

EUR 4732 d

KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN

**ERKENNUNG UND BEHANDLUNG
VON STRAHLENSCHÄDEN BEIM MENSCHEN**

von

T.M. FLIEDNER

1971



Bericht abgefasst von der
Universität Ulm, Schwerpunktgruppe Hämatologie, Ulm - Deutschland
im Rahmen des Vertrages

Euratom/Land Baden-Württemberg Nr. 072-68-1 BIOD

HINWEIS

Das vorliegende Dokument ist im Rahmen des Forschungsprogramms der Kommission der Europäischen Gemeinschaften ausgearbeitet worden.

Es wird darauf hingewiesen, daß die Kommission der Europäischen Gemeinschaften, ihre Vertragspartner und die in deren Namen handelnden Personen :

keine Gewähr dafür übernehmen, daß die in diesem Dokument enthaltenen Informationen richtig und vollständig sind, oder daß die Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen, oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden und Verfahren nicht gegen gewerbliche Schutzrechte verstößt;

keine Haftung für die Schäden übernehmen, die infolge der Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen, oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden oder Verfahren entstehen könnten.

Dieser Bericht wird in den auf der vierten Umschlagseite genannten Vertriebsstellen

zum Preise von	FB 125,—
----------------	----------

verkauft.

Es wird gebeten, bei Bestellungen die EUR-Nummer und den Titel anzugeben, die auf dem Umschlag jedes Berichts aufgeführt sind.

Gedruckt von Guyot, s.a., Brüssel
Luxemburg, Dezember 1971

Das vorliegende Dokument wurde an Hand des besten Abdruckes vervielfältigt, der zur Verfügung stand.

EUR 4732 d**ERKENNUNG UND BEHANDLUNG VON STRAHLENSCHÄDEN BEIM MENSCHEN** von T.M. FLIEDNER

Kommission der Europäischen Gemeinschaften
Bericht abgefasst von der Universität Ulm, Ulm (Deutschland)
Schwerpunktgruppe Hämatologie
im Rahmen des Vertrages
Euratom/Land Baden-Württemberg Nr. 072-68-1 BIOD
Luxemburg, Dezember 1971 - 84 Seiten - 28 Abbildungen - B.Fr. 125,—

Die Arbeiten basieren auf zwei Problemkreisen, die von primärer Bedeutung sind für das Verständnis der Strahlenschädigung.

Der *erste Problemkreis* befaßt sich mit der Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer hämatologischer Methoden, die für die Erkennung von Strahlenschäden von Bedeutung sind. Dabei interessieren sowohl einmalige, als auch wiederholte und auch chronische Strahlenbelastungen durch externe Strahlenquellen oder durch inkorporierte, radioaktive Isotope von unterschiedlicher Energie und Dosisleistung.

EUR 4732 d**DIAGNOSIS AND THERAPY OF RADIATION INJURIES OF MEN** by T.M. FLIEDNER

Commission of the European Communities
Report prepared by the University of Ulm, Ulm (Germany)
Schwerpunktgruppe Hämatologie
under contract
Euratom/Land Baden-Württemberg No. 072-68-1 BIOD
Luxembourg, December 1971 - 84 Pages - 28 Figures - B.Fr. 125.—

The work is based on two groups of problems which are of primary importance for the understanding of radiation damage.

The *first group* is concerned with the improvement of existing and the development of new haematological methods of importance in the diagnosis of radiation damage. Of interest in this connection is isolated as well as repeated and chronic radiation exposure from external radiation sources or from incorporated radioactive isotopes of varying energy and dose rate.

EUR 4732 d**DIAGNOSIS AND THERAPY OF RADIATION INJURIES OF MEN** by T.M. FLIEDNER

Commission of the European Communities
Report prepared by the University of Ulm, Ulm (Germany)
Schwerpunktgruppe Hämatologie
under contract
Euratom/Land Baden-Württemberg No. 072-68-1 BIOD
Luxembourg, December 1971 - 84 Pages - 28 Figures - B.Fr. 125.—

The work is based on two groups of problems which are of primary importance for the understanding of radiation damage.

The *first group* is concerned with the improvement of existing and the development of new haematological methods of importance in the diagnosis of radiation damage. Of interest in this connection is isolated as well as repeated and chronic radiation exposure from external radiation sources or from incorporated radioactive isotopes of varying energy and dose rate.

EUR 4732 d**DIAGNOSIS AND THERAPY OF RADIATION INJURIES OF MEN** by T.M. FLIEDNER

Commission of the European Communities
Report prepared by the University of Ulm, Ulm (Germany)
Schwerpunktgruppe Hämatologie
under contract
Euratom/Land Baden-Württemberg No. 072-68-1 BIOD
Luxembourg, December 1971 - 84 Pages - 28 Figures - B.Fr. 125.—

The work is based on two groups of problems which are of primary importance for the understanding of radiation damage.

The *first group* is concerned with the improvement of existing and the development of new haematological methods of importance in the diagnosis of radiation damage. Of interest in this connection is isolated as well as repeated and chronic radiation exposure from external radiation sources or from incorporated radioactive isotopes of varying energy and dose rate.

Der *zweite Problembereich* beschäftigt sich mit der Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer klinischer Methoden, die von Bedeutung sind für die Behandlung von Strahlenschäden der Blutzellbildung des Menschen und jener sekundären Komplikationen, die als Konsequenz der Zerstörung der Blutzellbildung zu beobachten sind sowie ihrer experimentellen Grundlagen.

Derartige Forschungsthemen können nur dann sinnvoll bearbeitet werden, wenn sie von einer experimentellen Grundlagenforschung begleitet werden: Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik und Therapie von Strahlenbelastungen sind nur in dem Masse zu erzielen, in dem es gelingt, die Physiologie der hämopoetischen Zellsysteme einschließlich Umsatzkinetik und Regulation zu erfassen. Aus diesem Grunde beschäftigt sich dieser Bericht in einem *dritten Problembereich* mit einigen Forschungsprojekten, die für die Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie der hämopoetischen Insuffizienz und ihrer Regeneration nach Strahleneinwirkung von Bedeutung sind.

The *second group* is concerned with the improvement of existing and the development of new clinical methods which are of importance in the treatment of radiation damage hematopoiesis and secondary complications which may be observed as a consequence of the destruction of hematopoiesis and their experimental bases.

Research of this kind can only be effectually pursued if it is accompanied by experimental basic research: progress in the field of the diagnosis and therapy of radiation damage can only be achieved to the extent that the physiology of the hematopoietic cell systems, including renewal kinetics and regulation, is understood. For this reason, the present report, in a *third group* deals with one or two research projects which are of importance in the study of the physiology and pathophysiology of hematopoietic insufficiency and its regeneration after the effects of radiation.

The *second group* is concerned with the improvement of existing and the development of new clinical methods which are of importance in the treatment of radiation damage hematopoiesis and secondary complications which may be observed as a consequence of the destruction of hematopoiesis and their experimental bases.

Research of this kind can only be effectually pursued if it is accompanied by experimental basic research: progress in the field of the diagnosis and therapy of radiation damage can only be achieved to the extent that the physiology of the hematopoietic cell systems, including renewal kinetics and regulation, is understood. For this reason, the present report, in a *third group* deals with one or two research projects which are of importance in the study of the physiology and pathophysiology of hematopoietic insufficiency and its regeneration after the effects of radiation.

The *second group* is concerned with the improvement of existing and the development of new clinical methods which are of importance in the treatment of radiation damage hematopoiesis and secondary complications which may be observed as a consequence of the destruction of hematopoiesis and their experimental bases.

Research of this kind can only be effectually pursued if it is accompanied by experimental basic research: progress in the field of the diagnosis and therapy of radiation damage can only be achieved to the extent that the physiology of the hematopoietic cell systems, including renewal kinetics and regulation, is understood. For this reason, the present report, in a *third group* deals with one or two research projects which are of importance in the study of the physiology and pathophysiology of hematopoietic insufficiency and its regeneration after the effects of radiation.

EUR 4732 d

KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN

ERKENNUNG UND BEHANDLUNG
VON STRAHLENSCHÄDEN BEIM MENSCHEN

von

T.M. FLIEDNER

1971



Bericht abgefasst von der
Universität Ulm, Schwerpunktgruppe Hämatologie, Ulm - Deutschland
im Rahmen des Vertrages

Euratom/Land Baden-Württemberg Nr. 072-68-1 BIOD

ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeiten basieren auf zwei Problemkreisen, die von primärer Bedeutung sind für das Verständnis der Strahlenschädigung.

Der *erste Problemkreis* befaßt sich mit der Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer hämatologischer Methoden, die für die Erkennung von Strahlenschäden von Bedeutung sind. Dabei interessieren sowohl einmalige, als auch wiederholte und auch chronische Strahlenbelastungen durch externe Strahlenquellen oder durch inkorporierte, radioaktive Isotope von unterschiedlicher Energie und Dosisleistung.

Der *zweite Problemkreis* beschäftigt sich mit der Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer klinischer Methoden, die von Bedeutung sind für die Behandlung von Strahlenschäden der Blutzellbildung des Menschen und jener sekundären Komplikationen, die als Konsequenz der Zerstörung der Blutzellbildung zu beobachten sind sowie ihrer experimentellen Grundlagen.

Derartige Forschungsthemen können nur dann sinnvoll bearbeitet werden, wenn sie von einer experimentellen Grundlagenforschung begleitet werden: Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik und Therapie von Strahlenbelastungen sind nur in dem Masse zu erzielen, in dem es gelingt, die Physiologie der hämopoetischen Zellsysteme einschliesslich Umsatzkinetik und Regulation zu erfassen. Aus diesem Grunde beschäftigt sich dieser Bericht in einem *dritten Problemkreis* mit einigen Forschungsprojekten, die für die Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie der hämopoetischen Insuffizienz und ihrer Regeneration nach Strahleneinwirkung von Bedeutung sind.

SCHLAGWORTE

RADIATION INJURIES	ANTIBODIES
IRRADIATION	ANTIGENS
RADIATION DOSES	TRANSPLANTS
RADIATION SOURCES	PHYSIOLOGY
GAMMA SOURCES	MEDICINE
RADIOISOTOPES	MAN
BLOOD	RATS
BONE MARROW	DIAGNOSIS
BLOOD FORMATION	THERAPY
LYMPHOCYTES	THOROTRAST
PLATELETS	THYMIDINE
DISEASES	TRITIUM COMPOUNDS
LEUCOCYTES	DNA
ERYTHROCYTES	BIOSYNTHESIS
CYTOLOGY	NERVE CELLS
HISTOLOGICAL TECHNIQUES	METABOLISM
IMMUNITY	

INHALTSVERZEICHNIS *)

1. <u>Allgemeine Vorbemerkungen</u>	5
2. <u>Untersuchungen über diagnostische Möglichkeiten bei Strahlenbelastung</u>	7
2.1 Allgemeine Vorbemerkungen	7
2.2 Hämatologische Untersuchungen bei Thorotrastträgern	7
2.3 Strahlentoxizität nach kontinuierlicher ^3H -Thymidininfusion	19
2.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen	19
2.3.2 Blutwerte bei ^3H -TdR Dauerinfusion von Ratten	19
2.4 Die Wirkung kontinuierlicher intrazellulärer Bestrahlung durch ^3H -TdR auf das Knochenmark der erwachsenen Ratten	23
3. <u>Untersuchungen im Zusammenhang mit Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer Methoden zur Behandlung von Insuffizienzständen der Blutzellbildung.</u>	26
3.1 Allgemeine Vorbemerkungen	26
3.2 Untersuchungen über die kryobiologischen Eigenschaften hämopoetischer Zellen	27
3.3 Immunbiologische Untersuchungen im Rahmen der Transplantationsforschung	31
3.3.1 Histokompatibilität	31
3.3.1.1 Mixed lymphocyte culture	31
3.3.1.2 Gewebstypisierung mit Hilfe von Immunseren	34
3.3.2 Untersuchungen zur Allergie vom verzögerten Typ in vitro beim Menschen.	37
3.4 Isolierung und Anreicherung hämopoetischer Stammzellen.	40
3.4.1 Selektive Anreicherung von Ruhezellen des Knochenmarkes mit möglicher Stammzellenfunktion mittels Albumingradient.	41

*) Manuskript erhalten am 1. Dezember 1970

3.4.2 Übertragung der Fraktion 3 ¹ des Albumingradienten von Knochenmarkzellen bei einem Kind mit Immuninsuffizienz	44
3.5 Untersuchungen zur Pathogenese thrombopenischer Blutungen bei hämopoetischer Insuffizienz.	46
3.5.1 Etablierung des Modells zur quantitativen Erfassung der thrombopenischen Blutung.	48
3.5.2 Untersuchungen über die Plättchenfunktion in bestrahlten Ratten	49
3.6 Schlussbemerkungen zum Thema Verbesserung therapeutischer Methoden beim Strahlenschaden.	50
<u>4. Physiologische und pathophysiologische Untersuchungen zur Blutzellbildung soweit sie für die Erforschung diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten beim Strahlenschaden relevant sind.</u>	52
4.1 Allgemeine Vorbemerkungen	52
4.2 DNS-Synthesezeit von Zellpopulationen	53
4.3 Einfluss ionisierender Strahlen auf die Nervenfasern des Knochenmarkes	55
4.4 Untersuchungen über die Entstehungsweise des Knochenmarkes	60
4.5 Die Verwendung der extrakorporalen Blutbestrahlung	66
<u>5. Literaturnachweis</u>	

1. Allgemeine Vorbemerkungen

Der vorgelegte Abschlußbericht über den Vertrag zwischen der Europäischen Atomgemeinschaft und dem Land Baden-Württemberg No. 072-68-1 BIO D umfaßt die Forschungsarbeiten der Schwerpunktgruppe Hämatologie der Universität Ulm, die in den Jahren 1968 und 1969 im Rahmen dieses Vertrages durchgeführt worden sind. Die Arbeiten basierten auf zwei Problemkreisen, die von primärer Bedeutung sind für das Verständnis der Strahlenschädigung.

Der erste Problemkreis befaßt sich mit der Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer hämatologischer Methoden, die für die Erkennung von Strahlenschäden von Bedeutung sind. Dabei interessieren sowohl einmalige, als auch wiederholte und auch chronische Strahlenbelastungen durch externe Strahlenquellen oder durch inkorporierte, radioaktive Isotope von unterschiedlicher Energie und Dosisleistung.

Der zweite Problemkreis beschäftigt sich mit der Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer klinischer Methoden, die von Bedeutung sind für die Behandlung von Strahlenschäden der Blutzellbildung des Menschen und jener sekundären Komplikationen, die als Konsequenz der Zerstörung der Blutzellbildung zu beobachten sind sowie ihrer experimentellen Grundlagen.

Derartige Forschungsthemen können nur dann sinnvoll bearbeitet werden, wenn sie von einer experimentellen Grundlagenforschung begleitet werden: Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik und Therapie von Strahlenbelastungen sind nur in dem Masse zu erzielen, in dem es gelingt, die Physiologie der hämopoetischen Zellsysteme einschliesslich Umsatzkinetik und Regulation zu erfassen. Aus diesem Grunde beschäftigt sich dieser Bericht in einem dritten Problemkreis mit einigen Forschungsprojekten, die für die Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie der hämopoetischen Insuffizienz und ihrer Regeneration nach Strahleneinwirkung von Bedeutung sind.

Diese Forschungsthematik setzt im stark verkleinerten Umfang die Forschungsarbeiten fort, die im Rahmen des Assoziationsvertrages No. 031-64.1 BIAD zwischen der Europäischen Atomgemeinschaft und der

Gesellschaft für Strahlenforschung mbH München von der Forschungsgruppe Freiburg durchgeführt wurden. Dieser Assoziationsvertrag fand mit dem 31.12. 1967 seinen Abschluß. Die leitenden Mitarbeiter der Forschungsgruppe Freiburg siedelten an die Universität Ulm, wo sie nunmehr im Rahmen der Schwerpunktgruppe Hämatologie der Universität Ulm die Forschungsarbeiten auch für den Euratom-Vertrag fortführen.

Bei der Übersiedlung nach Ulm musste durch die Verkleinerung des Euratom-Vertrages eine erhebliche Einschränkung der Forschungsarbeiten hingenommen werden. Aus diesem Grunde ist dieser Abschlußbericht über den angeführten Forschungsvertrag nicht so umfangreich wie die früheren Jahresberichte der Assoziation.

Die Thematik der Forschungsvorhaben für den Vertrag 072-68-1 BIOD war für einen Zeitraum von 5 - 10 Jahren konzipiert. Aus diesem Grunde ist es verständlich, wenn in den ersten beiden Jahren dieses Vertrages nur ein Teil der vorgeschlagenen Forschungsthemen in Angriff genommen werden konnte. Es ist die Aufgabe dieses Abschlußberichtes, die durchgeführten Arbeiten und ihre Ergebnisse zusammenfassend darzustellen in der Hoffnung, daß diese Arbeiten im Rahmen eines weiteren Euratom Forschungsvorhabens fortgeführt werden können.

2. Untersuchungen über diagnostische Möglichkeiten bei Strahlenbelastung

2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

In den Berichtsjahren 1968 und 1969 konzentrierten sich die Untersuchungen über die diagnostischen Möglichkeiten bei Strahlenbelastungen auf klinische Untersuchungen an Thorotrastträgern und tierexperimentelle Untersuchungen bei Ratten nach kontinuierlicher Infusion von verschiedenen Dosen von ^3H -Thymidin als ein Modell eines direkt in den Kern eingebrachten Strahlenträgers. Bei den Thorotrastträgern kam es darauf an, die in den Jahren 1964 und 1965 begonnenen Untersuchungen fortzusetzen. Es handelt sich dabei um Patienten, die vor 10 - 20 Jahren aus diagnostischen Gründen Thorotrast erhielten als Röntgenkontrastmittel, und bei denen sich herausstellte, daß diese Substanz im Knochenmark und in anderen Organen eingelagert zu einer erhöhten Frequenz von malignen Erkrankungen führt. Im Rahmen dieses Euratom-Vertrages ging es darum, zu versuchen, diagnostische Kriterien festzustellen, die gegebenenfalls auch nach anderer Langzeitbelastung mit ionisierenden Strahlen von Relevanz sind. Aus diesem Grunde wird in dem folgenden Abschnitt ein Überblick über die bisherigen Untersuchungen und deren Stand gegeben.

Im zweiten Abschnitt dieses Teiles wird darüber berichtet, daß es nach kontinuierlicher Infusion von erwachsenen Ratten mit ^3H -Thymidin zu erheblichen Strahlenschäden kommt. Bevor diagnostische Kriterien festgelegt werden, welche über die reinen Blutzellveränderungen hinausgehen, musste zunächst einmal das Modell entwickelt werden, um dann geeignete morphologische oder funktionelle Kriterien zu entwickeln.

2.2 Hämatologische Untersuchungen bei Thorotrastträgern

Die Forschungsgruppe setzte auch in den Jahren 1968/1969 ihre Kontrolluntersuchungen an den schon in den Jahren 1965 - 1967 beobachteten Patienten fort. Diese Untersuchungen werden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Zahnert, Versorgungsärztliche Untersuchungsstelle Stuttgart, durchgeführt, die diese Patienten laufend

W. Trepel
Zahnert
Facke
Barthel
Steinhoff
Förstl

betreut. Die Forschungsarbeiten konzentrieren sich auf folgende Fragen:

1. Lassen sich bei einer Personengruppe von Thorotrastträgern (Thorotrast im Knochenmark autoradiographisch nachgewiesen) bei regelmässigen Untersuchungen alle 1 - 2 Jahre in den numerischen oder morphologischen Blutzellwerten Trends feststellen, die auf eine Strahlendauerbelastung der Hämopoese schliessen lassen?
2. Erlauben Knochenmarkuntersuchungen Aussagen über die Strahlenbelastung, wenn man neben der üblichen morphologischen Beurteilung spezielle Kriterien hinzuzieht (z.B. binukleäre Blutzellvorstufen usw.)?

In Tabelle 1 - 4 sind die in den Jahren 1965 - 1969 erhobenen Befunde schematisch zusammengefasst. Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß von unserer Gruppe im Jahre 1969 insgesamt 42 Thorotrastträger hämatologisch erfasst sind. Da der Gruppe 1965 noch nicht alle Patienten bekannt waren, liegen nur bei 20 Patienten 2 oder mehrfache Blutbefunde vor.

Hinsichtlich der Erythrozyten lässt Tabelle 1 erkennen, daß sich der erste Eindruck einer erhöhten Erythrozytenzahl von 1965 in den folgenden Jahren nicht bestätigt hat: die Erythrozytenzahlen waren bei allen Thorotrastträgern etwa im Normbereich, auf alle Fälle war weder eine ausgeprägte Anämie noch eine Erythrozytenerhöhung festzustellen. Die Retikulozyten lagen 1969 bei den meisten Personen (Tabelle 2) im Normbereich (Mittelwert 0.7 %). Bei 5 Personen fand sich eine leichte Retikulozytose, die einen Hinweis auf einen gesteigerten erythropoetischen Umsatz bietet.

Die Leukozytenwerte (Tabelle 3) weisen für 1969 bei den meisten der untersuchten Personen Werte über 5 000 pro μ l Blut auf. Weder Leukozytosen noch Leukopenien wurden beobachtet. Bei einer Reihe von Patienten konnten ein- oder mehrfache Knochenmarkuntersuchungen durchgeführt werden. Tabelle 4 zeigt die bisher gewonnenen

Ergebnisse. 1969 kamen 14 Personen zur Untersuchung, davon 4 zum zweiten Mal. Bei einer Auszählung von 2 000 Erythroblasten pro Patient (E1 - E5 Zellen) lag der Anteil (in %) von mehrkernigen Zellen zwischen 0.5 und 5. Bei 4 Patienten lagen die Werte bei 2 - 5 %, wobei Kontrolluntersuchungen bei gesunden Vergleichspersonen hier einen Mittelwert von 1.2 ± 0.48 (Flidner et al. Blood 23, 471, 1964) erwarten lassen. Somit ist die Möglichkeit einer leichten Erhöhung der mehrkernigen Erythroblasten bei einigen Thorotrastträgern gegeben. In allen untersuchten Markproben fanden sich zwischen 1 und 3 Erythroblasten pro 1 000 mit Karyomeren als Zeichen einer gestörten Kern- und Zellteilung. Zellen mit Karyomeren sind normalerweise extrem selten. Hinsichtlich dem Myelopoetisch-Erythropoetischen Index lässt sich feststellen, dass eine leichte Verschiebung zugunsten der Erythropoese bei 9 Patienten festzustellen ist. Normalerweise erwartet man einen M : E Index von 2 - 3 : 1. Damit bestätigt sich im Knochenmark der schon früher gewonnene Eindruck, dass es bei vielen Thorotrastpatienten zu einer leicht gesteigerten Erythropoese kommt die auch mit bestimmten morphologischen Zellatypien einhergehen kann. Als Ursache kommt einerseits die Strahlenbelastung durch das im Mark eingelagerte Thorotrast in Frage. Andererseits muss der Allgemeinzustand des Patienten berücksichtigt werden: mehrere Patienten haben eine Leberzirrhose, assoziiert mit Thorotrasteinlagerungen, sodass erythropoetische Veränderungen auch in diesem Zusammenhang gesehen werden müssen. Ausserdem berichtete unsere Gruppe in früheren Berichten über Chromosomenanomalien in Blutlymphozyten von Thorotrastträgern - wie auch von anderen Forschern beschrieben - sodass eine Kombination von Strahlenwirkung und Stoffwechselstörung nicht auszuschließen ist. Bei zukünftigen Untersuchungen soll daher Wert gelegt werden auf Chromosomenuntersuchungen in Knochenmark und Blut sowie auf die Bestimmung der Markstammzellen durch eine in-vitro Zellkultur-Methode. Darüber hinaus sollen Tierversuche die Strahlenwirkung von Thorotrast auf Knochenmark und Blut eindeutiger analysieren als das unter klinischen Bedingungen möglich ist.

