

EUR 4405 d

ASSOZIATION

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT — EURATOM
GESELLSCHAFT FÜR STRAHLENFORSCHUNG mbH-GSF

**PATHOGENESE GENETISCHER UND
SOMATISCHER STRAHLENSCHÄDEN**

Abschlussbericht
über die wissenschaftliche Tätigkeit
in den Jahren 1965 - 1967

(zugleich Jahresbericht 1967)

LIBRARY

1970



Bericht abgefaßt beim GSF
Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlenforschung mbH,
Neuherberg/München - Deutschland

Assoziation Nr. 045-65-1 BIAD

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 DM 3,20	FF 4,—	FB 40,—	Lit. 500	Fl. 3,—
------------------------	--------	---------	----------	---------

verkauft.

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

Gedruckt von Van Muysewinkel, Brüssel
Luxemburg, April 1970.

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

EUR 4405 d

ASSOZIATION

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT — EURATOM
GESELLSCHAFT FÜR STRAHLENFORSCHUNG mbH-GSF

PATHOGENESE GENETISCHER UND SOMATISCHER STRAHLENSCHÄDEN

Abschlussbericht
über die wissenschaftliche Tätigkeit
in den Jahren 1965 - 1967

(zugleich Jahresbericht 1967)

EUR 4405 d

PATHOGENESIS OF GENETIC AND SOMATIC RADIATION DAMAGE —
Final report on the scientific activity during the years 1965-1967 (at the same
time Annual Report 1967)

Association : European Atomic Energy Community — EURATOM
Gesellschaft für Strahlenforschung mbH — GSF
Report prepared at the Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlenfor-
schung mbH, Neuherberg/München (Germany)
Association No. 045-65-1 BIAD
Luxembourg, April 1970 — 22 Pages — FB 40

The research programme is pursuing experimental studies on the frequency
and origin of somatic and genetic radiation damage from irradiation administered
externally or after incorporation of radioactive nuclides.

EUR 4405 d

PATHOGENESIS OF GENETIC AND SOMATIC RADIATION DAMAGE —
Final report on the scientific activity during the years 1965-1967 (at the same
time Annual Report 1967)

Association : European Atomic Energy Community — EURATOM
Gesellschaft für Strahlenforschung mbH — GSF
Report prepared at the Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlenfor-
schung mbH, Neuherberg/München (Germany)
Association No. 045-65-1 BIAD
Luxembourg, April 1970 — 22 Pages — FB 40

The research programme is pursuing experimental studies on the frequency
and origin of somatic and genetic radiation damage from irradiation administered
externally or after incorporation of radioactive nuclides.

ung mbH,

ZUSAMMENFASSUNG

Das Forschungsprogramm verfolgt experimentelle Studien über Häufigkeit und Entstehungsweise somatischer und genetischer Strahlenschäden bei Bestrahlung von außen und nach Inkorporation radioaktiver Nuklide.

Die Untersuchungen erstrecken sich auf ausgewählte Fragestellungen in folgenden 3 Gebieten:

1. Strahlengenetik von Wirbeltieren
2. Neurophysiologische Studien und Verhaltensstudien
3. Radiotoxizität.

SCHLAGWORTE

RADIATION EFFECTS	CHROMOSOMES
RADIATION INJURIES	CYTOLOGY
RADIATION DOSES	LETHAL DOSE
CONTAMINATION	GONADS
RADIOISOTOPES	MICE
GENETICS	SEX
VERTEBRATES	FISH
TISSUES	BRAIN
BODY	ELECTROENCEPHALOGRAPHY
NERVOUS SYSTEM	ELECTRIC POTENTIAL
PHYSIOLOGY	FREQUENCY
BEHAVIOUR	RECORDING SYSTEMS
DISEASES	CATS
RADIOBIOLOGY	RADIUM 224
TOXICITY	EXCRETION
IRRADIATION	URINE
MUTATIONS	FECES
GENES	RATS
MORTALITY	ORGANS
	RADIOSENSITIVITY

