

KFK-590

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Gesellschaft für Kernforschung m. B. H.
Zentrum Sicherheit

Mai 1967

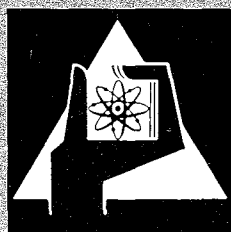
14. Aug 1967

KFK 590

Institut für Strahlenbiologie

Die Wasserstoffabspaltung aus γ -bestrahltem ^3H -Thymin und ^3H -Uracil

O. Merwitz



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

Als Manuskript vervielfältigt.

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.

Gesellschaft für Kernforschung m. b. H.

Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Mai 1967

KFK 590

Institut für Strahlenbiologie

Die Wasserstoffabspaltung aus γ -bestrahltem ^3H -Thymin
und ^3H -Uracil

Otto Merwitz

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. ALLGEMEINER TEIL	1
1.1. Strahlenchemisches Verhalten der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und ihrer Komponenten	1
1.2. Ergebnisse der ESR-Spektroskopie	1
1.3. Problemstellung	2
1.4. ^3H -markierte DNS-Komponenten und ihre Darstellung	2
1.4.1. Basen	2
1.4.2. Nukleoside	4
1.4.3. 2-Desoxy-D-ribose	5
1.5. ^{14}C -markierte DNS-Komponenten	5
2. EXPERIMENTELLER TEIL	6
2.1. Die Aktivitätsbestimmung der gelösten ^3H -Thymine und ^3H -Uracile	6
2.2. Präparation der festen ^3H -Thymine und Uracile	6
2.3. Thermische Stabilität von Thymin und Uracil	8
2.4. Bestrahlung der markierten Substanzen	10
2.5. Berechnung der nach der Bestrahlung in der Gasphase zu erwartenden Tritiumaktivität	10
2.6. Meßergebnisse	13
2.6.1. Durchführung der Versuche	13
2.6.2. Zusammensetzung der Zählraten	14
2.6.3. Verhalten von Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T	17
2.6.4. Genauigkeit der Gaszählung	18
2.6.5. Dosiseffektkurven nach Sublimation	20
2.6.6. Dosiseffektkurven ohne Sublimation	22

	Seite
3. DISKUSSION	25
3.1. Deutung der Dosiseffektkurven	25
3.2. G-Werte	28
4. ZUSAMMENFASSUNG	32
5. LITERATURVERZEICHNIS	34

1. ALLGEMEINER TEIL

1.1. Strahlenchemisches Verhalten der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und ihrer Komponenten

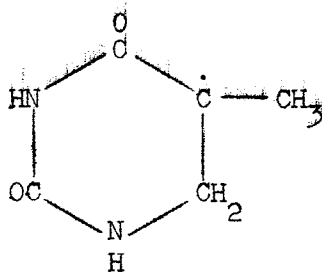
In Anbetracht der wichtigen biologischen Rolle der DNS ist ihr Verhalten unter der Einwirkung ionisierender Strahlung zum Gegenstand zahlreicher Untersuchungen geworden. Die Bestrahlungsexperimente wurden anfänglich in wäßrigem Medium durchgeführt, teils mit der DNS als solcher (1-7), teils mit ihren Basenbestandteilen (8-13). Die hierbei auftretenden Reaktionen sind jedoch wegen der Beteiligung der Wasserradikale komplexer Art. In den letzten Jahren hat man daher versucht, durch Bestrahlung der DNS und ihrer Komponenten im festen Zustand Aufschluß über den Strahlenschaden an diesen Molekülen zu gewinnen.

1.2. Ergebnisse der ESR-Spektroskopie

Mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie konnte 1957 die Bildung von langlebigen freien Radikalen im bestrahlten biologischen Material nachgewiesen werden (14). Vielfältige ESR-Studien haben seither die Kenntnis der in der DNS (15-26) und/oder ihren Komponenten (27-40) ablaufenden strahleninduzierten Reaktionen vermehrt. Diese Untersuchungen konzentrierten sich auf die Klärung folgender Punkte:

- a) Ermittlung der Dosiseffektcurven (Zahl der gebildeten freien Radikale in Abhängigkeit von der Strahlendosis),
- b) Bestimmung des G-Wertes (Zahl der gebildeten freien Radikale pro 100 eV absorbierter Strahlungsenergie),
- c) Zuordnung der Spektren zu bestimmten Molekülkonfigurationen.

1959 entdeckten Shields und Gordy (15) mit Hilfe der ESR-Spektroskopie das bei der γ -Bestrahlung von DNS, Thymin und Thymin auftretende Hydrothymylradikal:



Die Entstehung dieses Radikals wird auf die Anlagerung strahlenerzeugter H-Atome in der 6-Position des Thymins zurückgeführt (22,34,35,36,38).

1.3. Problemstellung

Der Wasserstoffanlagerung an ein Thyminmolekül geht eine strahleninduzierte Wasserstoffabspaltung aus den wasserstofftragenden Positionen anderer Thyminmoleküle voraus. Da die Gesamtmenge der abgespaltenen H-Atome sicher nicht zur Bildung der Hydrothymylradikale verbraucht wird, müßte nach der Bestrahlung von festem Thymin im Vakuum Wasserstoff in der Gasphase nachzuweisen sein.

Um diesen Nachweis zu erbringen und um die Frage zu klären, in welchem Ausmaß die einzelnen H-Positionen des Thymins an der Wasserstoffabspaltung beteiligt sind, war es naheliegend, unterschiedlich markierte ³H-Thymine zu bestrahlen.

1.4. ³H-markierte DNS-Komponenten und ihre Darstellung

1.4.1. Basen (Abb. 1)

Die vier DNS-Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin sind bisher in folgenden Positionsmarkierungen dargestellt worden:

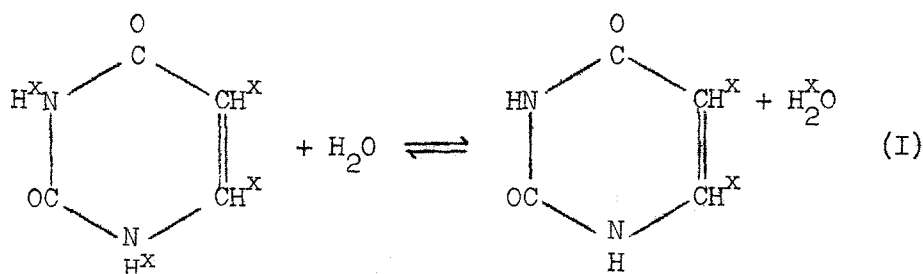
- Adenin-2,8-T
- Cytosin-5,6-T
- Guanin-8-T
- Thymin-6-T
- Thymin-(methyl-T)
- Thymin-1,3-T (nur in festem Zustand).

Die Existenz von drei verschiedenen positionsmarkierten ^3H -Thyminen - im Gegensatz zu je einer Positionsmarkierung der übrigen DNS-Basen - eröffnet für unsere Fragestellung interessante Aspekte.

Hinzu kommt die Möglichkeit, den Stammkörper des Thymins, die RNS-Base Uracil, in die Untersuchungen einzubeziehen, von dem ebenfalls drei Positionsmarkierungen bekannt sind:

Uracil-6-T
Uracil-5,6-T
Uracil-1,3-T (nur in festem Zustand).

Zur Lösung des vorliegenden Problems sind die nach Wilzbach (41) markierten Verbindungen ungeeignet, da weder die Tritiumverteilung auf die Wasserstoffpositionen des markierten Moleküls noch die Tritiumabspaltung während der Bestrahlung statistisch erfolgen. Das gesamtmarkierte ^3H -Uracil verliert in wässriger Lösung einen Teil des Tritiums aus den labilen N-Positionen 1 und 3:



H^{X} = mit ^3H markierter Wasserstoff

Dieser Isotopenaustausch kann durch Kochen der verdünnten alkalischen Lösung vervollständigt werden (42). Der Grad des Austauschs hängt generell von der Konstitution der markierten Verbindung, der Temperatur, dem Lösungsmittel und der Anwesenheit protonenabspaltender Stoffe ab. Das an Kohlenstoff gebundene Tritium haftet in der Regel sehr fest und wird in Lösung nur in Anwesenheit von Katalysatoren (Pd, Pt) ausgetauscht.

Wegen der Tritiumabspaltung aus den labilen Positionen sind nur solche tritiummarkierte Uracile und Thymine im Handel erhältlich, die das Tritium in stabilen Positionen enthalten: Uracil-6-T, Uracil-5,6-T, Thymin-6-T und Thymin-(methyl-T).

Die Darstellung dieser positionsmarkierten Verbindungen geschieht durch spezifische Reaktionen, an denen nur die zu markierenden Positionen beteiligt sind (43). So wird Thymin-(methyl-T) nach Angabe der Lieferfirma durch Dehalogenierung von 5-Chlormethyluracil dargestellt, Thymin-6-T vermutlich durch Decarboxylierung der in der Carboxylgruppe markierten Thymin-6-carbonsäure, Uracil-6-T und Uracil-5,6-T durch Reaktion der entsprechenden Bromuracile mit Tritiumgas in wäßrigem Dioxan.

Uracil-1,3-T und Thymin-1,3-T können in Umkehrung der Austauschreaktion I durch Auflösen von Uracil und Thymin in Tritiumwasser dargestellt werden. Das Tritiumwasser wird in der unter 2.2. beschriebenen Weise abdestilliert. Das zurückbleibende markierte Uracil enthält das Tritium nur an Stickstoff gebunden, während die Kohlenstoffpositionen nicht markiert werden (41). Das Thymin verhält sich analog. Da der Isotopenaustausch an den beiden N-Positionen des Uracils und des Thymins gleichzeitig erfolgt, sind die nur an einer N-Position markierten Substanzen Uracil-1-T, Uracil-3-T, Thymin-1-T und Thymin-3-T nicht zugänglich.

1.4.2. Nukleoside

³H-Thyminidin wurde durch Austauschreaktion von Thyminidin mit Tritiumwasser (44) oder mit tritierter Essigsäure (45) dargestellt. In dem nach diesen beiden Methoden markierten Thyminidin befand sich das stabil gebundene Tritium im Thyminanteil des Moleküls. Andere Autoren fanden bei Wiederholung dieser Versuche nur 40 % des Tritiums im Thyminanteil (46). Neuerdings wird zur Markierung von Nukleosiden eine Austauschreaktion mit tritiummarkiertem Benzol und Katalysator empfohlen. Im Falle eines Desoxyribofuranosylaminomercaptopurins fanden sich 80 % des Tritiums im Purinanteil (47).

Bei den nach diesen Methoden markierten Nukleosiden können keine Angaben über die Verteilung des Tritiums auf die wasserstofftragenden Positionen des Basenteils gemacht werden.

Von den positionsmarkierten Nukleosiden - enzymatisch aus positionsmarkierten Basen und 2-Desoxy-D-ribose dargestellt - sind folgende im

Handel erhältlich:

Cytidin-5-T
Desoxycytidin-5-T
Uridin-5-T
Uridin-5,6-T
Desoxyuridin-5-T
Desoxyuridin-5,6-T
Thymidin-6-T
Thymidin-(methyl-T).

Mit diesen Verbindungen kann ein möglicher Einfluß des Zuckers auf die Tritiumabspaltung aus dem Basenteil untersucht werden.

1.4.3. 2-Desoxy-D-ribose

Nach Jacobs (48) löst sich kristalline 2-Desoxy-D-ribose während der γ -Bestrahlung teilweise in dem aus ihr entstehenden Wasser auf. Bei der Dosis 10^8 rad entsteht eine vollkommen klare Lösung. ^3H -markierte 2-Desoxy-D-ribose könnte zur Klärung der strahleninduzierten Reaktionen dienen, doch liegen bezüglich der Markierung von 2-Desoxy-D-ribose bisher keine eindeutigen Angaben vor; so fand Simon (49) bei der Wilzbach-Markierung von kristalliner D-Ribose eine stark unterschiedliche Tritiumverteilung auf die einzelnen Positionen.

1.5. ^{14}C -markierte DNS-Komponenten

Von diesen sind im Zusammenhang mit dem vorliegenden Problem nur Thymin-(methyl- ^{14}C) und Thymidin-(methyl- ^{14}C) insofern von Interesse (50), als die Abspaltung von Methylgruppen eine Konkurrenzreaktion zur Wasserstoffabspaltung sein könnte.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Die Aktivitätsbestimmung der gelösten ^3H -Thymine und ^3H -Uracile

Die tritiummarkierten Thymine und Uracile gelangen in wäßriger Lösung in den Handel. Die kleinste käufliche Gesamtaktivität beträgt beim Thymin-(methyl-T) 5 mCi, bei den übrigen ^3H -Thyminen und ^3H -Uracilen 1 mCi. Aus den unter 2.5. angestellten Überlegungen ergibt sich, daß diese Gesamtaktivitäten für die Experimente ausreichend sind. In Tab. 1 sind in Spalte 1 die positionsmarkierten Thymine und Uracile aufgeführt, in Spalte 2 deren Lieferfirmen. Die Spalten 3 bis 5 enthalten Angaben der Hersteller. Wegen der hohen spezifischen Aktivität, die mittels Flüssigkeitsszintillation durch Vergleichsmessungen mit einem Tritiumstandard bestimmt wurde, muß die Autoradiolyse der markierten Substanzen während der Lagerzeit berücksichtigt werden (42, 50). In Spalte 6 ist die Zeit zwischen der Aktivitätsbestimmung der gelösten ^3H -Thymine und ^3H -Uracile beim Erzeuger und der Präparation der festen ^3H -Thymine und ^3H -Uracile angegeben. Spalte 7 enthält die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der festen markierten Thymine und Uracile; sie erfolgt ebenfalls durch Flüssigkeitsszintillation nach der Arbeitsvorschrift von Schieferdecker (52).

Uracil-1,3-T und Thymin-1,3-T wurden sofort nach ihrer Darstellung im festen Zustand bestrahlt.

2.2. Präparation der festen ^3H -Thymine und ^3H -Uracile

Die Gewichtsmenge der markierten Verbindungen in den käuflichen Lösungen liegt in der Größenordnung von wenigen Mikrogrammen, so daß inaktives Thymin /Uracil/ als Träger benötigt wird.

Die Aufarbeitung der Lösungen geschieht folgendermaßen:

Man überführt die Lösung der markierten Substanz (1 ml) mittels einer Mikropipette aus der gelieferten Ampulle in einen Rundkolben von 1 l Inhalt, fügt 300 ccm destilliertes Wasser hinzu, löst darin 10 g Thymin /Uracil/ unter Kochen am Rückfluß und destilliert anschließend etwa 100 ccm Wasser ab. Weder Thymin noch Uracil sind wasserdampf-

flüchtig. Die zurückbleibende Lösung läßt man erkalten, filtriert das auskristallisierte Thymin /Uracil/ durch eine Hahnsche Nutsche und Membranfilterpapier ab und trocknet es im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxid bis zur Gewichtskonstanz. Der Trocknungsprozeß dauert beim Thymin mehrere Tage, da sich beim langsamen Auskristallisieren aus wäßriger Lösung das Thyminmonohydrat bildet (53), das sein Kristallwasser nur allmählich abgibt.

Man erhält bei dieser Prozedur von den eingesetzten 10 g Thymin /Uracil/ etwa 9 g, die restliche Menge bleibt gelöst. Die spezifische Aktivität der festen markierten Thymine /Uracile/ beträgt sodann ungefähr 0,1 mCi/g, beim Thymin-(methyl-T) 0,5 mCi/g. Die genauen Werte sind in Tab. 1, Spalte 7, aufgeführt.

Zur Darstellung von Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T werden 0,25 mM Thymin (= 31,5 mg) bzw. 0,25 mM Uracil (= 28 mg) in einen 25 ml-Meßkolben eingewogen und mit Tritiumwasser der spezifischen Aktivität 5 mCi/ml bis zur Marke aufgefüllt. Das Pipettieren geschieht mittels mechanischer Pipettierhilfen. Nach längerem Schütteln löst sich das Thymin /Uracil/ vollständig. Die Lösung wird in den Kolben 1 der in Abbildung 2 gezeigten Destillierbrücke eingefüllt, die an eine Vakuumapparatur angeschlossen ist. Vor dem Evakuieren wird die Lösung mittels Kohlendioxid-Aceton oder flüssigem Stickstoff eingefroren, nach dem Evakuieren der Hahn zum Vakuum geschlossen, die Kühlung von Kolben 1 entfernt und unter Kolben 2 angebracht. Nach dem Auftauen des Wassers in Kolben 1 kann dieser mit einem Föhn zur Beschleunigung der Verdampfung erwärmt werden. Das Wasser soll hierbei nicht sieden, um ein Verspritzen der Lösung und Auskristallisieren der gelösten Substanz an der Kolbenwand zu vermeiden. Nach Beendigung der "Vakuumdestillation" soll die feste Substanz nur die untere Kolbenwand bedecken, da sie mechanisch entfernt werden muß. Hierzu wird der Kolbenhals abgesprengt und der Destillationsrückstand mittels eines Spatels von der Gefäßwand abkratzt und gewogen. Man erhält auf diese Weise etwa 2/3 der eingesetzten Gewichtsmengen als Ausbeute (22 mg Thymin-1,3-T, 19 mg Uracil-1,3-T). Die weitere Aufarbeitung ist unter 2.3. beschrieben.

