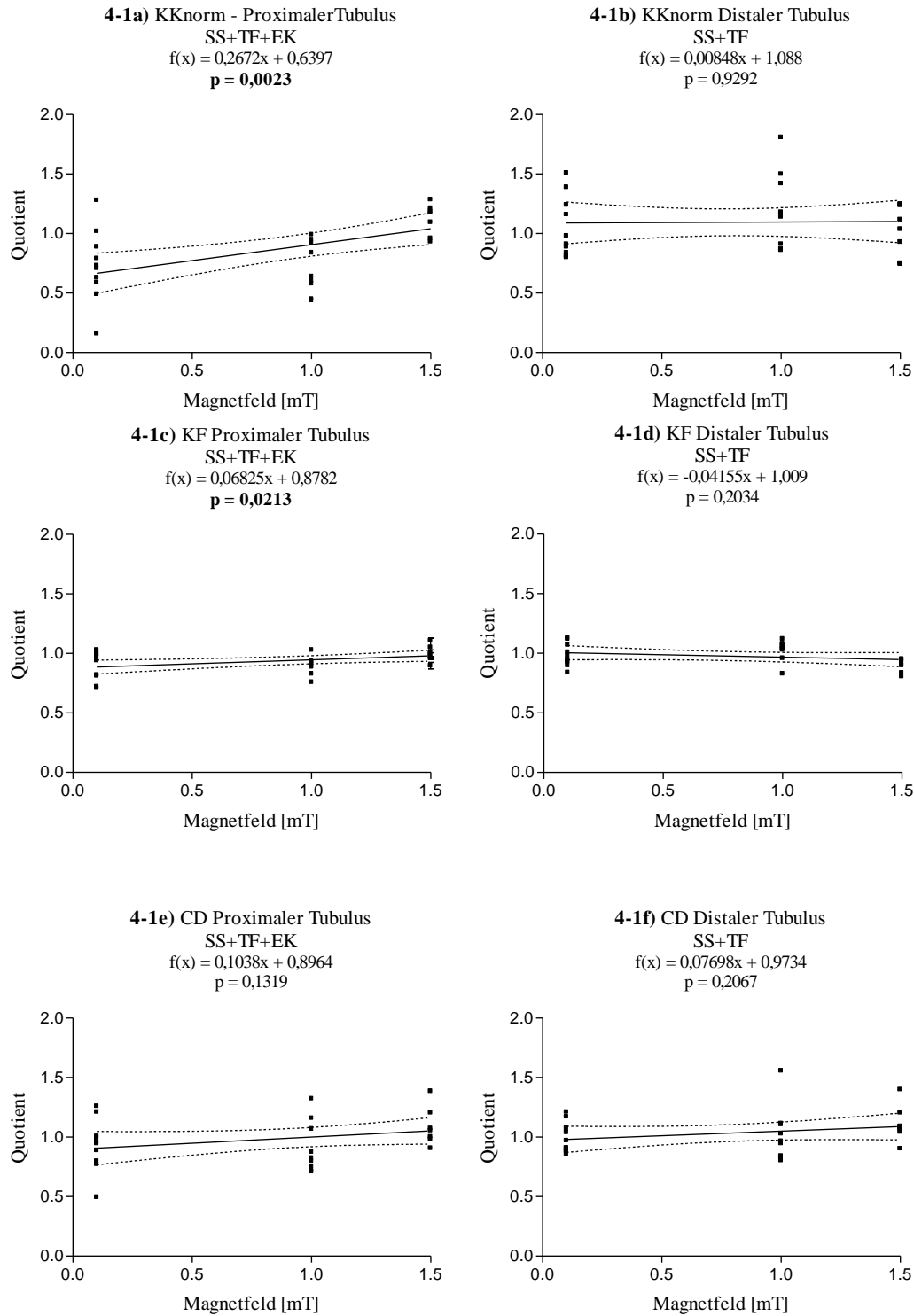


Abbildung 4-1: Lineare Regressionsgeraden zu Dosis-Wirkungs-Beziehungen.
Für $p < 0,05$ ist die Steigung signifikant von Null verschieden.

EK: Keller (2003) **TF:** Freuding (2004) **SS:** vorliegende Arbeit **KF:** Zellkernprojektionsfläche; **KKnorm:** normierte Silberkornzahlen über dem Zellkern; **CD:** Cytoplasmatische Dichte

Zu jeder Regressionsgeraden ist die Geradengleichung $f(x)$ sowie das 95% Konfidenzintervall angegeben.

Während Freuding (2004) in seinen ISNT–Untersuchungen an der Niere keine signifikanten Ergebnisse nach einer achtwöchigen Magnetfeld–Exposition mit 1,5 mT vorlegen konnte, fand Demmler (2008) – er untersuchte Nierenschnitte derselben Tiere wie in der vorliegenden Studie – für diejenigen Mäuse, die 5 min nach Abschalten des Magnetfelds $^3\text{H-TdR}$ erhalten und 2 h später getötet worden waren, einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß unreparierter DNA–Schäden und der Magnetfeld–Dosis. Dieser Effekt, der für proximale und insbesondere für distale Tubulusepithelzellen der Nierenrinde erhalten wurde, ließ sich allerdings mit nachfolgenden post hoc t–Tests nicht konkretisieren.

Insgesamt verdeutlichen die bisher erzielten Ergebnisse an der Niere, dass – trotz schwieriger Beweislage (siehe dazu später Abschnitt 4.4) – mit DNA–Schäden nach einer Magnetfeld–Exposition zu rechnen ist.

4.2.2 Zellmetabolismus

Proximaler Tubulus: Bei Betrachtung der Univarianzanalysen der Zellkernprojektionsflächen (KF) und der cytoplasmatischen Silberkorndichte lassen sich in Bezug auf die Magnetfeldstärke keine Signifikanzen erkennen. Dies weist zunächst darauf hin, dass weder ein signifikanter Anstieg noch Abfall von KF oder der mtDNA–Syntheserate mit steigender Magnetfeld-Dosis stattfand. Damit liegt auch eine Übereinstimmung mit Kellers und Freudings Ergebnissen vor.

Überraschenderweise ergab die Regressionsanalyse unter Einschluss der Daten von Keller (2003) und Freuding (2004) jedoch einen signifikanten Anstieg alleine für die Kernflächen bei steigender Magnetfeldstärke. Für die cytoplasmatische Silberkorndichte (Abb. 4-1e) ist die Steigung ebenfalls positiv, jedoch nicht signifikant.