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. VORBEMERKUNGEN	5
B. ORGANISATORISCHES	6
C. WISSENSCHAFTLICHER BERICHT	7
I. STRAHLENGENETIK VON WIRBELTIEREN	7
a) Allgemeines	7
b) Strahleninduzierte dominante Letalmutationen in den Keimzellen der männlichen Maus	7
c) Strahleninduzierte Mutationen an genetisch markierten X-Chromosomen von Tabby-Mäusen	9
d) Strahlen genetische Versuche mit Fischen (Lebistes reticulatus PETERS)	12
II. NEUROPHYSIOLOGISCHE STUDIEN UND VERHALTENSSTUDIEN	12
1. Neurophysiologische Studien	12
a) Das spontane Elektrocorticogramm der "cerveau isolé"-Katze	14
b) Die elektrische Kramperregbarkeit des Neocortex	14
c) "Evoked potentials"	15
2. Verhaltensstudien	15
III. RADIOTOXIZITÄT	18
a) Allgemeines	18
b) Physikalische Messungen über Verteilung und Aus- scheidung von Radium 224 und die mit der Inkor- poration verbundene Strahlenbelastung der ver- schiedenen Gewebe	19
c) Orientierende Versuche über die akute Mortalität bei Inkorporation von Radium 224	20
d) Untersuchungen über die Spätwirkungen von Radium 224 bei Mäusen und Ratten	21

A. VORBEMERKUNGEN *)

Der im März 1965 mit Rückwirkung vom 1.1.65 geschlossene Vertrag diente der Erforschung der Häufigkeit und der Entstehungsweise somatischer und genetischer Strahlenschäden bei Bestrahlung von außen und nach Inkorporation radioaktiver Nuklide. Die Untersuchungen sollten einerseits einen Beitrag zur strahlenbiologischen Grundlagenforschung darstellen, andererseits zu einer besseren Abschätzung des Strahlenrisikos, insbesondere auch nach Einwirkung schwacher Dosen, beitragen.

Das Programm gliedert sich in folgende 3 Gebiete:

1. Strahlengenetik von Wirbeltieren
2. Neurophysiologische Studien und Verhaltensstudien
3. Radiotoxizität

Ausgangsbasis waren dabei wissenschaftliche Arbeiten des Instituts für Biologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, deren Methoden und vorläufige Ergebnisse eine Ausweitung der Fragestellung und eine Intensivierung der Forschung auf diesen Gebieten als gerechtfertigt erscheinen ließen. Da Umfang und Dauer der angestrebten Versuche die institutsinternen Mittel überschritten hätten und andererseits eine Prüfung und Unterstützung von überregionaler Seite aus wünschenswert erscheinen ließen, wurde von allen beteiligten wissenschaftlichen Mitarbeitern der GSF und dem Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung der Abschluß eines Euratom-Assoziationsvertrages angestrebt. In gegenseitigen Konsultationen mit den zuständigen Wissenschaftlern von Euratom wurde das ursprüngliche Konzept modifiziert und nach verschiedenen Richtungen hin ausgeweitet.

Die personellen und technischen Voraussetzungen des Instituts für Biologie erforderten von Anfang an eine Beschränkung auf ausgewählte Methoden und Fragestellungen, mittels derer sich geeignete Ansatzpunkte für die Behandlung der übergeordneten Thematik finden ließen. Der Ablauf des Versuchsprogrammes erforderte hier und da Abwandlungen der ursprünglich vorgesehenen Arbeiten und erlaubte andererseits die Einbeziehung nicht expressis verbis festgelegter Studien.

*) Manuskript erhalten am 28. Juli 1969

B. ORGANISATORISCHES

Das Forschungsprogramm wurde unter Begutachtung und Überwachung der grundsätzlichen Richtlinien durch einen Lenkungsausschuß durchgeführt. Dieser Lenkungsausschuß setzte sich folgendermaßen zusammen:

Dr. WITTENZELLNER	GSF	Vorsitzender
Dr. APPLEYARD	EURATOM	stellvertr. Vorsitzender
Dr. ELLERKMANN	EURATOM	
Dr. EBERT	EURATOM	
Herr LOOSCH	DEUTSCHE VERTRETUNG BEI DEN EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN	
Prof. Dr. WACHSMANN	GSF	

Folgende Wissenschaftler des Instituts für Biologie der GSF waren am Projekt beteiligt:

Prof. Dr. O. Hug	(wissenschaftlicher Leiter des Programmes)
Prof. Dr. W. Gössner	(Euratom; Leiter der pathologisch-anatomischen Arbeiten, zugleich stellvertretender wissenschaftlicher Leiter)
Dr. M. Bornhausen	(Verhaltensforschung)
Dr. A. Luz	(Pathologie)
Dr. W. Müller	(Strahlenphysik und Isotopenforschung)
Dr. A. Nacimiento	(Neurophysiologie)
Dr. W. Rummel	(Pathologie) bis 30.4.67
Dr. H. Schröder	(Genetik)
Dr. M. Schwabe	(Pathologie) seit April 1967

Dipl.-Phys. O. Balk vom Institut für Biologie unterstützte die Arbeitsgruppen in dosimetrischen Fragen; die Versuchstiere stammten aus den von Frau I. Zeller und Dr. M. Nüssel betreuten Tierställen des Instituts für Biologie.