Tabelle 1

Patient	1965	1966	1967	1969
	Erythrozyt. in Millionen <3 3-5 >5			
1				+
2				+
3			+	+
4				+
5				+
6				+
7			+	
8	+	+	+	+
9				+
10	+	+		+
11				+
12				+
13				+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16		+		
17	+	+	+	+
18	+			
19	+	+	+	+
20	+	+	+	
21	+	+		+
22	+		+	
23				+
24			+	+
25	+			
26	+		+	
27		+	+	+
28				+
29				+
30	+			+
31		+	+	+
32		+		+

Patient	1965	1966	1967	1969
	Erythrozyt. in Millionen	Erythrozyt. in Millionen	Erythrozyt. in Millionen	Erythrozyt. in Millionen
	<3 3-5 >5	<3 3-5 >5	<3 3-5 >5	<3 3-5 >5
33	+		+	+
34	+	+		+
35	+		+	+
36			+	+
37				+
38			+	
39	+			
40	+	+		
41				+
42	+			

Tabelle 3

Pat	1965	1966	1967	1969
	Leukozyt. in Tausend <3 3-5>5	Leukozyt in Tausend <3 3-5>5	Leukozyt. in Tausend <3 3-5>5	Leukozyt. in Tausend <3 3-5>5
1				+
2				+
3			+	+
4				+
5				+
6				+
7			+	
8	+	+	+	+
9				+
10	+	+		+
11				+
12				+
13				+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16		+		
17	+	+	+	+
18	+			
19	+	+	+	+
20		+		
21	+	+	+	+
22	+	+	+	
23				+
24			+	+
25	+			
26	+	+	+	
27		+	+	+
28				+
29				+
30	+	+		+

Pat	1965 Leukozyt. in Tausend <3 3-5 >5	1966 Leukozyt. in Tausend <3 3-5 >5	1967 Leukozyt. in Tausend <3 3-5 >5	1969 Leukozyt. in Tausend <3 3-5 >5
31		+	+	+
32		+		+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36		+	+	+
37				+
38			+	
39	+			
40	+	+		
41				+
42	+			

Tabelle 4

Knochenmark Zählung von 2000 Zellen ($E_1 - E_5$)

1 = Zellen mit Karyomeren in ‰

3 = atypische Mitosen in ‰

2 = mehrkernige Zellen in ‰

4 = M : E Index

	1965				1966				1967				1969			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
3									3.5	2.0	-	1.7:1	2.0	0.5	-	1.3:1
5													1.5	-	-	2.4:1
6													3.0	2.0	1.5	1.1:1
8	3.0	8.5	-	1.7:1												
9													-	5.0	-	1.7:1
10	0.5	9.0	-	1.5:1												
13													1.0	-	1.0	2.6:1
14	1.0	1.5	-	3.4:1									1.0	2.0	-	1.8:1
15	1.5	3.0	-	1.3:1												
16					1.0	8.5		1.3:1								
17	0.5	3.5	1.0	1.4:1												
18	1.0	2.0	-	3.6:1												
19	3.5	7.5	-	1.2:1					3.5	3.0	-	1:1	2.0	1.0	1.0	1.5:1
20					1.0	2.0	-	0.5:1								
22					1.0	2.5	-	0.75:1								
24									4.0	1.5	-	2,9:1	2.5	1.0		1.2:1
25	0.5	4.5	-	1.5:1												
26	0.5	3.0	0.5	1.1:1												

	1965				1966				1967				1969			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
27					2.0	-	-	1.1:1								
28													1.5	2.5	0.5	2.5:1
29													1.0	1.5	-	1.2:1
30	0.5	1.0	-	1.8:1												
31									-	1.5	-	7.7:1				
32													2.0	0.5	-	0.7:1
33	0.5	5.5	-	2.6:1												
34	0.5	1.5	-	2.1:1												
35					-	3.5	-	1.1:1								
37																1.3:1
41													1.0	0.5	-	2.3:1
43													-	1.5	-	2.5:1

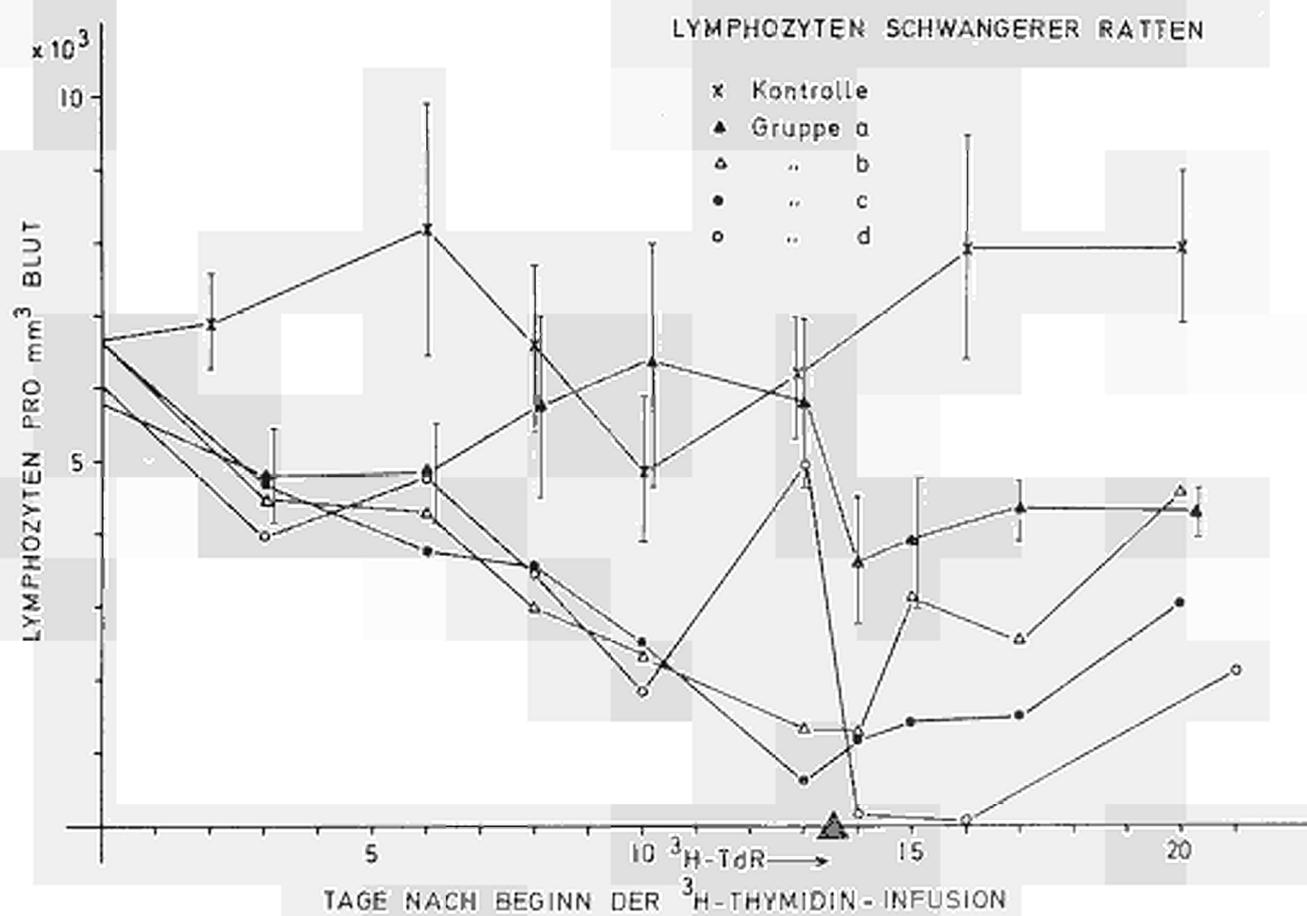


Abb. 1.

2.3 Strahlentoxizität nach kontinuierlicher ^3H -Thymidininfusion

2.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Ein grosser Teil der Forschungsarbeiten der Gruppe konzentrierte sich 1968 und 1969 auf die Frage nach der Strahlentoxizität von ^3H im Säugetierorganismus. Es ist bekannt, daß ^3H , Tritium, in der modernen Kernenergieindustrie zunehmend zum Problem wird. Aus diesem Grunde beschäftigt sich unsere Gruppe mit der Frage des Nachweises von Strahlenschäden der Hämatopoese durch Tritium. Um zu Grundlagenwerten zu kommen, wurde zunächst ^3H als Tritiumthymidin verwendet (^3H -TdR), das in die DNS der Zellen direkt eingebaut wird. Dieses wird normalen und schwangeren Ratten in verschiedenen Dosen kontinuierlich infundiert. Zunächst wurde geprüft, ob eine ^3H -TdR Dauerinfusion eine toxische Wirkung auf die Blutbildung hat und wenn ja in welchem Dosisbereich.

2.3.2 Blutwerte bei ^3H -TdR Dauerinfusion von Ratten

R.Haas
F.Bohne
F.Fache
E.Barthel
K.Steinhoff

Schwangeren Ratten wurde 13 - 14 Tage lang eine intravenöse Infusion von ^3H -Thymidin verabfolgt. 5 Versuchsgruppen wurden gebildet. Die Versuchsgruppe A erhielt 288 $\mu\text{Ci/ml/Tag}$ mit einer spezifischen Aktivität des Thymidins von 2 Ci/mMol. Gruppe B (3 Tiere) erhielt 576 $\mu\text{Ci/ml/Tag}$ mit einer spezifischen Aktivität von 4 Ci/mMol. Versuchsgruppe C (3 Tiere) erhielt 864 $\mu\text{Ci/ml/Tag}$ mit einer spezifischen Aktivität von 6 Ci/mMol. Versuchsgruppe D (5 Tiere) erhielt eine Dosis von 1152 $\mu\text{Ci/ 2 ml}$ mit einer spezifischen Aktivität von 8 Ci/mMol und Versuchsgruppe E (4 Tiere) erhielt eine Dosis von 1440 $\mu\text{Ci/ 2 ml}$ mit einer spezifischen Aktivität von 10 Ci/mMol.

In den Abbildungen 1 - 5 sind die Blutbildbefunde zusammenfassend dargestellt. In Abb. 1 zeigt sich, daß es bei allen Tieren mit einer Dosis jenseits von 288 $\mu\text{Ci/ml}$ zu einer Depression der Granulozytenzahl kommt. Die Granulozytenzahlen der Kontrolltiere schwanken zwischen 1 500 und 4 000/mm³ Blut und entsprechen damit

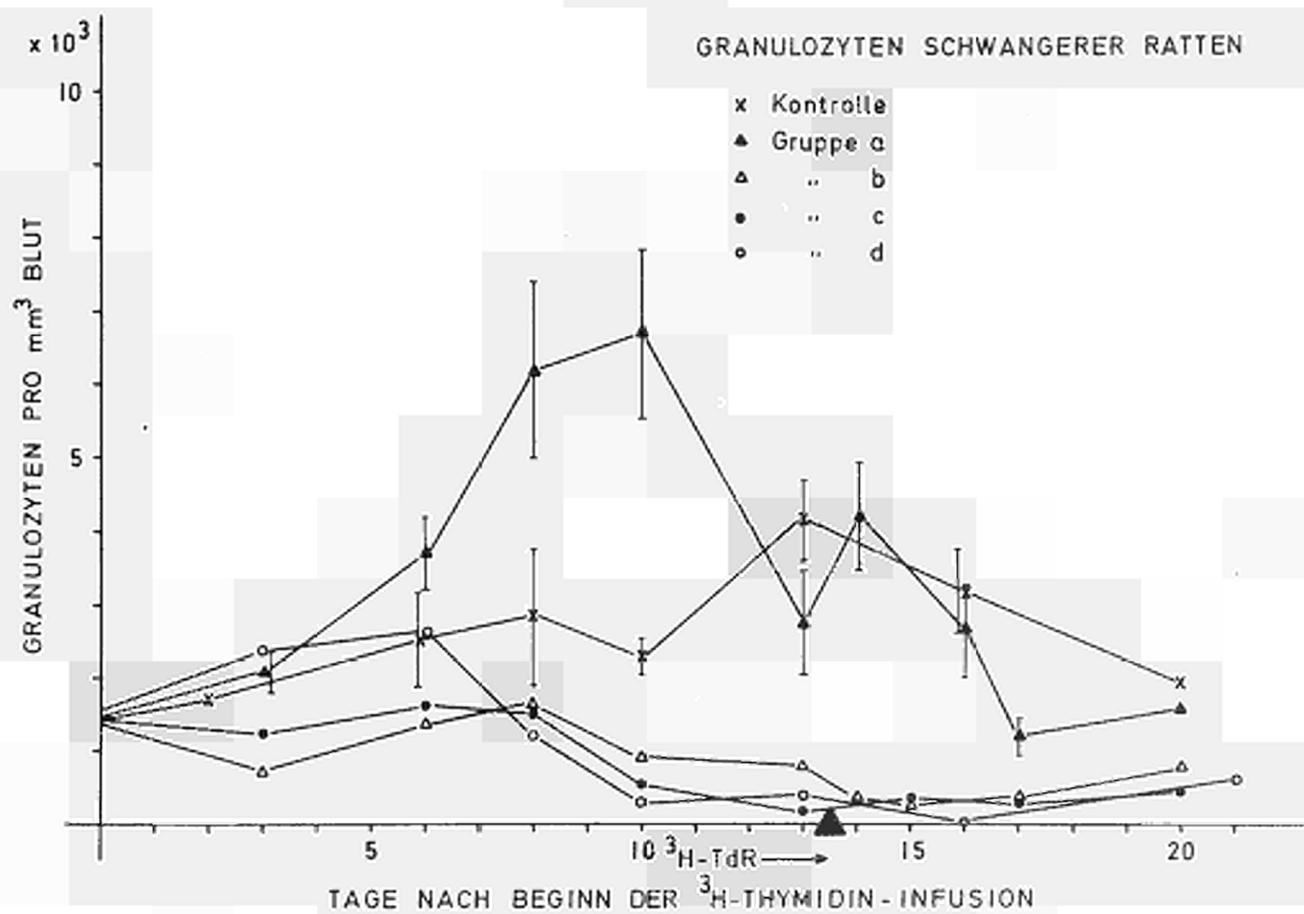


Abb. 2.

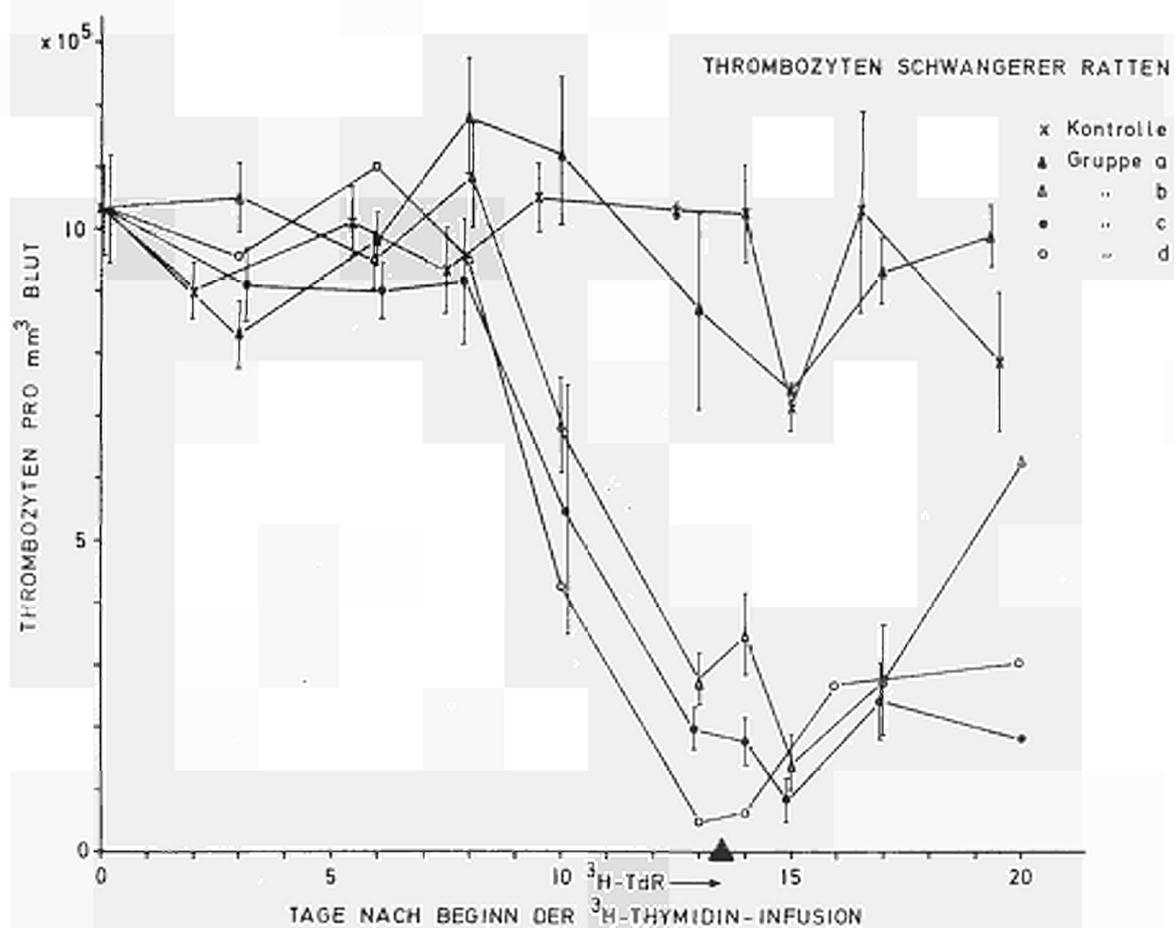


Abb. 3.

den normalen Schwankungswerten, die man bei Ratten im Verlauf einer Untersuchung finden kann. Bei der Gruppe A ($288 \mu\text{Ci/ml}$) stiegen zwischen dem 8. und 10. Tag die Granulozytenzahlen auf sehr hohe Werte an ($6 - 7000/\text{mm}^3$). Die Ursache hierfür ist noch nicht geklärt. Die Thymidininfusion wurde zwischen dem 13. und 14. Tag beendet und die Granulozytenzahlen fielen noch weiter geringfügig ab, um dann zum 20. - 21. Tag hin leicht wieder anzusteigen, d.h. innerhalb von 6 - 7 Tagen nach Beendigung der Thymidininfusion.

Auch bei den Lymphozytenwerten (Abb.2) ergeben sich ähnliche Befunde. Ein starker Abfall der Lymphozyten wird jenseits des 5. Tages nach Beginn der ^3H -Thymidininfusion deutlich, und zwar bei den Gruppen B, C und D merklicher als bei der Gruppe A oder bei der Kontrollgruppe. Bei Beendigung der Infusion waren die Lymphozytenzahlen auf Werte zwischen 1 000 und 2 000 Lymphozyten pro mm^3 abgefallen und waren 6 - 7 Tage nach Beendigung der ^3H -Thymidininfusion wieder im Anstieg begriffen. Über die Pathogenese dieser Lymphozytenveränderungen nach ^3H -Thymidininfusion mit radio-toxischen Dosen ist noch nicht viel bekannt. Es wäre zu klären, ob eine ähnliche Reaktion auch bei einer gleichen Menge Tritium markiertem Wasser auftritt. In diesem Falle wäre es einfach eine toxische Wirkung durch das Tritium in den Körperflüssigkeiten.

In Abb. 3 sind die Thrombozytenwerte der kontinuierlich ^3H -Thymidin infundierten Ratten aufgezeigt. 7 Tage lang nach Beginn der ^3H -Thymidininfusion bleiben die Thrombozytenwerte etwa im Normalbereich. Bei Gruppe A ergibt sich keine wesentliche Thrombozytenerniedrigung, die von der Kontrollgruppe unterschiedlich wäre. Bei den Gruppen B, C und D findet sich eine Thrombozytenerniedrigung zwischen dem 7. und 13. Tag nach Beginn der Thymidininfusion, wobei die höchste Dosis (Gruppe D) die niedrigsten Thrombozytenwerte zeigt und es bei dieser Dosis zu einer sehr schweren Thrombozytopenie kommt. Unmittelbar nach Absetzen der Thymidininfusion kommt es zu einer Regeneration der Thrombozyten-

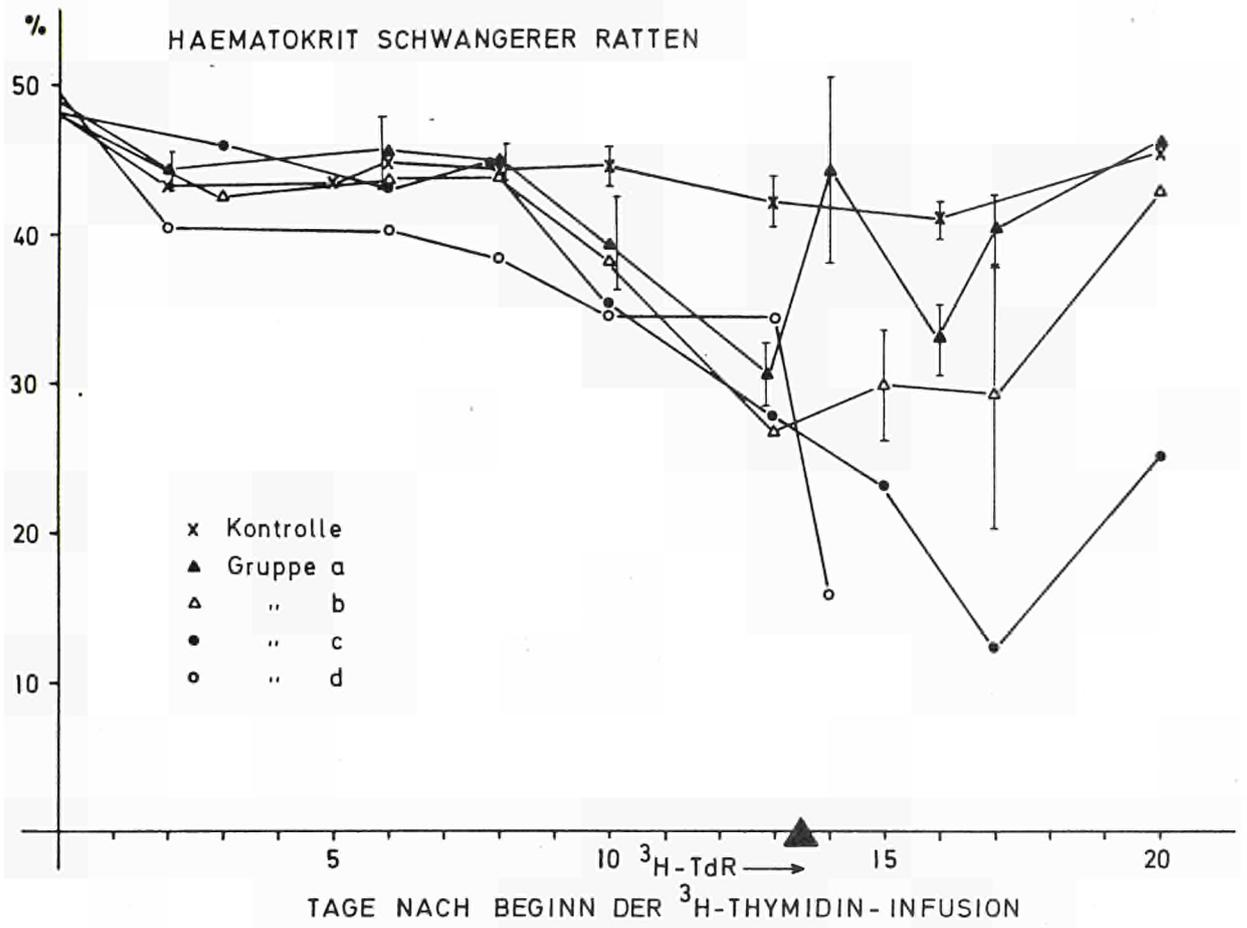


Abb. 4.

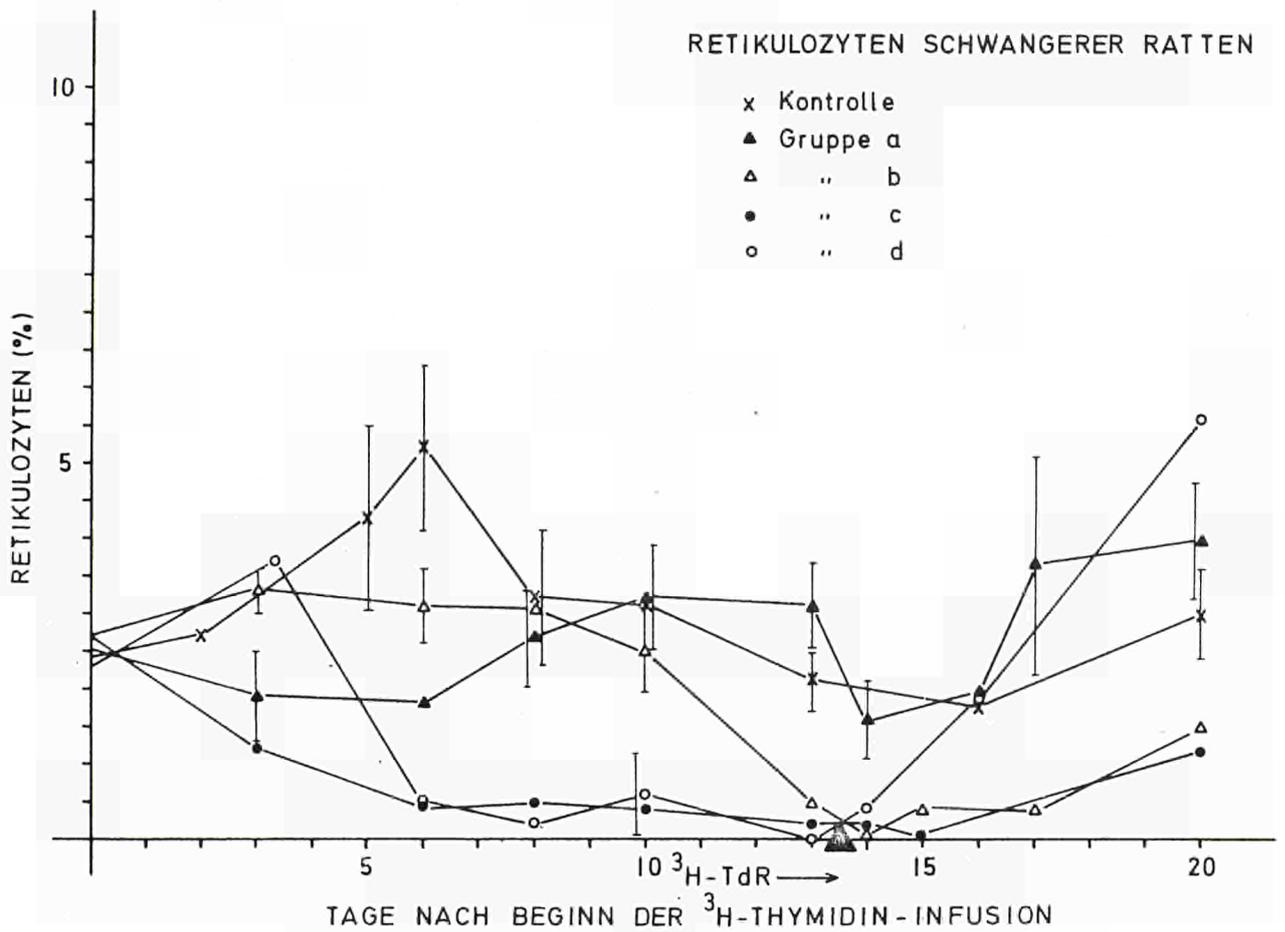


Abb. 5.

zahlen und 7 Tage nach Beendigung sind schon wieder erheblich verbesserte Werte vorhanden.