2.3. Thermische Stabilität von Thymin und Uracil

Über das Verhalten des Thymins beim Erhitzen finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben:

D'Ans-Lax, 1964	Schmelzpunkt 336°C unter Zers. u. Subl.
Handbook of Chem. and Physics, 1963/64	Schmelzpunkt 270°C unter Zers.
Biochem. Taschenbuch, 1964, I. Teil	Schmelzpunkt 326°C unter Zers.
Handbook of Chem. and Physics, 1965/66	Schmelzpunkt 226°C unter Subl.

Kossel und Neumann (54) machen folgende Angabe:

"Bei vorsichtigem Erhitzen kann die ganze Masse ohne Verkohlungs sublimesiert werden".

Beim Uracil stößt man ebenfalls auf unterschiedliche Daten.

Da die Sublimierbarkeit beider Substanzen für die vorliegenden Untersuchungen von großer Bedeutung ist, wurde ihr thermisches Verhalten eingehend untersucht. In einem Vakuum von 10^{-3} - 10^{-4} Torr sublimesiert Thymin in der in Abb. 3 gezeigten Anordnung bei 220 - 280°C unzersetzt, Uracil ebenfalls unzersetzt bei 260 - 320°C .

Die thermische Stabilität beider Verbindungen wird durch folgende Befunde bewiesen:

- a) Bei der Sublimation im Vakuum tritt keine Verfärbung oder Verkohlung auf und es hinterbleibt kein Rückstand.
- b) Der Druck im Sublimationsgefäß (mittels Kompressionsvakuummeter gemessen) ist nach der Sublimation der gleiche wie vorher.
- c) Das Gewicht des eingesetzten Thymins /Uracils/ verändert sich durch die Sublimation nicht. Es können daher auch keine kondensierbaren Gase entstehen.
- d) Bei der Sublimation aller markierten, nicht bestrahlten Thymine

und Uracile tritt keine Tritiumaktivität in der Gasphase auf. Dies beweist, daß keine wasserstoffhaltigen gasförmigen Zersetzungsprodukte entstehen.

- c) Die UV-Spektren von nicht sublimiertem Thymin /Uracil/ und sublimiertem Thymin /Uracil/ sind identisch (Abb. 4).

Infolge der Sublimierbarkeit der beiden Verbindungen ist es möglich, Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T von anhaftendem Tritiumwasser zu befreien. Da 0,1 mg HTO mit der niedrigen spezifischen Aktivität 1 $\mu\text{Ci/ml}$ immer noch radiometrisch eindeutig nachweisbar ist (222 Zerfälle pro Minute), können bei Trocknung bis zur Gewichtskonstanz noch meßbare HTO-Aktivitäten zurückbleiben.

Zur Vermeidung von Substanzverlusten ist es zweckmäßig, die kleine Menge markierter Substanz in einem hinreichend langen Sublimationsgefäß mit inaktivem Thymin /Uracil/ zu vermischen und die Sublimation dreimal nacheinander durch allmähliches Hochfahren des Ofens vorzunehmen. Das Sublimat wird zusätzlich gemörsert und die Aktivität mehrerer Proben durch Flüssigkeitsszintillation bestimmt, um die homogene Verteilung der markierten Moleküle zu kontrollieren. Nachstehende Zusammenstellung enthält die Ergebnisse dieser Prozedur.

	Thymin	Uracil
Einwaage mark. Substanz	0,022 g	0,019 g
Einwaage inakt. Substanz	0,540 g	0,530 g
Gesamteinwaage	0,562 g	0,549 g
Gesamtakt. Mittelwert aus 3 Best.	23,0 μCi	25,8 μCi
% der Ausgangsakt. des HTO (125 mCi)	0,018	0,020

Auch bei allen übrigen ^3H -Thyminen und ^3H -Uracilen ist die Sublimation erforderlich, da wegen der Autoradiolyse der Ausgangslösungen T-Atome aus den markierten Molekülen mit den H-Atomen des Wassers in geringem,

aber doch merkbarem Maße austauschen können. Die Sublimation muß aber nicht mehrfach vorgenommen werden, da beim Auskristallisieren aus wäßriger Lösung eine homogene Verteilung der markierten Moleküle gewährleistet ist.

2.4. Bestrahlung der markierten Substanzen

Die Bestrahlungen wurden in einer ^{60}Co -Quelle (Gammacell 220 der Atomic Energy of Canada Ltd) durchgeführt. Die Dosisleistung betrug 1,6 Mrad/h, die Bestrahlungszeit 5 Minuten bis 14 Tage. Die Abnahme der Dosisleistung infolge radioaktiven Zerfalls während der gesamten Dauer der Experimente wurde bei der Berechnung der Dosen berücksichtigt. Die Isodosenverteilung innerhalb der ausfahrbaren zylindrischen Bestrahlungskammer wird mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ angegeben.

Die Bestrahlungskammer faßt mehrere Bestrahlungsgefäße. In jedes Bestrahlungsgefäß können Gewichtsmengen von 0,1 - 0,5 g markierter Substanz eingewogen werden (je nach Größe der Zählrate und Größe der Dosis). Mit Hilfe eines "Glasrechens" (Abb. 6) können mehrere Bestrahlungsgefäße gleichzeitig evakuiert werden. Das Abschmelzen der Gefäße erfolgt unter einem Vakuum von 10^{-4} Torr.

2.5. Berechnung der nach der Bestrahlung in der Gasphase zu erwartenden Tritiumaktivität

In Abb. 5 sind die von Müller (31) mittels ESR-Spektroskopie bestimmten Radikalkonzentrationen (Spins/g) in Abhängigkeit von der Dosis aufgezeichnet. Aus dieser Darstellung sind die folgenden Werte für die Radikalkonzentrationen entnommen:

	10^5	10^6	10^7 (rad)
Thymin	-	$6 \cdot 10^{16}$	$4 \cdot 10^{17}$
Uracil	$4 \cdot 10^{16}$	$2 \cdot 10^{17}$	-

Unter der Voraussetzung, daß die Spins nur an den Stellen im Molekül entstehen, von denen Wasserstoff abgespalten wird, sind obige Zahlen mit der Zahl der abgespaltenen H-Atome identisch. Aus der Zahl der in 1 g Substanz vorhandenen Wasserstoffatome und der Zahl der aus 1 g bei Bestrahlung abgespaltenen H-Atome läßt sich der prozentuelle Anteil der Wasserstoffabspaltung ermitteln. Beispielsweise sind in 1 g Uracil $2,14 \cdot 10^{22}$ H-Atome vorhanden. Bei der Dosis von 10^6 rad entstehen in 1 g Uracil $2 \cdot 10^{17}$ Radikale, also werden $0,94 \cdot 10^{-3}$ % der vorhandenen H-Atome abgespalten.

Wenn man annimmt, daß die Wasserstoffabspaltung nur aus einer H-Position des Uracils erfolgt, in der sich nur $0,54 \cdot 10^{22}$ H-Atome/g befinden, dann erhöht sich bei der gleichen Dosis der Anteil der abgespaltenen H-Atome auf $3,7 \cdot 10^{-3}$ %. Die für die verschiedenen Strahledosen so berechneten Prozentzahlen sind:

	10^5	10^6	10^7 (rad)
Thymin	-	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$
Uracil	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	-

Die gleichen Überlegungen gelten für die Tritiumaktivität. Unter der Voraussetzung, daß die Wasserstoffabspaltung nur aus der Position erfolgt, in der sich das Tritium befindet, und daß kein Isotopieeffekt eintritt, würden $3,7 \cdot 10^{-3}$ % der vorhandenen Tritiumatome in der Gasphase nachzuweisen sein. Bei der Bestrahlung von 1 g Uracil-6-T (spez. Akt. 0,1 mCi/g) mit einer Dosis von 10^6 rad würden also $3,7 \cdot 10^{-3}$ % dieser Aktivität (3,7 nCi = 8210 Zerfälle pro Minute) in der Gasphase erscheinen.

Auf die spezifische Aktivität 0,1 mCi/g bezogen, ergeben sich aus den berechneten Prozentzahlen folgende Zählraten pro Minute:

	10^5	10^6	10^7 (rad)
Thymin	-	1865	12430
Uracil	1670	8210	-

Die Methylgruppe des Thymins wird in dieser Berechnung als eine Position angesehen, also die Gesamtzahl der H-Atome im Thymin (6) willkürlich auf 4 erniedrigt. Die Anlagerung eines Teils der abgespaltenen H-Atome bzw. T-Atome an die Doppelbindung des Thymins, die zur Entstehung des langlebigen Hydrothymylradikals führt, kann nicht berücksichtigt werden.

Obwohl diese Berechnung nur sehr angenähert ist, führt sie doch zu einer Abschätzung der nach der Bestrahlung der markierten ^3H -Thymine und ^3H -Uracile in der Gasphase zu erwartenden Tritiumaktivität (2.6.5.).

Der im Bestrahlungsgefäß zu erwartende Druck läßt sich in ähnlicher Weise berechnen. Bei der Bestrahlung des Thymins entstehen bei einer Dosis von 10^7 rad $4 \cdot 10^{17}$ H-Atome bzw. $2 \cdot 10^{17}$ H_2 -Moleküle, wenn man wieder von der Voraussetzung ausgeht, daß die Radikalkonzentration im Festkörper der Zahl der abgespaltenen H-Atome entspricht. $2 \cdot 10^{17}$ H_2 -Moleküle sind $7,5 \cdot 10^{-3}$ ccm H_2 -Gas (NTP). In dem Bestrahlungsgefäß (Inhalt ~ 20 ccm) sollte demnach ein Druck von $\sim 2,8 \cdot 10^{-1}$ Torr herrschen, während der Druck vor dem Aufbrechen der Glasspitze des Bestrahlungsgefäßes 10^{-4} Torr beträgt. Der Wasserstoffdruck im Bestrahlungsgefäß ist also genügend groß, um ein Ausströmen des Gases zu gewährleisten.

Als Ergebnis dieser Überlegungen läßt sich feststellen, daß bei einer spezifischen Aktivität von 0,1 mCi pro g markierter Substanz Zählraten von 10^3 - 10^5 Zerfällen pro Minute im Dosisbereich von 10^5 - 10^8 rad resultieren würden.

Um von der käuflichen Mindest-Gesamtaktivität von 1 mCi zu der spezifischen Aktivität von 0,1 mCi/g zu gelangen, wurden bei der Präparation der festen markierten Thymine /Uracil/ jeweils 10 g inaktives Thymin /Uracil/ eingesetzt.

2.6. Meßergebnisse

2.6.1. Durchführung der Versuche

Auf der linken Seite des Vakuumstrangs der in Abb. 6 gezeigten Versuchsapparatur befinden sich Ansatzstutzen zum Evakuieren der Bestrahlungsbehälter. Unterhalb der Hähne 1 und 3 ist der eigentliche Meßteil angebracht, bestehend aus Bestrahlungsgefäß, "Zertrümmerungsstrang" und Zählrohr. Das Blubbermanometer dient zur Vermeidung eines Überdrucks in der Apparatur, das Quecksilbermanometer zur Messung des Zählgasdrucks (Methan) und das Ölmanometer zur genauen Messung des Wasserstoffdrucks bei der Relativeichung der Zählapparatur (2.6.4.). Die drei Rundkolben unterschiedlicher Größe (geeicht durch Auswiegen mit Wasser) werden sowohl zur Volumeneichung der nicht auswägbaren Teile der Apparatur als auch zur Reduktion zu hoher Zählraten benötigt. Die bestrahlten Ampullen werden an Schliff S angeschlossen, die gesamte Apparatur bis auf 10^{-4} Torr evakuiert, die Hähne 1 und 3 geschlossen, Hahn 2 geöffnet, und die Glasspitze der Ampulle durch Fallenlassen des Eisenkerns zerschlagen. Der in der Glasampulle befindliche Tritiumwasserstoff verteilt sich auf das Volumen unterhalb der Hähne 1 und 3. Ein Teil des während der Bestrahlung entstandenen Tritiumwasserstoffs kann aber gelöst im Festkörper verbleiben (2.6.6.). Um diesen Teil zu erfassen, ist die Sublimation unumgänglich. Die bestrahlte Substanz wird innerhalb der Bestrahlungsampulle bei den auf Seite 12 angegebenen Temperaturen sublimiert, wobei der Ofen die Bestrahlungsampulle bis zur Hälfte überdeckt. Das Sublimat sammelt sich im oberen Teil des Gefäßes, und der gelöste Tritiumwasserstoff verteilt sich auf das vorhandene Volumen. Bei jeder Messung gelangt der gleiche Teil des insgesamt entstandenen Tritiumwasserstoffs in das Zählrohr. Nach Beendigung der Sublimation (Dauer ca. 1/2 Stunde) wird der Ofen entfernt, der Temperaturengleich abgewartet und Hahn 2 geschlossen. Sodann läßt man das Zählgas Methan in die Apparatur einströmen, öffnet während dieses Vorgangs Hahn 1 langsam und wartet, bis der Druck 600 Torr erreicht hat (Hg-Manometer). Dann wird Hahn 1 geschlossen, und die Tritiumzählrate pro Minute unter stets gleichen Bedingungen gemessen (2.6.4.).

Die nach dem Methaneinlaß gemessenen Zählraten liegen zu hoch (bis 10 %), da beim Einströmen des Methans der im Zählrohr befindliche Tritiumwasserstoff in den unteren Teil des Zählrohrs gedrückt wird und

die anschließende Rückdiffusion eine gewisse Zeit benötigt. Aus Abb. 7 ist zu ersehen, daß etwa 30 Minuten nach dem Gaseinlaß die Zählrate konstant bleibt. Diese konstante Zählrate ist mit einem Faktor zu multiplizieren, der das gesamte Volumen berücksichtigt, auf das sich der Tritiumwasserstoff verteilt hat. Das Volumen des Gasfüllzählrohrs FZ 50 P der Firma Friesecke und Höpfner beträgt 140 ccm, das Gesamtvolumen des Meßteils einschließlich des Bestrahlungsgefäßes 225 ccm. In das Zählrohr gelangen also jeweils nur etwa $2/3$ des gesamten Tritiumwasserstoffs. Die berechnete Aktivität ist dann auf die Einwaage zu beziehen und auf 1 g umzurechnen. Der Nulleffekt des Zählrohrs liegt ohne Abschirmung bei etwa 200 Zerf./min. Wünschenswert sind deshalb um den Faktor 10 - 100 höhere Tritiumzählraten; als niedrigste Zählrate soll das Doppelte des Nulleffekts zugelassen sein. Die berechneten Zählraten (2.5.) liegen in dieser Größenordnung.

2.6.2. Zusammensetzung der Zählraten

Beim Sublimieren einer tritiummarkierten organischen Substanz muß grundsätzlich mit dem Auftreten weiterer Zählratenanteile gerechnet werden. Eine tritiummarkierte Verbindung ist ein Gemisch aus tritiierten und nicht tritiierten Molekülen. Aus jeder dieser beiden Molekülsorten können sowohl durch die Bestrahlung als auch durch die nachfolgende Sublimation Zersetzungsprodukte entstehen, so daß sich die Gesamtzählrate Z aus folgenden Anteilen zusammensetzt:

$$Z = Z_N + Z_S + Z_S^x + Z_{B+S} + Z_{B+S}^x$$

S = sublimiert
B+S = bestrahlt und sublimiert

Z_N = Nulleffekt

Z_S = Zählrate, die als Folge der Entstehung gasförmiger Zersetzungsprodukte bei der Sublimation der nicht tritiierten Moleküle auftreten kann. Die Anwesenheit solcher gasförmigen Stoffe kann eine Löschung echter Tritiumimpulse oder Pseudoaktivität hervorrufen. Das wenig bekannte Phänomen der Pseudoaktivität dürfte auf der Instabilität mancher Gase im elektrischen Feld des Zählrohrs beruhen. Wird eine Verbindung A-B im Zählrohr-

feld in die Ionen A^+ und B^- aufgespalten, so werden die B^- -Ionen in gleicher Weise wie die Betateilchen des Tritiums zum Zählrohr hingetrieben und rufen dort Impulse hervor. Auf diese Weise kann im Zählrohr eine "Aktivität" auftreten, die nicht auf das Vorhandensein radioaktiver Strahlung zurückzuführen ist.

Im Falle einer Löschung erfährt die Gesamtzählrate Z eine Verminderung; deshalb ist vor Z_S und Z_B ein Minuszeichen in Klammern gesetzt.

Z_S^x = Zählrate, die die tritiierten Moleküle - ohne bestrahlt worden zu sein - infolge thermischer Zersetzung während der Sublimation oder infolge Autoradiolyse verursachen können.

Z_{B+S} = Zählrate, die auf Zersetzungsprodukte zurückzuführen ist, die während der Bestrahlung der nicht tritiierten Moleküle entstehen.

Z_{B+S}^x = Zählrate des bei der Bestrahlung aus den tritiierten Molekülen abgespaltenen Tritiums.

Durch die eingehende Untersuchung der thermischen Stabilität des Thymins /Uracils/ konnte bewiesen werden, daß Z_S keine Rolle spielt. Beide Verbindungen sublimieren unzersetzt (2.3.).