Die ersten Monate des Jahres 1965 waren dem Ausbau der Einrichtung und der Anpassung der Laboratorien an das Forschungsprogramm und der Gewinnung und Einarbeitung neuer Mitarbeiter gewidmet. Die Tierzucht des Instituts wurde entsprechend dem Programm erweitert. Die neu eingerichteten Laboratorien für allgemeine und experimentelle Pathologie einschließlich der Histochemie wurden in Betrieb genommen, die Isotopenabteilung durch zusätzliche Meßgeräte ergänzt. Mit dem Aufbau des elektrophysiologischen Meßplatzes wurde nach Gewinnung eines neurophysiologischen Mitarbeiters im Mai 1965 begonnen.

C. WISSENSCHAFTLICHER BERICHT

Als sich die Beteiligten darauf einigten, die geplanten Arbeiten unter dem Titel "Pathogenese genetischer und somatischer Strahlenschäden" zusammenzufassen, war man sich klar, daß ein Beitrag zu diesem Thema nur durch Einengung des Programmes auf einige wichtige Teilgebiete geleistet werden konnte, welche eine Klärung der Entstehungsmechanismen besonders bedeutsamer Strahlenschäden versprachen.

I. STRAHLENGENETIK VON WIRBELTIEREN

a) Allgemeines:

Ziel der strahlengenetischen Untersuchungen war es, teils mit bewährten, teils mit neu entwickelten Methoden quantitative Aufschlüsse über die mutagene Wirkung ionisierender Strahlen bei solchen Tierspecies zu gewinnen, die einerseits dem Menschen in der Evolutionsreihe möglichst nahe stehen, andererseits aufgrund rascher Generationsfolge und hoher Vermehrungsrate statistisch befriedigende Testungen erlauben. Insbesondere sollte für verschiedene genetische Effekte die Abhängigkeit von der Dosis und Dosisleistung untersucht werden, um dadurch Einblicke in die biophysikalischen Wirkungsmechanismen zu gewinnen und unsere Vorstellungen über das genetische Strahlenrisiko zu verbessern.

b) Strahleninduzierte dominante Letalmutationen in den Keimzellen der männlichen Maus (H. Schröder und O. Hug):

In den zahlreichen bisherigen Veröffentlichungen, in denen die Erzeugung dominanter Letalmutationen bei Säugetieren anhand von prä- und postimplantativen Embryonalverlusten getestet wurde, erfolgte entweder keine systematische Variation der Strahlendosis oder Dosiswirkungskurven wurden nur für einzelne Spermiogenesestadien gewonnen (LÉONARD). In den vorliegenden Versuchen wurden Mäusemännchen mit Dosen von 100 bis 1100 R bestrahlt. Durch Paarung

mit unbestrahlten Weibchen in fünf aufeinander folgenden Wochen nach Bestrahlung wurde dann die Strahlenempfindlichkeit aller postmeiotischen Spermiogenesestadien getestet. Um die Rolle der zeitlichen Dosisverteilung bei der Erzeugung dominanter Letalmutationen zu ermitteln, wurden Dosen von 600 R in Fraktionen mit verschiedenen zeitlichen Intervallen verabreicht und ferner die Wirkung einer einmaligen Bestrahlung mit 53 R/min verglichen mit der Wirkung protrahierter Bestrahlungen bei Dosisleistungen von 3 und 4 R/min und 5 und 25 R/h. Untersucht wurden zwischen dem 14. und 16. Gestationstage durch Autopsie die Zahl der fertilen Weibchen, der corpora lutea, der Implantate und der bereits resorbierten oder zu einem späteren Zeitpunkt abgestrobenen Embryonen. Zur Klärung der Frage, ob für die Entstehung von Mutationen nur die Gonadendosis entscheidend ist oder ob eine Mitbestrahlung des übrigen Körpers nicht einen vielleicht auch nur modifizierenden Einfluß hat, wurde bei einer Dosis von 600 R die Wirkung einer isolierten Gonadenbestrahlung mit einer Totalbestrahlung des Tieres verglichen. Diese Untersuchungen, bei denen insgesamt 6 952 Mäuseweibchen angepaart wurden, sind abgeschlossen. Es liegen mit befriedigender Genauigkeit ermittelte Dosiswirkungskurven für die Erzeugung dominanter Letalmutationen in den verschiedenen Spermiogenesestadien vor, aus denen sich ergibt, daß die Strahlenempfindlichkeit der postmeiotischen Stadien in folgender Reihenfolge zunimmt:

Spermatozoen < Spermatozyten < Spermatiden.