Hinsichtlich der Erythropoese (Abb. 4 und 5) wurden folgende Befunde erhoben. Der Hämatokrit von ^3H -Thymidin-infundierten Ratten geht innerhalb der ersten 12 - 13 Tage nach Beginn einer kontinuierlichen Thymidininfusion von dem Normalbereich zwischen 40 und 50 % auf etwa 30 % herunter, was darauf hindeutet, daß es auch zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Erythropoese kommt. Diese wird auch deutlich aus dem Verlauf der Retikulozytenzahlen (Abb. 5), wobei die Gruppen C und D besonders stark betroffen sind, die innerhalb von 6 Tagen kaum noch Retikulozytenwerte zeigen. Nach Absetzen der Thymidininfusion kommt es zu einem Wiederanstieg der Retikulozytenzahlen und damit verbunden auch zu einer Erholung der Hämatokritwerte.

2.4 Die Wirkung kontinuierlicher intrazellulärer Bestrahlung durch ^3H -TdR auf das Knochenmark der erwachsenen Ratte.

Nach 13 tägiger Infusion mit ^3H -TdR in einer Dosierung von 288 $\mu\text{Ci}/\text{Tag}$ (1 x Dosis) konnte keine Schädigung im Knochenmark von erwachsenen Ratten festgestellt werden.

Es fanden sich in den Ausstrichen etwa 32 % erythropoetische kernhaltige Zellen, 25 % myelopoetische Zellen, 21 % Lymphozyten, 5 % lymphoide Zellen, 5 % retikuläre Zellen und 2 % Endothelzellen. Der Rest verteilte sich auf unbestimmbare "Blasten", monozytoide oder große lymphatische Zellen. Die Verteilung in Ausstrichpräparaten der einzelnen kernhaltigen Zellen entsprach damit den Knochenmarkbildern, wie sie von normalen Ratten dieser Altersstufe bekannt sind. Insbesondere fanden sich keine Bildung von Riesenzellen oder pathologischen Mitosen wie sie nach Strahleneinwirkung vermutet werden können.

Histologisch konnten keine pathologischen Veränderungen, wie Hämorrhagien oder Ödembildung gesehen werden.

Die Markierung war überwiegend bei den "schnell proliferierenden" Zellen (Erythro- und Myelopoese) vertreten. Diese Zellen waren

zu 100 % in ihrem Kern $^3\text{H-TdR}$ markiert. Bei den kleinen Mark-lymphozyten wurden etwa 50 % markiert vorgefunden. Die Markierung endothelialer und retikulärer Zellen war unter 20 %.

Wurden höhere $^3\text{H-TdR}$ Dosen über 13 Tage lang verabreicht, so änderte sich das Knochenmarkbild dramatisch. Bei einer Dosis von 864 $\mu\text{Ci/Tag}$ (3 x Dosis), 1152 $\mu\text{Ci/Tag}$ (4 x Dosis) oder 1440 $\mu\text{Ci/Tag}$ (5 x Dosis) fand sich am Ende dieser Zeit das Vollbild einer Knochenmarkaplasie.

Im einzelnen wurden folgende morphologische Befunde erhoben, die proportional zu den verwendeten Thymidindosen gesteigert sichtbar wurden: typische Trümmerfeldzonen mit zahlreichen nekrobiotischen Zellen verschiedener Art, darunter auch Granulozyten. Über das ganze Bild verteilt auseinandergeflossenes rötliches Plasma zugrunde gegangener Zellen. Vielfach fanden sich "leere Bezirke", in denen keinerlei intakte Zellen mehr gesehen wurden. Diese Bezirke waren ausgefüllt mit ödematöser Flüssigkeit, die fein rötlich angefärbt war, feinverteilten Fetttropfen sowie veräussernden Erythrozyten. Die Kapillaren waren gut erhalten und zeigten deutlichen Endothelzellbelag obgleich ihr Lumen zum grossen Teil kollabiert war. Die Sinus waren überwiegend kollabiert und zeigten vereinzelt Strukturen zerstörter Endothelzellen.

Folgende Zelltypen im Knochenmark schienen trotz der hohen $^3\text{H-TdR}$ -Dosen intakt zu bleiben:

1. Auffallend häufig vorkommende beinahe ausnahmslos unmarkierte kleine lymphoide Zellen, die z.T. herdförmig in der Nähe des Zentralsinus und des Endostes gesehen wurden. Einzelne dieser Zellen zeigten pyknotische Kerne ohne erkennbare Chromatinstruktur. Vielfach hatten diese Zellen nur einen sehr schmalen Plasmasaum oder waren nacktkernig. Pyknose oder veräussernde Kerne bis zur Karyorrhexis wurden insbesondere bei der 5-fach Dosis gesehen.
2. Es wurden nach hohen $^3\text{H-TdR}$ Gaben auch noch grosse lymphoide Zellen mit z.T. deutlich retikulären Kernstruktur gesehen.

Diese Zellen waren häufig nacktkernig und konnten daher in vielen Fällen nur schwer eingeordnet werden. Ihre Anzahl war bei allen 3 Dosen, die hier beschrieben werden, unverändert. Die Markierungsintensität dieser Zellen war deutlich abhängig von der Höhe der verabreichten Dosis.

3. Auch Endothelzellen gehören zu den überlebenden Zellen nach $^3\text{H-TdR}$ Dauerinfusion. Die Markierung dieser Zellen war ebenfalls proportional zur gegebenen Dosis. Eine Modifikation solcher Endothelzellen konnte manchmal in Form von grösseren Zellen mit mehr retikulärem Kern gesehen werden. Diese Zellen stellen möglicherweise Adventitiazellen dar.

Es war auffällig, daß sich die Anzahl dieser letzteren Zellen nicht in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis änderte.

Während bei der 5-fach Dosis als einzige Zellen die beschriebenen Zellformen noch intakt angetroffen werden können, finden sich bei der 3 und 4-fach Dosis in umschriebenen Bezirken reife Granulozyten, von denen viele Mitosebedingte Anomalien (Riesenzellen) erkennen lassen. Mitosen wurden in den Markausstrichen nach Dauerinfusion mit der 3, 4 und 5-fach Dosis nicht beobachtet, entweder als Zeichen des niedrigen Mitoseindex nach Strahlenbelastung oder wegen der verwendeten Technik.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden. Die Dauerinfusion von $^3\text{H-Thymidin}$ kann bei erwachsenen Ratten in Abhängigkeit von der $^3\text{H-Dosis}$ zu schweren Schäden der Hämatopoese führen. Es bietet sich hier ein Modell an, die $^3\text{H-Toxizität}$ von verschiedenen $^3\text{H-Verbindungen}$ (mit jeweils kritischer Lokalisation in verschiedenen Zellanteilen wie Kern, Zytoplasma oder beides) zu messen mit dem Ziel der Pathogenese nachzugehen und diagnostische Kriterien zu entwickeln. In Zukunft soll die Toxizität von $^3\text{H-Verbindungen}$ bei nicht-schwangeren wie bei schwangeren Ratten und ihrer Nachkommenschaft getestet werden, wobei neben $^3\text{H-Thymidin}$ auch $^3\text{H}_2\text{O}$, $^3\text{H-Cytidin}$ u.s.w. untersucht werden wird.

3. Untersuchungen im Zusammenhang mit der Verbesserung der vorhandenen und der Entwicklung neuer Methoden zur Behandlung von Insuffizienz-zuständen der Blutzellbildung

3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Ein wesentlicher Programmpunkt im Forschungsvertrag 1968/1969 war die Verbesserung der vorhandenen und die Entwicklung neuer klinischer Methoden, die auch relevant sind für die Behandlung von Strahlenschäden der Blutzellbildung des Menschen sowie jener Sekundärkomplikationen, die als Konsequenz der Zerstörung der Blutzellbildung beobachtet werden, sowie ihrer experimentellen Grundlagen. In diesem Sinne hat die Ulmer Gruppe in den Jahren 1968 und 1969 eine Serie von Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, die Aufbewahrung von hämopoetischen Stammzellen bei Ultratiefemperaturen sicherzustellen und diese Methode der Tiefkühlkonservierung gegebenenfalls auch zu benutzen, um stoffwechselaktive Zellen, wie es die meisten der Knochenmarkzellen sind, zu schädigen und die stoffwechselruhenden Zellen, wie es von den Knochenmarkstammzellen vermutet wird, zu erhalten. Darüber hinaus bildete im Ulmer Forschungsprogramm die Immunbiologie einen weiteren Schwerpunkt, da die Transplantation von Stammzellen das Problem der Überwindung der immunologischen Komplikationen berücksichtigen muss. In diesem Zusammenhang wurde in Ulm die Methode von DICKE und VAN BEKKUM verwendet, um mit Hilfe eines Albumingradienten hämopoetische Stammzellen von immunkompetenten Zellen abzutrennen. - Bei der Insuffizienz des hämopoetischen Systems, wie sie nach Ganzkörperbestrahlung auch beim Menschen vorkommt, spielen die thrombopenischen Blutungen eine besondere Rolle. Die Ulmer Forschungsgruppe hat deshalb dem Problem der Beziehungen zwischen Thrombopenie, bakterieller Kontamination und Blutungsneigung besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Im folgenden soll über diese 4 Hauptpunkte der Forschung im einzelnen berichtet werden.

3.2 Untersuchungen über die kryobiologischen Eigenschaften hämopoetischer Zellen

C.Bruch
E.Rüber

Die kryobiologischen Untersuchungen der Ulmer Gruppe hatten 2 Ziele. Zunächst sollten Voruntersuchungen durchgeführt werden zur Errichtung einer Tiefkühlbank für hämopoetische Zellen. Danach sollte die Untersuchung bestimmter Aspekte des Nukleinsäurestoffwechsels von eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen Aufschlüsse geben darüber, ob die Zellen in der G_1 und G_2 - Phase des Zellzyklus weniger empfindlich für kryobiologische Massnahmen sind als in der S - Phase.

Zunächst lag das Hauptgewicht der Versuche auf dem Einfrierprozess von menschlichen Lymphozyten als Modellzellen für hämopoetische Zellen überhaupt. Als Viabilitätstest diente der Einbau von ^3H -Thymidin und ^3H -Cytidin nach Kultivierung und Phytohämagglutininstimulierung von eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen und zwar unter Verwendung der Flüssigkeitszintillationsmethoden. Der Grund für die Wahl von Lymphozyten für die Zellsuspensionen war vor allem ihre leichte Gewinnung auch unter normalen Bedingungen in grosser Zahl und die Vermutung, dass Lymphozyten ähnliche kryobiologische Eigenschaften haben, wie Knochenmarkstammzellen, Milz- und Thymuszellen sowie wie viele Tumorzellstämme und viele andere kernhaltige animalische Zellen.

Lymphozytensuspensionen wurden aus menschlichem, heparinisiertem Vollblut durch Dextrasedimentation der Erythrozyten und durch Filtration des leukozytenreichen Überstandes in einem Leukopacsystem gewonnen, was zu einer Abtrennung von Granulozyten und Monozyten führt.

Als Schutzsubstanz gegen das Einfrieren wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Den Lymphozyten (suspendiert in 20 %igem fötalen Kalbserum in TC-199) wurde bei 0°C tropfenweise eine 20 %ige DMSO-Lösung (in TC-199) in gleicher Menge zugegeben, sodass die Zellen in einer DMSO-Konzentration von 10 % in 10 %igem fötalen Kalbserum in TC-199 eingefroren wurden. Die Zellsuspension wurde

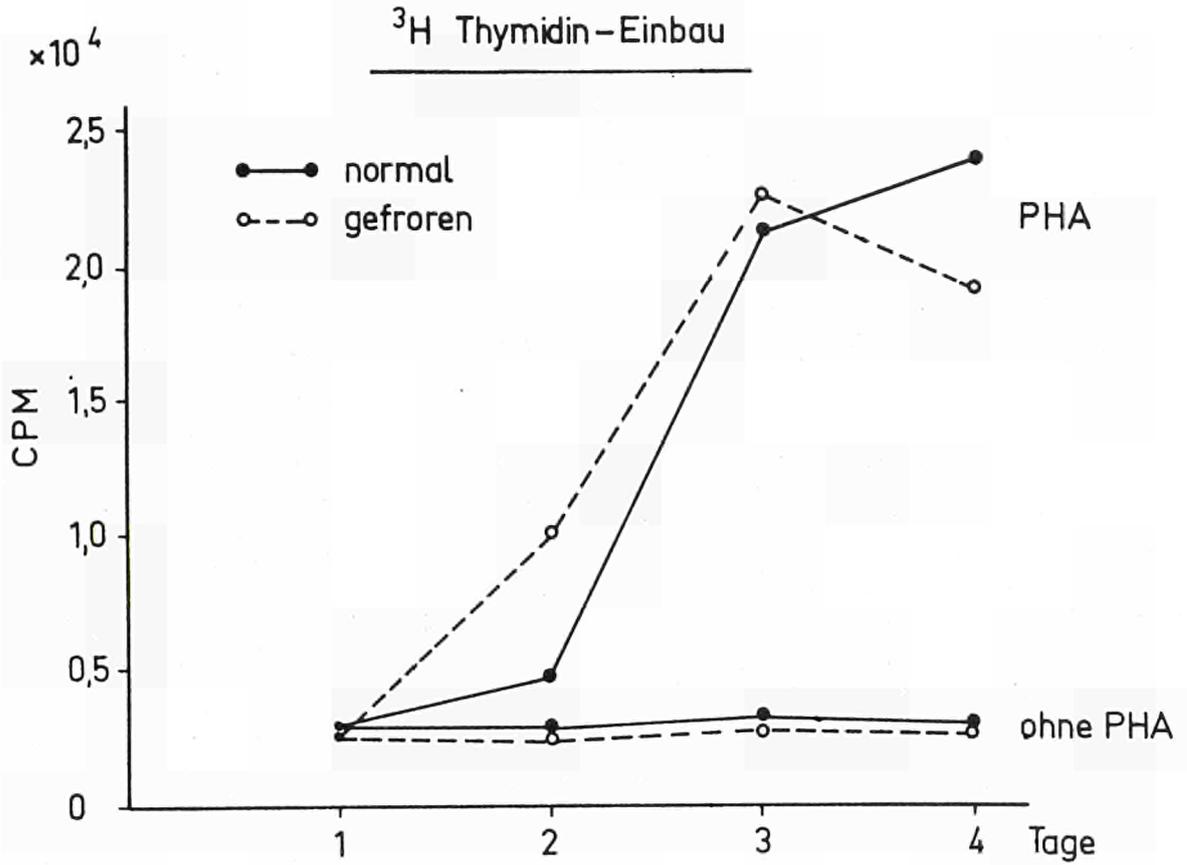


Abb. 6a.

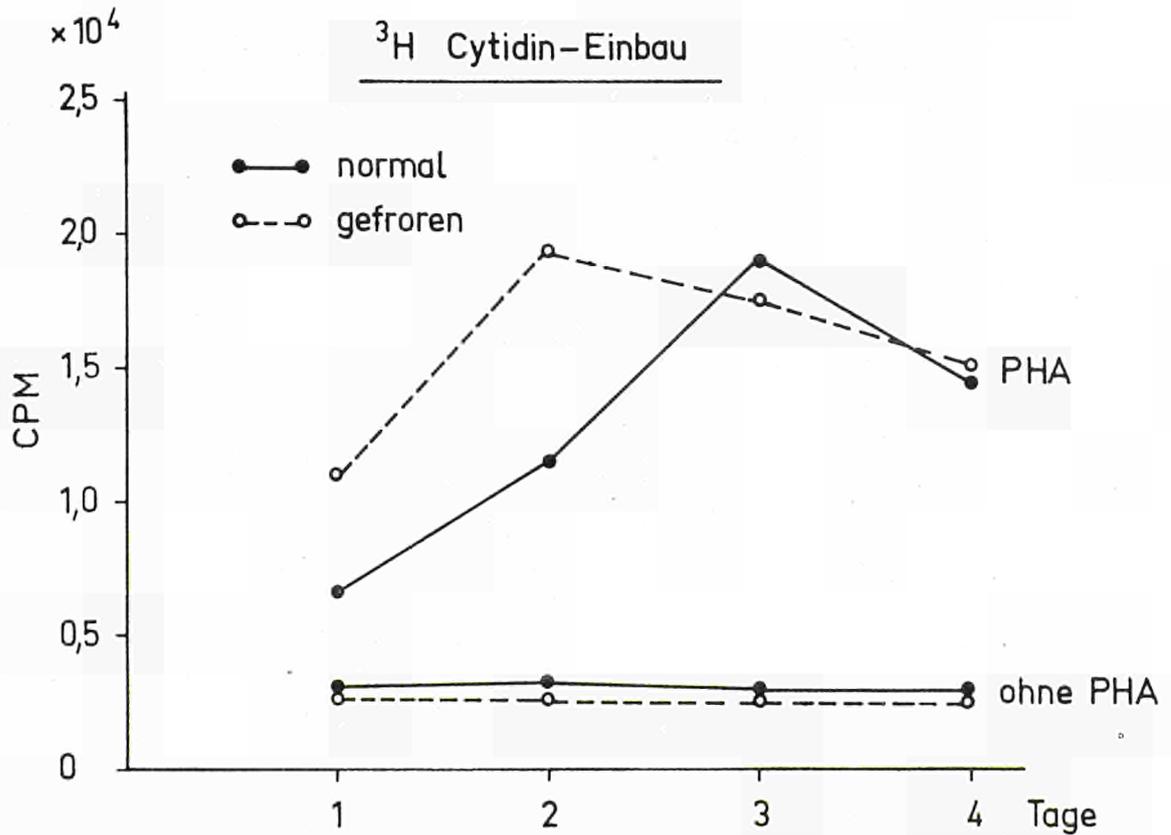


Abb. 6b.

in 1 ml Glasampullen abgefüllt verschlossen und anschließend langsam ($1 - 2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) bis auf -80°C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Als Einfrierapparatur diente ein Gerät der UNION CARBIDE, das mit flüssigem Stickstoff arbeitet und die Temperatur der einzufrierenden Zellprobe kontinuierlich misst.

Zur gewünschten Zeit wurde die Lymphozytensuspension in einem Wasserbad von 40°C aufgetaut und langsam (während einer Zeit von mindestens 5 Minuten) auf die zehnfache Menge mit 10 %igem fötalen Kälberserum in TC-199 verdünnt. Anschliessend wurden die Zellen 2 mal gewaschen.

Die so isolierten, aufgetauten Zellen wurden nunmehr Viabilitätstesten unterworfen. Dazu diente die Kultivierung und Phytohämagglutininstimulierung der Lymphozyten. Es wurde eine Lymphozytenkultur hergestellt, mit einer Konzentration von 1×10^6 Lymphozyten/ml. Die Auswertung der Kulturen erfolgte:

1. Mit morphologischen Methoden, z.B. Supravitalfärbung mit 0.01 %igem Acridinorange und einer Präparateanfertigung mit Methanol-Eisessig und Giemsa-Färbung zur Bestimmung des Blastenindex.
2. Durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin und ^3H -Cytidin am 1., 2., 3. und 4. Tag nach Beginn der Lymphozytenkultur im Flüssigkeitsscintillationszähler.

Bei diesen Untersuchungen ergab sich, dass die verwendeten Einfrier- und Zellhandhabungsmethoden offensichtlich geeignet sind, Zellen für eine bestimmte Zeit bei Ultratiefemperaturen am Leben zu erhalten. Die Viabilität der Lymphozyten (gemessen am Einbau von ^3H -Thymidin und ^3H -Cytidin) betrug zwischen 60 und 100 % verglichen mit der gleichen Lymphozytenzahl desselben Individuums. Einen derartigen Versuch zeigt Abb. 6. Wie die Abbildung zeigt, gibt es keinen wesentlichen Unterschied in dem Einbauverlauf von ^3H -Thymidin zwischen normalen und gefrorenen und wieder aufgetauten Lymphozyten mit und ohne Phytohämagglutininstimulation. Das gleiche gilt für den ^3H -Cytidineinbau. Hier ist bereits am ersten Tag nach Phyto-

hämagglutinstimulation eine wesentliche Steigerung des Einbaus zu beobachten.

Die Bestimmung des Blastenindex hingegen wies keine genaue Korrelation zur Inkorporationsrate von ^3H -Thymidin und ^3H -Cytidin auf. So betrug z.B. an einem Versuch die Viabilität der gefrorenen Lymphozyten 60 % gemessen am Einbau von Cytidin und Thymidin, der Blastenindex war jedoch im Vergleich zu den normalen Lymphozyten unverändert. Eine orientierende Messung der Viabilität von gefrorenen und wieder aufgetauten Zellen ist durch die Supravitalfärbung mit Acridinorange möglich. Sie wurde vor allem 10 - 15 Stunden nach Auftauen angewandt, da sie hier eine gute Korrelation zu dem später zu erwartenden Ergebnis zeigt.

Eine Untersuchungsserie wurde eingeleitet, die sich mit dem Problem beschäftigt, ob Zellen, die in der G_1 - oder G_2 -Phase sind, resistenter gegen die Prozedur des Einfrierens und Auftauens sind als Zellen, die sich in der DNS-Synthesephase befinden. Zu diesem Zweck wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Phytohämagglutinstimulation eingefroren. Ihre Stoffwechselaktivität wurde dann nach dem Auftauen wieder getestet. Über diese Untersuchungen wird gesondert berichtet werden.

Über die oben angeführten methodischen Untersuchungen hinaus beschäftigten sich die kryobiologischen Untersuchungen der Ulmer Gruppe im Jahre 1968 und 1969 mit dem Problem, Lymphozyten für die Gewebsverträglichkeitsproben einzufrieren. Mit einer Batterie von histokompatibilitätsgetesteten Lymphozyten können unbekannte Seren auf Isoantikörper getestet werden. Vorläufige Ergebnisse zeigen, daß in zwei Versuchen der zytotoxische Titer eines Anti-Lymphozytenserums mit frischen wie mit eingefrorenen Lymphozyten desselben Spenders identisch war. Das weist darauf hin, daß mit dem ausgearbeiteten Einfrierverfahren die gefrorenen Lymphozyten im zytotoxischen Test verwendet werden können.

Somit ist als Ergebnis der Untersuchungen 1968 und 1969 zusammenfassend zu berichten, daß ein kryobiologisches Laboratorium einge-

richtet wurde und nunmehr grössere Untersuchungsserien möglich sind über die Verwendbarkeit dieser Methoden zur langfristigen Aufbewahrung hämopoetischer Zellen, die dann zu therapeutischen Massnahmen verwendet werden können.

3.3 Immunbiologische Untersuchungen im Rahmen der Transplantationsforschung

H.D.Flad
G.Hochapfel
v.Neubeck
J.Flad

3.3.1 Histokompatibilität

3.3.1.1 MLC - mixed lymphocyte culture

Ein Teil der Arbeit der Ulmer Gruppe beschäftigt sich mit speziellen Problemen der Transplantationsimmunologie, insbesondere des Knochenmarkes, da die Therapie des akuten Strahlensyndroms in höheren Dosisbereichen von der erfolgreichen Ansiedlung von Stammzellen im bestrahlten Knochenmark abhängig ist. In diesem Zusammenhang sind die immunologischen Reaktionen zwischen Spender und Empfänger nach wie vor das grösste Hindernis in einer umfangreichen Anwendung der Knochenmarktransplantation bei hämopoetischer Insuffizienz.

Die Forschungen der vergangenen Jahre haben nicht nur deutlich gezeigt, dass für ein erfolgreiches Angehen einer Marktransfusion die geeignete Auswahl des Spenders aufgrund der bei ihm und beim Empfänger vorliegenden Histokompatibilität sondern auch Wege gewiesen, um Kompatibilität und Inkompatibilität zu messen.