Bei der Sublimation der ^3H -Thymine und ^3H -Uracile tritt keine Aktivität im Zählrohr auf. Eine Autoradiolyse dieser Substanzen ist nach 14-tägiger Aufbewahrung (= maximale Bestrahlungszeit) nicht feststellbar. Somit entfällt auch Z_S^x .

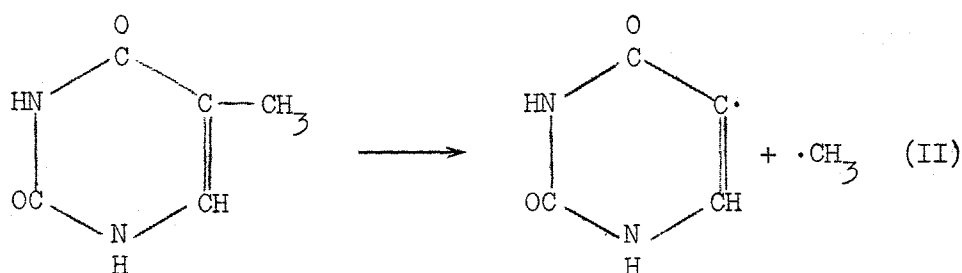
Die Sublimation des bestrahlten, nicht markierten Thymins /Uracils/ verursacht ebenfalls keine Störung des Nulleffekts. Die bei der Bestrahlung entstandenen gasförmigen Produkte verhalten sich neutral ($Z_{B+S} = 0$). Die Gesamtzählrate setzt sich also nur aus Nulleffekt und Tritiumzählrate zusammen:

$$Z = Z_N + Z_{B+S}^x$$

Aus zahlreichen Untersuchungen geht hervor, daß bei der Bestrahlung wasserstoffhaltigen organischen Materials die Wasserstoffabspaltung die

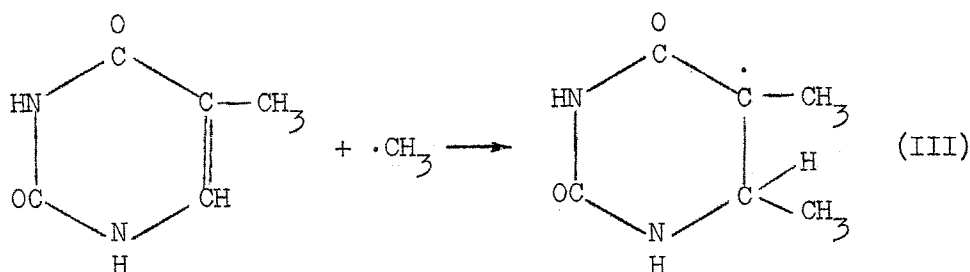
Hauptreaktion ist (56). Es kann daher auch bei der γ -Bestrahlung der ^3H -markierten Thyminen und Uracilen angenommen werden, daß das Tritium in Form von Tritiumwasserstoff in die Gasphase gelangt.

Um die Entstehung anderer tritiummarkierter Gase (H_2O und NH_3 aus Uracil; H_2O , NH_3 und CH_4 aus Thymin) bei der Bestrahlung auszuschließen, wurde zwischen dem Ausheizteil und dem Zählrohr eine Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff angebracht. Keine Auswirkungen auf die Zählraten zeigten sich bei Uracil-6-T, Uracil-5,6-T, Thymin-(methyl-T) und Thymin-6-T. Dadurch ist erwiesen, daß das an die C-Positionen beider Verbindungen gebundene Tritium nach der Bestrahlung nicht in Form von tritiummarkiertem Wasserdampf oder tritiummarkiertem Ammoniak vorliegt. Im Falle des Thymins kann die Bildung von Methan hingegen nicht ausgeschlossen werden, da der Dampfdruck des Methans bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs (-195°C) noch ~ 40 Torr beträgt. Würden bei der Bestrahlung von Thymin Methylradikale durch die Reaktion



entstehen, so hätten sie drei Reaktionsmöglichkeiten:

- Abstraktion von H-Atomen oder Reaktion mit eliminierten H-Atomen (CH_4 -Bildung)
- Dimerisierung zu Äthan (C_2H_6)
- Bildung des 6-Methyl-hydrothymylradikals



Durch die ESR-Spektroskopie konnte bisher bei der Bestrahlung des Thymins weder ein Uracilradikal (Reaktion II), noch ein 6-Methylhydrothymylradikal (Reaktion III) identifiziert werden. Es ist daher anzunehmen, daß die Methanbildung nicht oder nur in sehr geringem Umfang stattfindet. Eine eindeutige Klärung dieser Frage könnte mit Hilfe vom Thymin-(methyl- ^{14}C) erfolgen (2.2.), sobald es in fester Form mit genügend hoher spezifischer Aktivität erhältlich ist. Die Zählung von $^{14}\text{CH}_4$ ist im Prinzip mit der gleichen Zählordnung durchführbar.

2.6.3. Verhalten von Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T

Die an den N-Positionen markierten Verbindungen Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T unterscheiden sich von den an C-Positionen markierten in zwei Beziehungen:

- a) Der Abfall der Aktivität im Zählrohr erfolgt nicht gemäß Kurve 1 in Abb. 7, sondern gemäß Kurve 2a. Nach dem Evakuieren des Zählrohrs und erneuter Füllung mit Methan steigt die Zählrate an (Kurve 2b). Diese Erscheinung ist für eine Kontamination des Zählrohrs mit Tritiumwasserdampf typisch. Die Adsorption der Wassermoleküle an der Zählrohrwand bedingt die Abnahme der Zählrate, die Desorption nach dem Evakuieren ihren Wiederanstieg.

Das Auftreten von Tritiumwasserdampf kann nicht auf mangelnde Trocknung zurückzuführen sein, da nach der 3. Sublimation (2.3.) in der Gasphase keine Aktivität mehr auftritt.

- b) Mit Hilfe der Kühlfalle zwischen Ausheizteil und Zählrohr kann auch hier zwischen den möglichen gasförmigen Bestrahlungsprodukten unterschieden werden. Wird die Kühlung mit flüssigem Stickstoff (-195°C) vorgenommen, so erscheint keine Aktivität im Zählrohr. Da der Dampfdruck des Wasserstoffs schon bei -252°C 760 mm Hg beträgt, ist seine Bildung während der Bestrahlung auszuschließen. Auch bei der Kühlung mit Kohlensäure/Aceton (-78°C) tritt keine Aktivität im Zählrohr auf. Es kann also kein Ammoniak entstanden sein, da dessen Dampfdruck bei -79°C 40 mm Hg beträgt. Ohne Kühlung erfolgt die erwähnte Kontamination des Zählrohrs und der

Glaswände der Apparatur. Die Bestimmung reproduzierbarer Dosis-effektkurven für das Thymin-1,3-T und das Uracil-1,3-T wird dadurch unmöglich.

Das unterschiedliche Verhalten von Thymin-(methyl-T), Thymin-6-T, Uracil-6-T und Uracil-5,6-T einerseits, von Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T andererseits läßt sich folgendermaßen deuten:

Wenn die aus den C-Positionen des Thymins /Uracils/ durch die Bestrahlung eliminierten T-Atome eine Abstraktionsreaktion mit den H-Atomen der N-Positionen eingehen, entsteht Tritiumwasserstoff. Der umgekehrte Vorgang, die Abstraktion von H-Atomen aus den C-Positionen durch die eliminierten T-Atome der N-Positionen, findet nicht statt, denn sonst müßte bei der Bestrahlung von Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T Tritiumwasserstoff gebildet werden. Die Tritiumatome der N-Positionen erscheinen jedoch in Form von Tritiumwasser in der Gasphase. Die Bildung des Tritiumwassers könnte durch die räumliche Nachbarschaft der T- und O-Atome in den Wasserstoffbrückenbindungen des Thymins /Uracils/ begünstigt sein.

Bei der Bestrahlung der in den C-Positionen markierten Thymine und Uracile entsteht also Tritiumwasserstoff (HT) und Wasser (H_2O), bei der Bestrahlung der in den N-Positionen markierten Thymine und Uracile Wasserstoff (H_2) und Tritiumwasser (HTO). Der Isotopenaustausch zwischen HT und H_2O sowie zwischen H_2 und HTO ist so gering, daß er nicht nachweisbar ist.

2.6.4. Genauigkeit der Gaszählung

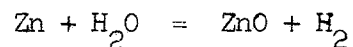
Das Gasfüllzählrohr war über einen Vorverstärker und einen Linearverstärker (Gesamtverstärkung 10000-fach) an eine 100-kHz-Zähleinheit angeschlossen. Nach Aufnahme der Zählrohrcharakteristik wurden alle Meßpunkte unter stets gleichen Bedingungen bestimmt: Hochspannung 3 kV, Diskriminator 3 V, Methandruck 600 mm Hg.

Da bei der Sublimation der bestrahlten Substanzen der gesamte Tritiumwasserstoff an die Gasphase abgegeben wird, liegt ein methodischer Fehler hinsichtlich der Wasserstoffmenge nicht vor, und die Meßfehler

werden lediglich durch die Zähleffektivität der Anordnung bedingt.

Aus diesem Grunde wurden Vergleichsmessungen mit einem Tritiumwasser-Standard der spezifischen Aktivität $1 \mu\text{Ci/ml}$ vorgenommen. Die Reduktion des Wassers zu Wasserstoff erfolgte mittels Zinkpulver nach der von Spornol und Denecke (55) beschriebenen Methode:

Nach vorherigem Wiegen des verschlossenen Reaktionsgefäßes (Abb. 8) wurden mittels einer ausgezogenen Pipette ca. 250 mg Tritiumwasser eingefüllt und verschlossen gewogen. Dann erfolgte die Einfüllung des Zinkpulvers (Korngröße $< 0,2 \text{ mm}$). Nach dem Anschluß des Reaktionsgefäßes an die Vakuumapparatur (Abb. 6) und Anbringung des Ofens wurde das Wasser mittels Kohlensäure/Aceton eingefroren, der Verbindungshahn 4 zwischen Reaktionsgefäß und Apparatur geöffnet und der Ofen unter dauerndem Evakuieren der Apparatur auf 400°C aufgeheizt (Schmelzpunkt des Zinks 419°C). Das Ausheizen des Zinks bis zum Aufhören der Gasabgabe dauerte etwa eine Stunde. Dann wurde Hahn 5 geschlossen und die Kühlung vom Reaktionsgefäß entfernt. Die Reaktion des Wasserdampfs mit dem Zinkpulver:



setzte allmählich ein und konnte am Anstieg des Drucks im Manometer deutlich verfolgt werden. Anstelle des von Spornol und Denecke verwendeten Löffelmanometers diente ein mit Hochvakuumöl (Apiezonöl, Diffelen) gefülltes Manometer (Länge 800 mm) zur Druckmessung. Das spezifische Gewicht des Öls betrug 0,865; somit entsprach 1 mm Hg 15,66 mm Öl. Die Ablesegenauigkeit war besser als 0,03 mm Hg (= 0,5 mm Öl). Angeschlossen waren sämtliche Teile der Apparatur außer Zählrohr und Ausheizteil. Das dem gebildeten Wasserstoff zur Verfügung stehende Volumen mußte so bemessen sein, daß der Wasserstoffdruck nicht über den Meßbereich des Ölmanometers hinaus stieg (ca. 50 mm Hg). Nach der Einstellung eines konstanten Drucks wurde die Heizung abgestellt und der Temperatúrausgleich abgewartet. Die Ausbeute an Wasserstoff ergibt sich durch die Beziehung:

$$A = \frac{M}{V_M \cdot p_0} \cdot \frac{p \cdot V}{(1 + \alpha t) \cdot E}$$
$$= 1,0575 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{p \cdot V}{(1 + \alpha t) E}$$

A = Ausbeute in %

M = Molgewicht des Wassers (g)

V_M = Molvolumen (ccm)

p_0 = 760 mm Hg

V = Volumen der Gesamtapparatur (ccm)

p = Wasserstoffdruck in der Apparatur nach Beendigung der Reaktion (mm Hg)

t = Temperatur nach Ausgleich ($1/10^\circ\text{C}$ genau)

E = Wassereinwaage (g)

α = Ausdehnungskoeffizient (Grad^{-1})

Die Umsetzung des Wassers mit Zink erfolgte praktisch quantitativ.

Das arithmetische Mittel aus 10 Bestimmungen ergab eine Ausbeute von 99,7 %. Der Fehler des Tritiumwasser-Standards betrug ± 5 %. Die mit der benutzten Zählordnung gemessenen Werte lagen im Mittel um 2,1 % unter den Sollwerten.

Alle den Dosiseffektcurven zugrundeliegenden Tritiumzählraten sind mit diesem Wert korrigiert und somit dem Fehler des Standards angepaßt worden.

2.6.5. Dosiseffektcurven nach Sublimation

Abbildung 9 zeigt die nach Sublimation der bestrahlten tritiummarkierten Thymin- und Uracil-erhaltenen Dosiseffektcurven im doppeltlogarithmischen Maßstab. Die genauen Meßwerte sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt.

Vergleichbar sind nur Dosiseffektcurven von Verbindungen mit gleicher spezifischer Aktivität. Die Thymin-(methyl-T)-Meßwerte in Tabelle 2 müssen deshalb durch 5 geteilt werden. Die eingezeichnete Thymin-(methyl-T)-Kurve entspricht der spezifischen Aktivität 0,1 mCi/g!

Der Verlauf der Curven gestattet zwei Feststellungen:

- a) Gleiche Molekülart bedingt gleiche Curvenform.
- b) Die Tritiumabspaltung ist positionsabhängig.

Aus der Ordinatendifferenz zwischen der Thymin-(methyl-T)-Kurve und

der Thymin-6-T-Kurve ergibt sich, daß die Tritiumabspaltung aus der Methylgruppe im Dosisbereich von 10^5 - 10^8 rad um den Faktor ~ 5 größer ist als die Tritiumabspaltung aus der 6-Position.

Beim Uracil ist eine ähnlich eindeutige Aussage nicht möglich. Wäre im Uracil-5,6-T die Verteilung des Tritiums auf die beiden Positionen 5 und 6 gleichmäßig und fände aus beiden Positionen eine Abspaltung im gleichen Umfang statt, dann müßte bei gleicher spezifischer Aktivität die Uracil-6-T-Kurve mit der Uracil-5,6-T-Kurve identisch sein. Die Uracil-5,6-T-Kurve liegt aber höher als die Uracil-6-T-Kurve. Das kann entweder bedeuten, daß sich in der 5-Position des Uracil-5,6-T mehr Tritium befindet als in der 6-Position, oder daß bei gleicher Verteilung des Tritiums auf beide Positionen aus der 5-Position mehr Tritium abgespalten wird als aus der 6-Position. Diese Unklarheit könnte nur mit Versuchen an Uracil-5-T beseitigt werden, das aber noch nicht erhältlich ist ⁺⁾ . Die Meßpunkte sämtlicher Kurven bei 10^5 rad liegen möglicherweise zu niedrig, da infolge der kurzen Bestrahlungszeit (5 min) der Temperatureausgleich in der Bestrahlungskammer der Kobaltquelle nicht gewährleistet ist. Es ist jedoch die Annahme begründet, daß der Temperatureffekt im Vergleich zu dem Einfluß der hohen Dosisleistung eine nur geringe Rolle spielt.

Unterhalb 10^5 rad liegen die Tritiumzählraten in der Nähe des Null-effektes; dadurch wird ihre exakte Messung unmöglich. Lediglich beim Thymin-(methyl-T) konnte noch ein Meßpunkt unterhalb 10^5 rad bestimmt werden. Zur Bestrahlung diente dabei eine 0,6 kCi-Kobaltquelle; die Bestrahlungstemperatur betrug $\sim 30^\circ\text{C}$. Bei der Dosisleistung von $6,48 \cdot 10^4$ rad/h entsprach der Meßpunkt bei $5,4 \cdot 10^3$ rad einer Bestrahlungszeit von 5 Minuten.

Um noch niedrigere und biologisch interessante Dosen zu erfassen, müßten zwei Forderungen erfüllt sein:

- a) Eine Kobaltquelle mit geringer Dosisleistung zur Erzielung längerer Bestrahlungszeiten,
- b) Höhere spezifische Aktivität der bestrahlten Substanzen zur Gewährleistung größerer Zählraten.

⁺⁾ Wird neuerdings von Amersham angeboten.

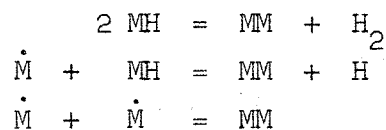
Bei höherer spezifischer Aktivität der ^3H -Thymine und ^3H -Uracile könnte jedoch ihre Autoradiolyse in Erscheinung treten und müßte getrennt untersucht werden.

Die Übereinstimmung der gemessenen Tritiumzählraten mit den näherungsweise berechneten (2.5.) ist noch am besten beim Thymin-(methyl-T):

	10^6	10^7 (rad)
berechnet	1865	12430
gefunden	1100	4500

Die Unterschiede sind in Anbetracht der Voraussetzungen nicht verwunderlich. Eine mathematische Formulierung des Zusammenhangs zwischen den durch ESR-Spektroskopie bestimmten Radikalkonzentrationen und den gemessenen Zählraten könnte aus einem kinetischen Ansatz unter Berücksichtigung der unter 3.1. getroffenen Reaktionsauswahl resultieren.