Die Dosiswirkungskurven für die 1. und 2. Paarungswoche zeigen einen stetigen Anstieg bis zu 70 % postimplantativer Verluste bei einer Dosis von 1100 R. In der 3. bis 5. Paarungswoche wird das Wirkungsmaximum, bis über 80 % Verluste, bereits bei 600 R erreicht, bei höheren Dosen fallen die Kurven dann ab. Wird eine Expositionsdosis von 1100 R in zwei Fraktionen von je 550 R mit einem Intervall von 24 Stunden verabreicht, so ist die mutagene Wirkung wesentlich stärker als bei der Einzeitbestrahlung. Die Fraktionierung und Protrahierung einer Dosis von 600 R

(2 x 300 R mit 70 h-Intervall, 4 x 150 R mit 12 h-Intervall bei einer Dosisleistung von 53 R/min) u. Einzeitbestrahlungen mit 600 R und Variation der Dosisleistung (5 und 25 R/h, 3 R/min und 53 R/min) ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Erzeugung dominanter Letalmutationen. Die Verluste bei Ganzkörperbestrahlung liegen zwar häufig höher als bei isolierter Bestrahlung der Gonadenregion mit gleicher Dosis, die Differenz ist aber nicht so ausgeprägt, wie aufgrund einer Vorstudie erwartet wurde. Der Unterschied zwischen beiden Bestrahlungsarten war nicht konstant und betrug maximal 12 %.

Nach Ganzkörperbestrahlung der Männchen traten insgesamt 6 % weniger trüchtige Weibchen als nach isolierter Bestrahlung der Gonadenregion auf.

c) Strahleninduzierte Mutationen an genetisch markierten X-Chromosomen von Tabby-Mäusen (H. Schröder):

Strukturelle und numerische Anomalien der Geschlechtschromosomen haben in den letzten beiden Jahrzehnten zunehmendes klinisches Interesse erlangt. An Säugetieren in vivo gewonnene experimentelle Ergebnisse lagen jedoch nur im beschränkten Umfang vor, insbesondere fehlten aber experimentelle Daten für die Abschätzung des genetischen Strahlenrisikos hinsichtlich der Induktion von rezessiven geschlechtschromosomengebundenen Letalfaktoren bei Säugetieren. Mit dem Ziel, diese Lücke zu schließen, wurde ein orientierender Versuch mit Mäusen begonnen, die sich durch mit dem Tabby-Faktor (Ta) markierte X-Chromosomen auszeichnen. Dieses Gen bewirkt eine typische Pigmentierung des Haarkleides, wodurch es möglich ist, die Genotypen Ta/+, Ta/Ta und +/+ phänotypisch voneinander zu unterscheiden. Es wurde untersucht, ob an das X^{Ta}-Chromosom gebundene rezessive Letalfaktoren nach Bestrahlung von Spermatogonien mit 600 R häufiger auftreten als bei den unbestrahlten gebliebenen Kontrollen. Zu diesem Zweck wurden X^{Ta}/Y-Männchen in der poststerilen Phase mit C3H-Weibchen gepaart, und die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen heterozygoten F₁-Weibchen wurden mit Männchen vom Stamm 101 ausgekreuzt.

In dieser Auskreuzungsgeneration war ein prä- oder post-natales Absterben der mit mindestens einem geschlechtschromosomengebundenen rezessiven Letalfaktor belasteten Männchen zu erwarten.

Bei dieser Versuchsanordnung war es außerdem möglich, Verluste des genetisch markierten X-Chromosoms durch das Auftreten von XO-Weibchen, dominante Letalmutationen an der Verminderung der Wurfgröße in der F_1 -Generation und die Häufigkeit strahleninduzierter Translokationen durch den Prozentsatz semisteriler F_1 -Weibchen zu ermitteln.

Nach Bestrahlung von Spermatogonien mit 600 R traten unter 1018 geprüften F_1 -Weibchen drei Weibchen auf, die beim Absetzen ihrer Nachkommen (bis zu 20 pro Weibchen) ohne Tabby-Söhne waren. Bei den Kontrollen hatte nur 1 von 1071 getesteten F_1 -Weibchen zum Termin der Entwöhnung der Jungen keine Tabby (X^{Ta}/Y)-Söhne. Somit besteht hinsichtlich der Häufigkeit X-gebundener rezessiver Letalmutationen kein statistisch zu sichernder Unterschied zwischen den Nachkommen bestrahlter und unbestrahlter Männchen. Es ist jedoch bemerkenswert, daß die nach Literaturdaten angenommene Schätzung der Rate geschlechtschromosomengebundener Letalfaktoren, die nach Bestrahlung von Spermatogonien mit 600 R 1% - d.h. 10 pro 1018 - betragen sollte, damit statistisch gesichert unterschritten wird: Mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % sind mehr als 3 rezessive X-chromosomengebundene Letalfaktoren unter 1018 bestrahlten X-Chromosomen resp. deren Reduplikanten zu erwarten, wenn die Mutationsrate in der Größenordnung von 1 % liegt. Damit darf behauptet werden, daß signifikant weniger rezessive Letalfaktoren sensu stricto, d.h. solche mit 100 %iger Penetranz, nach Bestrahlung von Spermatogonien der Maus mit 600 R auftreten als nach den bei Versuchsbeginn vorliegenden Schätzungen angenommen werden mußte.