In den Jahren 1968/1969 untersuchte und verwendete die Ulmer Gruppe vor allem die "mixed lymphocyte culture" (iLC), die hier nach der "one way MLC" Methode von Bach und Voynow (Science 143, 813, 1964) aufgebaut wurde. Im Idealfall der "Kompatibilität" zwischen Spender und Empfänger fehlt eine Stimulation von Spender- und Empfängerlymphozyten. Das Prinzip der verwendeten "one way MLC" besteht darin, dass der DNS-Stoffwechsel einer der beiden an der Reaktion partizipierenden Lymphozytenpopulationen durch Zugabe von Mitomycin C gehemmt wird, die stimulierende Aktivität, die auf Antigenunterschieden besteht, auf die andere

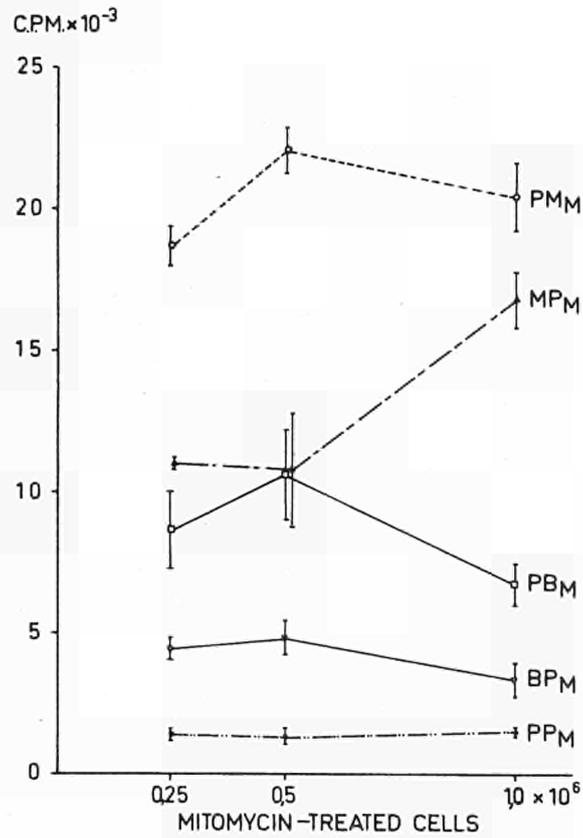


Abb. 7.

Legende: PP_M = Patient Ly. + Mitomycin behandelte Ly. des Patienten
 PB_M = Patient Ly. + " " Ly. des Bruders
 PM_M = Patient Ly. + " " Ly. der Mutter
 MP_M = Ly. der Mutter + " " Ly. des Patienten
 BP_M = Ly. des Bruders + " " Ly. des Patienten

unbehandelte Lymphozytenpopulation jedoch erhalten bleibt. Dabei erscheint der Grad der Stimulierung von Lymphozyten durch die zugesetzten allogenen Lymphozyten proportional zum Grad der Inkompatibilität im HL-A-System zu sein. Gegenüber der zweiten Methode zur Gewebsverträglichkeits-Untersuchung, nämlich des "tissue-typing" mit Hilfe von Immunsereen, hat die MLC-Methode den Vorteil auch Antigenmuster zu erfassen, die bisher nicht durch spezifische Seren nachgewiesen werden können. Sie hat weiter den Vorteil, quantitativ zu sein: der Grad der gegenseitigen Stimulierung von Spender- und Empfängerlymphozyten wird bei standardisierten Bedingungen durch den Einbau von radioaktiven DNS-Vorstufen (C^{14} -Thymidin) gemessen.

Die eigenen Untersuchungen beschäftigten sich 1968 und 1969 zunächst mit der Standardisierung dieser Methode in den neu eingerichteten Labors, um sie für die Gruppe verfügbar zu haben. Sie wurde dann getestet in mehreren Fällen von aplastischen Anämien und bei einem angeborenen Immundefekt, bei denen eine Knochenmarktransplantation erwogen oder durchgeführt wurde. Folgende Befunde wurden im einzelnen erhoben: Bei einem Fall mit schwerer Chloramphenicol-induzierter aplastischer Anämie mit schwerer hämorrhagischer Diathese wurde die MLC angewendet um festzustellen ob der Bruder oder die Mutter am besten als Spender von Thrombozyten für die Patientin geeignet waren. In diesem Fall wurde die MLC mit verschiedenen Mengen Mitomycin-behandelter, stimulierender Zellen durchgeführt (Abb. 7). Es zeigte sich, dass die Lymphozyten des Bruders und die der Patientin sich gegenseitig weniger stimulierten als die Lymphozyten der Mutter und die der Patientin. Diese bessere Kompatibilität zwischen Bruder und Patientin liess sich auch im "tissue typing" verifizieren. Folglich wurde die Patientin mit Thrombozyten des Bruders behandelt. Diese Thrombozyten hatten im Empfänger eine bessere Überlebenszeit als die der Mutter.

Bei Zwillingen (ZI und ZII) mit lymphopenischer Hypogammaglobulinämie musste entschieden werden, wer von den beiden Eltern als Spender von Knochenmark für welches der beiden Kinder infrage kam. Das gesunde Geschwisterkind war zu klein, um Knochenmarkzellen in ausreichender Menge spenden zu können. Die MLC ergab folgendes Ergebnis:

M.-behandelte Zellen von:	Vater	Mutter	Bruder	ZI	ZII
Vater	250 ⁺ 92 ⁺	3390 ⁺ 12	----	4528 ⁺ 1130	1413 ⁺ 525
Mutter	1911 ⁺ 311	102 ⁺ 5,9	----	841 ⁺ 654	268 ⁺ 214
Bruder	----	-----	----	-----	-----
ZI	1696 ⁺ 132	980 ⁺ 53	477 ⁺ 303	161 ⁺ 91	247 ⁺ 47
ZII	2158 ⁺ 853	1098	892 ⁺ 91	2609 ⁺ 1212	95 ⁺ 44

⁺ C.P.M. ⁺ S.E., gemessener ¹⁴C-Thymidin-Einbau nach Inkubation mit ¹⁴C-Thymidin, 146 - 168 Stunden.

Es zeigte sich, dass der Bruder als Knochenmark-Spender für ZI am besten in Frage kam, dann die Mutter für ZI oder ZII, während der Vater mit den Lymphozyten beider Kinder stark reagierte und nicht infrage kam. In jedem Fall aber ist bei Übertragung von Knochenmark von Eltern auf das Kind eine "graft-versus-host"-Krankheit zu erwarten.

3.3.1.2 Gewbestypisierung mit Hilfe von Immunsereen

Zur Bestimmung von Leukozytengruppen mit spezifischen Antisereen wie für die Suche nach Leukozytenantikörpern unbekannter Spezifität wurden folgende Methoden aufgebaut und auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im hiesigen Labor untersucht:

- a) die Agglutinationsreaktion nach van ROOD
- b) der Zytotoxizitätstest nach TERASAKI

Es stellte sich heraus, dass die in der Literatur für die Agglu-

tinationsreaktion angegebene Reproduzierbarkeit von ca. 80 % bei positiven Resultaten und 60 % bei negativen Ergebnissen und von ca. 90 % für den Zytotoxizitätstest im hiesigen Labor erreicht wurde.

In Zusammenarbeit mit der Frauenklinik der Universität Ulm und der gynäkologischen Abteilung der Kreiskrankenhäuser Heidenheim, Geislingen, Schwäbisch Gmünd, Günzburg, Krumbach, wurden von Frl. Dr. E. Marcard und Frl. E. Krug ca. 500 Seren multiparer Frauen untersucht. Jedes Serum wurde gegen je 20 Spender der Städt. Blutzentrale Ulm mit beiden Methoden getestet. Es fanden sich 90 antikörperhaltige Seren, von denen sich bisher eines als monospezifisch herausgestellt hat.

Diese Testergebnisse bildeten die Voraussetzung für die Zusammenarbeit mit Dr. van ROOD, der uns im Austausch gegen vorge-testete Seren unbekannter Spezifität definierte Antiseren zur Verfügung stellte. Ausserdem erhielten wir spezifische Antiseren vom National Institute of Health, Bethesda, Maryland. Insgesamt arbeitete das Labor mit folgenden definierten Antiseren:

Cytotoxischer Test: van Rood-Seren:

HL-A 1, 2, 3, 9, 10, 11/ 5, 7,
8, 12 R, Orlina 7b, HL-A 7⁺/4a,4b

N.I.H.-Seren : HL-A 1 (Torres a), 1(Torres b),
3(Thornton a), 5(Kiefer),
5(Lambert), 5(Terasaki)

Agglutination: 4a (3Seren,)4b(3Seren), 6a,6b,8a(2Seren),5a,5b(2Seren)

Mit diesen Seren wurden folgende klinisch-wissenschaftliche Forschungsprojekte bearbeitet:

- 1) Bestimmung der Leukozytengruppen zur Auswahl von optimalen Spender-Empfängerpaaren bei
 - a) Patienten, die wegen ihrer Grundkrankheit (Panmyelopathie, Leukämie, nach intensiver zytostatischer Therapie) über lange Zeit mit Thrombozyten substituiert werden müssen.

Die starke Iso-Immunisierung dieser Patienten gegen Leukozyten- und Thrombozytenantigene durch vorausgegangene Transfusion von Vollblut oder Thrombozytenkonserven macht eine effektive Substitution mit Thrombozyten unmöglich, da die Überlebenszeit der transfundierten Thrombozyten stark verkürzt ist. Findet man durch Bestimmung der Leukozytenantigene genetisch identische oder kompatible Spender, haben dessen Thrombozyten eine normale Lebenszeit.

Es wurden bei 10 Patienten mit schweren thrombozytopenischen Blutungen die näheren Angehörigen und je Patient, maximal 150, im ABO-Rh-System gruppengleiche Spender getestet. In 5 Fällen gelang es, kompatible Spender zu finden, deren Thrombozyten trotz der starken Isoimmunisierung dieser Patienten eine normale Überlebenszeit hatten (W. Adam, E. Marcard, H. Erdmann, E. Kratt, Ergebnisse der Bluttransfusionsforschung S. Karger-Verlag, Basel, im Druck).

- b) In einem Fall von lymphopenischer Hypogammaglobulinämie war die Bestimmung der Leukozytengruppen Voraussetzung für eine Knochenmarkstransplantation. Die Leukozytentypisierung wurde bei den Eltern und den Geschwistern des Patienten durchgeführt. Dabei zeigten die Testergebnisse gute Übereinstimmung mit denen von Dr. van ROOD, Leiden und Dr. JEANNET, Genf.
 - c) Bei 20 Patienten, die chronisch dialysiert werden müssen und für eine eventuelle Nierentransplantation vorgesehen sind, wurden die Leukozytengruppen bestimmt.
- 2) Da bei polytransfundierten Patienten trotz Gabe von gewaschenen Erythrozytenkonserven häufig febrile Transfusionsreaktionen auftreten, die durch Leukozytenantikörper bedingt sind, wurde untersucht, ob sich durch weitere "Reinigung" der Erythrozyten diese Reaktionen vermeiden lassen. Es gelingt durch

Filtration von Vollblutkonserven. (E. Marcard, H.-G. Spiess, Ergebnisse der Bluttransfusionsforschung S. Karger-Verlag, Basel, im Druck).

Neben der Fortführung der bisherigen Arbeiten, ist folgendes vorgesehen:

-) Um eigene monospezifische Antiseren zu finden, ist es notwendig, das Screening-Programm zu intensivieren. Hierzu muss das Einzugsgebiet zur Gewinnung von Seren multiparer Frauen erweitert und die Zusendung dieser Seren organisiert werden.
-) Die bisher gefundenen antikörperhaltigen Seren müssen in einem grossen Panel jeweils gegen eine Mindestzahl von 100 Spendern getestet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollen unter Einsatz eines Computers ausgewertet werden. Gleichzeitig werden die Leukozytengruppen dieser Spender der Ulmer Blutzentrale bestimmt, um möglicherweise auf diesen Stamm von Spendern mit bekannten Leukozytengruppen für die obengenannten klinisch-wissenschaftlichen Aufgaben zurückgreifen zu können.
-) Mit der Auswahl von Lebendspendern für die Nierentransplantation soll in Zusammenarbeit mit den Organisationen Eurotransplant und Swisstransplant begonnen werden.
-) Ein weiteres Programm: "Untersuchung zur Überlebenszeit von transfundierten Granulozyten bei kompatiblen und inkompatiblen Spendern befindet sich in Vorbereitung.

3.3.2 Untersuchungen zur Allergie vom verzögerten Typ in-vitro beim Menschen

Die Allergie vom verzögerten Typ spielt bei der Transplantationsabstossung eine entscheidende Rolle. Ihre Erkennung beim Menschen durch ein einfaches System ist Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen gewesen. Im Tierversuch hat sich gezeigt, dass - nach der Methode von DAVID 3 Komponenten entscheidend sind.

1. wandernde Makrophagen, 2. sensibilisierte Lymphozyten und
3. das spezifische Antigen, unter dessen Einfluss Lymphozyten den sog. "migration-inhibition-factor" (MIF) bilden. Dieser Test,

H. D. Flad
G. Hochapfel
J. Flad

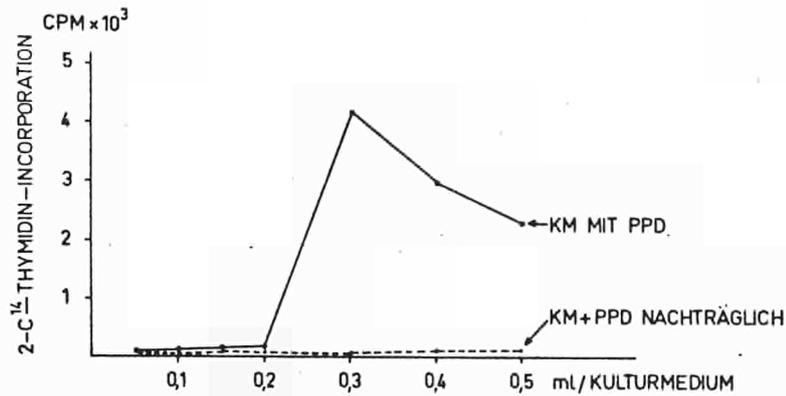
der zunächst im Tierversuch entwickelt worden war, wurde nunmehr für die Verhältnisse beim Menschen adaptiert. THOR et al. hatten berichtet, dass Meerschweinchenexsudatzellen durch zellfreie Kulturmedien, die durch Inkubation sensibilisierter menschlicher peripherer Lymphozyten mit dem spezifischen Antigen gewonnen wurden, in ihrer Wanderung gehemmt werden können. In eigenen Versuchen wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen dem Hauttest mit Tuberkulin und dem in-vitro System besteht, d.h. in welchem Prozentsatz bei Tuberkulin-positiven Versuchspersonen eine Hemmung der Migration von Meerschweinchenexsudatzellen durch den von menschlichen Lymphozyten produzierten Faktor auftritt.

Tabelle 5

Einfluss von Kulturmedien, die nach Inkubation peripherer Lymphozyten mit Tuberkulin gewonnen wurden, auf die Wanderung von Peritonealexsudatzellen des Meerschweinchens. Ergebnisse bei 18 Versuchspersonen

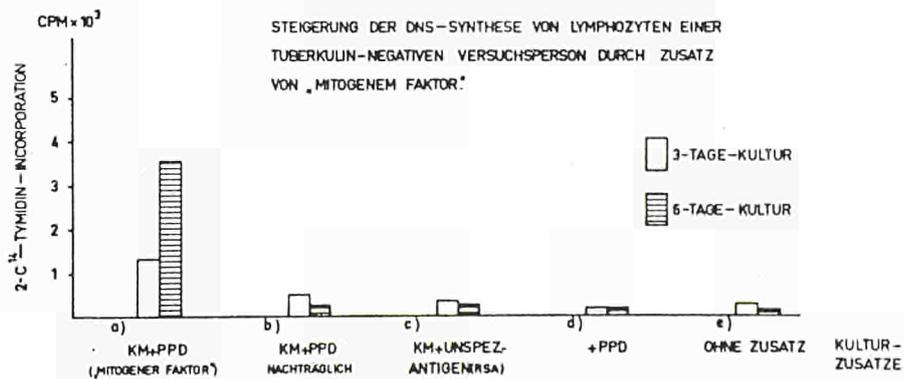
Tuberkulinkonz. in $\mu\text{g/ml}$	Zahl der Ansätze	Signifikante ⁺ Hemmung	Keine signifikante Hemmung
10	7	1	6
25	14	3	11
50	14	5	9
75	7	4	3
100	12	3	9
Gesamt:	54	16	38

⁺Signifikante Hemmung bedeutet Mi. von weniger als 75 %.



STIMULIERUNG DER DNS-SYNTHESE VON LYMPHOZYTEN EINER TUBERKULIN-NEGATIVEN VERSUCHSPERSON DURCH VERSCHIEDENE MENGEN KULTURMEDIUM (KM) EINER LYMPHOZYTENKULTUR VON EINER TUBERKULIN-POSITIVEN VERSUCHSPERSON

Abb. 8. Das Kulturmedium wurde aus Kulturen von Lymphozyten gewonnen, die 72 Stunden lang bei 37°C mit 16γ/ml Tuberkulin (PPD) oder ohne PPD inkubiert worden waren.



STEIGERUNG DER DNS-SYNTHESE VON LYMPHOZYTEN EINER TUBERKULIN-NEGATIVEN VERSUCHSPERSON DURCH ZUSATZ VON „MITOGENEM FAKTOR“

Abb. 9. "Mitogener" Faktor wird nur gebildet, wenn Lymphozyten einer Tuberkulinpositiven Versuchsperson mit dem spezifischen Antigen (PPD), nicht mit einem unspezifischen Antigen (Rinderserum-Albumin, RSA) kultiviert werden.

In Tabelle 5 ist der Einfluss von Kulturmedien, die nach Inkubation peripherer Lymphozyten mit Tuberkulin gewonnen wurden, auf die Wanderung von Peritonealexsudatzellen des Meerschweinchens bei 18 Versuchspersonen dargestellt. Es ergab sich allerdings, dass nur in etwa einem Drittel der Gesamtreaktionen eine Übereinstimmung zwischen positivem Hauttest und Hemmung der Migration beobachtet wurde, eine Beobachtung die mit der von anderen Autoren übereinstimmt. Es erscheint möglich, dass die mangelnde Korrelation zwischen dem Migrationshemmungstest und dem Tuberkulin-Hauttest möglicherweise durch Abänderungen in der Technik beseitigt werden kann.

Ferner konnte erstmalig die Bildung eines neuen "mitogenen" Faktors beschrieben werden, der freigesetzt wird, wenn Lymphozyten einer Tuberkulin-positiven Versuchsperson mit Tuberkulin kultiviert werden. Der Faktor hat die Eigenschaft, Lymphozyten einer Tuberkulin-negativen Versuchsperson zur Blastentransformation und DNS-Synthesesteigerung anzuregen (siehe Abb. 8 und 9). Es handelt sich also um eine Übertragung der zellulären Immunität in-vitro, die antigenspezifisch ist.

3.4 Isolierung und Anreicherung hämopoetischer Stammzellen

Für die erfolgreiche Transplantation hämopoetischer Zellen ist als Ergänzung zu den Histokompatibilitätsuntersuchungen die Isolierung und Anreicherung hämopoetischer Stammzellen von besonderem Interesse. Ziel der meisten Untersuchungen ist es, die immun-kompetenten Lymphozyten von den eigentlich hämatopoetischen Zellen abzutrennen. In unserer Gruppe wird die Methode der Stammzellisolierung vor allem verwendet, um die Frage zu prüfen, in wie weit die von uns als "Ruhezellen" beschriebenen Lymphozyten des Knochenmarkes mit der Fraktion der isolierbaren hämatopoetischen Stammzellen identisch sind. Darüber hinaus führten Dicke und van Bekkum in unserer Gruppe diese Albumin-Gradienten-Methode der Stammzellisolierung bei einem Kind mit angeborener lymphopenischer Hypogammaglobulinämie durch.

3.4.1 Selektive Anreicherung von Ruhezellen des Knochenmarkes mit möglicher Stammzellenfunktion mittels Albumingradient

R Haas
I. Fache
H. Flad
K. Meyer-Hamme
A. v. Neubeck

Ausgangspunkt der Untersuchungen ist die Beobachtung, dass die verschiedenen Fraktionen einer in einem Albumingradienten aufgetrennte Markzellsuspension verschiedene Eigenschaften mit Bezug auf ihre Fähigkeit haben, ein aplastisches Knochenmark zu regenerieren und/oder eine graft-versus-host Erkrankung hervorzurufen. Dicke und van Bekkum fanden bei Mäusen und Affen, dass die Fraktion 3' eine Anreicherung von hämopoetischen Stammzellen enthält, während die schwerste graft-versus-host Reaktion bei Übertragung der Fraktion 5 erfolgt.

Für unsere Gruppe war es zunächst erforderlich, die Methode als solche für den Versuch an Ratten zu adaptieren, da wir an dieser Tierspezies das Modell der ^3H -Thymidin markierten Knochenmarkruhezellen entwickelten, unter denen wir die hämopoetische Stammzelle vermuten.

Der Albumingradient wurde folgenderweise angesetzt:

Stammlösungen von bovinem-Serum-Albumin (BSA) (Fraktion 5, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) 35 % w/v werden bei Raumtemperatur in 0,155 M Tris-Puffer bei einem pH von 7,2 vorbereitet. Die Osmolalität der 35 %igen BSA-Stammlösung wird bestimmt. Sie setzt sich zusammen aus der Osmolalität von 17 %iger BSA in aqua dest. + der Osmolalität des Tris-Puffers (pH 7,2). Die Osmolalität des Tris-Puffers wird mit aqua-dest. so eingestellt, dass sie addiert mit der Osmolalität der 17 %igen BSA-aqua dest-Lösung 270 ergibt. Der pH-Wert des Tris-Puffers von 7,2 muss beibehalten werden.

Die verschiedenen BSA-Konzentrationen werden durch Verdünnung der BSA-Stammlösung (35 %) mittels 0,154 M NaCl, 0,01 M Phosphat Puffer pH 7,2 durchgeführt. Diese BSA-Konzentrationen von 35 % - 17 % werden mittels des Refraktometers von Zeiss eingestellt. Die abgelesenen Werte müssen auf der Geraden der vorher

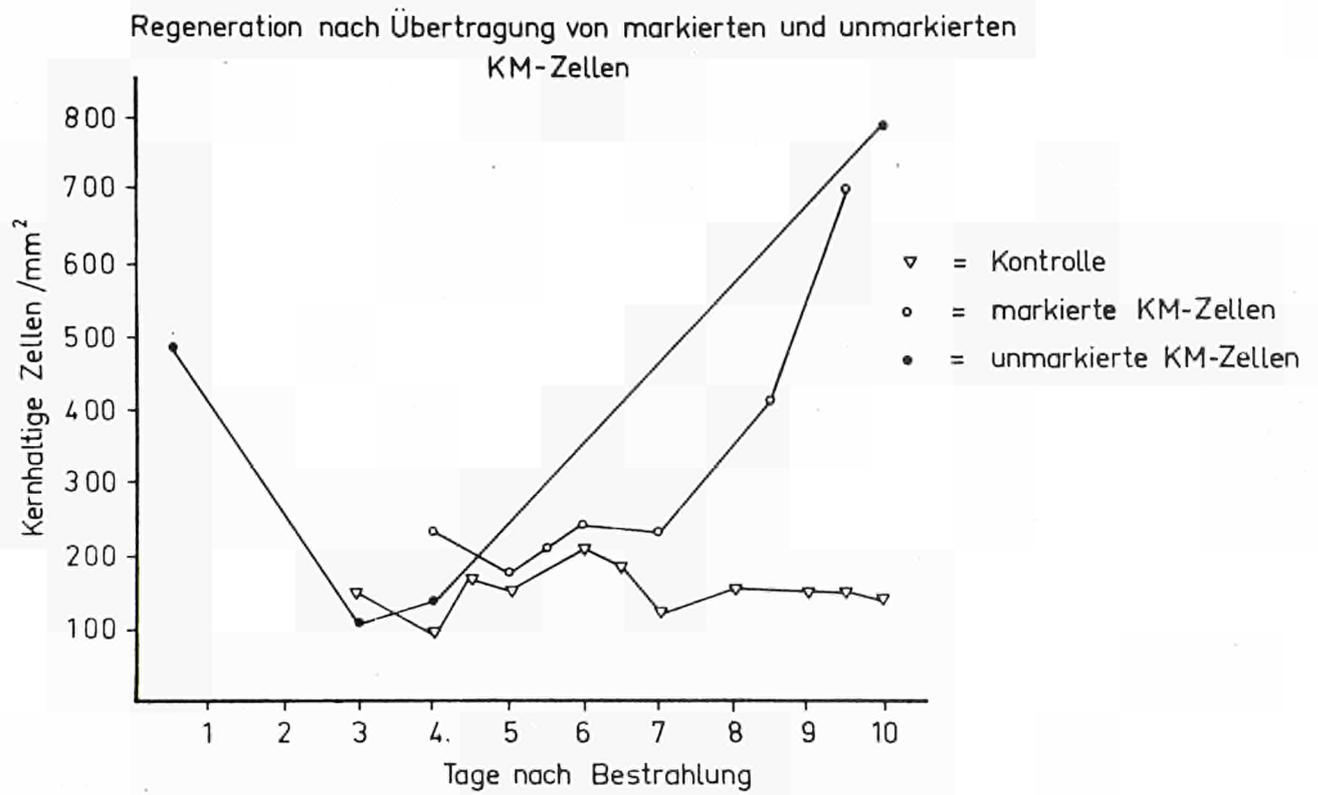


Abb. 10.

angefertigten Eichkurve liegen. Die verschiedenen Konzentrationen sind 35, 33, 31, 29, 27, 25, 23, 21, 19, 17 %. Portionen von jeweils 0,6 ml der verschiedenen BSA Lösungen werden mittels einer Pasteurpipette in einem Spezialröhrchen (16 x 0,8 cm) in der Reihenfolge ihrer Verdünnungen geschichtet. Auf die oberste Gradientenschicht (17 % BSA) werden 300×10^6 Zellen aufgebracht.