Bei der Sublimation von Proben, die mit Dosen $> 10^7$ rad bestrahlt wurden, hinterblieben nicht sublimierbare Rückstände, deren Menge sich mit zunehmender Dosis vergrößerte. Hierbei dürfte es sich um Dimerisierungsprodukte handeln, die durch die Reaktionen



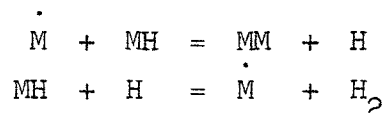
gebildet werden können (3.1.).

2.6.6. Dosiseffektcurven ohne Sublimation

Ohne Sublimation der bestrahlten ^3H -Thymine und ^3H -Uracile ergeben sich die in den Abbildungen 10 bis 13 gezeigten unteren Dosiseffektcurven. Die entsprechenden Meßwerte sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengestellt. Die oberen Curven sind die zu Vergleichszwecken eingezeichneten

Dosiseffektkurven nach Sublimation: Aus den Abbildungen 10 und 11 ist zu ersehen, daß das relative Verhältnis der ohne Sublimation in der Gasphase gefundenen Tritiumaktivität zu der nach Sublimation gefundenen bei Thymin-(methyl-T) und Thymin-6-T in gleicher Weise ansteigt (von etwa 3/10 bei 10^5 rad auf etwa 9/10 bei $5 \cdot 10^8$ rad). Bei Uracil-5,6-T und Uracil-6-T ist innerhalb des kleinen Dosisbereichs, in dem Dosis-effektkurven ohne Sublimation gemessen werden konnten, eine solche Annäherung der unteren an die oberen Kurven nicht festzustellen.

Es ist möglich, daß die Differenzen zwischen den ohne und nach Sublimation gemessenen Tritiumaktivitäten auf der Diffusion des Tritiumwasserstoffs im Festkörper beruhen. Eine längere Bestrahlungszeit bedeutet längere Diffusionszeit, d.h. eine Vergrößerung der Menge des aus dem Festkörper herausdiffundierten Wasserstoffs. Daß bei den ^3H -Uracilen (Abb. 12 und 13) keine wesentliche Erhöhung des relativen Verhältnisses T ohne/ T nach Sublimation mit steigender Dosis auftritt, könnte seine Ursache in einem - verglichen mit Thymin - kleineren Diffusionskoeffizienten des Wasserstoffs im Uracil haben. Um zu prüfen, ob es sich tatsächlich um einen Diffusionsprozeß handelt, müßte man von zwei mit gleicher Dosis bestrahlten Proben die eine sofort nach Bestrahlung messen, die andere hingegen erst nach längerer Lagerung bei der Temperatur der Bestrahlungskammer. Sollte die gelagerte Probe dann eine größere Aktivität aufweisen, so wäre der Beweis für die Diffusion erbracht - wenn nicht bei der Temperatur der Bestrahlungskammer (50°C) die zur Wasserstoffbildung führenden Reaktionen



ablaufen (3.1.).

Würden die Bestrahlungen bei tieferen Temperaturen vorgenommen, dann müßte die Temperaturabhängigkeit der Diffusion berücksichtigt werden.

Auch die Ausheizkurven der bestrahlten Thymine und Uracile - die bei allen vier markierten Derivaten unabhängig von der Dosis einen ähnlichen Verlauf zeigen - erlauben keine Entscheidung zwischen der Diffusion und einer zur Wasserstoffbildung führenden Reaktion der

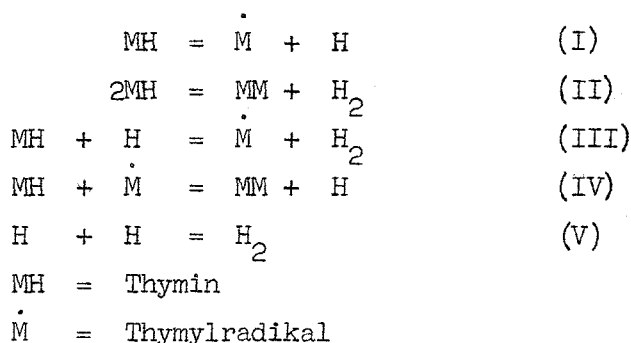
Festkörperradikale mit ungeschädigten Molekülen. Abbildung 14 gibt die Ausheizkurve von Thymin-(methyl-T), Abbildung 15 die von Uracil-6-T wieder. Trägt man diese Kurven im halblogarithmischen Maßstab auf (Abb. 16 und 17), so zeigt sich, daß keine lineare Anhängigkeit der Tritiumaktivität in der Gasphase von der reziproken Temperatur besteht. Daraus kann geschlossen werden, daß kein Vorgang mit definierter Aktivierungsenergie (chemische Reaktion oder einheitlicher Diffusionsprozeß) die alleinige Ursache für die Erhöhung der Tritiumaktivität nach der Sublimation sein kann.

Die Zunahme der Tritiumaktivität in der Gasphase mit steigender Temperatur der bestrahlten Substanz (Ausheizkurve) konnte nur diskontinuierlich vorgenommen werden. Nach dem Aufbrechen der Bestrahlungsampulle wurde die Tritiumaktivität in der unter 2.8.1. beschriebenen Weise gemessen, das Zählrohr bei geschlossenem Hahn 2 über Hahn 1 evakuiert, Hahn 1 geschlossen, Hahn 2 geöffnet und die Ampulle auf eine bestimmte Temperatur aufgeheizt. Jede Temperatur wurde 30 min konstant gehalten, dann Hahn 2 geschlossen, über Hahn 1 Methan eingelassen und die Zählrate bestimmt. Bei jeder Messung mußte die im Ausheizteil verbliebene Gasaktivität der vorausgegangenen Messung berücksichtigt werden. Der Ausheizteil wird durch die Hähne 2 und 3 begrenzt.

3. DISKUSSION

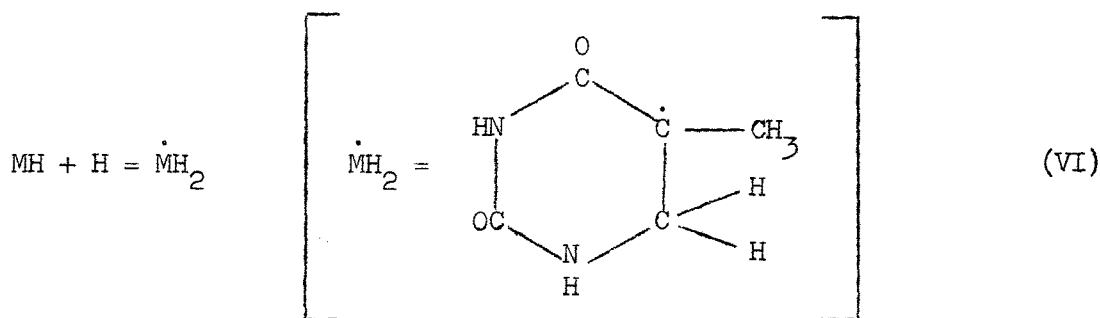
3.1. Deutung der Dosiseffektkurven

Die Deutung der Dosiseffektkurven der ^3H -Thymine stößt auf mannigfache Schwierigkeiten, da ihr Verlauf sich aus einer Überlagerung von Parallel- und Folgereaktionen ergibt. Ohne zunächst die Ergebnisse der ESR-Spektroskopie zu berücksichtigen, wären folgende zur Bildung von molekularem Wasserstoff führende Teilschritte denkbar:

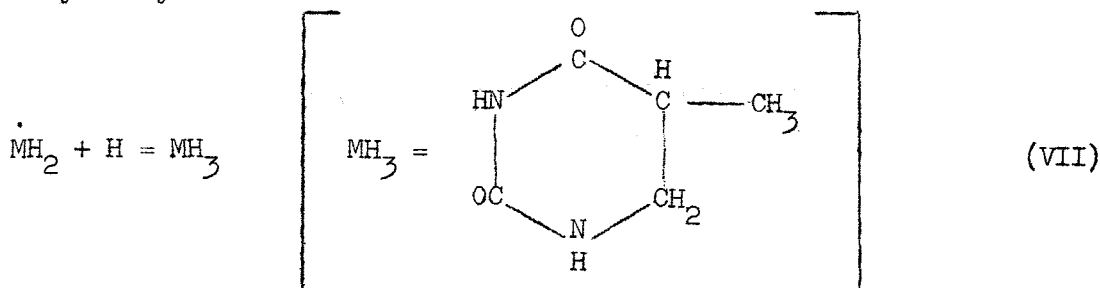


Nur Reaktion II führt primär zur Bildung von H_2 , die Reaktionen III und V sind Folgereaktionen von I und IV.

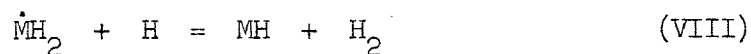
Der Reaktionsablauf wird durch den Verbrauch eines Teils der H-Atome für die Bildung der (durch ESR-Spektroskopie nachgewiesenen) Hydrothymylradikale kompliziert:



Diese "Anlagerungsradikele" können mit H-Atomen weiter reagieren zum Dihydrothymin:



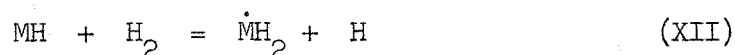
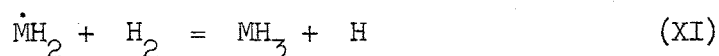
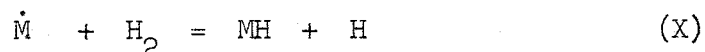
oder unter H_2 -Bildung:



Weiterhin muß die Rekombination (Rückreaktion von I) in Betracht gezogen werden:



Auch der molekulare Wasserstoff kann in verschiedener Weise in die Reaktionsfolge eingreifen:



Außerdem kann Dissoziation erfolgen:



Wenn die Konzentration des Thymins (MH) in den Reaktionen I, II, III, IV, VI, XII und XIII als konstant angesehen wird, dann gehören die Reaktionen I und II der 0. Reaktionsordnung, die Reaktionen III, IV, VI, XII und XIII der 1. Ordnung und die Reaktionen V, VII, VIII, IX, X und XI der 2. Ordnung an.

Aus der Literatur geht hervor, daß einige der denkbaren Reaktionen I-XIV ausgeschlossen werden können oder wenig wahrscheinlich sind.

Als erster Schritt des chemischen Reaktionsschemas kann die Dissoziation des Thymins in ein Thymylradikal und ein H-Atom angenommen werden (I). Dies geschieht in Analogie zu den von Braams (56) zitierten Bestrahlungsexperimenten mit verschiedenen organischen Verbindungen und steht im Einklang mit den Ergebnissen der ESR-Spektroskopie und mit den Resultaten der vorliegenden Untersuchungen.

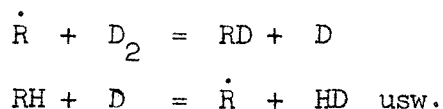
Von Dole et al. (57) wird Reaktion II unter die Primärreaktionen bei der strahleninduzierten Bildung von H_2 aus organischen Stoffen eingereiht.

Infolge der großen Reaktionsfähigkeit der H-Atome in *statu nascendi* ist zu erwarten, daß der Abstraktionsreaktion III eine wichtige Rolle bei der H₂-Produktion zukommt.

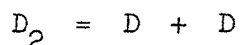
Hey (58) stellte fest, daß beim thermischen Ausheilen von Radikalen in Alanin und Protein Gas entwickelt wird, was für den Ablauf der Reaktion IV zu sprechen scheint. Die Gasentwicklung könnte aber auch auf das Herausdiffundieren von gelöstem Wasserstoff aus dem bestrahlten Material zurückzuführen sein. Eine solche Annahme konnte weder bewiesen noch ausgeschlossen werden (2.6.6.).

Die Additionsreaktion VI gilt durch die Existenz des Hydrothymylradikals als bewiesen.

Anhaltspunkte für die Reaktionen X bis XIV ergeben sich aus den Untersuchungen von Vershavskii et al. (59) über die Aufnahme von Deuterium durch Polymere während der Bestrahlung. Sie konnten zeigen, daß das Eindringen von Deuterium in die polymeren Substanzen auf Isotopenaustausch beruht, nicht auf Aktivierung der Adsorption durch Bestrahlung. Die Autoren halten es für wahrscheinlich, daß der Isotopenaustausch als Folge der Reaktion zwischen Polymer-Radikalen \dot{R} und D₂ anzusehen ist:



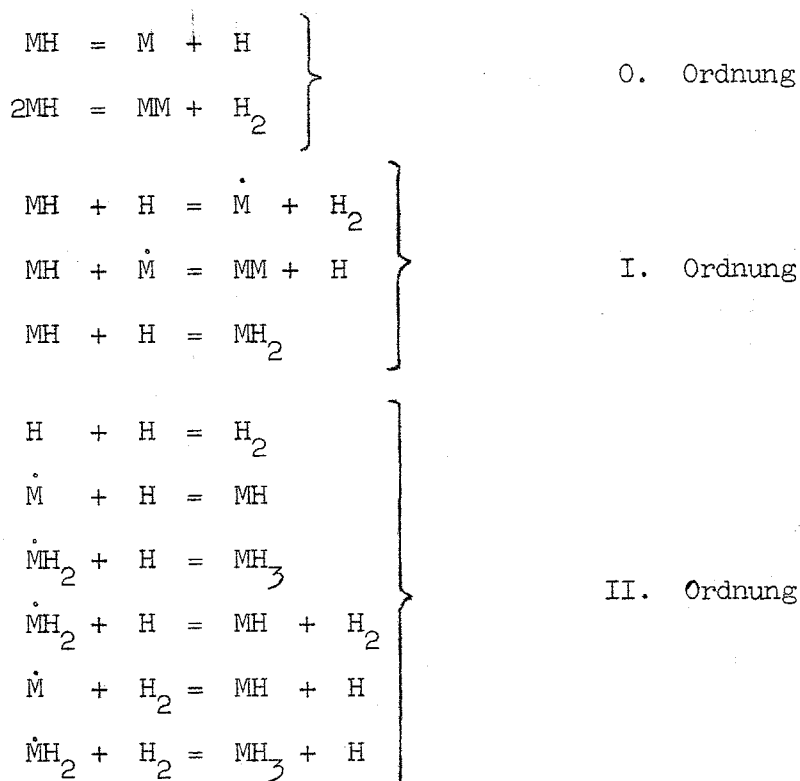
Der Mechanismus



wird von ihnen als wenig wahrscheinlich dargestellt.

Weiterhin konnten sie durch einen Vergleich der von Polyäthylen und Polybutadien aufgenommenen H₂-Mengen zeigen, daß die Anlagerung des Deuteriums an die Doppelbindungen der Polymere anscheinend nicht vor sich geht. Nach diesen Ergebnissen können die Reaktionen X und XI nicht außer Betracht gelassen werden, hingegen erscheinen die Reaktionen XII, XIII und XIV als unwahrscheinlich.

Zur Formulierung eines kinetischen Modells für die Wasserstoffabspaltung verbleiben also folgende Reaktionen:



Es kann nicht vorausgesetzt werden, daß jede dieser Reaktionen sich im gesamten Dosisbereich gleich stark manifestiert, vielmehr ist anzunehmen, daß das Ausmaß der einzelnen Reaktionen eine starke Dosisabhängigkeit aufweist. Von den Reaktionen II. Ordnung ist zu erwarten, daß sie erst bei höheren Radikalkonzentrationen größere Bedeutung gewinnen.

Für das Uracil gelten prinzipiell dieselben Überlegungen. Die beim Thymin vorhandene Methylgruppe, die als Wasserstoffdonator anzusehen ist, fehlt jedoch beim Uracil, so daß die Anlagerung von H-Atomen an die Doppelbindung nicht in Betracht zu ziehen ist. Die Klärung der Frage, ob eine Deutung der Dosiseffektcurven für die Wasserstoffabspaltung mit Hilfe der ausgewählten Reaktionen auf kinetischer Basis möglich ist, kann nur auf mathematischem Wege erfolgen (60).

3.2. G-Werte

Die durch ESR-Spektroskopie bestimmte Abhängigkeit der Spinkonzentration in einem Festkörper von der Strahlendosis wird vielfach durch die Funktion

$$C = C_{\infty} [1 - \exp. (D/D_0)]$$

wiedergegeben (27,38,61).

C = Spinkonzentration bei der Dosis D

C_{∞} = Sättigungswert der Spinkonzentration
für $D \longrightarrow \infty$

D_0 = Dosis, bei der die e-Funktion den
Wert $1/e$ annimmt

Wenn Spinkonzentration und Dosis einander nicht proportional sind, dann ist der G-Wert (Anzahl der erzeugten Spins/100 eV absorbiertes Energie) eine Funktion der Dosis. Es wird deshalb ein funktionsunabhängiger Anfangs-G-Wert G_0 definiert:

$$G_0 = \lim_{D \longrightarrow 0} (dC/dD)$$

Die Berechnung von G_0 setzt im Falle der Tritiumabspaltung aus Thymin /Uracil/ entweder einen bekannten mathematischen Zusammenhang zwischen der Tritiumaktivität in der Gasphase und der Dosis oder experimentelle Punkte im niedrigen Dosisbereich voraus.