Strahleninduzierte Subvitalfaktoren ("detrimental genes") auf dem X-Chromosom, die auch im hemizygoten (XY) Genotyp nicht immer zum Tode ihrer Träger führen, ließen sich durch

Vergleich des prozentualen Anteils der F_1 -Weibchen in beiden Versuchsreihen ermitteln, in deren Nachkommenschaft das Verhältnis von Weibchen zu Ta/Y-Männchen größer als 2 ist. In der bestrahlten Serie erfüllten 450 von 1015, in der Kontrollserie 466 von 1070 Weibchen diese Forderung. Somit ist kein Unterschied zwischen beiden Serien nachzuweisen.

Unter 1053 weiblichen Nachkommen der mit 600 R bestrahlten Männchen traten 5 XO-Weibchen auf. Drei Tieren fehlte das väterliche, also bestrahlte X-Chromosom, zwei Weibchen das unbestrahlte mütterliche Gonosom.

Der Unterschied zu den Kontrollen, bei denen sich unter 1094 geprüften F_1 -Weibchen nur 1 XO-Maus ohne väterliches X-Chromosom befand, ließ sich statistisch nicht sichern.

Der signifikante Unterschied in der mittleren Wurfgröße zwischen bestrahlter und Kontrollserie in der F_1 -Generation betrug 12,5 % (6,72 in der bestrahlten Serie versus 7,68 bei den Kontrollen).

Damit stimmt aber die auf dem Wege des Vergleichs der mittleren Wurfgrößen ermittelte Rate dominanter Letalmutationen nach Bestrahlung der väterlichen Spermato gonien mit 600 R ausgezeichnet überein mit dem Wert, der durch Autopsie trächtiger Weibchen gewonnen wurde, wobei die Summe der Verluste vor und nach Implantation der befruchteten Eier in Prozent der Corpora lutea $22,80 \pm 2,37$ nach Bestrahlung und $10,28 \pm 1,02$ bei den Kontrollen betrug, wie Versuche an (101 x C3H-)Hybridmäusen ergaben.

Der Anteil der F_1 -Weibchen, deren Wurfgröße nur die Hälfte des häufigsten Wertes (8) beträgt, die also nur 1 - 4 Junge in ihrem 1. Wurf hatten, ergab den Prozentsatz der semi-sterilen Weibchen. In der bestrahlten Reihe wurden unter 1006 geprüften Weibchen 64 Tiere mit 1 bis 4 Jungen pro 1. Wurf gefunden, bei den Kontrollen dagegen nur 45 unter 1046. Die Differenz zwischen beiden Reihen ist statistisch gesichert ($P < 0,05$), die Induktionsrate für Translokationen von 2 % liegt in einer Größenordnung, wie sie aus ähnlichen Untersuchungen bekannt ist.

d) Strahlengenetische Versuche mit Fischen
(*Lebistes reticulatus* PETERS) (H. Schröder):

Es wurde die Variabilität von Merkmalen untersucht, die für das Überleben einer Population von Bedeutung sind, wie postnatale Sterblichkeit, Häufigkeit von Totgeburten, Geschlechtsverhältnis und die Frequenz von äußerlich sichtbaren Anomalien. Nach Bestrahlung entweder der Weibchen oder der Männchen oder beider Eltern wurden in der F_1 - und F_2 -Generation diese Viabilitätsmerkmale bestimmt. Außer der erwarteten Zunahme der Zahl der Totgeburten und der Häufigkeit teilweise erblicher Deformationen der Wirbelsäule traten bei den Nachkommen der mit 500 oder 1000 R bestrahlten Fische auch höhere Wurfgrößen und eine geringere postnatale Mortalität als bei den Kontrollen auf.