Wie schon von Demmler (2008) hervorgehoben, sind die Ergebnisse für Zellkernprojektionsflächen recht skeptisch in Hinblick auf eine biologische Interpretation zu sehen: Die wichtige Annahme, dass die Zellkerne des proximalen Tubulus kugelig sind, ist zu bezweifeln. Das bedeutet insgesamt, dass wohl keine Beeinflussung des Magnetfeldes auf den Zellmetabolismus im proximalen Tubulussystems vorliegen dürfte.

Distaler Tubulus: In den Univarianzanalysen der Kernflächen und der cytoplasmatischen Silberkorndichten der distalen Tubuluszellen sind keine Signifikanzen bezüglich der Magnetfeldstärke erkennbar. Dies steht im Gegensatz zu Freudings Ergebnissen, die eine

Signifikanz in der cytoplasmatischen Silberkorndichte ergaben. Bei näherer Untersuchung lässt sich jedoch ein Rechenfehler bei Freuding (2004) feststellen, der zu diesem Ergebnis geführt hat: Bei der Berechnung der Silberkorndichte im Cytoplasma wurde die Zellkernprojektionsfläche nicht von der Gesamtfläche abgezogen, wodurch sich falsche Werte als Cytoplasmafläche ergaben. Nach Bezug auf die korrekten Flächen lassen sich auch bei Freuding für distale Tubulusepithelzellen keine Signifikanzen mehr feststellen.

Es bleibt anzumerken, dass die Regressionsanalysen – unter Einfluss der jetzt korrekten Werte von Freuding (2004) – keine von Null signifikanten Anstiege ergaben (Abb. 4-1f).

4.3 Einfluss des Zeitpunktes der ³H-Thymidin-Injektion auf UDS und Zellmetabolismus

Die Univarianzanalysen zeigten bezüglich des Einflusses des Zeitpunktes der ³H-Thymidin-Injektion auf die UDS für beide untersuchten Zellarten keine Signifikanzen, wohl aber im Hinblick auf die Silberkorndichte im Cytoplasma beider Zellarten. Im post hoc t-Test war das allerdings nicht zu bestätigen. Allerdings fanden sich bei außer Acht lassen der Bonferroni-Korrektur jedoch signifikante Ergebnisse, bei denen aber erstaunlicherweise die Silberkorndichten in Gruppe C, also bei Tieren, die das ³H-Thymidin sieben Tage nach Abschalten des Magnetfeldes injiziert bekamen, gegenüber der anderen besonders hoch ausfiel. Dies würde bedeuten, dass das Magnetfeld eher eine repressive Wirkung auf die mtDNA gehabt und sich nach Abschalten wieder eine normale mtDNA-Syntheserate eingestellt hätte – eine Vermutung, die im Widerspruch zu den im vorigen Kapitel getroffenen Folgerungen steht.

Vielleicht würden hier weitere Untersuchungen an mehr Versuchstieren klärend wirken.

Es ist anzumerken, dass auch die zur UDS korrespondierenden ISNT-Untersuchungen keine signifikanten Effekte erbracht haben (Demmler, 2008). Im Zusammenhang mit den in Abschnitt 4.2.1 dargelegten Befunden spricht das dafür, dass die sicherlich schwachen DNA-Schäden bereits innerhalb der ersten Minuten nach Abschalten des Magnetfeldes wahrscheinlich vollständig repariert wurden.

4.4 Einfluss der Streubreite der Messwerte auf die Aussagen zu UDS und Zellmetabolismus

Bei Betrachtung der relativen Streubreiten (d. h. Standardabweichungen als Prozentsätze ihrer Mittelwerte; siehe Tabelle 4-3) ist kein Einfluss auf die Aussagen zu UDS oder zum Zellmetabolismus zu sehen. Während bei Keller (2003) die relativen Streubreiten der

Messwerte der proximalen Tubulusepithelzellen mit steigender Magnetfeld-Dosis auch anstiegen, waren bei Freuding (2004), Demmler (2008) und in der vorliegenden Arbeit keine solch klaren Zusammenhänge erkennbar. Es war allenfalls zu sehen, dass die Streubreiten dieser Arbeit im Durchschnitt höher lagen als bei Keller (2003) und Freuding (2004), deren Werte sich im Allgemeinen in einer ähnlichen Größenordnung befanden. Das verschiedene Ausmaß der Streubreiten könnte evtl. auf jahreszeitliche Schwankungen zurückzuführen sein, da die Tiere der Arbeiten von Keller (2003) und Freuding (2004) im Sommer (August 1998) untersucht wurden und die Tiere der vorliegenden Arbeit im Winter (November/Dezember 2003).

Die hohe Streuung der Messwerte dieser Arbeit könnte möglicherweise mit dafür verantwortlich sein, dass sich nicht signifikante Ergebnisse in den post hoc t-Tests fanden. Das gilt insbesondere auch für die ISNT–Untersuchungen an denselben Mäusen (Demmler, 2008).

Tabelle 4-3: Vergleich von relativen Streubreiten (d. h. Standardabweichungen als Prozentsätze ihrer Mittelwerte) für normierte Silberkornzahlen (KK_{norm}), Zellkernprojektionsflächen (KF) und cytoplasmatische Silberkorndichten (CD) proximaler und distaler Tubuli (5 min nach Abschalten des MF)

Verfasser	MF-Dosis (mT)	Zellart	KKnorm [SD (%)]	KF [SD (%)]	CD [SD (%)]
EK	0	PT	13,7	8,1	16,2
	1,5	PT	19,0	9,1	25,4
TF	0	PT	20,2	5,4	17,4
	1,5	PT	15,5	5,9	5,4
SS	0	DT	13,7	11,2	11,9
	1,5	DT	20,9	6,4	13,9
	0	PT	22,3	7,2	28,0
	0,1	PT	41,6	13,8	23,5
	1	PT	30,2	8,3	24,0
	0	DT	30,9	10,2	18,3
MD	0,1	DT	24,1	9,9	12,8
	1	DT	28,3	8,7	22,9
	0	PT	61,8	-	-
	0,1	PT	25,7	-	-
	1	PT	32,6	-	-
	0	DT	38,0	-	-
	0,1	DT	37,7	-	-
	1	DT	43,7	-	-

EK: Keller (2003) **TF:** Freuding (2004) **SS:** vorliegende Arbeit **MD:** Demmler (2008)

5 Zusammenfassung

1.) Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, mit Hilfe autoradiographischer Untersuchungen nach Injektion von ^3H -Thymidin (TdR) das Ausmaß der nukleären DNA-Reparatursyntheserate („unscheduled DNA synthesis“= UDS) sowie der mitochondrialen DNA-Syntheserate proximaler und distaler Tubulusepithelzellen in der Niere 9 Monate alter Mäuse nach achtwöchiger Magnetfeld-Exposition unterschiedlicher Stärke zu untersuchen.