Aufgrund der unter 3.1. angestellten Betrachtungen zeigt sich, daß eine einfache Kinetik im Sinne der obigen Exponentialfunktion für die Tritiumabspaltung nicht zu erwarten ist. Unterhalb einer Dosis von 10^5 rad (bei Thymin-(methyl-T) $5 \cdot 10^3$ rad) liegen keine Meßpunkte vor (Abb. 9). In Tab. 7 sind deshalb die dosisabhängigen G-Werte (Zahl der pro 100 eV absorbiertes Energie aus 1 g positionsmarkierter Substanz eliminierten T-Atome) zusammengestellt.

Der prozentuelle Anteil der in der Gasphase gefundenen Tritiumaktivität an der Ausgangsaktivität der tritiummarkierten Substanz vor der Bestrahlung ergibt sich durch den Ausdruck:

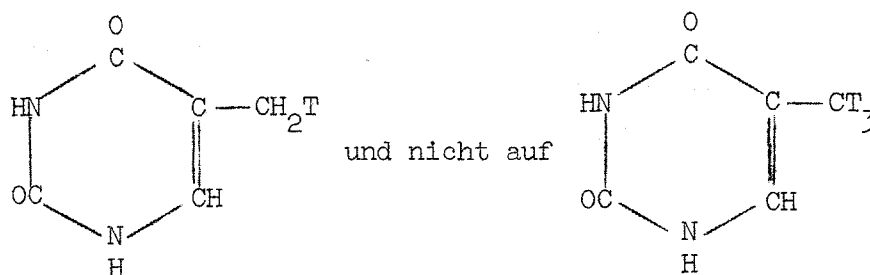
$$\text{Tritiumabspaltung in \%} = \frac{\text{T-Aktivität im Gas (Z/min.g)} \cdot 100}{\text{T-Aktivität im Festkörper (Z/min.g)}}$$

Die Zählraten bei den Dosen 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 rad können - soweit

gemessen - den Kurven in Abb. 9 entnommen werden. Die errechneten Prozentzahlen sind in Tab. 6 aufgeführt.

Beispielsweise sind beim Thymin-6-T bei der Dosis 10^6 rad $1,4 \cdot 10^{-4}$ % der ursprünglich im festen markierten Thymin vorhandenen Aktivität in die Gasphase gelangt. Es ist nicht erforderlich, die Absolutzahl der abgespaltenen T-Atome zu berechnen. Die Zahl der aus einer Position abgespaltenen T-Atome ist den aus den Zählraten errechneten Prozentzahlen proportional. Befände sich in der 6-Position des Thymins ausschließlich Tritium, dann wären in einem Gramm Thymin $4,8 \cdot 10^{21}$ T-Atome enthalten. Von diesen würden bei 10^6 rad ebenfalls $1,4 \cdot 10^{-4}$ %, also $6,7 \cdot 10^{15}$ T-Atome abgespalten. Diese Zahl mit dem Umrechnungsfaktor $1,602 \cdot 10^{-12}$ multipliziert ($1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-14}$ rad) und durch 10^6 geteilt, ergibt den in Tab. 7 eingetragenen G-Wert von 0,01.

Beim Thymin-(methyl-T) bezieht sich der Prozentsatz der Abspaltung auf



Die in Tab. 7 aufgeführten G-Werte gelten für die Abspaltung von Tritium aus einer bestimmten Position und können wegen des Isotopieeffekts nicht für die Abspaltung von H-Atomen aus derselben Position übernommen werden. Gemäß der Theorie des Isotopieeffekts dürften die G-Werte für die H-Abspaltung höher liegen als die G-Werte für die T-Abspaltung.

Die Summe der G-Werte für die einzelnen T-abspaltenden Positionen stellt ein Maß dar für die insgesamt abgespaltenen T-Atome, die in den weiteren Reaktionsverlauf nicht wieder eingreifen.

Die G-Werte für die Bildung des Hydrothymylradikals geben ein Maß für die an ungeschädigte Thyminmoleküle angelagerten H-Atome.

Läßt man den Isotopieeffekt unberücksichtigt, ließen sich durch Addition der G-Wert-Summen für die einzelnen T-abspaltenden Positionen

und der G-Werte für die Bildung des Hydrothymylradikals die G-Werte für die gesamte Wasserstoffabspaltung ermitteln, wenn nicht weitere H-Vernichtungsreaktionen, wie die Bildung von Dihydrothymin, in Betracht zu ziehen wären.

Es zeigt sich hier, daß die G-Werte für die Wasserstoffabspaltung aus Thymin nur grobe Orientierungswerte sein können, da Abspaltung und Anlagerung von H-Atomen in komplizierter Weise ineinandergreifen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Positionsmarkierte ^3H -Thymine und ^3H -Uracile wurden im festen Zustand und unter Vakuum einer ^{60}Co -Gammabestrahlung unterworfen. Die spezifische Aktivität von 0,1 mCi/g Substanz war für die Untersuchungen im Dosisbereich von 10^5 - $5 \cdot 10^8$ rad ausreichend.

Der Strahlenschaden manifestiert sich bei beiden Basen im Auftreten von Tritiumwasserstoff und Tritiumwasser. Tritiumwasserstoff entsteht aus den in C-Positionen markierten Derivaten Thymin-(methyl-T), Thymin-6-T, Uracil-6-T, Uracil-5,6-T, Tritiumwasser aus den an beiden N-Positionen markierten Derivaten Thymin-1,3-T und Uracil-1,3-T.

Die angewandte Methode führte zu gut reproduzierbaren Ergebnissen bei der Messung der Aktivität des abgespaltenen Tritiumwasserstoffs; zur Aktivitätsbestimmung des Tritiumwasserdampfs war sie wegen der Kontamination der Zählrohre nicht geeignet.

Die ermittelten Dosiseffektkurven gestatten quantitative Aussagen über die Positionsabhängigkeit der Tritiumabspaltung. Die Methylgruppe des Thymins erwies sich als Wasserstoffdonator für die Bildung des Hydrothymylradikals. Die Unterschiede zwischen den ohne und nach Sublimation der bestrahlten Substanzen bestimmten Dosiseffektkurven zeigten die Schwierigkeiten bei der Bestimmung strahleninduzierter Gase in organischen Festkörpern auf. Für die einzelnen markierten Positionen des Thymins und Uracils konnten dosisabhängige G-Werte angegeben werden. Es wurden strahleninduzierte Reaktionen diskutiert, die zur Formulierung eines kinetischen Modells für die Wasserstoffabspaltung aus Thymin und Uracil führen könnten. Ein solches Modell ließe sich als Prototyp für die Wasserstoffabspaltung auch aus anderen organischen Verbindungen heranziehen.

Zur Vervollständigung und Vertiefung der vorliegenden Ergebnisse könnten folgende Experimente dienen:

Ausdehnung der Messungen auf den Dosisbereich $< 10^5$ rad unter Verwendung markierter Substanzen mit hoher spezifischer Aktivität,

Bestimmung der Dosiseffektkurven für andere Strahlenarten,

Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der Wasserstoffabspaltung,

Bestrahlung von Thymin-(methyl-¹⁴C) zur Klärung der Frage, ob eine Entmethylierung des Thymins stattfindet,

gleichzeitige Bestrahlung von markierter Substanz und Schutzsubstanz zwecks Ermittlung des Einflusses der Schutzsubstanz auf die Wasserstoffabspaltung,

Untersuchung der Diffusion von Wasserstoff in organischen Festkörpern.

Die in dieser Arbeit erläuterte Methode gewährt Aufschlüsse über die positionsbedingte Unterschiedlichkeit der strahleninduzierten Wasserstoffabspaltung aus organischem Material. Sie vermittelt Einsichten in die während der Bestrahlung ablaufenden chemischen und physikalischen Vorgänge, liefert Hinweise auf die Art der Festkörperradikale und kann zur Unterstützung theoretischer Arbeiten über die Elektronenverteilung in organischen Verbindungen dienen.

Die Sublimierbarkeit der organischen Substanz sollte nicht Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Untersuchungsverfahrens sein. Es ist vielmehr zu hoffen, daß auch Substanzen, die unter Vakuum unzersetzt schmelzen, positive Resultate liefern werden.

Die Ergebnisse der beschriebenen Methode und die aufgezeigten Möglichkeiten für weitere Experimente lassen erkennen, daß die Aufklärung der Natur des Strahlenschadens der DNS durch Bestrahlung ihrer ³H-markierten Komponenten und Aktivitätsbestimmung der Bestrahlungsprodukte gefördert wird.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Scholes, G., Ward, J.F. und Weiss, J. (1960)
Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acids.
J. Mol. Biol. 2, 379.
2. Hems, G. (1960)
Chemical effects of ionizing radiation on deoxyribonucleic acid
in dilute aqueous solution.
Nature 186, 710.
3. Emmerson, P., Scholes, G., Thomson, D.H. et al. (1960)
Chemical effects of ionizing radiation on nucleic acids and
nucleoproteins.
Nature 187, 319.
4. Apelgot, S., Ekert, B., Latarjet, R. und Rebeyrotte, N. (1962)
Radiobiochemische Untersuchungen an Nukleinsäuren.
Strahlentherapie 118, 54.
5. Scholes, G. (1963)
The radiation chemistry of aqueous solutions of nucleic acids
and nucleoproteins.
Progress in Biophysics 13, 59.
6. Latarjet, R., Ekert, B. und Demerseman, P. (1963)
Peroxydation of nucleic acids by radiation: biological implications.
Rad. Res. Suppl. 3, 247.
7. Collyns, B., Okada, S., Scholes, G. et al. (1965)
Chain scission and hydrogen bond breakage on irradiation of DNA.
Rad. Res. 25, 526.
8. Ekert, B. und Monnier, R. (1957)
Peroxydation de la thymine par le rayons X.
Ann. Inst. Pasteur 92, 556.
9. Ekert, B. und Monnier, R. (1959)
Structure of thymine hydroperoxide produced by X-irradiation.
Nature 184, 58 B.A.
10. Scholes, G. und Weiss, J. (1960)
Organic hydroxy-hydroperoxides: a class of hydroperoxides formed
under the influence of ionizing radiations.
Nature 185, 305.
11. Ekert, B. und Monnier, R. (1960)
Effect of X-rays on cytosine in aerated aqueous solution.
Nature 188, 309.

12. Ekert, B. (1962)
Effect of gamma rays on thymine in de-aerated aqueous solution.
Nature 194, 278.
13. Conlay, J.J. (1963)
Effect of ionizing radiation on adenine in aerated and de-aerated
aqueous solutions.
Nature 197, 555.
14. Zimmer, K.G., Ehrenberg, L. und Ehrenberg, A. (1957)
Nachweis langlebiger magnetischer Zentren in bestrahlten bio-
logischen Medien und deren Bedeutung für die Strahlenbiologie.
Strahlentherapie 103, 3.
15. Shields, H. und Gordy, W. (1959)
Electron spin resonance studies of radiation damage to the nucleic
acids and their constituents.
Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 269.
16. Zimmer, K.G. (1960)
Studien zur quantitativen Strahlenbiologie.
Akad. Wiss. Lit. (Mainz), Abh. Math. Naturw. Klasse 3.
17. Müller, A. (1962)
The efficiency of radical production by X-rays in dry proteins
and nucleic acids.
Int. J. Rad. Biol. 5, 199.
18. Ehrenberg, A., Ehrenberg, L. und Löfroth, G. (1963)
Thymidine-like electron spin resonance spectra in gamma-irradiated
deoxyribonucleic acid.
Nature 200, 376.
19. Salovey, R., Shulman, R.G. und Walsh, W.M. jr. (1963)
Electron spin resonance of irradiated DNA.
J. Chem. Phys. 39, 839.
20. Van de Vorst, A. (1964)
Stabilité des radicaux libres induits par le rayonnement gamma
du ⁶⁰Co dans l'acide déoxyribonucléique.
Int. J. Rad. Biol. 8, 111.
21. Van de Vorst, A. und Villée, F. (1964)
Sur la nature des radicaux libres induits par le rayonnement X
dans l'acide déoxyribonucléique l'état solide.
C. R. Acad. Sci., Paris, 259, 928.
22. Pershan, P., Shulman, R., Wyluda, B. und Eisinger, J. (1964)
Electron spin resonance of irradiated DNA.
Physics 1, 163.

23. Van de Vorst, A. und Richir, M. (1965)
Sur l'identification des radicaux libres induits par le rayonnement X dans l'acide déoxyribonucléique.
C. R. Acad. Sci., Paris, 260, 6458.
24. Van de Vorst, A. und Krsmanovic-Simic, D. (1965)
Sur la localisation des radicaux libres induits par le rayonnement ionisant dans l'acide déoxyribonucléique en phase solide.
C. R. Acad. Sci., Paris, 262, 2288.
25. Ormerod, M.G. (1965)
Free-radical formation in irradiated deoxyribonucleic acid.
Int. J. Rad. Biol. 9, 291.
26. Cook, J.B. und Wyard, S.J. (1966)
Electron spin resonance study of thermal effects in irradiated deoxyribonucleic acid.
Nature 210, 526.
27. Müller, A. und Köhnlein, W. (1964)
Quantitative ESR-measurements of radiation-induced radicals in nucleosides.
Int. J. Rad. Biol. 8, 121.
28. Müller, A. (1964)
Quantitative ESR-measurements of radiation induced radicals in nucleotides.
Int. J. Rad. Biol. 8, 131.
29. Köhnlein, W. und Müller, A. (1964)
Quantitative ESR-measurements of radiation-induced radicals in nucleic-acid bases and pentoses.
Int. J. Rad. Biol. 8, 141.
30. Lacroix, M. und Williams-Dorlet, C. (1964)
Sur le radicaux libres induits dans la thymidine tritée ou irradiée les rayonnements X et gamma.
C. R. Acad. Sci., Paris, 259, 1771.
31. Lacroix, M. und Van de Vorst, A. (1964)
Sur le déterminisme de la radiorésistance des nucleotides en phase solide.
C. R. Acad. Sci., Paris, 259, 2027.
32. Müller, A. (1964)
Spektrographische Untersuchungen mittels paramagnetischer Elektronenresonanz über die Wirkung ionisierender Strahlen auf elementare biologische Objekte.
Akad. Wiss. Lit. (Mainz) Abh. Math. Naturw. Klasse 5.

33. Gordy, W., Pruden, B. und Snipes, W. (1965)
Some radiation effects on DNA and its constituents.
Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 751.
34. Pruden, B., Snipes, W. und Gordy W. (1965)
Electron spin resonance of an irradiated single crystal of thymidine.
Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 917.
35. Herak, J.N. und Gordy, W. (1965)
Free radicals formed by hydrogen atom bombardement of the nucleic-acid bases.
Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1287.
36. Heller, H.C. und Cole, T. (1965)
The reaction of hydrogen atoms with thymine and DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1486.
37. Zimmer, K.G. und Müller, A. (1965)
New light on radiation biology from electron spin resonance studies. In "Current Topics in Radiation Research" (M. Ebert and A. Howard, eds.), Vol. 1, 1-47, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
38. Holmes, D.E., Myers, L.S. und Ingalls, R.B. (1966)
Electron spin resonance technique for investigating reactions of free radicals with compounds of biological interest: nucleic acid constituents.
Nature 209, 1017.
39. Pietsch, E. (1967)
Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen an α - und γ -bestrahltem Thymin, Uracil und Adenin.
Dissertation, Universität Heidelberg.
40. Müller, A. (1967)
The formation of radicals in nucleic acids, nucleoproteins and their constituents by ionizing radiations.
Progress in Biophysics 17, 99.
41. Wenzel, M. und Schulze, P.E. (1962)
Tritium-Markierung. Darstellung, Messung und Anwendung nach Wilzbach ³H-markierter Verbindungen, Walter de Gruyter u. Co., Berlin.
42. Fink, R.M. (1964)
Studies of isotope distribution in tritiated pyrimidines.
Arch. Biochem. Biophys. 107, 493.
43. Evans, E.A. (1966)
Tritium and its Compounds, Butterworth, London.

44. Verly, W.G. und Hunebelle, G. (1957)
Préparation de thymidine marquée avec tritium.
Bull. Soc. Chim. Belg. 66, 640.
45. Taylor, H., Woods, P.S. und Hughes, W.L. (1957)
The organization and duplication of chromosomes as revealed by
autoradiographic studies using tritium labeled thymidine.
Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 122.
46. Crowter, D.G., Evans, E.A. und Lambert, R.W. (1960)
Tritium-labelled thymidine.
Chemistry and Industry 899.
47. Le Page, G.A. und Junga, I.G. (1965)
Labelling of nucleosides with tritium.
Can. J. Chem. 43, 1279.
48. Jacobs, S.S. (1962)
The solid state gamma irradiation of crystalline amino acids
and sugars.
Thesis, Univ. of Colorado.
49. Simon, H. (1963)
Z. Naturf. 18b, 360.
Die Tritium-Verteilung in Zuckern nach Wilzbach-Markierung.
50. Bignardi, G., Boeykens, W. und Carpentero, L. (1963)
Synthèse de thymine-(methyl- ^{14}C) et thymidine (methyl- ^{14}C).
BLG-356.
51. Evans, E.A. und Stanford, F.G. (1963)
Decomposition of tritium-labelled organic compounds.
Nature 197, 551.
52. Schieferdecker, H. (1966)
Nachweis von Tritium im Urin.
Externer Bericht Nr. 23/66-1 der Gesellschaft für Kernforschung,
Karlsruhe.
53. Gerdil, R. (1961)
The crystal structure of thymine monohydrate.
Acta Cryst. 14, 333.
54. Kossel A. und Neumann, A. (1893)
Über das Thymin, ein Spaltungsprodukt der Nukleinsäure.
Ber. 26, 2753.
55. Spornol, A. und Denecke, B. (1964)
Präzise Absolutmessung der Aktivität von Tritium.
Int. J. Appl. Rad. Isot. 15, 139.