Bei der Schichtung des Gradienten ist darauf zu achten, dass jeweils 0,6 ml BSA möglichst tief über die zuletzt einpipettierte Schicht in die Mitte des Reagenzglas-Lumens einpipettiert wird, um eine Vermischung verschiedener BSA-Konzentrationen durch Herunterlaufen an der Glaswand zu vermeiden.

Nach der Schichtung des Gradienten und dem Aufbringen der Zellen wird das Röhrchen 30 Minuten lang bei 10 °C mit 1 000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind 10 Schichten deutlich sichtbar. Diese einzelnen Fraktionen werden mittels einer silicisierten Pasteurpipette abgehebert, mit Hankslösung ausgewaschen. Beim Abpipettieren der einzelnen Fraktionen wird nur die zellhaltige Schicht entnommen, während die BSA enthaltende Lösung zurückbleibt.

Die bisherigen Untersuchungen haben zunächst gezeigt, dass Knochenmarkzellen, die mittels des Dichtegradienten separiert wurden, eine gleiche Regenerationsaktivität entfalten wie normales Knochenmark bei Transplantationen mit gleichen Zellzahlen.

Weiterhin konnte bisher gezeigt werden, dass Knochenmark, in dem nur zytokinetisch ruhende Zellen markiert waren, d.h. Knochenmark, das von ehemals 100 % markierten Ratten abstammte, eine gleiche Repopulationsfähigkeit entwickelte wie normales Knochenmark (Abb. 10). Dabei wurde noch nicht der Unterschied der einzelnen Fraktionen hinsichtlich der Regeneration gegenüber unsepariertem Knochenmark herausgearbeitet. Diese Untersuchungen sind Gegenstand der im Augenblick laufenden Arbeiten. Erste Ergebnisse der unterschiedlichen Regeneration der Fraktion 3' gegenüber Fraktion 5' vermittelt die Tabelle 6.

Tabelle 6

Absolute Anzahl kernhaltiger Zellen $\times 10^3$ /mg Knochenmark nach Übertragung von $9,5 \times 10^6$ Zellen in bestrahlte Empfängerratten (1200 R)

	9 Tage nach Bestrahlung		12 Tage nach Bestrahlung	
	Fraktion 3'	Fraktion 5	Fraktion 3'	Fraktion 5
E1-E5	106.0	1.6	316.0	18.5
M1-M4	61.0	0.7	82.0	6.6
M5-M8	75.0	0.9	154.0	6.8
Lymphozyten	59.0	0.2	147.0	0.4
Retikulumzellen	46.3	29.6	41.0	57.6
Blasten	20.8	0.3	2.3	1.3
Sonstige	17.9	1.8	33.2	3.5

Nachdem in diesen Voruntersuchungen gezeigt wurde, dass die Gradientenmethode an sich nicht zu einer Beeinträchtigung der Repopulationsfähigkeit der Markzellsuspension führt und dass diese auch nicht durch die Tatsache der ^3H -TdR-Markierung der in der Suspension befindlichen Ruhezellen des Markes beeinträchtigt wird erlaubt nunmehr die Erforschung der Frage nach dem Korrelat zwischen Ruhezellen des Markes, der hämatopoetischen Regenerationsfähigkeit und der Immunkompetenz.

3.4.2 Übertragung der Fraktion 3' des Albumingradienten von Knochenmarkzellen bei einem Kind mit Immuninsuffizienz

T.M.Fliedner
H.Flad
R.Haas
I.Fache
K.Dicke
D.vanBekum

Erstmalig in Deutschland und zum 2. Mal in Europa wurde im Dezember 1969 bei einem 9 Monate alten Knaben mit angeborener Immuninsuffizienz eine Knochenmarktransfusion durchgeführt. Das Mark (ca. 600 ml Knochenmarkblut) wurde von der Mutter als Spenderin entnommen. Es wurden dann von Dicke und van Bekum

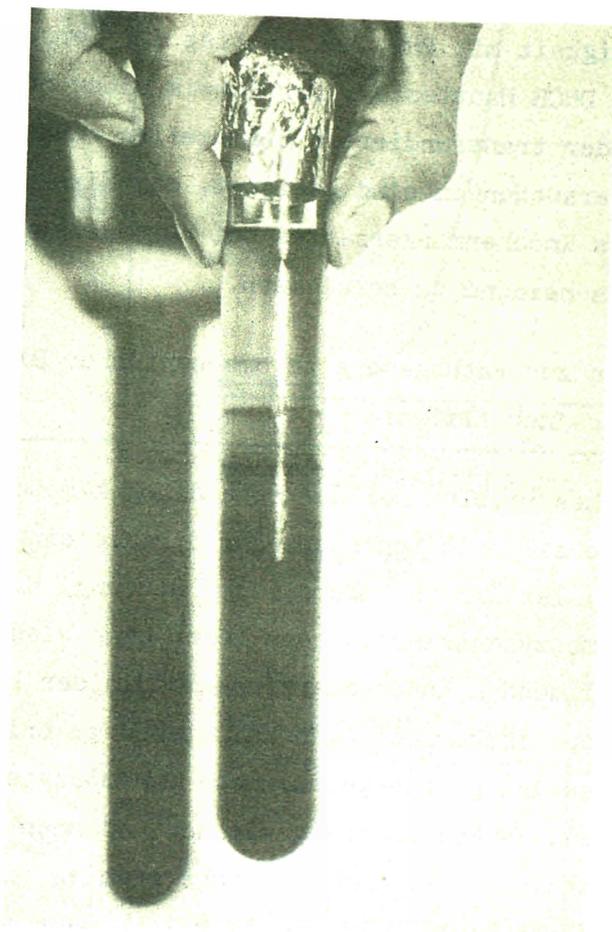


Abb. 11.

in einem Albumingradienten 5 Fraktionen aufgetrennt (Abb. 11). Dem Kind wurden 40×10^6 Zellen der Fraktion 3 dieses Gradienten infundiert. Das Kind war an 4 Tagen vor der Markzelltransfusion vom Tag -4 bis Tag -1 mit 62,5 mg/kg/Tag Antilymphozytenglobulin vorbehandelt worden mit dem Ziel, die restliche Immunkompetenz des Kindes noch weiter zu vermindern. Die Ergebnisse sind noch nicht abgeschlossen. Auf alle Fälle ergab sich nach der "Stammzellentransfusion" eine Normalisierung der Lymphozytentransformationsfähigkeit mit PHA, ein Anstieg der Serumglobulinwerte und des DNCB Hauttestes. Der Beweis einer endgültigen "Ansiedlung" der transfundierten Stammzellen steht noch aus. Derartige Untersuchungen sind geeignet, das Wissen um die Möglichkeiten des Knochenmarkersatzes bei Versagenszuständen der Hämopoese entscheidend zu bereichern.

3.5 Untersuchungen zur Pathogenese thrombopenischer Blutungen bei hämopoetischer Insuffizienz

Ein wesentliches Problem bei der Behandlung hämopoetischer Insuffizienz wie sie nach ionisierender Strahleneinwirkung beobachtet wird, ist die thrombopenische Blutung. Es ist bekannt, dass nur Thrombozytentransfusionen (oder eine Wiederherstellung der blutzellbildenden Knochenmarkfunktion) in der Lage sind, derartige thrombopenische Blutungen zum Stehen zu bringen, nicht aber beispielsweise gefrieretrocknete Thrombozyten oder Blutstillungsmittel. Im Zusammenhang mit den modernen gnotobiotischen Möglichkeiten wurde nun die Frage wichtig, in wieweit eigentlich die mikrobielle Flora als solche oder in ihrer Zusammensetzung einen Einfluss auf die Blutungsneigung bei bestehender Thrombopenie hat. Die klinische Beobachtung lehrt, dass Thrombopenien lange Zeit gut ertragen werden können, dass aber ein hinzutretender bakterieller Infekt unter Umständen eine umfassende Blutungsneigung auslösen kann. Es war deshalb die Frage, inwieweit sich Thrombopenie und bakterieller Infekt

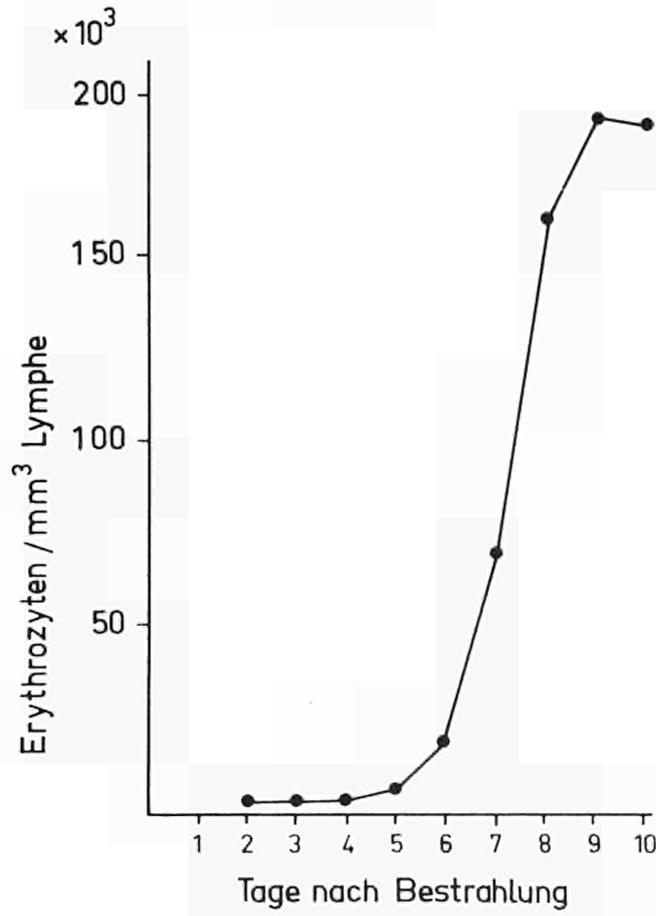


Abb. 12.

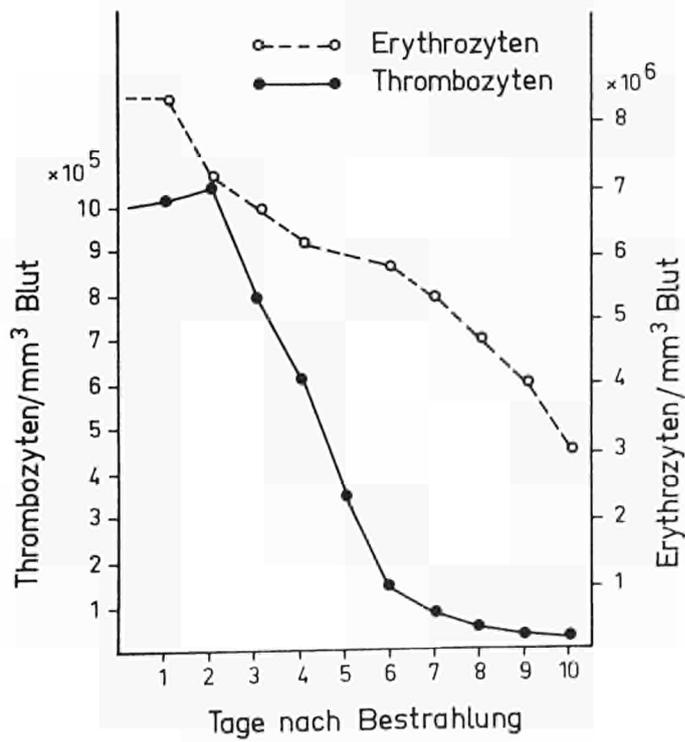


Abb. 13.

gegenseitig im Hinblick auf die Blutungsneigung beeinflussen, oder umgekehrt, ob bei keimfreien oder bei gnotobiotischen Tieren die Blutungsneigung geringer ist. Da es heute möglich ist, auch Menschen keimarm oder gar keimfrei zu halten, erscheint diese Klärung wesentlich für die Frage des therapeutischen Handelns bei Patienten mit hämopoetischer Insuffizienz, bei denen sowohl die Granulozytopoese wie die Megakaryozytopoese beeinträchtigt ist.

3.5.1 Etablierung des Modells zur quantitativen Erfassung der thrombopenischen Blutung

R.Hohage

Um die nach subletaler Bestrahlung auftretende hämorrhagische Diathese von konventionellen und keimfreien Tieren miteinander vergleichen zu können, muss das Ausmass der Blutungen quantitativ erfasst werden. Uns scheint die Zahl der in die Lymphe austretenden Erythrozyten ein geeigneter Parameter zur Beurteilung solcher thrombopenischer Blutungen zu sein. Es wurden deshalb in Anlehnung an die von Ross, Furth und Bigelow (1952) unternommenen Versuche weibliche Wistarratten von 200 - 250 g Gewicht mit 700 r bestrahlt (entspricht bei diesem Stamm etwa der LD_{50/30 Tage}.) Am zweiten Tag nach Bestrahlung wurde nach einer von Bollmann, Cain und Grindlay (1948) angegebenen Technik der Ductus Thoracicus kanuliert. Die Erythrozytenzahlen in der Lymphe wurden zweimal täglich gemessen.

In den ersten drei Tagen nach der Operation bewegten sich, abgesehen von leichten traumatischen Blutungen kurz nach der Operation, die Erythrozytenzahlen in der Lymphe mit 100 - 5 000 Zellen/mm³ im Normbereich. Zwischen dem 5. und dem 7. Tag nach Bestrahlung setzte ein deutlicher Anstieg der Erythrozytenzahlen ein, am 8. Tag wurde das Maximum erreicht (Abb. 12). Die Thrombozytenzahlen im peripheren Blut sanken beginnend 3 Tage nach Bestrahlung, bis zum 10. Tag hin kontinuierlich ab (Abb. 13). Zum Zeitpunkt der ersten eintretenden Blutungen in die Lymphe lagen sie zwischen 30 000 und 200 000 Zellen/mm³. Die Erythrozyten-

zahlen im peripheren Blut sanken am zweiten Tag nach Bestrahlung und wenige Stunden nach Operationsende leicht ab, der Abstieg erfolgte dann kontinuierlich weiter bis zum 10. Tag nach Bestrahlung (Abb. 13).

Erste Versuche, die Technik der Ductus-Thoracicus-Kanulierung an keimfreien Ratten in einem Operationsisolator durchzuführen, verliefen erfolgreich. Versuche mit ganzkörperbestrahlten keimfreien Ratten sind in Vorbereitung.

3.5.2 Untersuchungen über die Plättchenfunktion in bestrahlten Ratten

R.Hohage

Zum Nachweis einer veränderten Thrombozytenfunktion als Ursache verstärkter Blutungsneigung bei Thrombopenie wurde eine Methodik zum Studium der Plättchenfunktion bei Ratten entwickelt. Bestimmt wird dabei die Fähigkeit der Plättchen zur Retraktion von Gerinnseln aus plättchenfreiem menschlichen Mischplasma sowie die Aggregation durch ADP und durch Kollagen-Partikel in Modifikation der Born'schen turbidimetrischen Methode.

Die Retraktionsfähigkeit der Plättchen war sowohl am vierten wie am fünften Tag nach Bestrahlung (700 R) um mehr als 10 % geringer als die von unbestrahlten Kontrollen. Auch die Aggregation durch Kollagen-Partikel war bei den bestrahlten Tieren im Durchschnitt schwächer ausgeprägt, wobei die Tiere am fünften Tag nach Bestrahlung die schwächste Aggregation zeigten. Da die ADP-induzierte Aggregation bei den bestrahlten Tieren gegenüber den Kontrollen unverändert war, ist anzunehmen, dass die schwächere Aggregation nach Kollagenzusatz auf eine gestörte ADP-Freisetzung aus den Plättchen zurückzuführen ist.

Die Befunde lassen vermuten, dass bei der Genese der strahlenbedingten Hämorrhagien neben der Thrombopenie auch eine veränderte Funktion der Thrombozyten von Bedeutung ist, die sich

zum Teil durch die überalterte Plättchenpopulation vier bis fünf Tage nach Bestrahlung erklärt. Zusätzlich kann jedoch auch eine Schädigung der Megakaryozyten durch die Röntgenstrahlen mit nachfolgender Freisetzung funktionsschwacher Thrombozyten eine Rolle spielen.

3.6 Schlussbemerkungen zum Thema Verbesserung therapeutischer Methoden beim Strahlenschaden

Die Untersuchungen der Ulmer Gruppe im Hinblick auf das Problem der Verbesserung therapeutischer Methoden beim Strahlenschaden lassen unter Berücksichtigung der Arbeit anderer, vor allem europäischer Forschungsgruppen die Notwendigkeit von drei Arbeitsbereichen erkennen, deren Intensivierung wesentlich erscheint.

A. Die Gnotobiotik ist heute in die klinischen Bereiche eingedrungen. Ihre konsequente Anwendung lässt es möglich erscheinen, dass eine unmittelbar nach Bestrahlung einsetzende antibiotische Dekontaminationsbehandlung und die Aufrechterhaltung des gnotobiotischen Zustandes im keimfreien Milieu, die Infekthäufigkeit stark herabzusetzen vermag. Dieses ist wichtig für alle Dosisbereiche jenseits einer LD 50/60 Tage, da sowohl für das Problem der granulozytopenischen Infekte wie für das der thrombopenischen Blutungen als auch für die Konsequenzen der Immunreaktionen bei Markzelltransfusion der gnotobiotische oder gar keimfreie Zustand von grösster Bedeutung sind.

B. Die Hämostaseologie muss weiter vorangetrieben werden: Immer noch bilden Blutungen ein ernstes Problem für die Behandlung von Strahlenschäden. Es muss erneut der Pathogenese der Blutungsneigung nachgegangen werden, wobei der Einfluss von mehreren Faktoren von Bedeutung ist: die Funktion der Thrombozyten selbst nach Strahleneinwirkung, die Wechsel-

wirkung zwischen Blutgefäß und Thrombozyt, die Wechselwirkung zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelien und die Wechselwirkung zwischen diesen Elementen und der mikrobiellen Flora.

- C. Die Transplantationsforschung muss in zwei Richtungen hin verbessert werden. Einerseits erfordern die immunologischen Probleme der allogenen Knochenmarktransplantation erneuten Einsatz, und zwar durch Verbesserung der Charakterisierung der Histokompatibilität. Andererseits sollten die Spender und Empfängerprobleme in mehreren Richtungen vorangetrieben werden: Isolierung und Anreicherung von Stammzellen der Hämpoese, wenn möglich aus dem strömenden Blut sowie ihre Abtrennung von immunkompetenten Zellen. Möglicherweise Vorbehandlung des Spenders zur Erhöhung der Effektivität der Zellseparierung oder gegebenenfalls seiner Immunkompetenz. Vorbehandlung des Empfängers mit dem Ziel, die Ansiedlungseffektivität durch geeignete Beeinflussung der lokalen Ansiedlungsbedingungen zu ändern und die Abstossung zu erschweren.

Für den ganzen Bereich ist vertiefte Grundlagenforschung erforderlich da in vielen Bereichen sowohl physiologische wie pathophysiologische Grundtatsachen bisher nicht hinreichend bearbeitet wurden.

4. Physiologische und Pathophysiologische Untersuchungen zur Blutzellbildung soweit sie für die Erforschung diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten beim Strahlenschaden relevant sind

4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Strahlenhämatologische Forschung auf dem Gebiet der Diagnostik und Therapie des Strahlenschadens erfordert die Erforschung bestimmter physiologischer und pathophysiologischer Tatbestände, ohne die die angewandte Forschung nicht auskommt.

Die Ulmer-Gruppe konzentrierte ihre Bemühungen in den Jahren 1968/1969 im Rahmen dieses Vertrages auf 4 Bereiche. Im ersten Abschnitt (4.2) soll über die Versuche berichtet werden, die DNS-Syntheszeiten von Zellpopulationen durch die "Doppelmarkierungsmethode" zu charakterisieren. Degeneration und Regeneration des Markes nach Strahleneinwirkung lassen sich nur erfassen und möglicherweise beeinflussen, wenn die Parameter der Zellerneuerung hinreichend definiert sind. Im zweiten Abschnitt wird über den Einfluss von Strahlen auf die Nerven des Knochenmarkes berichtet. Damit tut sich ein neues Gebiet der Strahlenhämatologie auf, der Strahlen-Neurohämatologie und zwar deshalb, weil offensichtlich relativ kleine Strahlendosen in der Lage sind, nachhaltige Wirkungen auf die Nervenfasern auszuüben. Ein dritter Abschnitt soll die Frage nach der Embryogenese bearbeiten, da man durch die Erforschung der Entstehungsweise des Knochenmarkes eine Fülle von Informationen für das Stammzellenproblem erwarten kann. Schliesslich soll in einem 4. Abschnitt über Untersuchungen zur extrakorporalen Blutbestrahlung berichtet werden. Diese neue Methode verspricht wichtige Aufschlüsse über die Physiologie und Pathophysiologie des lymphatischen Systems neben ihren Vorteilen in der nuklearmedizinischen Behandlung von hämatopoetischen Erkrankungen.

4.2 DNS-Synthesezeit von Zellpopulationen

B.Harriss
D.Kunik
Kibler
Risse

Für die Zellphysiologie und ihre Strahlenpathologie ist die DNS-Synthesezeit ein wesentlicher Parameter, dessen exakte Bestimmung in der klinischen Forschung und im Tierexperiment noch immer auf erhebliche Schwierigkeiten stösst. Eine elegante Methode für die Bestimmung der DNS-Synthesezeit (T_s) ist die von Wimber und Quastler (1963) und von Hilscher und Maurer (1962) beschriebene Doppel-Markierungsmethode. Die in DNS-Synthese befindlichen Zellen werden zuerst mit ^3H -Thymidin und nach einer bestimmten Zeit mit ^{14}C -Thymidin radioaktiv markiert. Zellen, die während der Zeit t die DNS-Synthese vollendet haben, werden dann nur mit ^3H -Thymidin markiert sein und ihre Anzahl N_{H^3} ist der Zeit t proportional. Zellen, die zur Zeit der zweiten Markierung mit ^{14}C -Thymidin noch in DNS-Synthese waren und solche die in der Zeit t ihre DNS-Synthese begonnen haben, werden mit ^{14}C -Thymidin markiert sein und ihre Zahl $N_{\text{C}-14}$ ist der Zeit T_s proportional. Daher gilt die Bezeichnung

$$\frac{N_{\text{H}^3}}{N_{\text{C}-14}} = \frac{t}{T_s}$$

Die Unterscheidung von Zellen die nur mit ^3H -Thymidin markiert wurden können autoradiographisch von Zellen die mit ^{14}C -Thymidin markiert sind (mit oder ohne ^3H -Thymidin) dadurch unterschieden werden, dass die Weglängen der Zerfallselektronen von ^{14}C und ^3H auf Grund ihrer Energiedifferenz unterschiedlich sind. Dadurch ist es dann möglich, mit Hilfe einer einzigen Gewebeprobe, die zu einer bestimmten Zeit nach ^3H -Thymidininjektion gewonnen wurde, und der dann erfolgten kurzfristigen in-vitro Inkubation mit ^{14}C -Thymidin die DNS-Synthesezeit T_s zu bestimmen. Diese Methode hat vor allem bei Patienten den Vorteil, dass sie praktisch durchführbar ist. Die "Markierte Mitosen-

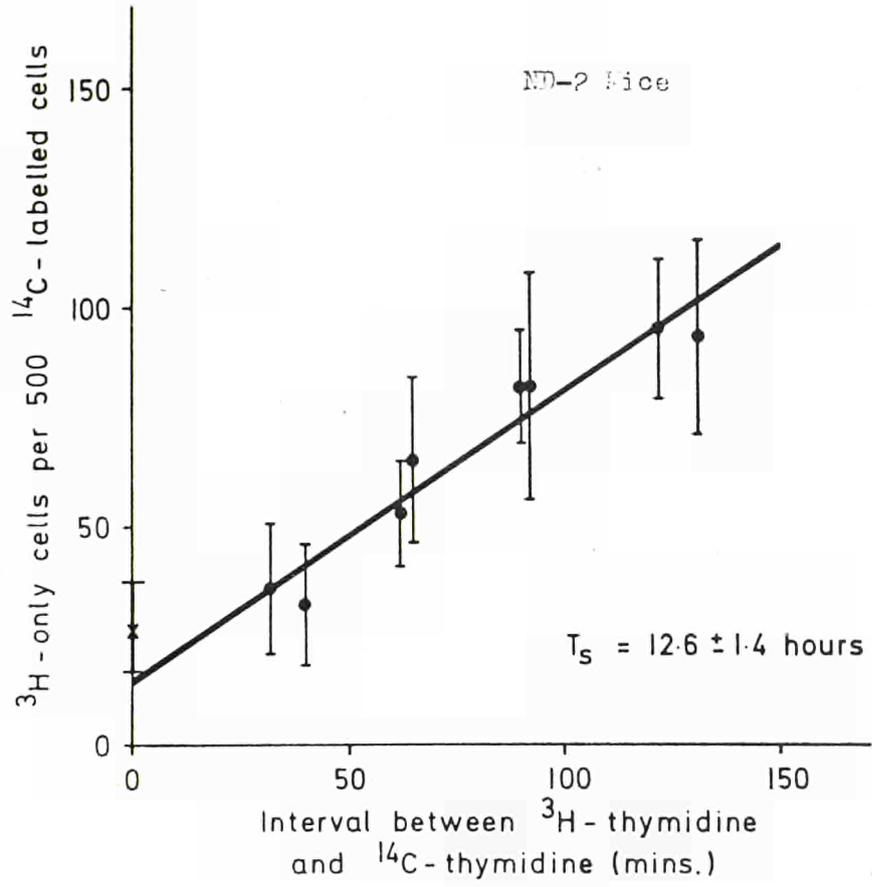
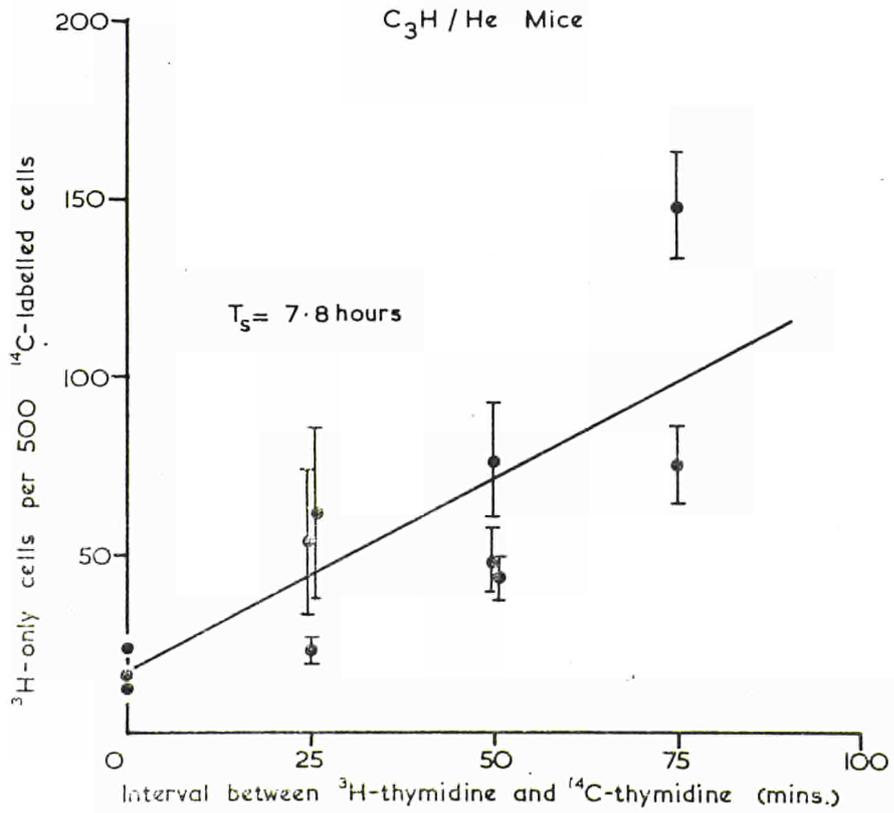


Abb. 14.