2.) Von insgesamt 80 Versuchstieren wurden jeweils 29 einem 50 Hz Magnetfeld (MF) mit einer mittleren magnetischen Flussdichte von 1 mT bzw. 0,1 mT ausgesetzt und 15 scheinexponiert (0 mT). Zur Nulleffektkontrolle dienten sieben inaktive Tiere, d. h. Tiere, die weder Magnetfeld-exponiert waren noch ^3H -Thymidin injiziert bekamen. Den Magnetfeld-exponierten Tieren wurde 5 min (Gruppe A) bzw. 24 h (Gruppe B) bzw. 7 d (Gruppe C) nach Beendigung der Exposition 555 kBq ^3H -Thymidin pro Gramm Körpergewicht injiziert. Jeweils weitere zwei Stunden danach erfolgten die Tötung, die Organentnahme (z.B. Niere) und deren Fixation über mehrere Wochen. Anschließend wurden 3 μm dicke Paraffinschnitte und letztlich die Autoradiogramme angefertigt (Expositionszeit: 250d), die unter dem Mikroskop bei einer 1250-fachen Primärvergrößerung untersucht wurden. Hierbei wurden jeweils 100 fortlaufende Zellen pro Zellart hinsichtlich ihrer Silberkornzahlen über Zellkern- bzw. Cytoplasmaprojektionsfläche sowie die Größen der genannten Anschnittsflächen ermittelt. Durch Korrektur von Nulleffekt, Normierung der Zellkernmarkierung auf eine einheitliche DNA-Menge pro Anschnittsvolumen und Berechnung von Silberkorndichten über dem Cytoplasma wurde ein direkter Vergleich verschiedener Zellarten ermöglicht.

3.) Die Darstellung der Ergebnisse in Form von kumulativen Häufigkeitsverteilungen diente dazu, eventuell entstandene Artefakte aufzudecken. Präparate mit auffallend starker Markierung (Rechtsverschiebungen der Häufigkeitsverteilungen) wurden dabei von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da diese auf einen verstärkten Nulleffekt hinweisen. Nach Mittelwertbildung der verbliebenen Daten erfolgte der Vergleich der Tiergruppen mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse und post hoc t-Tests unter Berücksichtigung einer Bonferroni-Korrektur. Alle Wahrscheinlichkeiten $p \leq 0,05$ wurden hierbei als signifikant bewertet. Letztlich dienten lineare Regressionsanalysen zur Beantwortung der Frage nach Dosis-abhängigen Effekten.

4.) Die Univarianzanalysen erbrachten bezüglich der UDS weder im proximalen noch im distalen Tubulus signifikante Ergebnisse. Wenn allerdings in relativer Form die Daten früherer, mit gleicher Methodik erzielten Untersuchungen von Keller (2003) und Freuding (2004) für eine Magnetfeld-Exposition mit 1,5 mT mit einbezogen wurden, fand sich in der linearen Regressionsanalyse eine mit der Dosis signifikant ansteigende UDS, allerdings nur für die Tubulusepithelzellen des proximalen Tubulus. Das stimmt voll mit früheren Befunden von Keller (2003), nicht aber mit Freuding (2004) überein. Die Univarianzanalysen für Kernflächen und auch für cytoplasmatische Silberkorndichten sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus wiesen keine Signifikanzen auf.

5.) Bezüglich des Einflusses des Zeitpunktes der ^3H -Thymidin-Injektion auf die UDS fanden sich in den Univarianzanalysen keine Signifikanzen. Im Hinblick auf die cytoplasmatische Silberkorndichte dagegen fand sich sowohl für proximale als auch distale Tubulusepithelzellen ein signifikantes Ergebnis, welches jedoch in den nachfolgenden post hoc t-Tests nicht bestätigt werden konnte.

6.) In Hinblick auf die der hier erzielten relativen Streubreiten der Messwerte fiel im Vergleich zu Keller (2003) und Freuding (2004) eine deutliche Zunahme dieser Werte auf; es waren jedoch keine Zusammenhänge mit der Magnetfeldstärke zu erkennen. Möglicherweise führten diese starken Streuungen dazu, dass keine signifikanten Ergebnisse erzielt wurden.

7.) Wenn man alle bisherigen Ergebnisse zu MF-induzierten DANN-Schäden an Zellarten der Niere zusammenfasst, deutet sich an, dass nach einer Magnetfeld-Exposition mit 50 Hz durchaus mit Schäden an der nukleären DNA zu rechnen ist. Diese Schäden dürften aber direkt nach ihrer Entstehung – wahrscheinlich vollständig – repariert werden.

6 Literaturverzeichnis

BioInitiative Working Group

BioInitiative Report: (2007): A Rationale for a Biologically-based Public Exposure Standard for Electromagnetic Fields (ELF and RF).

www.bioinitiative.org/report/index.htm (2007)

Born T. B.

Autoradiographische Untersuchungen zu nukleären DNA-Strangbrüchen in unterschiedlichen Zellarten im Gehirn der Maus nach einer achtwöchigen 50 Hz Magnetfeld-Exposition.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (2009)

Bosse K. I.

Einfluss einer achtwöchigen 50 Hz Magnetfeld-Exposition auf DNA-Reparatur und mitochondriale DNA-Synthese von Sammelrohr-Epithelzellen der Niere.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (2009)

Boyce R. P., Howard-Flanders P.

Release of ultraviolet light-induced thymidine dimers from DNA in *E. coli* K-12.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **51**, 293-300 (1964)

Brasnjevic I., Hof P. R., Steinbusch H. W. M., Schmitz C.

Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: Molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases.

DNA Repair **7**, 1087-1097 (2008)

Cleaver J. E., Thomas G. H.

Measurement of unscheduled synthesis by autoradiography.