Noch nicht abgeschlossene Untersuchungen betreffen die auf Mikromutationen beruhenden Veränderungen solcher quantitativer Merkmale, durch die sich Rassen und Arten voneinander unterscheiden. Um sicherzustellen, daß nicht Inzuchtdepressionen die Versuchsergebnisse einseitig beeinflussen, wurden diese Versuche gleichzeitig an Hybriden und Inzuchttieren vorgenommen. Außerdem wurde in diesen Untersuchungen die mutagene Wirkung der ionisierenden Strahlung auf Oogonien mit der auf Spermatogonien verglichen.

II. NEUROPHYSIOLOGISCHE STUDIEN UND VERHALTENSSTUDIEN

1. Neurophysiologische Studien: (A.C. Nacimiento)

Während das Zentralnervensystem vom morphologischen Standpunkt aus noch immer als relativ strahlenresistent angesehen werden muß, wurden in den letzten Jahren in verstärktem Maße Funktionsstörungen nervaler Art bei Einwirkung ionisierender Strahlen beobachtet. Bei verschiedenen niederen Tieren war die Auslösung reflexartiger Sofortreaktionen durch Röntgen- und γ -Strahlen beobachtet worden. Auch bei Säugetieren wurden strahleninduzierte Verhaltensstörungen festgestellt. Insbesondere sowjet-russische Autoren haben Veränderungen auch bei extrem

niedrigen Strahlendosen registriert. Elektroenzephalographisch wurden u.a. kurzfristige und langanhaltende Veränderungen der Spontanaktivität und der elektrischen Erregbarkeit des peripheren, autonomen und zentralen Nervensystems beobachtet. Eine kritische neurophysiologische Analyse der entsprechenden Literatur (siehe u.a. drei internationale Symposien über dieses Gebiet, sowie GANGLOFF und HUG) ergab jedoch recht uneinheitliche und widersprechende Ergebnisse. Auch können die experimentellen Bedingungen, unter denen man glaubte Strahlenwirkungen auf das Zentralnervensystem nachweisen zu können, nicht immer als einwandfrei bezeichnet werden. Andererseits kann die moderne experimentelle Neurophysiologie vorzügliche Testobjekte anbieten, die es erlauben, unter präzise definierten Bedingungen diese Frage der Strahlenempfindlichkeit nervaler Systeme zu klären. Von diesen Überlegungen ausgehend, wurde das vorliegende Versuchsprogramm im Rahmen des Euratom-Assoziationsvertrages über die Pathogenese somatischer und genetischer Strahlenschäden aufgestellt. Ziel war dabei, einige Methoden auszuwählen, mit denen nicht nur phänomenologisch eine Strahlenreaktion nachweisbar ist, sondern die auch Schlüsse auf den Angriffsort und die Angriffsweise ionisierender Strahlen erlauben. Eine besonders wichtige Frage war, ob am Gehirn registrierbare elektrophysiologische Veränderungen nach Bestrahlung auf Störungen nervaler Strukturelemente in den betreffenden Arealen selbst oder der Peripherie (Rezeptoren, Nervenbahnen) beruhen oder womöglich sekundäre Erscheinungen von Schädigungen anderer Organe oder des Organismus im ganzen darstellen.

Ein Weg zur Klärung dieser Frage ist die Untersuchung am "cerveau isolé". Ferner wurde in das Programm das Studium von Reaktionspotentialen der Großhirnrinde bei peripherer Reizung einbezogen, da auf diese Weise zunächst das gesamte Reaktionssystem von den Rezeptoren bis zur Großhirnrinde erfaßt wird und dann Schritt für Schritt analysiert werden kann, in welchem Glied der Reaktionskette die Strahlung eingreift. Diese Untersuchungen sollten nicht nur der Erfassung strahleninduzierter Funktionsstörungen am erwach-