56. Braams, R. (1963)
A mechanism for the direct action of ionizing radiations.
Nature 200, 752.
57. Dole, M., Williams, D.C. und Arvia, A.J. (1958)
The radiation chemistry of a typical macromolecule, polyethylene.
Proc. Int. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva, Paper
818.
58. Hey, Th.
zitiert von Braams (56).
59. Varshavskii, Ia. M., Vasilev, G. Ia., Karpov, V.L., Lazurkin,
Iu. S. und Petrov, I. Ia. (1958)
Der Isotopenaustausch zwischen gasförmigem Wasserstoff und
festen Polymeren unter der Einwirkung von Kernstrahlung.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 118, 315.
60. Heitkamp, D., Merwitz, O. und Späth, H.
Zur Kinetik der Wasserstoffabspaltung aus γ -bestrahltem Thymin.
In Vorbereitung.
61. Rotblat, J. und Simmons, J.A. (1963)
Dose-response relationship in the yield of radiationinduced free
radicals in amino acids.
Phys. Med. Biol. 7, 489.

Tab. 1: Die Aktivitäten der positionsmarkierten ^3H -Thymine und ^3H -Uracile

Substanz	Lieferfirma	Spez. Akt. d. gelösten Substanz in Ci/mM	Gesamtakt. d. Lösungen in mCi	Zersetzungsrate	Alter der Lösungen in Monaten	Gemessene spez. Akt. d. festen Substanzen in $\mu\text{Ci/g}$
Thymin-(methyl-T)	Amersham ⁺⁾	15,7	5	10% pro Jahr bei 0°C	8,5	494
Thymin-6-T	NEN ⁺⁺⁾	3,0	1	keine Angabe	13,3	91
Thymin-1,3-T	-	-	-	-	-	42
Uracil-5,6-T	Amersham	1,0	1	1% pro Monat bei 0°C	4,7	96
Uracil-6-T	NEN	9,65	1	keine Angabe	0,7	100
Uracil-1,3-T	-	-	-	-	-	47

+) The Radiochemical Centre Amersham

++) New England Nuclear Corporation, Boston

Tab. 2: Meßwerte zu den Dosiseffektkurven in Abb. 9

Thymin-(methyl-T)		Thymin-6-T	
Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)	Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)
$5,40 \cdot 10^3$	$1,46 \cdot 10^3$	$2,02 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^2$
$1,31 \cdot 10^5$	$2,60 \cdot 10^3$	$5,30 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^2$
$4,18 \cdot 10^5$	$4,10 \cdot 10^3$	$1,10 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^2$
$1,12 \cdot 10^6$	$5,64 \cdot 10^3$	$1,96 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^2$
$2,90 \cdot 10^6$	$9,60 \cdot 10^3$	$4,20 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^2$
$6,56 \cdot 10^6$	$1,80 \cdot 10^4$	$6,75 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^2$
$1,05 \cdot 10^7$	$2,32 \cdot 10^4$	$1,28 \cdot 10^7$	$9,1 \cdot 10^2$
$2,53 \cdot 10^7$	$4,66 \cdot 10^4$	$3,00 \cdot 10^7$	$1,98 \cdot 10^3$
$4,55 \cdot 10^7$	$9,82 \cdot 10^4$	$4,99 \cdot 10^7$	$3,10 \cdot 10^3$
$6,83 \cdot 10^7$	$1,39 \cdot 10^5$	$7,85 \cdot 10^7$	$4,56 \cdot 10^3$
$1,01 \cdot 10^8$	$1,88 \cdot 10^5$	$1,09 \cdot 10^8$	$5,80 \cdot 10^3$
$1,47 \cdot 10^8$	$2,25 \cdot 10^5$	$2,65 \cdot 10^8$	$1,42 \cdot 10^4$
$5,78 \cdot 10^8$	$8,67 \cdot 10^5$	$5,02 \cdot 10^8$	$2,77 \cdot 10^4$

Tab. 3: Meßwerte zu den Dosiseffektcurven in Abb. 9

Uracil-5,6-T		Uracil-6-T	
Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)	Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)
$1,32 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^2$	$6,51 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^2$
$1,05 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^2$	$3,02 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^2$
$4,80 \cdot 10^6$	$9,6 \cdot 10^2$	$1,00 \cdot 10^7$	$6,6 \cdot 10^2$
$2,32 \cdot 10^7$	$1,30 \cdot 10^3$	$2,42 \cdot 10^7$	$8,1 \cdot 10^2$
$5,00 \cdot 10^7$	$1,50 \cdot 10^3$	$1,16 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^3$
$1,16 \cdot 10^8$	$1,85 \cdot 10^3$	$3,57 \cdot 10^8$	$3,20 \cdot 10^3$
$3,10 \cdot 10^8$	$3,08 \cdot 10^3$	$5,41 \cdot 10^8$	$4,29 \cdot 10^3$
$5,05 \cdot 10^8$	$4,93 \cdot 10^3$		

Tab. 4: Meßwerte zu den Dosiseffektkurven in Abb. 10 und 11

Thymin- (methyl-T)		Thymin-6-T	
Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)	Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)
$1,31 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^2$	$6,75 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^2$
$4,18 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^3$	$1,28 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^2$
$1,12 \cdot 10^6$	$2,64 \cdot 10^3$	$3,00 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^2$
$2,90 \cdot 10^6$	$5,50 \cdot 10^3$	$4,99 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^3$
$6,56 \cdot 10^6$	$8,90 \cdot 10^3$	$7,85 \cdot 10^7$	$2,97 \cdot 10^3$
$1,05 \cdot 10^7$	$1,56 \cdot 10^4$	$1,09 \cdot 10^8$	$3,92 \cdot 10^3$
$2,53 \cdot 10^7$	$3,08 \cdot 10^4$	$2,65 \cdot 10^8$	$1,22 \cdot 10^4$
$4,55 \cdot 10^7$	$6,21 \cdot 10^4$	$5,02 \cdot 10^8$	$2,38 \cdot 10^4$
$6,83 \cdot 10^7$	$9,32 \cdot 10^4$		
$1,01 \cdot 10^8$	$1,22 \cdot 10^5$		
$1,47 \cdot 10^8$	$1,88 \cdot 10^5$		
$5,78 \cdot 10^8$	$7,40 \cdot 10^5$		

Tab. 5: Meßwerte zu den Dosiseffektkurven in Abb. 12 und 13

Uracil-5,6-T		Uracil-6-T	
Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)	Dosis (rad)	T-Aktivität (Z/min·g)
$4,80 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^2$	$2,42 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^2$
$2,32 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^2$	$1,16 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^2$
$5,00 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^2$	$3,57 \cdot 10^8$	$9,4 \cdot 10^2$
$1,16 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^2$	$5,41 \cdot 10^8$	$1,34 \cdot 10^3$
$3,10 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^3$		
$5,05 \cdot 10^5$	$1,38 \cdot 10^3$		

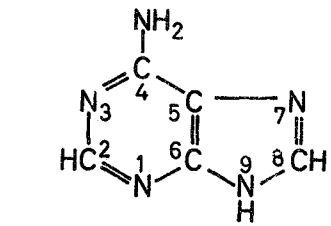
Tab. 6: Tritiumabspaltung in Prozent

	10^5	10^6	10^7	10^8 (rad)
Thymin-(methyl-T)	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$5,3 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$
Thymin-6-T	-	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
Uracil-5,6-T	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$8,1 \cdot 10^{-4}$
Uracil-6-T	-	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$5,3 \cdot 10^{-4}$

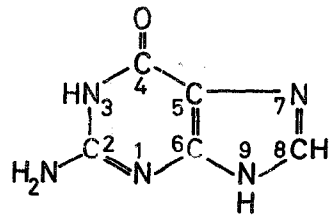
Tab. 7: Dosisabhängige G-Werte für die Tritiumabspaltung

	10^5	10^6	10^7	10^8 (rad)
Thymin-(methyl-T)	0,1689	0,0407	0,0160	0,0122
Thymin-6-T	-	0,0107	0,0039	0,0019
Uracil-5,6-T	0,4480	0,0604	0,0086	0,0014
Uracil-6-T	-	0,0180	0,0026	0,0004

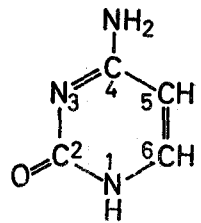
Abb.1 Purin- und Pyrimidinbasen der Nucleinsäuren.



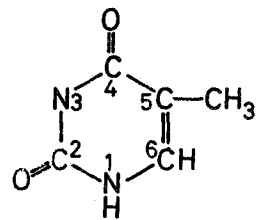
Adenin



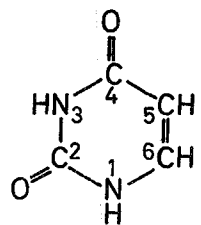
Guanin



Cytosin



Thymin



Uracil

Abb.2 Destillierbrücke

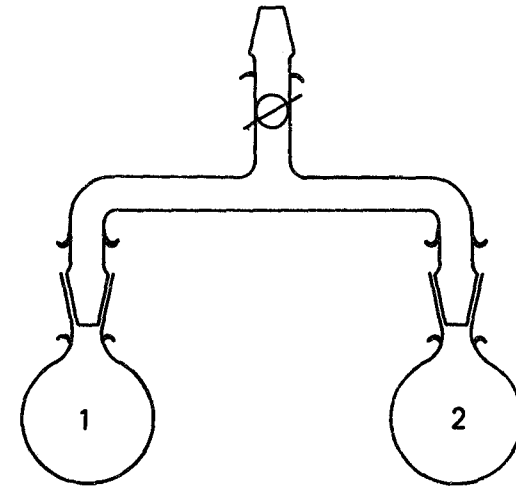


Abb.3 Sublimationsanordnung

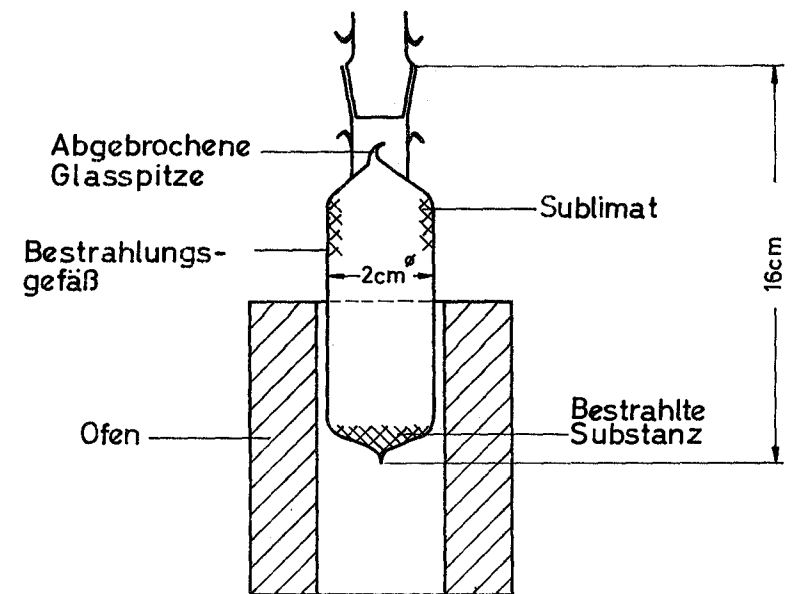


Abb. 4 Extinktion E der 10^{-4} molaren wässrigen Lösungen von nicht sublimiertem und sublimiertem Thymin(Uracil) in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ [$m\mu$]

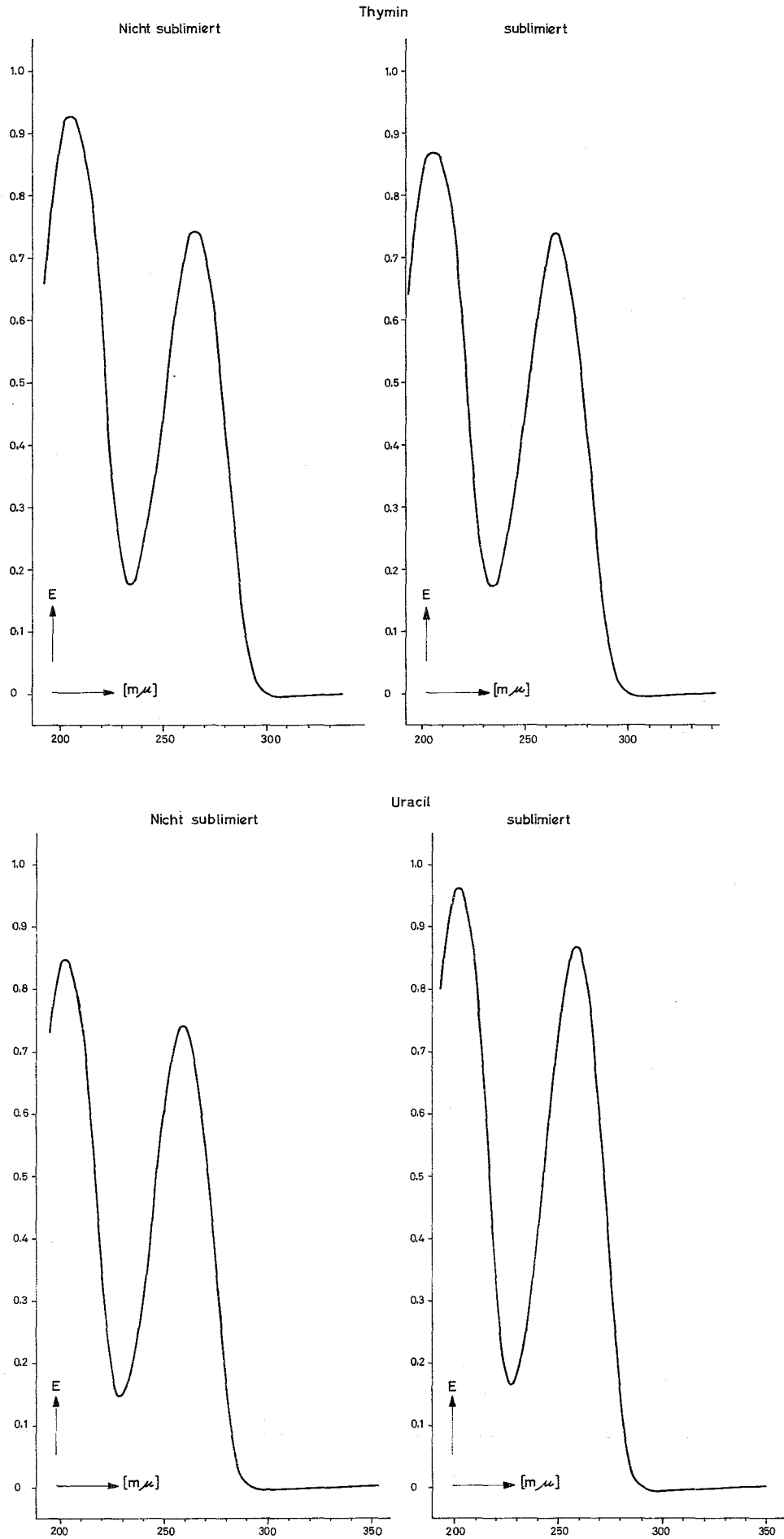


Abb. 5 Radikalkonzentrationen bestrahlter Pyridiminbasen nach Müller (31)