In: *DNA Repair. A Laboratory Manual of Research Procedures, Vol. 1 B* (E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt, Eds.), pp. 277-287, Dekker, New York (1981)

Demmler M.

Autoradiographische Untersuchungen zu nukleären DNA-Strangbrüchen in verschiedenen Zellarten in der Niere der Maus nach einer achtwöchigen 50 Hz Magnetfeld-Exposition.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (2008)

Djordjevic B., Tolmach G. H.

Responses of synchronous populations of HeLa cells to ultraviolet irradiation of selected stages of the generation cycle.

Radiat. Res. **32**, 327-346 (1967)

England J. M., Rogers A. W.

The statistical analysis of autoradiographs I. Grain count distributions over uniformly labelled sources.

J. Microsc. **92**, 159-165 (1970)

Feinendegen L. E.

Tritium-labeled Molecules in Biology and Medicine.

Academic Press: New York and London (1967)

Freuding T.

Autoradiographische Untersuchungen an Gehirn und Niere adulter Mäuse auf mögliche DNA-Schäden nach einer 8-wöchigen 50 Hz Magnetfeld-Exposition.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (2004)

Halliwell B., Aruoma O. J.

DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems.

FEEBS Lett. **281**, 9-19 (1991)

Howard A., Pelc S. R.

Nuclear incorporation of P-32 as demonstrated by autoradiographs.

Exp. Cell Res. **2**, 178-187

Iseki S.

DNA strand breaks in rat tissues as detected by in situ nick translation.
Exp. Cell Res. **167**, 311-326 (1986)

Iseki S., Mori T.

Histochemical detection of DNA strand scissions in mammalian cells by in situ nick translation.
Cell Biol. Int. Rep. **9**, 471-477 (1985)

Keller E.

Autoradiographische Untersuchungen zum Einfluss einer 50 Hz Magnetfeld-Exposition auf DNA-Reparatur und mitochondriale DNA-Synthese verschiedener Zellarten in Gehirn und Niere der adulten Maus.
Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (2003)

Koburg E., Maurer W.

Autoradiographische Untersuchungen mit Tritium-Thymidin über die Dauer der Desoxyribonucleinsäuresynthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus.
Biochem. Biophys. Acta **61**, 229-242 (1962)

Korr H.

Light microscopical autoradiography of nervous tissue.
In: *Techniques in Neuroanatomical Research*, (Ch. Heym und W. G. Forssmann, Eds.), pp. 218-244, Springer Verlag, Heidelberg, New York (1981)

Korr H.

Determination of correction factors of ^3H - β -self-absorption for quantitative evaluation of grain number in autoradiographic studies: interferometric studies of different cell types in the mouse brain.
Histochemistry **83**, 65-70 (1985)

Korr H., Schmidt H.

An improved procedure for background correction in autoradiography.
Histochemistry **88**, 407-410 (1988)

Korr H., Schmidt H.

A new procedure for correcting background in quantitative autoradiographic studies.
Acta Histochem. Suppl. **XXXVII**, 149-155 (1989)

Korr H., Schultze B.

Unscheduled DNA synthesis in various types of cells of the mouse brain in vivo.
Exp. Brain Res. **74**, 573-578 (1989)

Korr H., Koeser K., Oldenkott S., Schmidt H., Schultze B.

X-ray dose-effect relationship on unscheduled DNA synthesis and spontaneous unscheduled DNA synthesis in mouse brain cells studied in vivo.
Radiat. Environ. Biophys. **28**, 13-26 (1989)

Korr H., Kurz C., Seidler T. O., Sommer D., Schmitz C.

Mitochondrial DNA synthesis studied autoradiographically in various cell types in vivo.
Braz. J. Med. Biol. Res. **31**, 289-298 (1998)

Korr H., Philippi V., Helg C., Schiefer J., Graeber M. B., Kreutzberg G. B.

Unscheduled DNA synthesis and mitochondrial DNA synthetic rate following injuring of the facial nerve.
Acta Neuropathol. **94**, 557-566 (1997)

Korr H., Rohde H. T., Benders J., Dafotakis M., Grolms N., Schmitz C.

Neuron loss during early adulthood following prenatal low-dose X-irradiation in the mouse brain.
Int. J. Radiat. Biol. **77**, 567-580 (2001)

Lai H., Singh N. P.

Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells.
Bioelectromagnetics **18**, 156-165 (1997a)

Lai H., Singh N. P.

Melatonin and N-tert-butyl-alpha-phenylnitron block 60-Hz magnetic field-induced DNA single and double strand breaks in rat brain cells.

J. Pineal Res. **22**, 152-162 (1997b)

Lai H., Singh N. P.

Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat.

Environ. Health Perspect. **112**, 687-694 (2004)

Maurer W., Primbsch E.

Größe der β -Selbstabsorption bei der ^3H -Autoradiographie.

Exp. Cell Res. **33**, 8-18 (1964)

May B.

Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thymidin zum Einfluss einer Röntgenbestrahlung des Kopfes bzw. einer Chloralhydratnarkose auf das Proliferationsverhalten von Zellen der subependymalen Schicht sowie Glia- und Endothelzellen im Gehirn der adulten Maus.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (1991)

Oldenkott S.

Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thymidin zum Ausmaß der strahleninduzierten DNA-Reparatur-Synthese in verschiedenen Zellarten im Cortex und Corpus callosum der adulten Maus.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (1991)

Olive P. L.

Molecular approaches for detecting DNA damage.

In: *DNA Damage and Repair* (J. A. Nickoloff and M. F. Hoekstra, Eds.), pp. 539-557, Humana Press, Totowa, NJ (1998)

Pettijohn D., Hanawalt P.

Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria.

J. Mol. Biol. **9**, 395-410 (1964)

Rahimyar N.

Autoradiographische Untersuchungen zu nukleären DNA-Strangbrüchen in perizentralen und periportalen Hepatozyten der Maus nach einer achtwöchigen 50 Hz Magnetfeld-Exposition.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (2009)

Rogers A. W.

Techniques of Autoradiography.

3rd ed, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1979)

Rohde H. T.

Ausmaß an DNA-Strangbrüchen in verschiedenen Zellarten des Gehirns fetaler, junger und adulter Mäuse nach einer schwachen Röntgenbestrahlung während der Fetalzeit.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (1999)

Rutten B. P. F., Schmitz C., Gerlach O. H., Oyen H. M., de Mesquita E. B., Steinbusch H. W.M., Korr H.