senen Gehirn dienen, sondern auch der Erfassung von Entwicklungsstörungen des reifenden Gehirns bei Bestrahlung im prä- oder postnatalen Zustand. Die elektrische Aktivität des Zentralnervensystems wurde während und nach lokalisierter Bestrahlung des Kopfes an Katzen untersucht. Die Hauptergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- a) Das spontane Elektrocorticogramm der "cerveau isolé"-Katze wird einige Sekunden nach Bestrahlungsbeginn mit einer Dosisleistung von 40 - 100 R/min erheblich verändert: die typische Spindeln-Aktivität (Schlaf-Zustand) wird durch eine hochfrequente Aktivität mit kleinerer Amplitude abgelöst. Diese "Weckreaktion" ist von der Gesamtdosis unabhängig. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß die Weckreaktion einer Erregungsbildung am Riechepithel zuzuschreiben ist. Da die Versuchstiere durch eine Trachealkanüle geatmet haben, und zusätzliche Untersuchungen nach mechanischer Blockierung der höheren Luftwege die Reaktion nicht verhindert haben, ist es anzunehmen, daß das Riechen von Ozon oder anderen gasförmigen Bestrahlungsprodukten keine Rolle spielen kann. Dagegen erlauben die Intensität der Reaktion, die bekannte akute und chronische Ansprechbarkeit des olfaktorischen Systems auf Bestrahlung und die Abhängigkeit von Receptorpotentialen des Riechepithels vom Polarisationszustand der Zellmembran die Hypothese, daß durch die Bestrahlung das Riechepithel und das olfaktorische System direkt möglicherweise durch eine Beeinflussung der Zellmembran stimuliert wird.
- b) Auch die elektrische Krampferregbarkeit des Neocortex an der "cerveau isolé"-Katze wird durch Bestrahlung verändert. Nach verhältnismäßig niedrigen Dosen (300 - 500 R, 100 R/min) wurde die Dauer von lokalisierten Nachentladungen erheblich verlängert und die Entladungsschwellen gesenkt. Es ist daraus zu schließen, daß die Nervenzellen des nicht narkotisierten Neocortex durch Bestrahlung depolarisiert werden, wodurch die Krampferregbarkeit erhöht wird. Die wirksamen Dosen liegen weit unter denen, die für eine ähnliche Depolarisation von peripheren Nerven notwendig sind.

c) Eingang-Ausgangs-Kurven haben gezeigt, daß Bahnungsmechanismen durch Bestrahlung verstärkt werden können. Ferner wiesen "evoked potentials" Veränderungen auf, die für eine erhöhte Erregbarkeit der afferenten synaptischen Systeme neocorticaler Areale sprechen.

Bei erwachsenen Katzen entwickelt sich ein charakteristisches Muster von somatischen Repräsentationsarealen, das sich durch stereotaktische Ableitung der Reaktionspotentiale, zum Beispiel nach Reizung peripherer Hautnerven, kartieren läßt. Bei Kontrolltieren konnte die vollkommene Entwicklung solcher Felderkarten am Ende der ersten 4 postnatalen Wochen festgestellt werden. Nach Bestrahlung der Katzen unmittelbar nach Geburt mit Dosen von 1000 R und bei einer elektrophysiologischen Untersuchung 4 Wochen später war keine solche Abgrenzung der somatischen Repräsentationsareale zu beobachten. Vorläufige histologische Befunde können diese Ergebnisse nicht ausreichend erklären. Die vorliegenden Untersuchungen weisen auf eine erhebliche Beeinträchtigung der Reifung der synaptischen Organisation und der Cytoarchitektur der somatischen Hirnrinde hin.

2. Verhaltensstudien: (M. Bornhausen)

Mit Methoden der Verhaltensforschung sollten Funktionsstörungen des Zentralnervensystems erfaßt werden, die bei Bestrahlung sowohl des reifenden als auch des reifen Gehirns hervorgerufen werden. Dabei sollten möglichst Dosen getestet werden, die zu keinen groben morphologischen Veränderungen und beim Embryo zu keinen Mißbildungen führen. In den Jahren 1965/66 hielt sich ein Mitarbeiter zum Studium und zur Auswahl geeigneter Verhaltensteste in den physiologischen und psychologischen Abteilungen der Yale School of Medicine, New Haven, auf.

Die vorliegenden Arbeiten machen es deutlich, wie wenig es bisher gelungen ist, von strahleninduzierten Verhaltensstörungen auf Angriffsort und -weise im Organismus und im Zentralnervensystem zu schließen. Es erwies sich als aussichtsreich, als Basis für strahlenbiologische Verhaltensstudien standardisierte instrumentelle Lern-Methoden zu

wählen. Die quantitative Erfassung der Anpassung an ein definiertes Konditionierungsmuster gibt Aufschluß über die "intellektuelle" Leistungsfähigkeit eines Tieres.

Die eigenen experimentellen Arbeiten verzögerten sich vor allem aus technischen Gründen. Unvorhergesehene Verschiebungen der Baupläne des Instituts erzwangen über Jahre eine provisorische Unterbringung des Labors für Verhaltensforschung, das erst im Herbst 1968 endgültig eingerichtet werden konnte. Somit mußten die bisher durchgeführten Versuche vor allem der Erprobung verschiedener verhaltensphysiologischer Methoden dienen. Die eigentlichen Bestrahlungsversuche wurden erst vor kurzem begonnen.

Ratten wurden darauf trainiert, einen Hebel zu drücken, der zu einer antriebsfördernden Reizung des hinteren Hypothalamus und damit zu einer Verstärkung der Grundtätigkeit führt. Wenn die vom Versuchstier als Belohnung gewertete Hirnreizung an die Erfüllung bestimmter vorgegebener Bedingungen geknüpft wird, können daher höhere Leistungen des Zentralnervensystems, wie z.B. Lernvorgänge, leichter aus der veränderten Grundtätigkeit abgelesen werden.