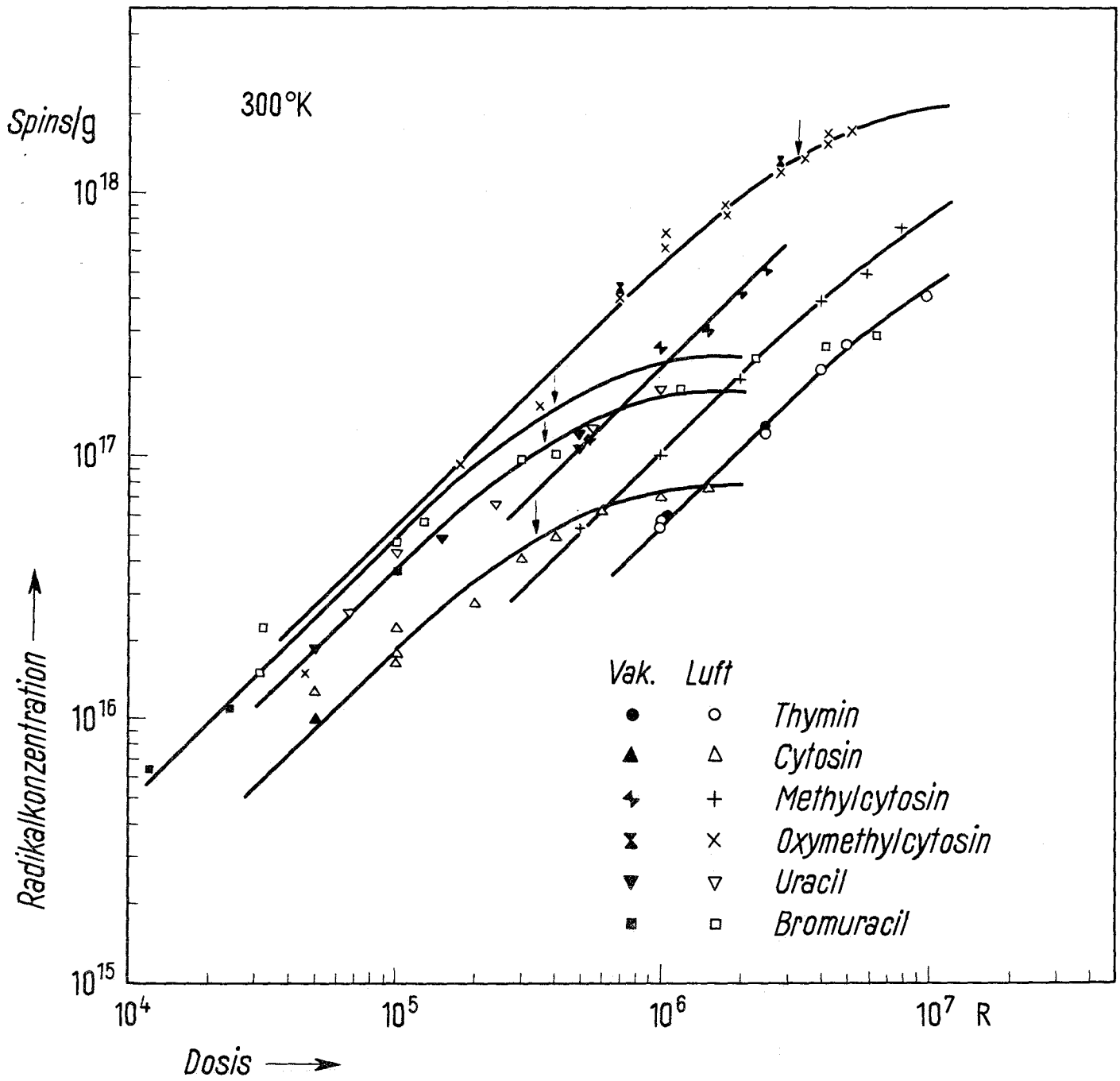
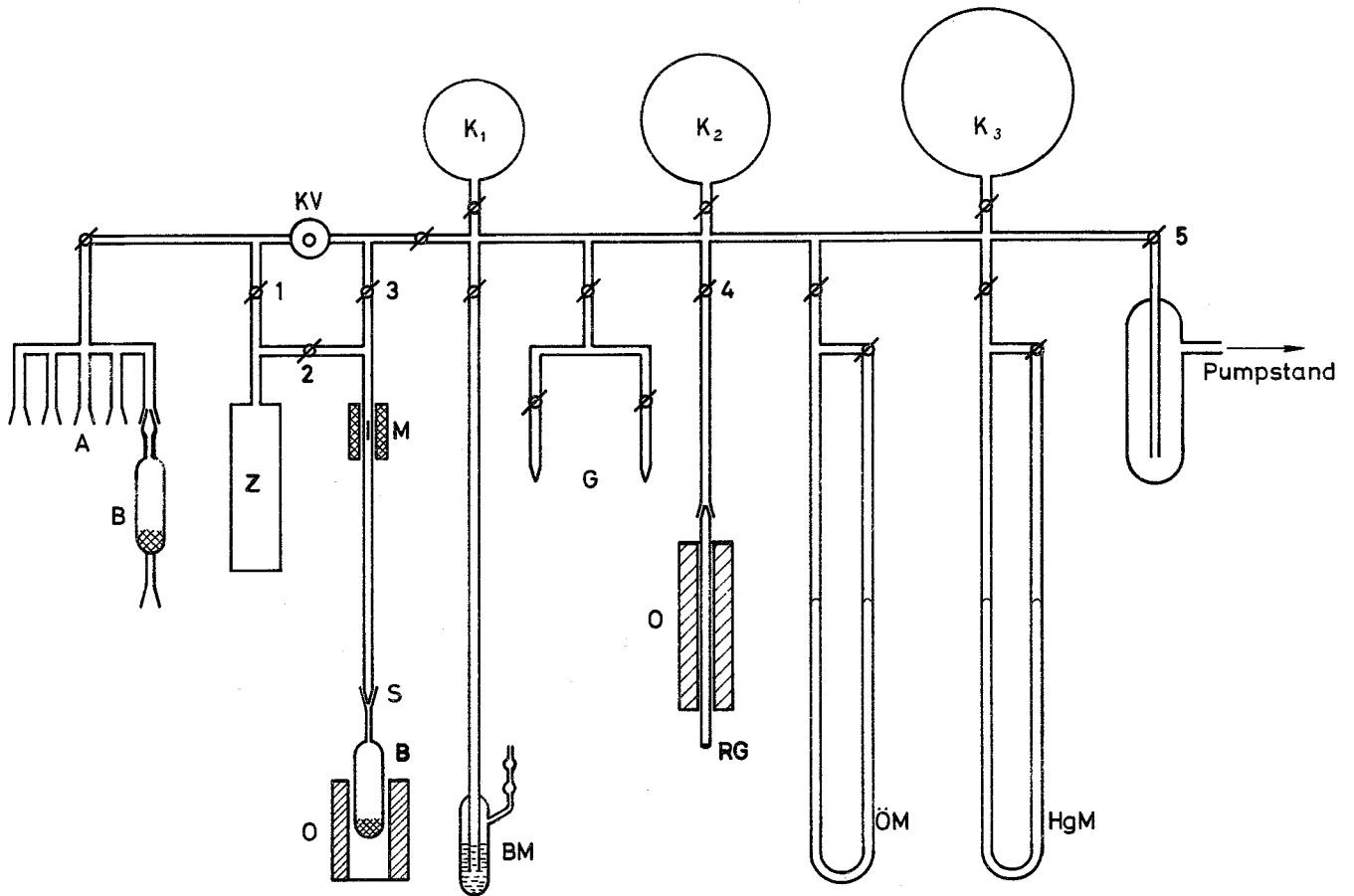


Abb.6 Schematische Skizze der Versuchsanordnung



A = Anschlüsse zum Evakuieren der Bestrahlungsgefäße

KV = Kompressionsvakuumeter nach Moser (drehbar)

B = Bestrahlungsgefäße (Abb. 3)

BM = Blubbermanometer

RG = Reaktionsgefäß für die HTO-Umsetzung mit Zink (Abb.8)

HgM = Quecksilbermanometer

K₁, K₂, K₃ = Kolben verschiedener Größen

Z = Zählrohr

M = Magnet

S = Schliff

G = Gaseinlaß

O = Ofen

ÖM = Ölmanometer

Abb. 7 Abfall der Zählrate

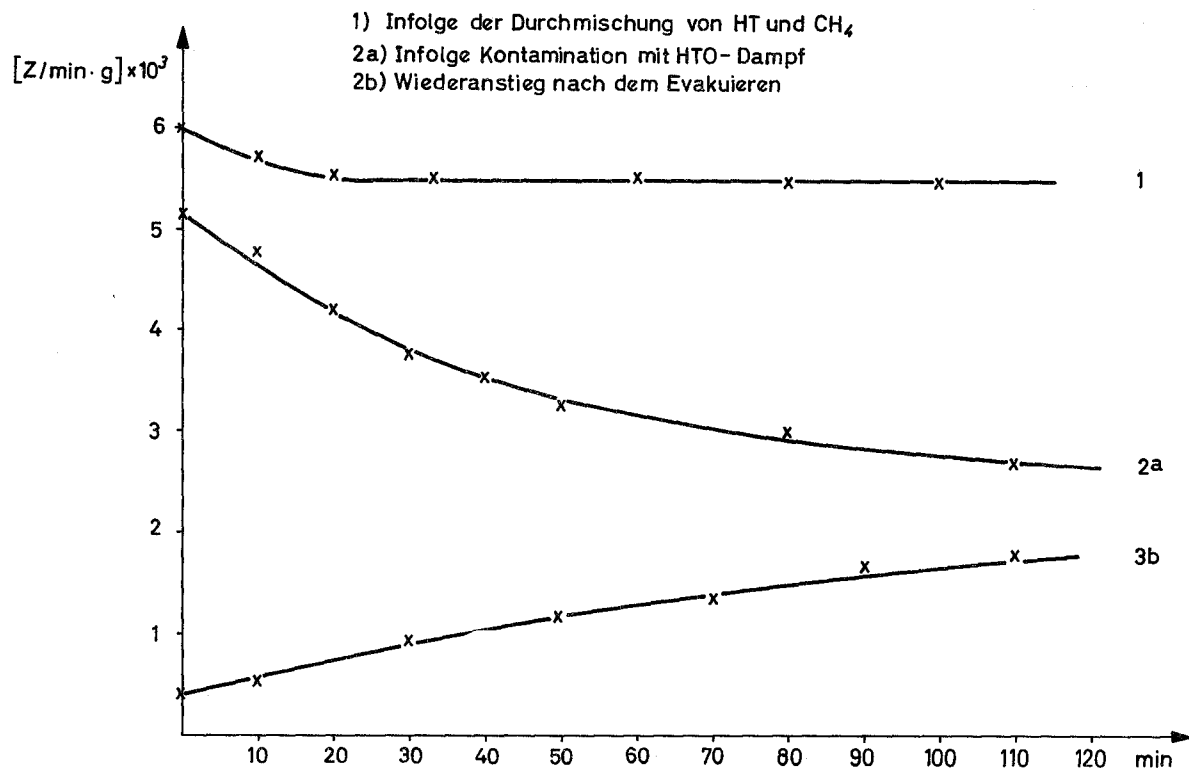
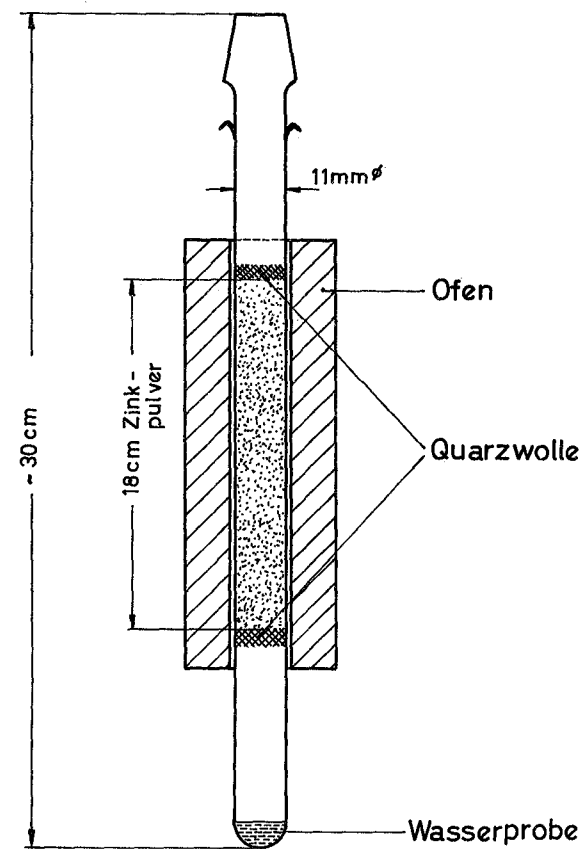
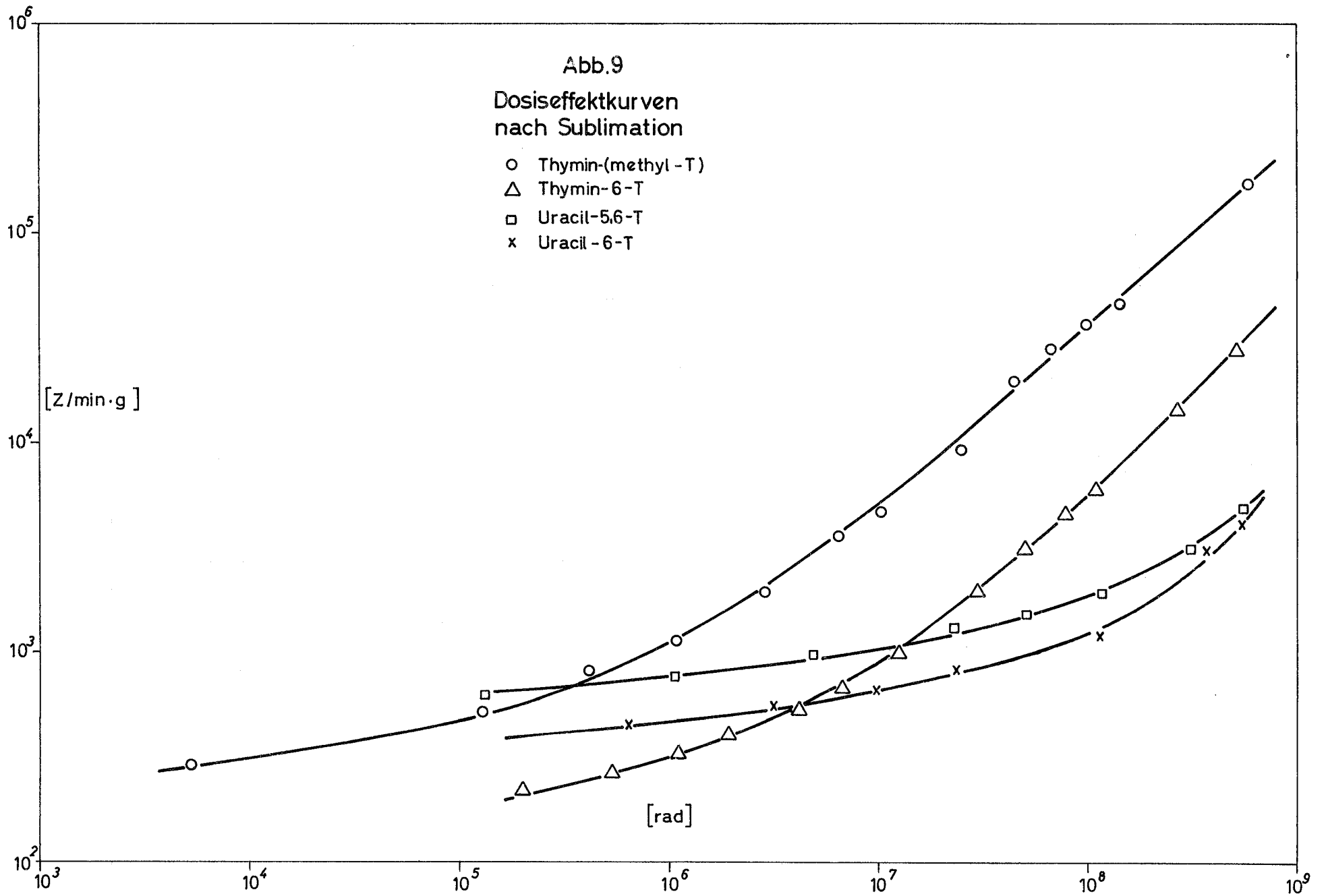
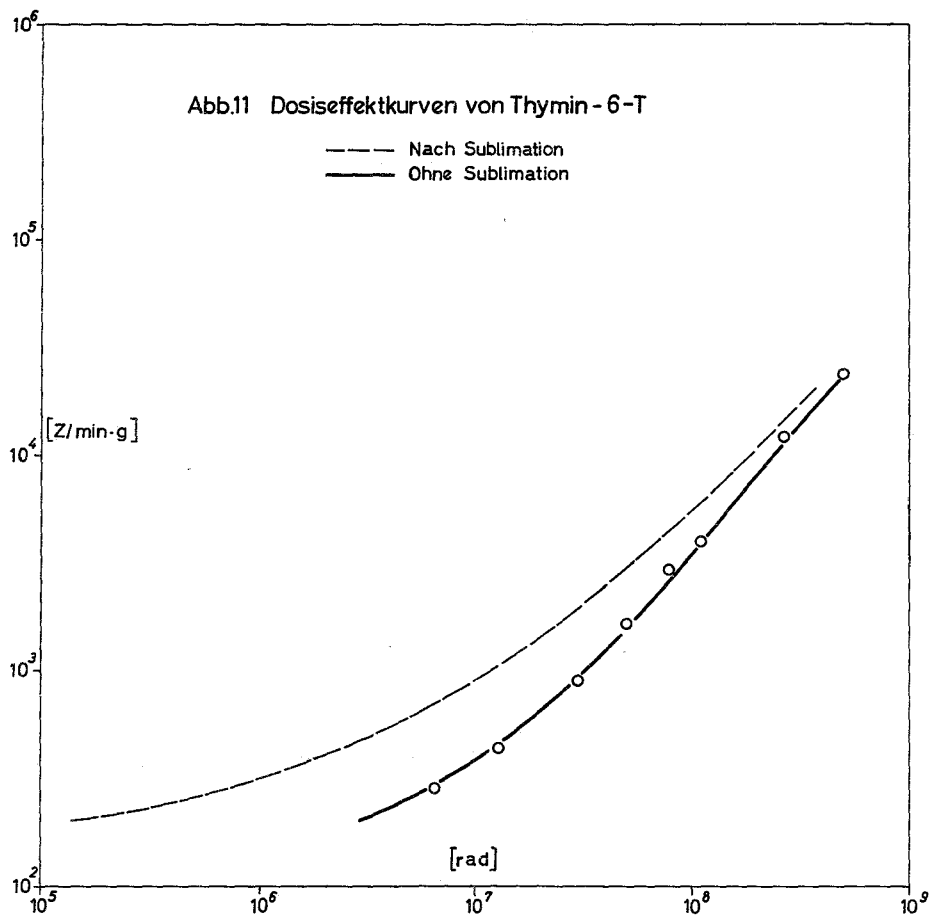
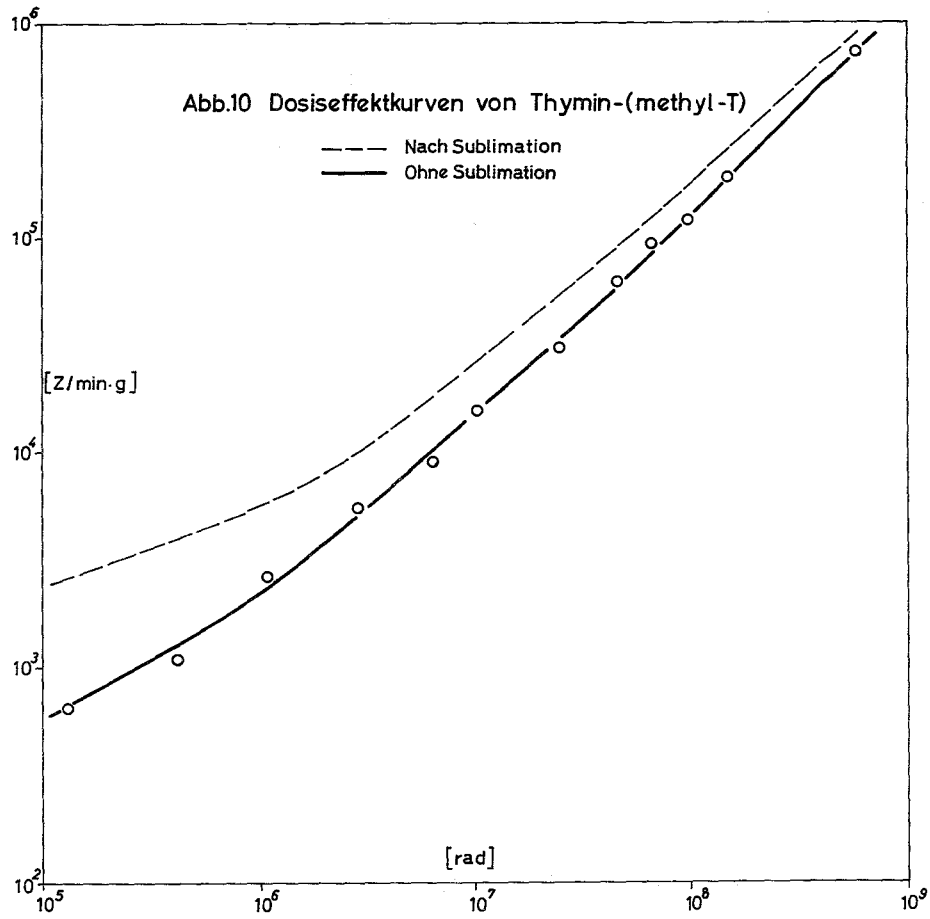