Thea ging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss?

Neurobiol. Aging **28**, 91-98 (2007)

Schmidt H.

Autoradiographische Untersuchungen mit Tritium-Thymidin zum Ausmaß der strahleninduzierten DNA-Reparatursynthese verschiedener Zellarten im Cerebellum und Hippocampus der adulten Maus.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (1990)

Schmitz C.

Spontane DNA-Reparatur-Syntheserate verschiedener Zellarten in Cortex und Hippocampus der Maus als Funktion des Lebensalters.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (1994)

Schmitz C., Keller E., Freuding T., Silny J., Korr H.

50-Hz magnetic field exposure influences DNA repair and mitochondrial DNA synthesis of distinct cell types in brain and kidney of adult mice.

Acta Neuropathol **107**, 257-264 (2004)

Schultze B.

Autoradiography at the cellular level.

In: *Physikal Techniques in Biological Research. Vol. III, Part B.* (A. W. Pollister, Ed.)

New York, London: Academic Press (1969)

Setlow R. B., Carrier W. L.

The disappearance of thymidine dimers from DNA: An error-correcting mechanism.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **51**, 226-231 (1964)

Silny J.

Elektromagnetische Felder im Alltag.

Landesamt für Umweltschutz Baden-Württemberg (2002)

Sommer D.

Autoradiographische Untersuchungen mit ³H-Thymidin zum zeitlichen Verlauf von DNA-Markierungen in Kern und Cytoplasma verschiedener Zellarten in Leber, Skelettmuskel, Niere und Urogenitaltrakt der adulten Maus.

Diss. Med. Fak. RWTH Aachen (1998)

Stillström J.

Grain count corrections in autoradiography.

Int. J. appl. Rad. Isotopes **14**, 113-118 (1963)

Stillström J.

Grain count corrections in autoradiography.

Int. J. appl. Rad. Isotopes **16**, 357-363 (1965)

7 Anhang

7.1 Charakteristika und Messergebnisse – Proximaler Tubulus

Tabelle A3-3: Charakteristika zu den Versuchstieren sowie Messergebnisse für proximale Tubuluszellen der Niere

VT-Nr.	Zeitpunkt	Dosis	Gewicht	ARG-Serie	KK	PL	KK _{kor.}	KF	NF	KK _{norm.}	KC	PL	KC _{kor.}	CF	CD
18	A	I	48	10a P2	2,88	0,91	3	20,47	2,93	8,78	2,81	0,95	2,58	35,38	0,0729
19	A	I	46	10a P2	2,2	0,87	2,36	20,46	2,93	6,9	2,34	1	1,98	31,92	0,062
20	A	I	46	10a P2	2	1	1,8	16,38	2,71	5,02	2,45	1	2,09	32,23	0,0648
21	A	I	55	8a P1	1,48	0,56	2,32	20,96	2,95	6,84	2,19	0,93	2,16	27,24	0,0793
22	A	I	51	6a P1	1,1	0,56	1,73	21,2	2,96	5,12	2,5	0,92	2,52	29,51	0,0854
23	A	I	47	8a R4	2,47	0,86	2,81	21,3	2,97	8,34	2,68	0,92	2,87	38,53	0,0745
24	A	I	48	3a R7	1,84	0,95	1,88	19,02	2,85	5,36	2,94	0,97	2,96	34,45	0,0859
26	A	I	49	8a R4	3,58	0,91	3,53	22,06	3	10,6	3,66	1	3,62	30,15	0,1201
27	A	I	50	8a R4	1,87	0,8	2,28	20,43	2,92	6,67	2,06	0,97	2,08	32,66	0,0637
28	A	II	53	6a P1	1,88	0,73	2,4	22,39	3,02	7,25	2,49	0,98	2,36	28,47	0,0829
29	A	II	41	6a P1	1,94	0,8	2,26	22,1	3,01	6,79	1,94	1	1,76	25,11	0,0701
30	A	II	46	8a P1	1,5	0,78	1,76	21,16	2,96	5,21	2,09	0,98	1,95	28,64	0,0681
31	A	II	47	9a P1	1,5	0,78	1,76	17,78	2,79	4,91	1,86	0,98	1,71	25,07	0,0682
32	A	II	52	2a P1	1,97	0,99	1,84	19,96	2,9	5,34	2,11	1	1,93	21,37	0,0903
33	A	II	40	5a R1	2,96	0,94	3,1	18,85	2,84	8,82	2,18	1	2,17	29	0,0748
34	A	II	59	2a R1	1,72	0,95	1,74	16,52	2,72	4,73	1,87	1	1,86	28,32	0,0657
35	A	II	48	2a R1	2,71	0,92	2,89	18,34	2,82	8,14	2,47	1	2,46	26,38	0,0933
36	A	II	38	2a R1	1,61	0,94	1,64	19,4	2,87	4,71	1,82	1	1,81	25,86	0,07
37	A	II	52	2a R1	1,92	0,91	2,03	18,3	2,82	5,72	2,21	1	2,2	27,41	0,0803