Kurve" die normalerweise tierexperimentell zur Bestimmung der DNS-Synthesezeit verwendet wird erfordert viele Probeentnahmen, die sich beim Patienten häufig nicht durchführen lassen. Vor Anwendung dieser Methode beim Menschen war es jedoch notwendig, bei Ratten und Mäusen die geeignetsten Bedingungen herauszuarbeiten, um Zellen, die nur mit ^3H -markiert waren von solchen die mit ^{14}C -markiert sind zu unterscheiden. In Abb. 14 werden die Ergebnisse eines Experiments dargestellt, in dem die Zeit t (Interval zwischen der ersten und zweiten Thymidinmarkierung) von 0.5 bis 2 Stunden variiert wurde. Es ergab sich für T_s ein Wert von etwa 12 Stunden und zwar aus dem Neigungswinkel der gewonnenen Kurve. Dieser Wert erscheint im Vergleich zu anderen DNS-Synthesezeiten von Mäusen relativ lang, der gewöhnlich bei ca. 8 Stunden liegt (auf Grund von Mitose-Markierungskurven). Jedoch fanden wir in einem anderen Mäusestamm mit der Doppelmarkierungsmethode einen Wert von 7.8 Stunden für T_s (Abb. 15). Jedoch fand Frindel 1967 in diesem Mäusestamm mit der Mitosenmarkierungsmethode einen Wert von 4 Stunden. Aus diesem Grund erhebt sich die Frage nach den Ursachen für diese Diskrepanz. Aus diesem Grunde befindet sich zur Zeit eine Studie in der Durchführung, in der beide Methoden beim gleichen Stamm verwendet werden. Darüber hinaus sind Untersuchungen am Menschen in der Durchführung, um zur Frage vorzustossen, ob die DNS-Synthesezeit in den hämopoetischen Organen und insbesondere bei den verschiedenen Zellarten gleich ist oder nicht.

4.3 Einfluss ionisierender Strahlen auf die Nervenfasern des Knochenmarkes

Ein weiteres wesentliches Arbeitsgebiet unserer Gruppe ist seit mehreren Jahren die Erforschung der Neuroarchitektonik des Knochenmarkes als Grundlage für die Beschreibung der neurophysiologischen Regulation der Zellproduktions- und Ausschwem-

.Calvo
.Forteza-Vila
.Krebs
.Heinl

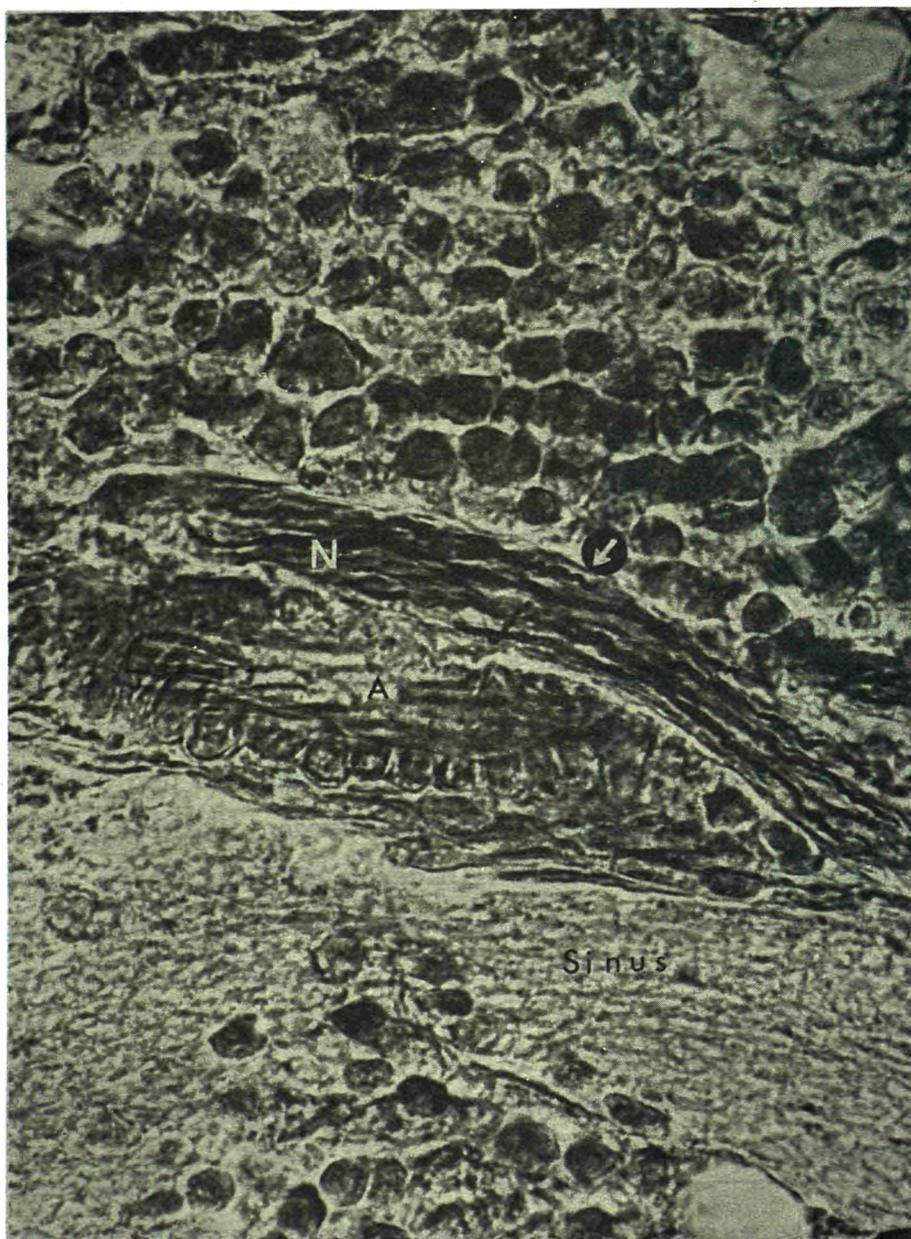


Abb. 16. "Korkenzieherartige" Veränderungen (Pfeil) der paravasculären Nervenfasern. Knochenmark des Femurs 24 Stunden nach Ganzkörperbestrahlung (400 rad). Reduziertes Silbernitrat nach Cajal-Castro. Vergr. X 1000.



Abb. 17. Nicht-myelinisierte Nervenfasern des Ratten-Knochenmarkes (Femur) 24 Stunden nach Ganzkörperbestrahlung (400 rad). Ein Axon zeigt vermehrt Glykogen (Gl), während die anderen eine normale Struktur aufweisen (A).



Abb. 18. Nervenendigung zwischen Adventitia and Tunica media einer Arteria nutritia des Ratten-Knochenmarkes (Femur) 24 Stunden nach Ganzkörperbestrahlung mit 400 rad. Die axonale Membran fehlt teilweise. Die Nervenendigungen werden von Zytoplasmaausläufern der Adnentiiazellen umgeben. Durch vermehrt interstitielle Flüssigkeit (Oedem) sind diese Zytoplasmaausläufer auseinandergedrängt.

mungsmechanismen. Diese Ergebnisse wurden in früheren Arbeiten und Berichten dargestellt (Calvo 1968, Calvo und Haas 1969, Calvo und Forteza-Vila 1969).

Es war nunmehr die Frage in wie weit die Nerven des Knochenmarkes durch ionisierende Strahlen im Bereich unterhalb der LD 50 geschädigt werden könnten. Die ersten Ergebnisse dieser Versuche sollen hier dargestellt werden. Wistarratten wurden einer Ganzkörperbestrahlung in Höhe von 400 rad ausgesetzt. Diese Dosis erzeugt bekanntlich eine schwere Knochenmarkschädigung, jedoch kann das Mark spontan ohne spezielle Behandlung vollständig regenerieren. Andererseits verursacht eine derartige Dosis unseres Wissens nach keine morphologischen Veränderungen des Nervensystems in anderen Geweben. Es war daher das Ziel unseres Versuchs die Frage zu prüfen, ob die Knochenmarksnerven in einem so strahlensensiblen Organ wie dem Knochenmark morphologische Alterationen aufweist.

Die üblichen Färbemethoden der Pathologie erlauben naturgemäss keine Darstellung der einzelnen Nervenfasern, jedoch den Nachweis der stattgefundenen Schädigung von Markzellen und der Markblutgefässe. Dagegen konnten die spezifischen Nervenfärbemethoden mit reduziertem Silbernitrat nach Cajal bereits 24 Stunden nach Bestrahlung eindeutige Veränderungen an den Nervenfasern herausstellen. Diese Befunde zeigen "korkenzieherartige" Veränderungen der Fasern und Irregularitäten in ihrem Durchmesser sowie eine Weiterstellung der Zwischenräume zwischen den Nervenfasern (s. Abb. 16).

Ebenso war auch elektronenoptisch die Schädigung der Nervenfasern deutlich zu erkennen. Dabei kommt es zu einer Akkumulation von Glykogen-Granula in einer Anzahl der Nicht-myelinisierten Fasern, im Zytoplasma der Schwannschen Zellen und in den Fibrozyten der Nerven (Abb. 17). Darüber hinaus konnte eine ZerreiSSung der axonalen Membranen in den Nervenendigungen beobachtet werden (Abb. 18).

Die hier beobachteten Läsionen waren nicht schwer genug, um die Nerven zerstören zu können. Während der zellulären Regeneration des Markes fanden sich zahlreiche Nervenfasern inmitten der neugebildeten Zellgruppen. Diese Fasern waren sehr dünn und entsprangen offenbar den dicken Nerven, die die Blutgefäße begleiteten. Die Fasern wiesen mehr Schwann-Zellen als die vorher vorhandenen Fasern gehabt haben auf. Die Feinstruktur der Nervenfasern in solchen Regenerationsinseln war der von Fasern bei neugeborenen Ratten sehr ähnlich. In beiden Fällen fehlt das Endoneurium, ebenso fehlen die Kollagenschichten um die Nervenfasern. Dagegen kommt es in beiden Fällen zum Auftreten einzelner Schwann-Zellen, die nur einige wenige, sehr dünne, nicht myelinisierte Axone aufweisen und in der Nähe von Lymphozyten, Retikulum-Zellen und unreifer Blutzellen liegen. In den grösseren Nervenfasern-Komplexen fanden sich auch Frühformen der Myelinisierung.

Diese Befunde weisen einmal auf die ungewöhnlich grosse Strahlensensibilität der Nervenfasern im Knochenmark hin. Zum anderen zeigen sie, dass es gleichzeitig mit der Markzell-Regeneration zu einer Neubildung von Nervenfasern kommt. Möglicherweise hängt eine effektive Hämpoese von der Entwicklung einer gut innervierten Knochenmark-Matrix ab, die erst dann in der Lage ist, eine feine Regulation der Zellproliferation und Zellentleerung im Knochenmark zu steuern.

4.4 Untersuchungen über die Entstehungsweise des Knochenmarkes

W. Calvo
R. Haas
G. Cuda
B. Krebs

Ein zentrales Problem der strahlenhämatologischen Forschung ist das der funktionellen Struktur des Stammzellenspeichers der Blutzellbildung, da in ihr das Verständnis verborgen ist für die Reaktionen der Hämpoese bei physiologischen Adaptationsvorgängen wie nach Strahleneinwirkung und den nachfolgenden Regenerationsvorgängen. Viele Wege wurden eingeschlagen, um der Lösung des Problems näher zu kommen. Ein noch wenig be-

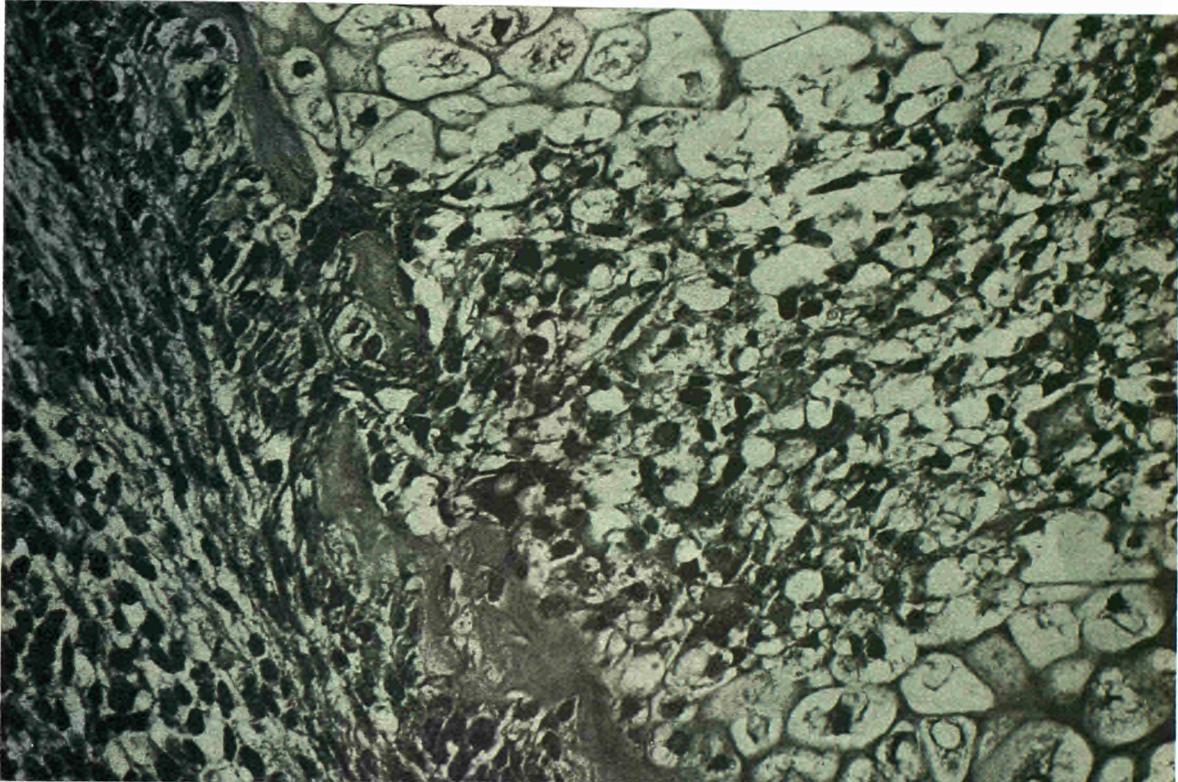


Abb. 19. Femur einer Ratte, 19. Tag der Fetalzeit. Invasion mesenchymaler Zellen in nekrotische Knorpelzellbezirke durch Corticalifenster. Im linken Teil der Abb. sieht man parallele Lagen spindelförmiger Zellen in der perichondralen Zone. Abgerundete oder sternförmige Mesenchymzellen dringen durch die beiden Öffnungen in die leeren Räume ein, die durch Untergang der Knorpelzellen entstanden sind. Rechts unten einzelne untergehende Knorpelzellen. Hämalum-Erythrosin. Vergr. X 350.

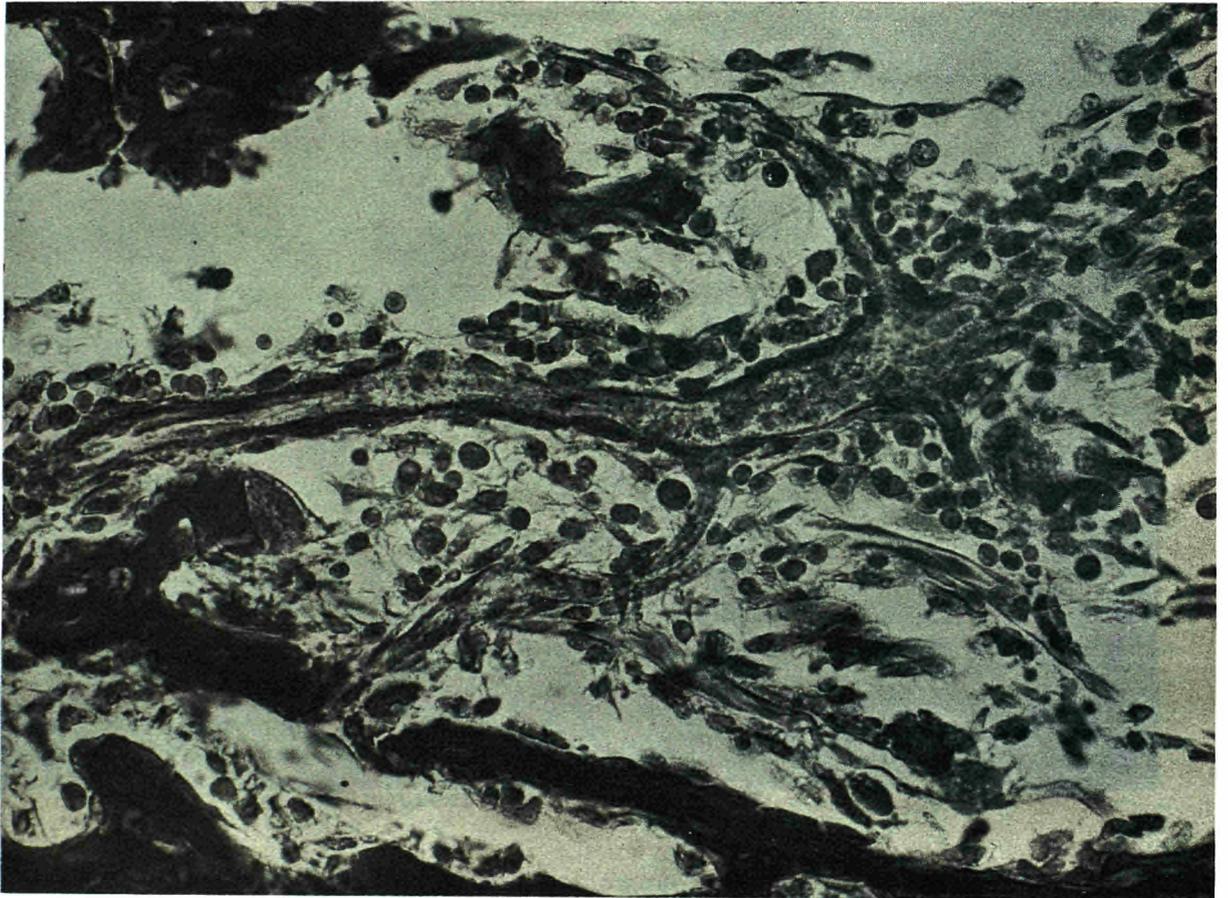


Abb. 20. In der zentralen primitiven Knochenmarkhöhle des Femurs am 20. Fetaltag verzweigt sich die primitive Arteria nutritia. Die kleineren Seitenäste sind noch nicht blutgefüllt. Ihr Lumen erlaubt noch keine Passage von Erythrozyten. Reduziertes Silbernitrat nach Cajal-Castro. Vergr. X 500.

schrittener Weg ist, die Genese der Hämopoese in der prä- und postnatalen Phase der Knochenentwicklung morphologisch und funktionell zu verfolgen und zu erforschen, in welcher Weise sich der oder die Stammzellenspeicher der Hämopoese etablieren.

Unsere eigenen Untersuchungen der Jahre 1968/1969 befassten sich zunächst mit dem Problem der Histogenese des Knochenmarkes und darüber hinaus mit der Frage nach der Zellkinetik derjenigen Zellen, die das Knochenmark erstmals hämopoetisch besiedeln.

Die frühen Entwicklungsstadien des Knochenmarkstromas während des Beginns der Blutzellbildung wurden an Wistarratten mit Hilfe einer Kombination von histologischen und zytologischen Methoden untersucht. Besondere Aufmerksamkeit galt der nervalen Versorgung des fötalen und neonatalen Knochenmarkes und ihrer Beziehung zur Blutzellbildung. Am 18. Tag der Fetalperiode findet sich lediglich im Bereich der späteren Diaphyse eine beginnende Atrophie der Knorpelzellen. Am 19. Tag erkennt man im Zentrum des Femurs die Entstehung von "Lacunen" durch den Untergang von Knorpelzellen. Für das Verständnis der Knochenmarkentstehung war der Befund wichtig, dass diese Lacunen von zahlreichen mesenchymalen Zellen besiedelt werden, die aus der perichondralen Zone durch feine Öffnungen der Corticalis im Diaphysenbereich ins Innere der Knochenhöhle eindringen (Abb. 19 u. 20). In der Nähe der Corticalisöffnungen sieht man auffallend häufig Mitosen der Mesenchymzellen. In diesem Stadium dringen erstmals feine Kapillaren ins Innere der Knochenmarkhöhle durch die Corticalisöffnungen ein. Sie gehen aus den Gefässen der Perichondralzone hervor. Es finden sich an diesem Tag weder Retikulin- noch Nervenfasern. Am 20. Tag sind die primitiven Markhöhlen grösser geworden und enthalten mehr Zellen. Neben den Mesenchymzellen, die jetzt eine sternförmige Gestalt aufweisen, werden undifferenzierte kleine mononukleäre Zellen und grosse un-

differenzierte Blastenformen extravasal angetroffen. Daneben gibt es reife Granulozyten. In dieser Zeit unterscheidet man am Periost 2 Zelltypen: entlang der Corticalis sieht man in einer inneren Schicht rundliche, mesenchymale Zellen und in einer äusseren Schicht lang ausgezogene Mesenchymzellen, die durch zahlreiche Retikulिन- und Kollagenfasern miteinander verknüpft sind. Diese Elemente bilden das spätere Periost. Die Mesenchymzellen der inneren Schicht verändern offensichtlich ihr Aussehen, wenn sie durch die Corticalisöffnungen ins Innere der Knochenmarkhöhle eindringen: sie werden sternförmig. Die Auszählung des zwischen dem 20. und 24. Tag der Femurmarkentwicklung gefundenen Zellgehaltes ergibt die in Tabelle 7 angegebenen Werte. Am 21. Tag der Fetalperiode hat sich das Mark ausgedehnt, es finden sich erste Nervenfasern wie auch Retikulinfasern. Sie formen ein Netzwerk zwischen den Zellen des Parenchyms und bilden damit ein Stützgerüst. Es finden sich Blasten. Definitive erythropoetische und myelopoetische Vorstufen der Knochenmarkszellen können erst 24 Stunden nach Geburt mit Sicherheit nachgewiesen werden. Am 22. Tag der Fetalperiode sieht man im Metaphysenbereich des Femurs mesenchymale Zellelemente, die runde oder ovale Kerne und ein blau angefärbtes Zytoplasma haben. Gelegentlich sind Mitosen zu sehen. An hämopoetischen Elementen finden sich vorwiegend reifere granulozytäre und erythrozytäre Elemente. Die frühen "Blasten" sind durch ihr stark basophiles Zytoplasma und ihren sehr dunklen Kern gekennzeichnet. Die ersten Sinusoide treten auf, charakterisiert durch ihren dünnen Endothelbelag. Zu dieser Zeit wird das Gerüst der Matrix des Markes stärker ausgebaut. Es finden sich Retikulinfasern, die die Äste der Arteria nutritia begleiten. Einzelne dieser Fasern reichen ins Parenchym hinein und zwar vorwiegend im Bereich der Diaphyse. Am Foramen nutritium ist der dort eintretende Nerv von 2 Reihen Schwamm-scher Zellen umgeben. Von seinem Stamm zweigen einzelne Fasern

in Y- oder T-Form ab und gelangen zwischen die primitive Knochenmarkzellelemente. Im Bereich der Verzweigungen der Arteria nutritia in ihre Hauptäste sieht man ausserdem feine Verästelungen von Nervenfasern, die mit ihren Enden die Gefässwände berühren. Die Funktion der Nerven für die hämopoetische Differenzierung bedarf weiteren Studiums. In der Zeit nach Geburt bildet sich die Hämopoese im Rahmen der mesenchymalen Matrix aus. Dabei ist von prinzipiellem Interesse, dass die einzelnen Knochen des Körpers den jeweils gleichen Prozess der Knochenmarkentwicklung, aber zu verschiedenen Zeiten durchmachen. Während beispielsweise das Femurmark schon kurz nach Geburt mit einer hämopoetischen Aktivität beginnt, verzögert sich die Bildung von hämopoetischem Mark in anderen Knochen (z.B. Mittelhandknochen) mehrere Stunden bis Tage nach Geburt. Im Femurmark sind 24 Stunden nach Geburt alle hämopoetischen Zellformen erkennbar, also der Myelopoese wie auch der Erythropoese. Aber auch die Matrix differenziert sich aus: In der Höhe des Foramen nutritium beginnt in der Wand der Arteria nutritia die Differenzierung glatter Muskelfasern, eine Entwicklung die in der Wand der Arteriolen noch nicht erkennbar ist. Die Arteria nutritia wird von einem Nerven begleitet, der sich innerhalb des Knochenmarkes ebenso wie die Äste der Arteria nutritia aufteilt. Von den paravasalen Nerven dringen einzelne Fasern in das Knochenmarkparenchym ein und bilden eine plexusartige Formation.