Abb. 8 Reaktionsgefäß
 (Nach Spornol u. Denecke)







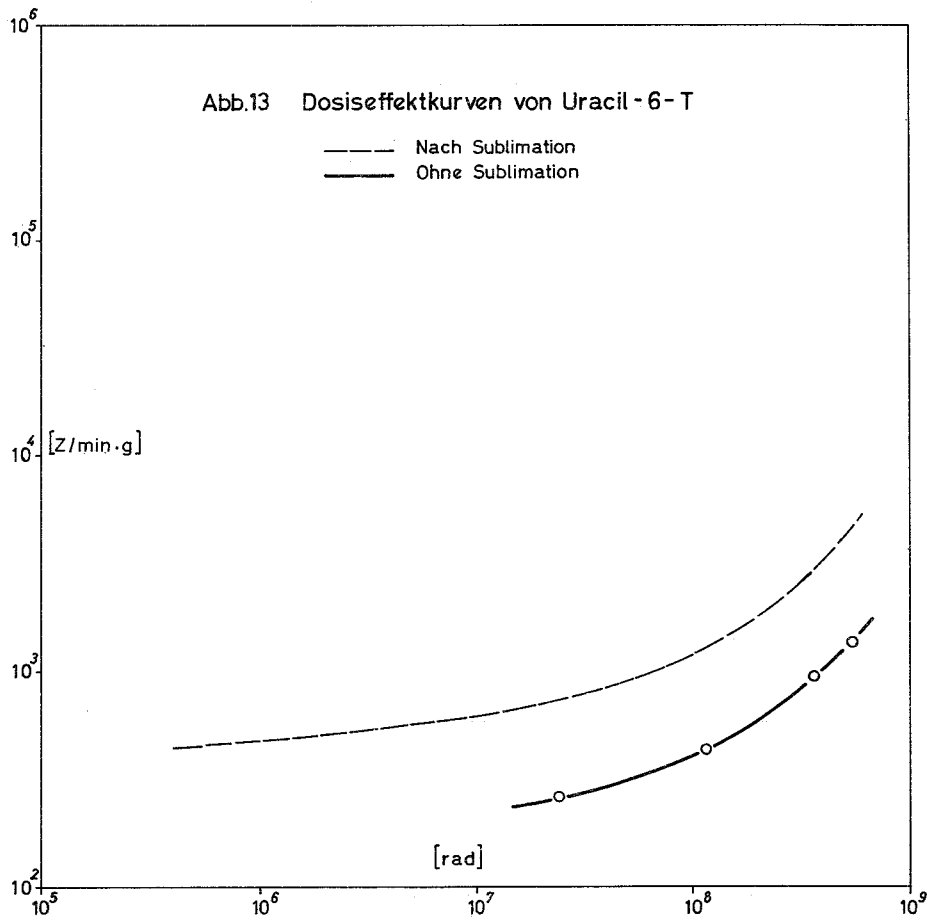
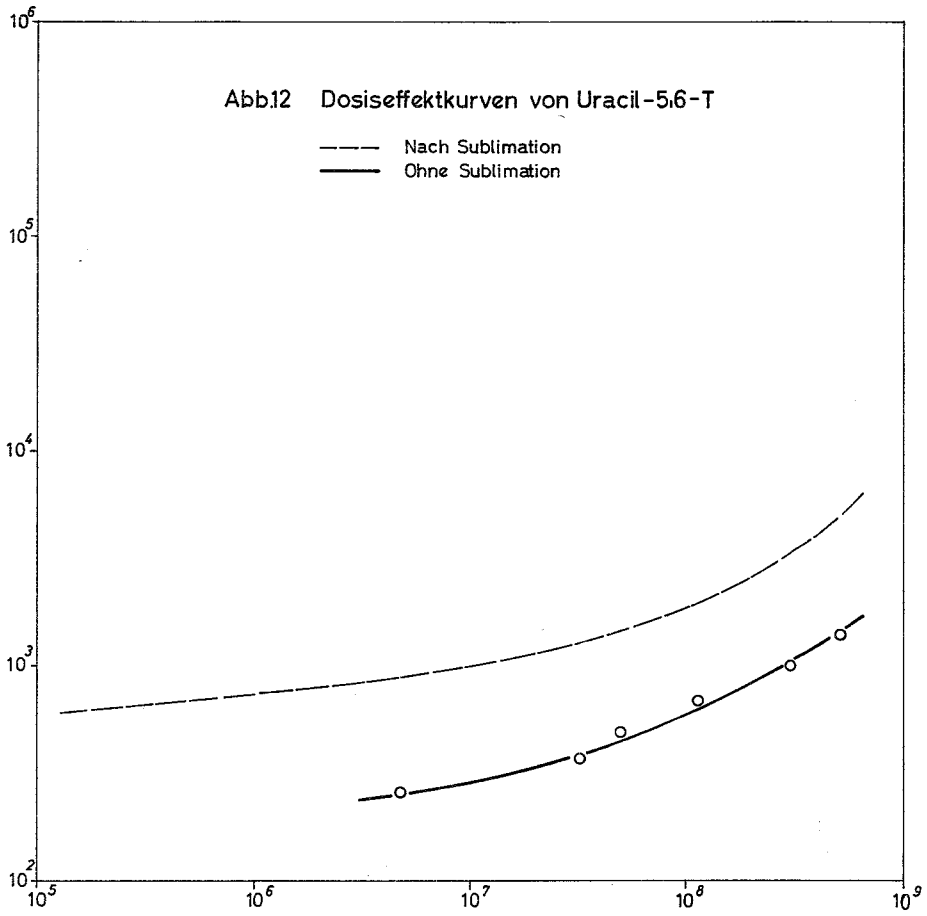


Abb.14 Ausheizkurve von Thymin-(methyl-T)

Dosis $2.1 \cdot 10^7$ rad

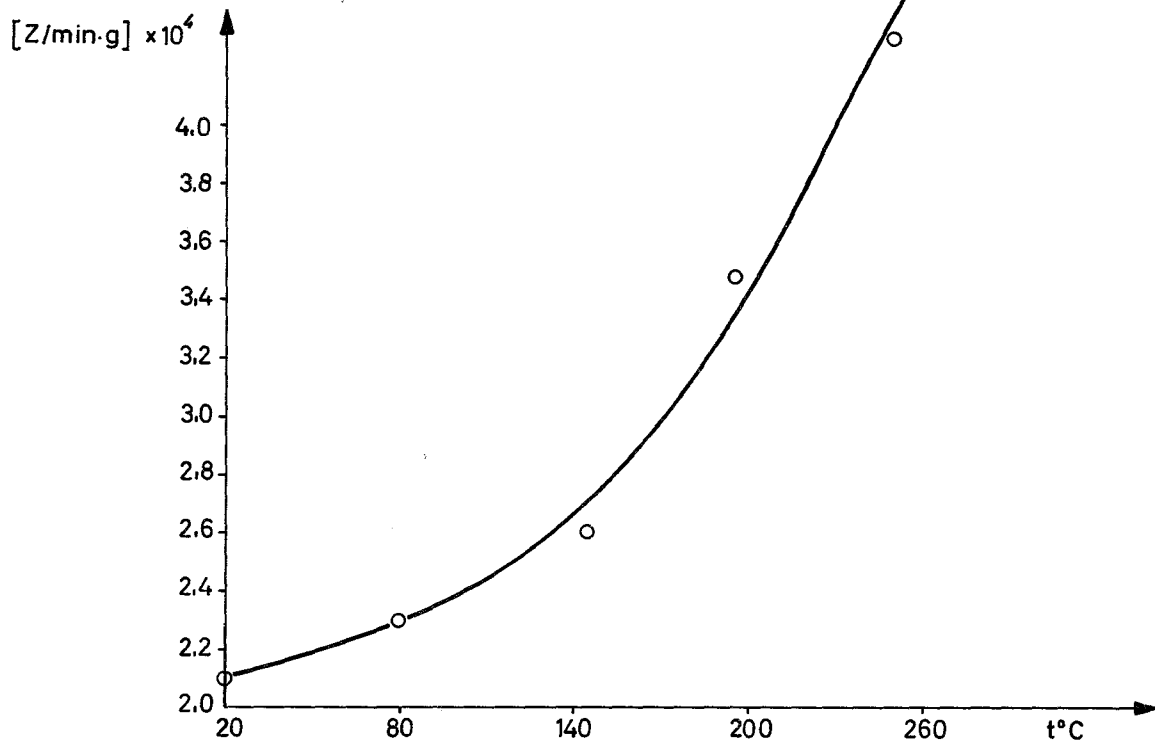


Abb.15 Ausheizkurve von Uracil-6-T

Dosis $3.5 \cdot 10^8$ rad

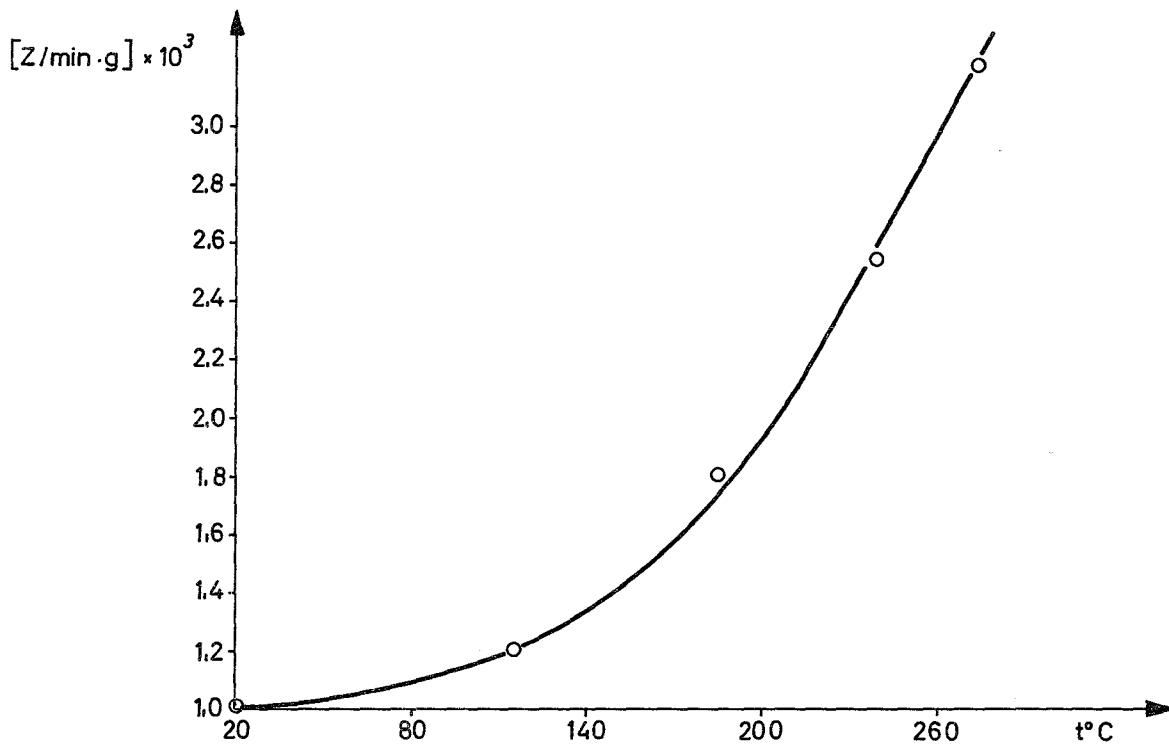


Abb.16 Temperaturabhängigkeit von $\log [Z/\text{min}\cdot\text{g}]$

Thymin - (methyl - T)

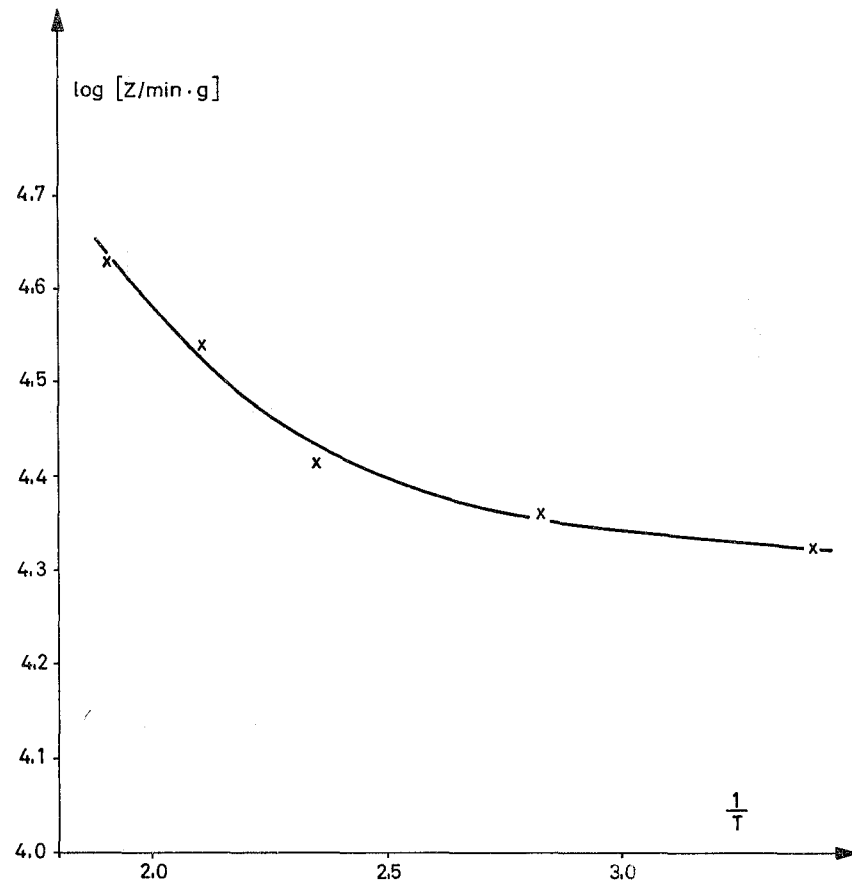


Abb.17 Temperaturabhängigkeit von $\log [Z/\text{min}\cdot\text{g}]$

Uracil-6-T