38	A	III	47	2a P1	1,61	0,87	1,7	21,36	2,97	5,05	1,79	1	1,61	24,52	0,0657
39	A	III	56	2a P1	1,66	0,82	1,87	20,16	2,91	5,44	2,19	1	2,01	25,37	0,0792
41	A	III	53	2a P1	0,99	0,79	1,09	22,61	3,03	3,3	1,38	0,88	1,36	26,54	0,0512
40	A	III	60	2a P1	1,87	0,79	2,2	21,7	2,99	6,57	2,32	0,92	2,14	25,08	0,0853
42	A	III	42	2a R1	2,39	0,87	2,67	17,86	2,79	7,46	2,4	1	2,39	27,79	0,086
43	A	III	43	2a R1	1,38	0,94	1,39	17,74	2,79	3,87	1,75	0,98	1,78	26,05	0,0683
45	A	III	38	2a R1	2,11	0,86	2,37	17,39	2,77	6,56	2,12	1	2,11	24,17	0,0873
46	A	III	43	2a R1	2,68	0,87	3,01	19,28	2,87	8,63	2,81	0,95	2,95	31,52	0,0936
47	B	I	48	2b P2	2,41	0,89	2,54	20,27	2,92	7,41	3,46	0,98	3,16	27,72	0,114
48	B	I	51	2b P2	3,2	0,91	3,25	22,19	3,01	9,78	3,74	0,98	3,45	30,29	0,1139
49	B	I	46	2a P2	1,43	0,92	1,39	22,07	3	4,18	2,26	1	1,9	32,49	0,0585
50	B	I	53	2a P2	2,13	0,88	2,25	20,88	2,95	6,63	3	0,98	2,69	30,41	0,0885
51	B	I	44	2a P2	2,25	0,7	2,73	22,84	3,04	8,3	3,22	0,94	3,04	31,85	0,0954
52	B	I	48	8a R4	1,85	0,86	2,09	18,95	2,85	5,96	1,98	0,86	2,26	31,5	0,0717
53	B	I	47	8a R4	1,85	0,86	2,09	21,23	2,96	6,19	2,17	0,99	2,15	30,76	0,0699
54	B	I	51	8a R4	1,11	0,7	1,51	20,56	2,93	4,43	1,33	0,8	1,61	30,78	0,0523
55	B	I	48	8a R4	0,99	0,89	1,06	21,02	2,95	3,13	1,31	0,98	1,3	27,81	0,0467
57	B	II	51	2b P2	2,39	0,8	2,39	20,18	2,91	6,96	2,22	1	1,86	23,2	0,0802
58	B	II	43	2a P2	1,51	0,95	1,43	20,48	2,93	4,19	1,84	1	1,48	24,62	0,0601
59	B	II	44	2a P2	1,69	0,84	1,83	19,04	2,85	5,22	1,6	1	1,24	21,53	0,0576
60	B	II	55	2a P2	2,53	0,87	2,74	20,14	2,91	7,97	2,77	0,94	2,56	26,96	0,095
61	B	II	45	2a P2	2,33	0,91	2,41	21,69	2,99	7,2	2,73	0,98	2,42	26,24	0,0922
62	B	II	49	2a R2	1,74	0,89	1,94	20,65	2,93	5,69	2,59	0,95	2,73	34,48	0,0792
63	B	II	51	2a R2	2,31	0,89	2,58	20,2	2,91	7,51	3,1	0,97	3,2	35,06	0,0913
64	B	II	44	2a R2	1,79	0,8	2,23	18,58	2,83	6,31	2,19	1	2,19	35,25	0,0621
65	B	II	45	2a R2	1,94	0,75	2,57	18,81	2,84	7,31	2,83	0,92	3,08	33,69	0,0914
66	B	II	44	2a R2	1,46	0,77	1,88	17,95	2,8	5,26	2,68	0,94	2,85	33,29	0,0856

73	C	I	50	2a P3	2,03	0,81	2,42	19,01	2,85	6,9	2,93	0,94	3,04	25,4	0,1197
74	C	I	42	2b P3	1,92	0,78	2,37	20,78	2,94	6,97	2,99	0,93	3,14	28,17	0,1115
75	C	I	48	2a P3	2,4	0,9	2,59	19,66	2,89	7,47	3,32	0,96	3,18	28,02	0,1135
76	C	I	47	2a P3	1,88	0,72	2,51	18,28	2,81	7,07	2,66	0,94	2,76	27,76	0,0994
77	C	I	48	2a P3	2,63	0,83	3,1	20,05	2,91	9,01	3,6	1	3,53	29,02	0,1216
78	C	I	48	10a R4	1,42	0,71	1,93	18,52	2,83	5,46	1,95	0,98	1,95	29,56	0,0666
79	C	I	51	8a R4	2,03	0,84	2,36	20,88	2,95	6,95	2,09	0,99	2,07	27,81	0,0744
80	C	I	48	8a R4	1,72	0,95	1,76	20,54	2,93	5,16	1,95	1	1,91	27,97	0,0683
81	C	I	51	8a R4	2,07	0,84	2,4	20,59	2,93	7,04	2,63	0,96	2,7	28,71	0,094
82	C	I	42	8a R4	3	0,94	3,11	20,3	2,92	9,07	3,08	0,97	3,13	28	0,1118
83	C	II	48	2a P3	1,68	0,79	2,04	18,54	2,83	5,77	2,68	0,95	2,75	30,23	0,091
84	C	II	48	2a P3	3,03	0,92	3,22	19,73	2,89	9,33	3,59	1	3,52	27,17	0,1296
85	C	II	60	2a P3	3,4	0,93	3,58	19,14	2,86	10,24	4,33	0,99	4,51	30,03	0,1502
86	C	II	42	2a P3	1,71	0,69	2,38	19,81	2,89	6,89	3,04	0,93	3,19	29,16	0,1094
87	C	II	45	2a P3	2,05	0,85	2,33	19,2	2,86	6,67	3,13	0,94	3,26	30,02	0,1086
88	C	II	53	5a R3	2,8	0,81	3,42	19,47	2,88	9,84	3,62	0,97	3,69	34,63	0,1066
89	C	II	45	4a R3	0,67	0,44	1,45	20,84	2,94	4,27	2,4	0,98	2,41	26,22	0,0665
90	C	II	47	2a R3	1,97	0,86	2,22	21,84	2,99	6,64	2,43	1	2,39	36,83	0,0649
91	C	II	46	2a R3	1,67	0,8	2,05	20,52	2,93	6	2,58	0,97	2,62	34,01	0,077
92	C	III	46	2a P3	1,86	0,87	2,06	19,21	2,86	5,9	3,14	0,92	3,34	29,43	0,1135
93	C	III	58	2a P3	2,38	0,88	2,63	20,63	2,93	7,72	2,67	0,98	2,65	31,7	0,0836
94	C	III	40	2a P3	2,46	0,75	3,19	22,2	3,01	9,6	3,4	0,98	3,4	31,67	0,1074
95	C	III	48	2a P3	1,93	0,87	2,14	20,26	2,92	6,24	2,44	0,97	2,44	27,96	0,0873
96	C	III	46	4a R3	1,92	0,96	1,97	22,08	3	5,92	2,06	1	2,02	37,34	0,0541
97	C	III	50	4a R3	1,14	0,74	1,49	19,14	2,86	4,26	1,92	0,98	1,92	36,85	0,0521
99	C	III	40	2a R3	2,05	0,79	2,56	20,22	2,91	7,46	2,76	0,99	2,75	37,65	0,073

7.2 Charakteristika und Messergebnisse – Distaler Tubulus

Tabelle A3-3: Charakteristika zu den Versuchstieren sowie Messergebnisse für distale Tubuluszellen der Niere