Die nervöse Versorgung des Knochenmarkes nimmt zur 48. Stunde nach Geburt weiter zu: der Nerv, der zu diesem Zeitpunkt die Knochenmarkhöhle versorgt enthält nun, gegenüber früheren Stadien, zahlreiche Axona. Er teilt sich stark auf und zielt zusammen mit den arteriellen Verästelungen in das Parenchym. Es gibt darüber hinaus dünne Nervenbündel von 2-4 Einzelfasern, sowie einzelne Nervenfasern, die das Knochenmarkparenchym unabhängig von den Gefässen durchqueren. Diese liegen im engen

Kontakt mit den blutbildenden Zellelementen und den Wänden der Sinusoide. Die Erforschung ihrer Bedeutung und Funktion erscheint für das Verständnis der Hämopoese und ihrer Regulation von besonderer Bedeutung.

Mit dieser Entwicklung ergeben sich - vor allem im Hinblick auf das Verständnis der Entstehung von Stammzellenspeichern - zwei wichtige Gesichtspunkte. Ein Prozess der Ausbildung eines Stromas ist von dem Prozess der Etablierung der Blutzellbildung zu unterscheiden. Das Stroma scheint von immigrierten Mesenchymzellen seinen Ausgang zu nehmen. Der Ursprung der Blutzellbildung bleibt noch ungeklärt: zur Zeit sprechen die Befunde für die Immigration ortsständiger Zellen des primitiven Perichondriums durch "Fenster" in der Corticalis in die primitive Markhöhle als Ursprungszellen auch der Hämopoese. Weniger wahrscheinlich ist die Einwanderung zirkulierender Stammzellen, Diese Frage soll aber 1969/1970 durch kinetische Studien der Zellmigration in die Markhöhle weiter geklärt werden. Auf alle Fälle scheint die Entwicklung eines innervierten Stromas erst die Voraussetzungen für die Proliferation und Differenzierung von Zellen in die hämatopoetischen Zellsysteme zu schaffen. Darüber hinaus geraten die Knochenmarkfunktionen durch die Nervenversorgung des Knochenmarkes nach der Geburt unter den Einfluss einer übergeordneten Regulation.

4.5 Die Verwendung der extrakorporalen Blutbestrahlung

G.Meuret
W.Schütz
E.B.Harriss
T.M.Fliedner
D.Hoelzer
J.Afkham,
P.Obrecht
K.Musshoff
V.Heinzl
A.Tourkantonis
O.Bock

In den Jahren 1968/1969 wurden die Möglichkeiten untersucht, die durch die Verwendung der extrakorporalen Blutbestrahlung in der Erforschung der Kinetik lymphatischer Zellen gegeben sind. Während die Forschungsgruppe in Freiburg war, wurde die Methode etabliert und zwar durch die Behandlung von 3 Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie. Die Beobachtungen die in Abb. 21, 22 und 23 aufgetragen sind, bestätigen zunächst im Prinzip die Befunde anderer Autoren.

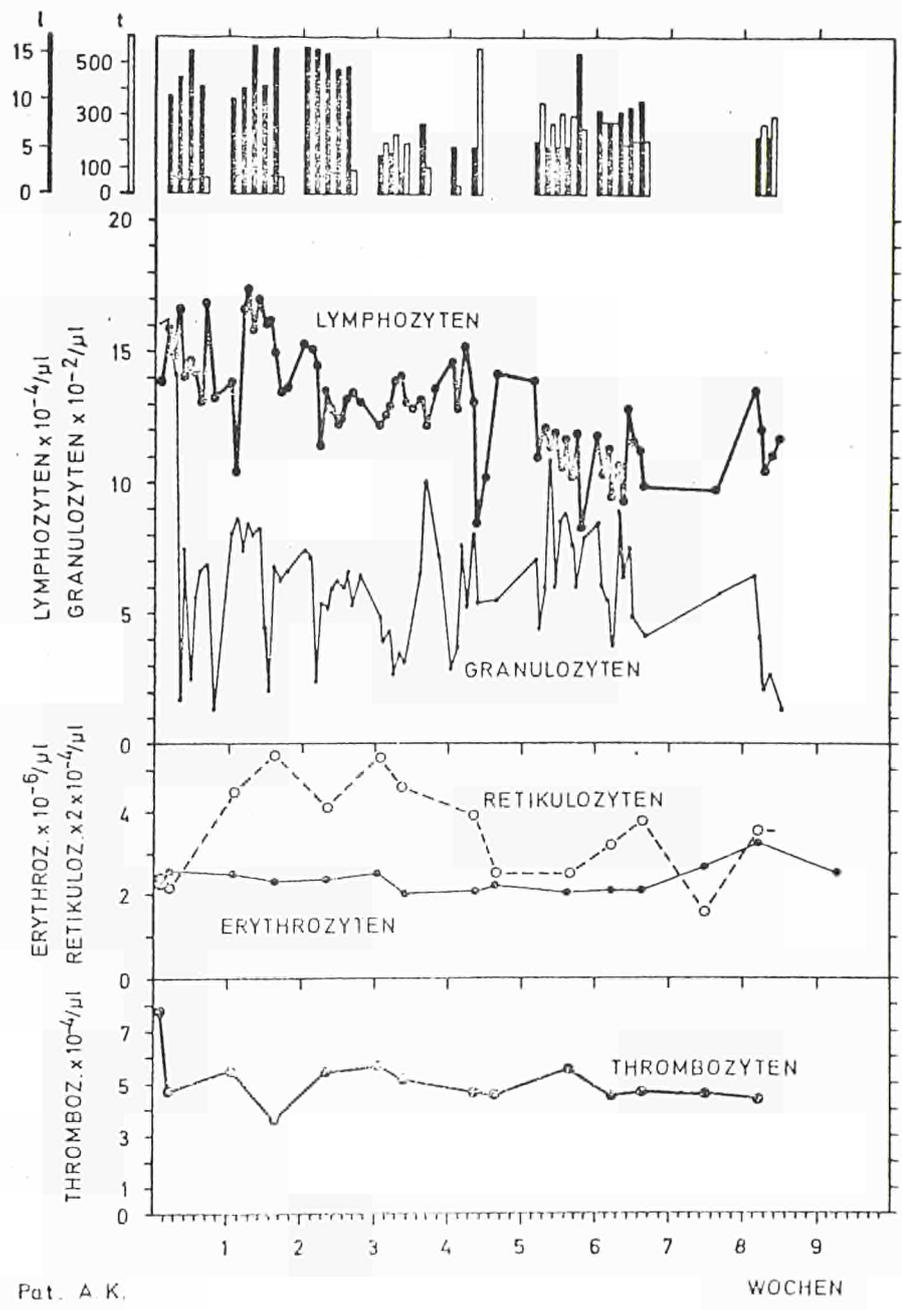


Abb. 21.

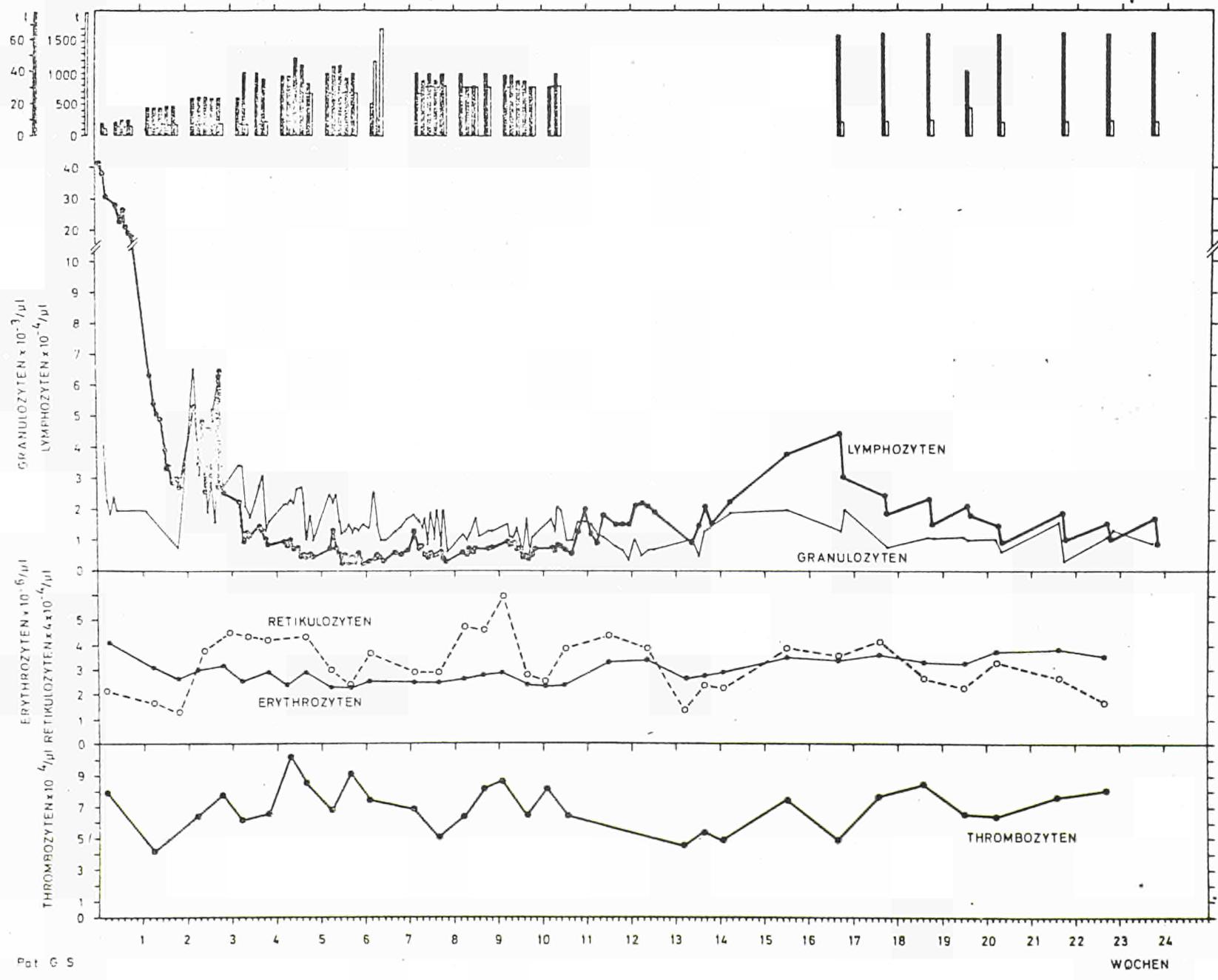
Durch die extrakorporale Blutbestrahlung von Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie kann die Lymphozytenzahl im Blut progressiv und anhaltend verringert werden, während die Zahlen der Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten nicht im Sinne einer Verringerung reagieren, sondern sich entweder stabilisieren, konstant bleiben oder als regenerative Reaktion auf die Verbesserung der leukämischen Ausgangslage ansteigen.

Der Behandlungsverlauf der in diesen Abbildungen mitgeteilten Fälle zeigt die Möglichkeiten aber auch die Schwierigkeiten der Methode.

Zunächst ergaben sich eine Reihe von beachtenswerten Schwierigkeiten bei der Anlage eines arterio-venösen "Shunts" zur extrakorporalen Blutbestrahlung bei Patienten mit Leukämien. Die Technik ist im Prinzip die gleiche, die auch bei der extrakorporalen Dialyse verwendet wird. Bei leukämischen Patienten muss die jedoch häufig vorliegende Resistenzschwäche gegenüber bakteriellen Infekten berücksichtigt werden. Aus diesem Grund ist auf eine besondere Infektprophylaxe Wert zu legen. Hinsichtlich der Frage, welcher Shunt zu bevorzugen ist, würde sich nach den mitgeteilten Erfahrungen ergeben, dass für die Dauerbehandlung mit extrakorporaler Blutbestrahlung die arterio-venöse Fistel (Cimino-Shunt) zu bevorzugen ist, da die Komplikationsrate wesentlich geringer ist als beim Scribner-Shunt und der Patient wesentlich weniger behindert ist und keine dauernde chirurgische Versorgung benötigt.

Die mitgeteilten Befunde zeigen darüber hinaus die möglicherweise auftretenden Nebenwirkungen bei dieser Art von Bestrahlungsbehandlung: Gerade bei Fall 1 wird deutlich, dass der Therapeut gezwungen werden kann, auf Grund von klinischen Nebenwirkungen die extrakorporale Blutbestrahlung abubrechen. Die Allgemeinreaktionen, die bei diesem Fall jeweils während der Behandlung auftraten, nämlich Fieberanstieg mit Schüttelfrost,

Abb. 22.



stehen offensichtlich in erster Linie im Zusammenhang mit der sehr raschen Erniedrigung der Lymphozytenzahl durch Abbau der im Shunt bestrahlten Lymphozyten.

Es war zunächst nabeliegend, den Schüttelfrost und den Temperaturanstieg als eine Reaktion auf exogene Pyrogene aufzufassen. Deshalb wurde ein Lehrversuch unternommen, wobei das extrakorporale Schlauchsystem mehrere Stunden lang ohne Bestrahlung mit dem Blut des Patienten durchströmt wurde. Dabei kam es nicht zu einer entsprechenden Reaktion. Dann wurde das für den ersten Patienten verwendete Schlauchsystem bei einem anderen Patienten angeschlossen, bei dem unter der Bestrahlung keine Reaktionen auftraten. Dagegen ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem Einsetzen von Allgemeinreaktionen und dem Abfall der Lymphozytenzahl in dem Sinne, dass die Reaktionen dann auftraten, wenn die Strahlendosis während der Bestrahlung so gewählt wurde, dass ein Lymphozytenabfall über 20 000/ μ l Blut erzeugt wurde. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass als Ursache für die Allgemeinreaktion eine Überschwemmung des Körpers mit Abbauprodukten der zerfallenden Lymphozyten an erster Stelle der Möglichkeiten der Erklärung steht.

Fall 2 zeigt die günstigen therapeutischen Möglichkeiten der extrakorporalen Blutbestrahlung besonders deutlich. Hier kam es zu einem progressiven Abfall der Lymphozyten ohne Nebenerscheinungen. Nicht nur die Lymphozyten wurden normalisiert, sondern es trat auch eine Verbesserung des subjektiven und objektiven Allgemeinbefundes auf. In den ersten Wochen nach Bestrahlungsbeginn verspürte der Patient eine deutliche Besserung seines Allgemeinbefindens. Diese zeigte sich in einer Leistungssteigerung, sowie in einem völligen Verschwinden der vorher vorhandenen Hyperhidrosis. Offensichtlich im Zusammenhang mit dem Nachlassen der Beschwerden durch die vorher enorm vergrößerte Milz, verspürte der Patient einen besseren Appetit. Die vor Bestrahlungsbeginn bestehende Vergrößerung von Lymph-

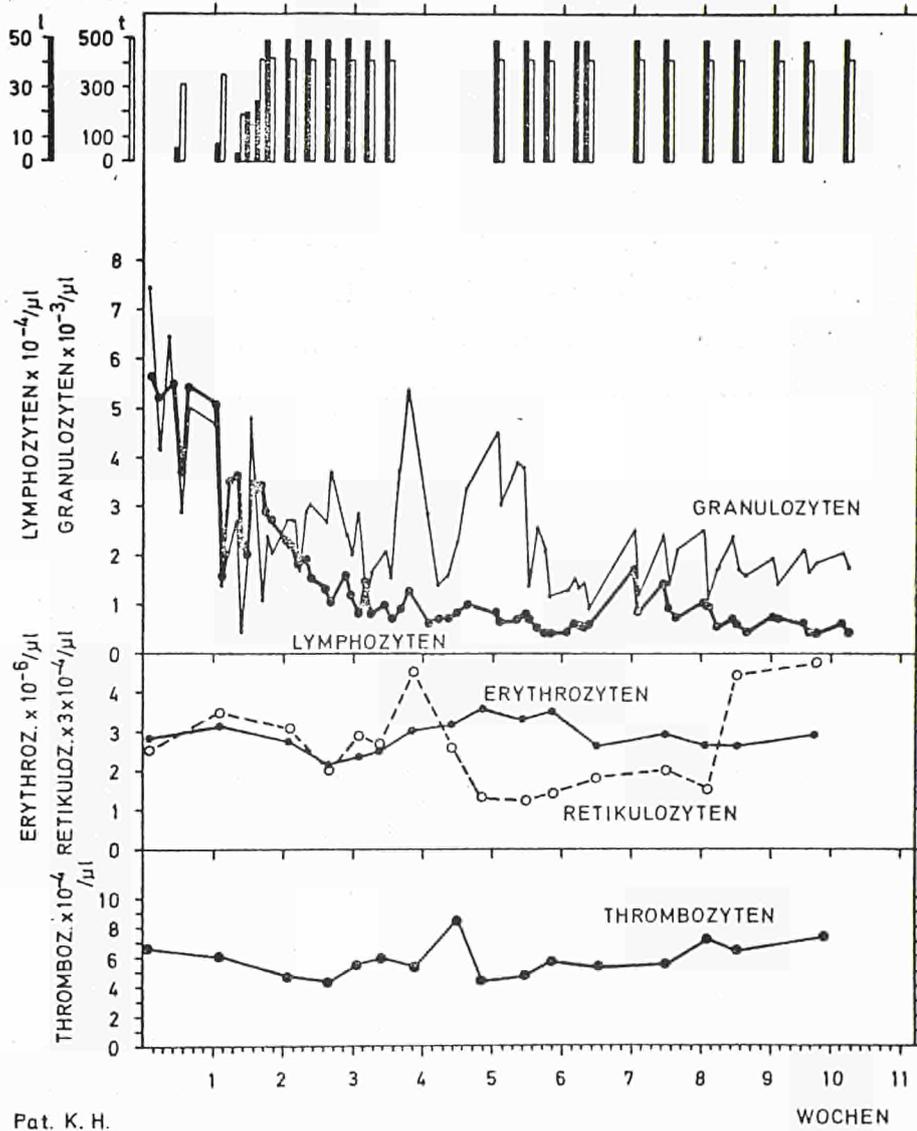


Abb. 23.

knoten, Leber und Milz, ging unter der Behandlung erheblich zurück. Ein weiterer, objektiv günstiger Befund war das Ansteigen der Retikulozytenzahl als Ausdruck einer regenerativen Phase der Erythropoese wie auch die Tatsache, dass sich die Erythrozytenzahlen nicht nur konstant hielten, sondern schliesslich sogar nach Absetzen der ersten Behandlungsserie anstiegen. Weiterhin kam es zu einer Vermehrung der Gamma-Globuline im Serum, was möglicherweise als Ausdruck einer Regeneration der Antikörperbildenden Zellsysteme gewertet werden kann. Die Normalisierung der Aktivität der alkalischen Serumphosphatase kann vielleicht im Zusammenhang mit dem Verschwinden der Hepatomegalie gesehen werden, die - ohne ausdrücklich nachgewiesen worden zu sein - doch wohl auf Grund leukämischer Infiltrate erklärt werden muss.

Eindrucksvoll war bei Fall 3, einem Zytostatika-resistenten Patienten mit mässiger Leukozytose, das vollständige Verschwinden leukämischer Hautinfiltrate während der Behandlung, ein Befund, der bisher noch nicht in dieser Weise beobachtet worden ist.

Die wiederholte Bestrahlung des Blutes wirft die Frage auf, ob nicht die Erythrozyten eine Strahlendosis akkumulieren, die schliesslich zu ihrer Zerstörung führen muss. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde allerdings nie das Eintreten einer massiven Hämolyse beobachtet.

Erwähnenswert im Zusammenhang dieses Jahresberichtes ist die in Freiburg verwendete Apparatur für die extrakorporale Blutbestrahlung. Die verwendeten Geräte sind in Abb. 24 und 25 dargestellt. Das Blut wurde in einem Siliconschlauch mit einem Innendurchmesser von 3 mm bestrahlt. Dieser Schlauch wurde in einer am Kopf des Bestrahlungsgerätes fixierbaren Aluminiumkapsel zu einer Spule gewickelt, die bis zu 105 ml Flüssigkeit aufnehmen konnte. Vor den einzelnen Bestrahlungssitzungen wurde der Schlauch jeweils mit Hilfe einer Wasserstrahl-

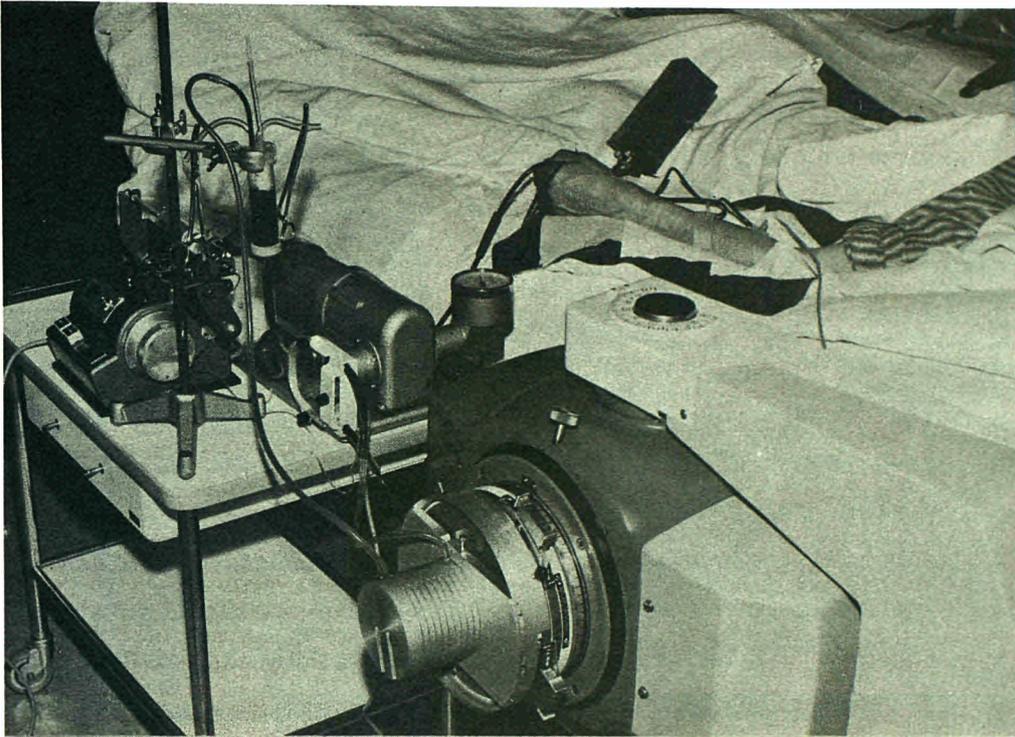


Abb. 24.