VT-Nr.	Zeitpunkt	Dosis	Gewicht	ARG-Serie	KK	PL	KK _{kor.}	KF	NF	KK _{norm.}	KC	PL	KC _{kor.}	CF	CD
18	A	I	48	10a P2	2,88	0,91	3	20,47	2,93	8,78	2,81	0,95	2,58	35,38	0,0729
19	A	I	46	10a P2	2,2	0,87	2,36	20,46	2,93	6,9	2,34	1	1,98	31,92	0,062
20	A	I	46	10a P2	2	1	1,8	16,38	2,71	5,02	2,45	1	2,09	32,23	0,0648
21	A	I	55	8a P1	1,48	0,56	2,32	20,96	2,95	6,84	2,19	0,93	2,16	27,24	0,0793
22	A	I	51	6a P1	1,1	0,56	1,73	21,2	2,96	5,12	2,5	0,92	2,52	29,51	0,0854
23	A	I	47	8a R4	2,47	0,86	2,81	21,3	2,97	8,34	2,68	0,92	2,87	38,53	0,0745
24	A	I	48	3a R7	1,84	0,95	1,88	19,02	2,85	5,36	2,94	0,97	2,96	34,45	0,0859
26	A	I	49	8a R4	3,58	0,91	3,53	22,06	3	10,6	3,66	1	3,62	30,15	0,1201
27	A	I	50	8a R4	1,87	0,8	2,28	20,43	2,92	6,67	2,06	0,97	2,08	32,66	0,0637
28	A	II	53	6a P1	1,88	0,73	2,4	22,39	3,02	7,25	2,49	0,98	2,36	28,47	0,0829
29	A	II	41	6a P1	1,94	0,8	2,26	22,1	3,01	6,79	1,94	1	1,76	25,11	0,0701
30	A	II	46	8a P1	1,5	0,78	1,76	21,16	2,96	5,21	2,09	0,98	1,95	28,64	0,0681
31	A	II	47	9a P1	1,5	0,78	1,76	17,78	2,79	4,91	1,86	0,98	1,71	25,07	0,0682
32	A	II	52	2a P1	1,97	0,99	1,84	19,96	2,9	5,34	2,11	1	1,93	21,37	0,0903
33	A	II	40	5a R1	2,96	0,94	3,1	18,85	2,84	8,82	2,18	1	2,17	29	0,0748
34	A	II	59	2a R1	1,72	0,95	1,74	16,52	2,72	4,73	1,87	1	1,86	28,32	0,0657
35	A	II	48	2a R1	2,71	0,92	2,89	18,34	2,82	8,14	2,47	1	2,46	26,38	0,0933
36	A	II	38	2a R1	1,61	0,94	1,64	19,4	2,87	4,71	1,82	1	1,81	25,86	0,07
37	A	II	52	2a R1	1,92	0,91	2,03	18,3	2,82	5,72	2,21	1	2,2	27,41	0,0803

38	A	III	47	2a P1	1,61	0,87	1,7	21,36	2,97	5,05	1,79	1	1,61	24,52	0,0657
39	A	III	56	2a P1	1,66	0,82	1,87	20,16	2,91	5,44	2,19	1	2,01	25,37	0,0792
41	A	III	53	2a P1	0,99	0,79	1,09	22,61	3,03	3,3	1,38	0,88	1,36	26,54	0,0512
40	A	III	60	2a P1	1,87	0,79	2,2	21,7	2,99	6,57	2,32	0,92	2,14	25,08	0,0853
42	A	III	42	2a R1	2,39	0,87	2,67	17,86	2,79	7,46	2,4	1	2,39	27,79	0,086
43	A	III	43	2a R1	1,38	0,94	1,39	17,74	2,79	3,87	1,75	0,98	1,78	26,05	0,0683
45	A	III	38	2a R1	2,11	0,86	2,37	17,39	2,77	6,56	2,12	1	2,11	24,17	0,0873
46	A	III	43	2a R1	2,68	0,87	3,01	19,28	2,87	8,63	2,81	0,95	2,95	31,52	0,0936
47	B	I	48	2b P2	2,41	0,89	2,54	20,27	2,92	7,41	3,46	0,98	3,16	27,72	0,114
48	B	I	51	2b P2	3,2	0,91	3,25	22,19	3,01	9,78	3,74	0,98	3,45	30,29	0,1139
49	B	I	46	2a P2	1,43	0,92	1,39	22,07	3	4,18	2,26	1	1,9	32,49	0,0585
50	B	I	53	2a P2	2,13	0,88	2,25	20,88	2,95	6,63	3	0,98	2,69	30,41	0,0885
51	B	I	44	2a P2	2,25	0,7	2,73	22,84	3,04	8,3	3,22	0,94	3,04	31,85	0,0954
52	B	I	48	8a R4	1,85	0,86	2,09	18,95	2,85	5,96	1,98	0,86	2,26	31,5	0,0717
53	B	I	47	8a R4	1,85	0,86	2,09	21,23	2,96	6,19	2,17	0,99	2,15	30,76	0,0699
54	B	I	51	8a R4	1,11	0,7	1,51	20,56	2,93	4,43	1,33	0,8	1,61	30,78	0,0523
55	B	I	48	8a R4	0,99	0,89	1,06	21,02	2,95	3,13	1,31	0,98	1,3	27,81	0,0467
57	B	II	51	2b P2	2,39	0,8	2,39	20,18	2,91	6,96	2,22	1	1,86	23,2	0,0802
58	B	II	43	2a P2	1,51	0,95	1,43	20,48	2,93	4,19	1,84	1	1,48	24,62	0,0601
59	B	II	44	2a P2	1,69	0,84	1,83	19,04	2,85	5,22	1,6	1	1,24	21,53	0,0576
60	B	II	55	2a P2	2,53	0,87	2,74	20,14	2,91	7,97	2,77	0,94	2,56	26,96	0,095
61	B	II	45	2a P2	2,33	0,91	2,41	21,69	2,99	7,2	2,73	0,98	2,42	26,24	0,0922
62	B	II	49	2a R2	1,74	0,89	1,94	20,65	2,93	5,69	2,59	0,95	2,73	34,48	0,0792
63	B	II	51	2a R2	2,31	0,89	2,58	20,2	2,91	7,51	3,1	0,97	3,2	35,06	0,0913
64	B	II	44	2a R2	1,79	0,8	2,23	18,58	2,83	6,31	2,19	1	2,19	35,25	0,0621
65	B	II	45	2a R2	1,94	0,75	2,57	18,81	2,84	7,31	2,83	0,92	3,08	33,69	0,0914
66	B	II	44	2a R2	1,46	0,77	1,88	17,95	2,8	5,26	2,68	0,94	2,85	33,29	0,0856

73	C	I	50	2a P3	2,03	0,81	2,42	19,01	2,85	6,9	2,93	0,94	3,04	25,4	0,1197
74	C	I	42	2b P3	1,92	0,78	2,37	20,78	2,94	6,97	2,99	0,93	3,14	28,17	0,1115
75	C	I	48	2a P3	2,4	0,9	2,59	19,66	2,89	7,47	3,32	0,96	3,18	28,02	0,1135
76	C	I	47	2a P3	1,88	0,72	2,51	18,28	2,81	7,07	2,66	0,94	2,76	27,76	0,0994
77	C	I	48	2a P3	2,63	0,83	3,1	20,05	2,91	9,01	3,6	1	3,53	29,02	0,1216
78	C	I	48	10a R4	1,42	0,71	1,93	18,52	2,83	5,46	1,95	0,98	1,95	29,56	0,0666
79	C	I	51	8a R4	2,03	0,84	2,36	20,88	2,95	6,95	2,09	0,99	2,07	27,81	0,0744
80	C	I	48	8a R4	1,72	0,95	1,76	20,54	2,93	5,16	1,95	1	1,91	27,97	0,0683
81	C	I	51	8a R4	2,07	0,84	2,4	20,59	2,93	7,04	2,63	0,96	2,7	28,71	0,094
82	C	I	42	8a R4	3	0,94	3,11	20,3	2,92	9,07	3,08	0,97	3,13	28	0,1118
83	C	II	48	2a P3	1,68	0,79	2,04	18,54	2,83	5,77	2,68	0,95	2,75	30,23	0,091
84	C	II	48	2a P3	3,03	0,92	3,22	19,73	2,89	9,33	3,59	1	3,52	27,17	0,1296
85	C	II	60	2a P3	3,4	0,93	3,58	19,14	2,86	10,24	4,33	0,99	4,51	30,03	0,1502
86	C	II	42	2a P3	1,71	0,69	2,38	19,81	2,89	6,89	3,04	0,93	3,19	29,16	0,1094
87	C	II	45	2a P3	2,05	0,85	2,33	19,2	2,86	6,67	3,13	0,94	3,26	30,02	0,1086
88	C	II	53	5a R3	2,8	0,81	3,42	19,47	2,88	9,84	3,62	0,97	3,69	34,63	0,1066
89	C	II	45	4a R3	0,67	0,44	1,45	20,84	2,94	4,27	2,4	0,98	2,41	26,22	0,0665
90	C	II	47	2a R3	1,97	0,86	2,22	21,84	2,99	6,64	2,43	1	2,39	36,83	0,0649
91	C	II	46	2a R3	1,67	0,8	2,05	20,52	2,93	6	2,58	0,97	2,62	34,01	0,077
92	C	III	46	2a P3	1,86	0,87	2,06	19,21	2,86	5,9	3,14	0,92	3,34	29,43	0,1135
93	C	III	58	2a P3	2,38	0,88	2,63	20,63	2,93	7,72	2,67	0,98	2,65	31,7	0,0836
94	C	III	40	2a P3	2,46	0,75	3,19	22,2	3,01	9,6	3,4	0,98	3,4	31,67	0,1074
95	C	III	48	2a P3	1,93	0,87	2,14	20,26	2,92	6,24	2,44	0,97	2,44	27,96	0,0873
96	C	III	46	4a R3	1,92	0,96	1,97	22,08	3	5,92	2,06	1	2,02	37,34	0,0541
97	C	III	50	4a R3	1,14	0,74	1,49	19,14	2,86	4,26	1,92	0,98	1,92	36,85	0,0521
99	C	III	40	2a R3	2,05	0,79	2,56	20,22	2,91	7,46	2,76	0,99	2,75	37,65	0,073

VT-Nr.: Versuchstiernummer; **KK:** Silberkörper über dem Zellkern; **pk(0):** Häufigkeit von Zellkernen bzw. Cytoplasmaprojektionsflächen mit Null Silberkörnern; **KF:** Zellkernprojektionsfläche; **KZ:** Silberkörper über dem Cytoplasma; **ZF:** Cytoplasmaprojektionsfläche; **CD:** KZ/ZF

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Professor. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. H. Korr, der mir dieses überaus interessante Dissertationsthema zur Verfügung stellte.

Sein Engagement, seine Zuverlässigkeit und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Betreuung erleichterten mir jede einzelne Aufgabe dieser Arbeit in großem Maße und halfen mir, vor allem bei schwierigeren Phasen, mich stets zu motivieren und nicht das Ziel aus den Augen zu verlieren. Ganz besonders dankbar bin ich für seine vielen Ratschläge, seine väterliche Fürsorge und sein Verständnis auch um Belange neben der wissenschaftlichen Arbeit.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Professor Dr.-Ing. Silny für seine Mitwirkung an der Versuchsanordnung und Herrn Prof. Dr. C. Schmitz für die Durchsicht der Ergebnisse und seine Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen des Anatomischen Instituts für die Anfertigung der Autoradiogramme bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Freundinnen und Mitstreiterinnen Frau Tatjana Born und Frau Kerstin Bosse, die mir nicht nur bei der Anfertigung dieser Arbeit, sondern während des gesamten Studiums zur Seite standen.

Schließlich danke ich meinen Eltern für ihre überaus liebevolle Unterstützung und dafür, dass sie mich über all die Jahre hinweg stets begleitet haben. Ohne sie wäre all dies nicht möglich gewesen.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei meinem Betreuer

**Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr,
Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Aachen,**

hinterlegt sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Sepideh Salimi
Geburtsdatum:	26.12.1983
Geburtsort:	Teheran (Iran)
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Schulbildung:

1989-1993	Grundschule Annaschule Aachen
1993-2002	Couven Gymnasium Aachen
2002	Abitur

Studium:

10/2002	Beginn des Humanmedizinstudiums an der RWTH Aachen
09/2004	Ärztliche Vorprüfung
8/2007-7/2008	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Aachen und am Medizinischen Zentrum Kreis Aachen
05/2009	Ärztliche Prüfung