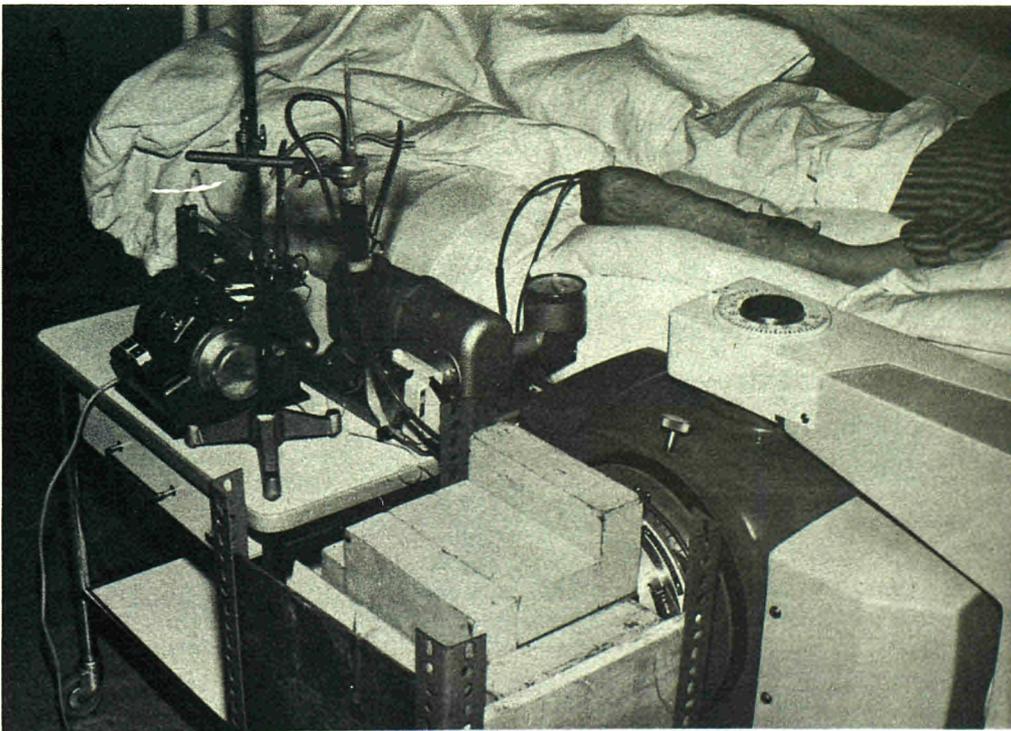


Abb . 25.

pumpe 15 Minuten lang erst mit Wasser, dann mit 2 l Seifenlösung und schliesslich mit 5 l aqua-dest durchspült und anschliessend im Autoklaven sterilisiert. Der in die Kapsel eingelegte Schlauch war mindestens für 500 Bestrahlungsstunden verwendbar. Im Laufe der Bestrahlung wurde er härter und verfärbte sich, Phänomene, die keine nachweisbaren Nebenwirkungen am Patienten zur Folge hatten.

Beim Scribner-Shunt und bei kleinen Spulen bis zu 12 ml Kapazität genügte der arterielle Blutdruck, um eine ausreichende Flussgeschwindigkeit von 60 - 100 ml pro Minute zu gewährleisten. Für grössere Spulen und zum Anschluss an die arteriovenöse Fistel wurden Schlauchpumpen verwendet. Bei dieser Anordnung war dem Bestrahlungsschlauch ein spezielles, steriles, arterielles Schlauchbesteck mit Pumpenschlauch und Heparinleitung vor- und ein venöses mit Tropfenkammer und Filter nachgeschaltet.

Verwendet zur extrakorporalen Blutbestrahlung wurden das

Siemens "Caesa-Gammatron"
das Siemens "Gammatron 1"
und das Siemens Röntgentherapiegerät "Stabilivolt"

Für die Messung der absorbierten Dosis im Schlauchsystem wurde eine Dosimetrie mit Hilfe von Fe SO_4 durchgeführt. Einzelheiten der Dosimetrie sind in der entsprechenden Veröffentlichung beschrieben worden.

Die Etablierung der extrakorporalen Bestrahlungsmethode wird die Gruppe jetzt in die Lage versetzen, spezifische Forschungen auf dem Gebiete des Gleichgewichtes der lymphatischen Zellen im Blut und in den lymphatischen Geweben unter den Bedingungen der Erkrankung durchzuführen, wobei später daran gedacht ist, Untersuchungen an nicht neoplastischer Lymphopoese im Zusammenhang mit Nierentransplantationen durchzuführen.

In Ulm stehen entsprechende konventionelle Strahlentherapiegeräte nicht zur Verfügung. Deswegen wurde zusammen mit der Firma Buchler, basierend auf einer Entwicklung im Laboratorium

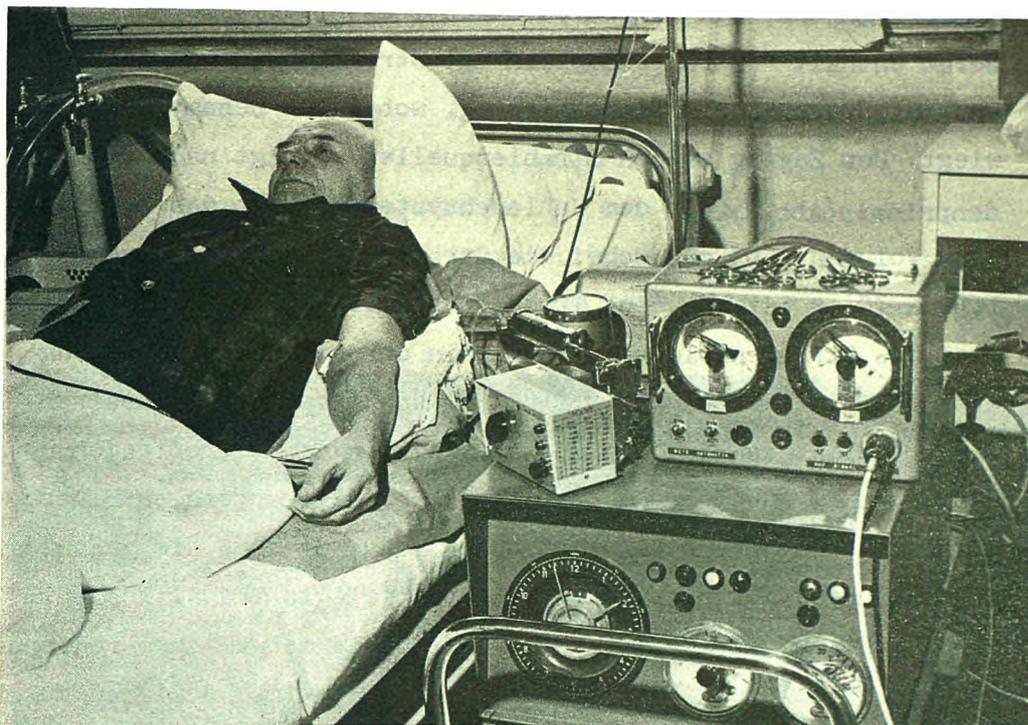


Abb. 26.

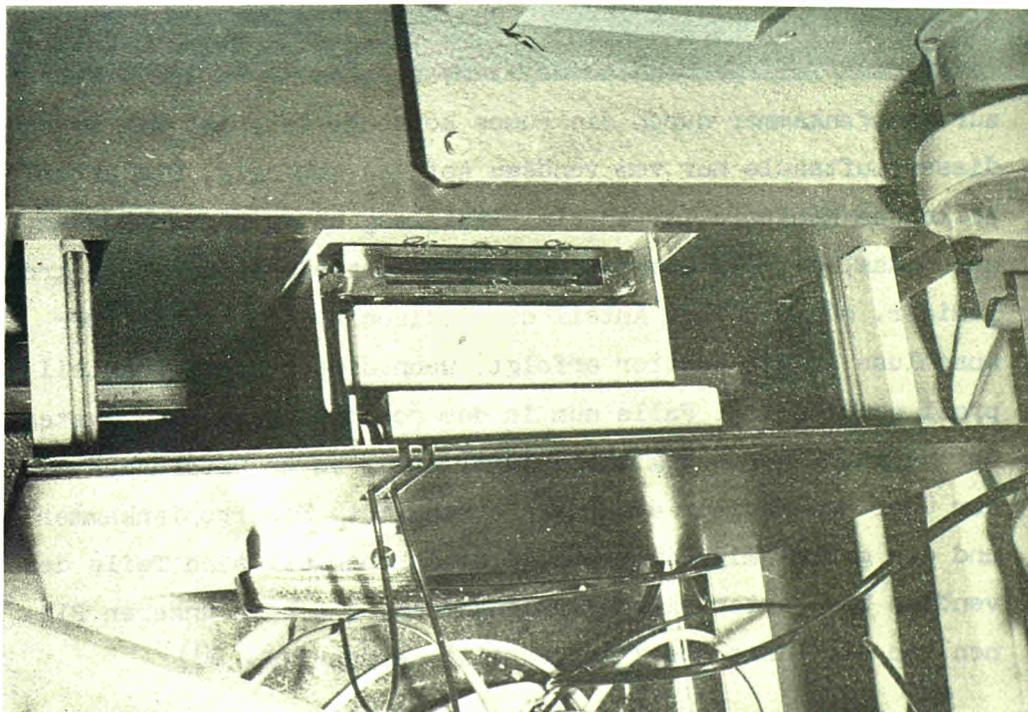


Abb. 27.

von Dr. Lajtha, ein fahrbares Strontium-90 Gerät gebaut. Dieses Gerät enthält 4 Strahlenquellen mit Strontium 90 von je 6 Curie und entsprechender Bleiabschirmung, wobei das Gesamtgerät 360 kg wiegt. Der Zugang zu den Strahlenquellen erfolgt nach dem Schubladenprinzip (Abb. 26/27). In dem Schlauchsystem beträgt das bestrahlbare Volumen 2,93 ml, wobei die Strahlung in diesem Bereich $1,94 \times 10^4$ R ist. Um eine Transitdosis von 400 rad zu erhalten, muss das Strahlenfeld von 142 ml/min durchflossen werden. Um also bei einem Patienten 5 Blutvolumenequivalente zu bestrahlen, benötigt man je nach dem Blutvolumen des betreffenden Patienten $2\frac{1}{2}$ - 3 Stunden. Da bei der extrakorporalen Blutbestrahlung eine Pumpe benutzt werden muss, um über die gesamte Bestrahlungsdauer eine konstante, festgelegte Transitdosis zu erreichen, und um im Falle einer eventuell notwendigen regionalen Heparinisierung Heparin und Protamin optimal dosieren zu können, ist ein Monitor-System erforderlich, durch das im zuführenden Schenkel ein zu grosser Sog und im abführenden Schenkel ein zu grosser Druck vermieden wird. Um dies zu erreichen, wurde ein Monitor gebaut, der auf Luftdruckschwankungen reagiert und bei Über- oder Unterschreiten bestimmter einstellbarer Druckwerte die elektrisch betriebenen Pumpen unterbricht. Die venöse Seite des Monitors ist mit der Luftsäule einer Tropfenkammer im venösen Teil des Schlauchsystems verbunden. Da der Zufluss zur Tropfenkammer durch die Pumpe konstant ist, ist der Druck dieser Luftsäule nur vom venösen Abfluss abhängig. Die arterielle Seite des Monitors ist an ein Plexiglasgehäuse angeschlossen, durch das, mittels Gummistopfen luftdicht einpassbar, ein grosslumiger, dünnwandiger Anteil des Schlauchsystems läuft. Der Anschluss an den Monitor erfolgt, wenn dieser Schlauchanteil prall gefüllt ist. Falls nun in dem so abgeschlossenen System der Schlauch durch Sog kollabiert, kommt es zu Unterdruck, der über den Monitor die Pumpe abschaltet. Die Tropfenkammer und der grosslumige dünnwandige Schlauchanteil sind Teile des venösen bzw. arteriellen Einmalsystems, die nach unseren Plänen von der Firma Medix hergestellt werden. (Abb. 28)

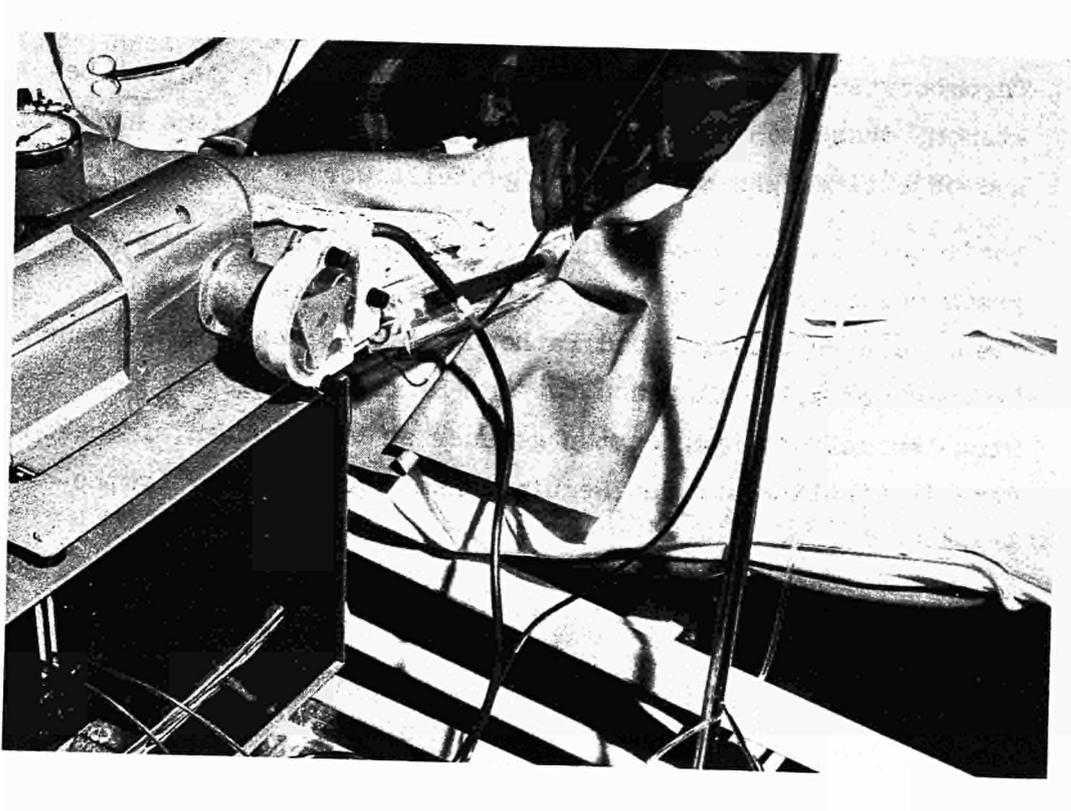


Abb. 28.

Dieses fahrbare Blutbestrahlungsgerät der Firma Buchler wurde bisher bei einem Patienten angewendet, einem 61-jährigen Mann, bei dem im August 1969 die Diagnose einer chronisch-lymphatischen Leukämie gestellt wurde. Zu Beginn der Bestrahlung hatte er eine stark vergrößerte Milz, vergrößerte Lymphknoten und in der Peripherie 33 000 Leukozyten/ μ l Blut, davon 90 % Lymphozyten. Die extrakorporale Blutbestrahlung führte bei diesem Patienten zu einem raschen Abfall der Lymphozyten bei gleichbleibenden Thrombozyten- und Erythrozytenwerten. Es kann kein Zweifel bestehen, dass auch bei diesem Patienten eine deutliche subjektive und objektive Verbesserung festgestellt werden konnte.

Somit soll in der Zukunft das extrakorporale Bestrahlungsprogramm weitergeführt werden, allerdings mit dem speziellen Zweck, die Physiologie und Pathophysiologie des lymphatischen Systems vor allen Dingen unter dem Einfluss ionisierender Strahlen auf die Lymphozyten genauer zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf den Regulationsmechanismus der Lymphopoese.

Die in diesem Jahresbericht dargestellten Projekte werden unter dem laufenden Assoziationsvertrag Nr. 079-69-1 BIA C zwischen der Europäischen Atomgemeinschaft und dem Land Baden-Württemberg weiter durchgeführt.

Literaturnachweis

1. Calvo, W. : The innervation of the bone marrow in laboratory animals.
Am. J. Anat. 123, 315-328, 1968
2. Calvo, W., and Haas, R.J. : Die Histogenese des Knochenmarks der Ratte, Nervale Versorgung, Knochenmarkstroma und ihre Beziehung zur Blutzellbildung.
Z.Zellforsch. 95, 377-395, 1969.
3. Calvo, W. and Forteza-Vila, J. : On the development of bone marrow innervation in new born rats as studied with silver impregnation and electron microscopy.
Amer. J. Anat. 126, 355-372, 1969.
4. Flad, H.-D., Hochapfel, G. und Federlin, K. : Verzögerte Allergie in vitro: Möglichkeiten zur Anwendung des Systems beim Menschen.
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 75, 711-714, 1969.
5. Flad, H.-D., Fliedner, T.M., and Heimpel, H. : Blast transformation and DNA-Synthesis in lymphocyte culture from patients with aplastic anaemia.
XIIIth Congress of the International Society on Blood Transfusion, Moskow, USSR, 1969, Proceedings (in Press).
6. Flad, H.-D., Genscher, U., Dietrich, M., Krieger, D., Trepel, F., Hochapfel, G., Teller, W. und Fliedner, T.M. : Immunological deficiency syndrome (lymphopenic hypogammaglobulinaemia) in non-identical twins: attempts at treatment with transplants of bone marrow and fetal thymus.
Lancet (in Press)

7. Fliedner, T.M., Haas, R.J., Stehle, H., Adams, A.C.:
Complete labeling of all cell nuclei in newborn rats with ^3H -thymidine. A tool for the evaluation of rapidly and slowly proliferating cell systems.
Lab. Invest. 18, 249, 1968.
8. Fliedner, T.M., Haas, R.J. und Stehle, H.: Die ^3H -Thymidin-Markierung aller Zellkerne neugeborener Ratten.
Acta histochem., Suppl. VIII, 232-256, 1968.
9. Haas, R.J., Fliedner, T.M. und Stehle, H.: Cytokinetic analysis of slowly renewing bone marrow cells after administration of nitrogen mustard.
In: "Effects of Radiation on Cellular Proliferation and Differentiation". 205-220, I.A.E.A., Vienna, 1968.
10. Haas, R.J., Bohne, F. und Fliedner, T.M.: On the development of slowly turning over cell types in neonatal rat bone marrow.
In Blood 34, 791-805, 1969.
11. Fliedner, T.M., Haas, R.J., Bohne, F. und Harriss, E.B.: Radiation effects produced in pregnant rats and their offspring by continuous infusion of tritiated thymidine.
In: "Radiation Biology of the fetal and juvenile mammal" 263-282, Ed. Sikow, M.R. and Mahlum, D.D., U.S. Atomic Energy Commission, Oak Ridge, 1969.
12. Haas, R.J., Bohne, F. und Fliedner, T.M.: Die Wirkung kontinuierlicher intrazellulärer Bestrahlung durch ^3H -Thymidin auf schwangere Ratten und auf die Entwicklung ihrer Nachkommenschaft.
Strahlentherapie im Druck.

13. Fliedner, T.M., Calvo, W., Haas, R.J., Forteza-Vila, J. and Bohne, F. : Morphological and cytokinetic aspects of bone marrow stroma.
In: "Hemopoietic Cellular Proliferation" Ed. Stohlman, F., 67-86, Grune and Stratton, N.Y., 1970.
14. Fliedner, T.M. : A cytokinetic comparison of hematological Consequences of radiation exposure in different mammalian species.
In: "Comparative Cellular and species Radiosensitivity", 89-101, Igaku Shoin, Ltd. Tokyo, 1970.
15. Fliedner, T.M. : Viability Tests for fresh and stored hemopoietic cells.
In: "Bone marrow Conservation, Culture and Transplantation", 95-106, I.A.E.A., Vienna, 1969.
16. Harriss, E.B., Kunik, S.D. and Kibler, R. The measurement of DNA synthesis time in bone marrow cells of germfree and conventional mice by the double labeling technique. Radioactive Isotope in Klinik und Forschung, 8, 291-302, 1968.
17. Meuret, G., Schütz, W., Harriss, E.B., Fliedner, T.M., Hoelzer, D., Afkham, J., Obrecht, P., Musshoff, K., Heinze, V., Tourkantonis, A. : Die Behandlung der chronisch-lymphatischen Leukämie durch extrakorporale Blutbestrahlung unter Verwendung konventioneller Strahlentherapiegeräte. Strahlentherapie, 137, 429-441, 1969.
18. Fliedner, T.M. und Meuret, G. : Die extrakorporale Blutbestrahlung : Forschungsaspekte und Erfahrungen bei chronisch-lymphatischer Leukämie.
7. Jahrestagung der Gesellschaft für Nuclearmedizin, 25. - 27. September 1969, Zürich (im Druck).
19. G. Stecker, Kubanek, B., Zahnert, R., Fliedner, T.M., Burckhardt, K. : Über die Wirkung von Thorotrast auf das Knochenmark.
Blut, 16, 326-332, 1968.

Vorträge

1. Autoradiographic studies on the function of slowly turning over bone marrow cells after stimulation with cytotoxic agents. Irradiation. Symposium on: Effects of radiation on cellular proliferation and differentiation.
Monacco 1 - 5 April, 1968 I.A.E.A.
2. Cytokinetic studies on the development of rapidly and slowly proliferating bone marrow cell renewal.
XII. Congress of the international society of Haematology, New York, 1 - 6 September, 1968.
3. Complete ³H-Thymidine labeling of newborn rats. A tool to study quantitatively slowly and rapidly proliferating cell systems.
Second meeting of the European study group for cell proliferation. 2 - 4 October, Schloss Reisenburg bei Günzburg, 1968.
4. Current research projects on haematological stem cells.
EORTC meeting on cooperative research projects in stem cell characterization, Brüssel, 17. Januar 1969.
5. Cytokinetic analysis of slowly renewing bone marrow cells during recovery from radiation injury.
VII Annual meeting of the European society for radiation biology, 2. - 6. September in Ulm, 1969.
6. Cytokinetic analysis of slowly renewing bone marrow cells after administration of nitrogen - mustard or hydroxy - urea.
VII Annual meeting of the European society for radiation biology, 2. - 6. September, Ulm 1969.

7. Effect of prolonged treatment with 10 cytostatic agents on hemopoietic cell distribution and the incorporation of nucleic acid precursors into lymphatic cells of guinea pigs.
EORTC-Meeting, Paris, Juni 1969.

8. Allergie vom verzögerten Typ in vitro: Experimentelle Anwendung und erste Ergebnisse zur Anwendung des Systems beim Menschen.
1. Arbeitstag über Leukozytenkulturen, 26.4. 1969, Marburg/Lahn.

9. Verzögerte Allergie in vitro : Bildung humoraler Faktoren durch Antigen-stimulierte Lymphozyten.
1. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Freiburg
16. - 18. 10. 1969.



AN UNSERE LESER

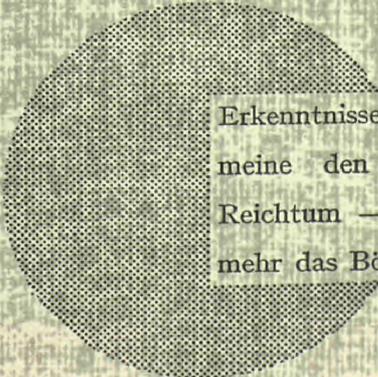
Alle von der Kommission der Europäischen Gemeinschaften veröffentlichten wissenschaftlichen und technischen Berichte werden in der Monatszeitschrift „euro-abstracts“ angezeigt.

Abonnements (1 Jahr : DM 75,- Bfrs 1.020,-) und Probehefte sind erhältlich bei :

Handelsblatt GmbH
„euro-abstracts“
D-4 Düsseldorf 1
Postfach 1102
Deutschland

oder

**Amt für amtliche Veröffentlichungen
der Europäischen Gemeinschaften
Postfach 1003 - Luxemburg 1**



Erkenntnisse verbreiten ist soviel wie Wohlstand verbreiten — ich meine den allgemeinen Wohlstand, nicht den individuellen Reichtum — denn mit dem Wohlstand verschwindet mehr und mehr das Böse, das uns aus dunkler Zeit vererbt ist.

Alfred Nobel

VERTRIEBSSTELLEN

Alle von der Kommission der Europäischen Gemeinschaften veröffentlichten Berichte sind bei folgenden Stellen zu den auf der ersten Rückseite des Umschlags angegebenen Preisen erhältlich. Bei schriftlicher Bestellung bitte die EUR-Nummer und den Titel, die beide auf der ersten Umschlagseite jedes Berichts stehen, deutlich angeben.

AMT FÜR ÄMTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN

Postfach 1003 - Luxemburg 1
(Compte chèque postal N° 191-90)

BELGIQUE — BELGIË

MONITEUR BELGE
Rue de Louvain, 40-42 - B-1000 Bruxelles
BELGISCH STAATSBAD
Leuvenseweg 40-42 - B-1000 Brussel

LUXEMBOURG

OFFICE DES
PUBLICATIONS OFFICIELLES DES
COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES
Case Postale 1003 - Luxembourg 1

DEUTSCHLAND

VERLAG BUNDESANZEIGER
Postfach 108 006 - D-5 Köln 1

NEDERLAND

STAATSDRUKKERIJ-
en UITGEVERIJBEDRIJF
Christoffel Plantijnstraat - Den Haag

FRANCE

SERVICE DE VENTE EN FRANCE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES
rue Desaix, 26 - F-75 Paris 15^e

ITALIA

LIBRERIA DELLO STATO
Piazza G. Verdi, 10 - I-00198 Roma

UNITED KINGDOM

H. M. STATIONERY OFFICE
P.O. Box 569 - London S.E.1

Kommission der
Europäischen Gemeinschaften
G.D. XIII - C.I.D.
29, rue Aldringen
L u x e m b o u r g

CDNA04732DEC