Die stereotaktischen Implantationen von subcorticalen Elektroden zusammen mit der Kopfsockelbefestigung werden nicht nur für die Reizung sondern später auch für die Registrierung elektrophysiologischer Messungen eingesetzt. Die Korrelation verhaltensanalytischer mit elektrophysiologischen Daten soll später bei der Abgrenzung direkter Strahlenwirkung auf das Gehirn weiterhelfen.

Für die unbehinderte Bewegung der Versuchstiere (Ratten) im isolierten Testkäfig wurde eine in Quecksilber rotierende elektrische Verbindung entwickelt. Mehrere Versuchsschaltungen wurden auf ihre Eignung für Fernreizung und Funkübertragung elektrophysiologischer Messungen untersucht. Einige Prototypen wurden gebaut, die nach Befestigung am

Kopfsockel des Tieres augenblicklich für längere Versuchszeiten erprobt werden. Hiermit sollen verhaltensphysiologische Studien an mehreren Tieren gleichzeitig und bei nur minimaler Beeinflussung ihrer Umweltbedingungen ermöglicht werden.

Der Verhaltenstest wird unter weitgehend standardisierten und automatisierten Bedingungen durchgeführt. Wegen der Schwankungen des spontanen Aktivitätsmusters können die Tests auch während der Nacht automatisch ablaufen. Ein schwieriges - und noch nicht hinreichend gelöstes - Problem liegt in der Normierung des vorbereitenden Trainings (preliminary shaping), dessen Einfluß auf die Erreichung des späteren Tätigkeitsniveaus nur abgeschätzt werden kann. In diesem Zusammenhang wurden Versuche zur Automatisierung der Erst-Trainingsprozedur mit Annäherungsschaltern und Photozellen begonnen. Hiermit soll die unüberschaubare Wechselwirkung zwischen Versuchstier und Experimentator ausgeschaltet werden.

Die die Grundtätigkeit des Hebeldrückens verstärkende, fortlaufende Elektrostimulation des Hypothalamus macht die exakte Beachtung der Reizparameter notwendig. Unter Verwendung moderner Halbleiter-Operationen-Verstärker wurde eine Schaltung entwickelt, mit der gleichstromfreie Wechselstrompulse mit eingprägter Stromstärke und beliebiger Frequenz zur Selbststimulation des Versuchstiers eingesetzt werden können. Hiermit ist der Effekt des Hirnreizes unabhängig von Polarisationsartefakten und Elektrodenimpedanzschwankungen.

Zum Zeitpunkt der Vorlage dieses Berichtes stehen mehr als 150 Ratten im Versuch, von denen ca. 60 pränatal bestrahlt wurden. Nach Implantation der Elektroden werden sie in verschiedenem Alter getestet (LEVINSON 1962, ARNOLD 1962, MEIER 1962). Nach Fertigstellung der organisatorischen und technischen Voraussetzungen für einen optimalen und ausbaufähigen Versuchsansatz können nunmehr strahlenbiologische Verhaltensteste durchgeführt werden.

III. RADIOTOXIZITÄT (W. Gössner, O. Hug, A. Luz und W. Müller)

a) Allgemeines:

Bei der Entwicklung von somatischen Strahlenschäden wurde das Interesse vor allem auf Strahlenspättschäden gerichtet und dabei insbesondere auf die Entstehung von malignen Geschwülsten bei Inkorporation osteotroper Radionuklide. Hierbei sollten ausgedehnte statistische Erhebungen über Lebenserwartung und Geschwulstbildung nach Applikation verschieden großer Radioaktivitätsmengen kombiniert werden mit pathologisch-anatomischen, vor allem histologischen und histochemischen Studien über die Entstehungsweise der Geschwülste. Eine besondere Fragestellung, nämlich die Abhängigkeit der Geschwulstbildung von der zeitlichen Dosisverteilung, sollte dadurch angegangen werden, daß chemisch identische Radioisotope mit unterschiedlicher Halbwertszeit in ihrer Wirkung verglichen werden.

Die Arbeiten haben sich in der Berichtszeit auf die Untersuchung von Radium ²²⁴ (Thorium X) konzentriert mit dem Ziel, die Wirkung dieses kurzlebigen Radiumisotops mit dem langlebigen Radium ²²⁶ zu vergleichen.

Bei den sog. "Bone Seekern" ergibt sich das Problem, ob für die Entwicklung von Osteosarkomen die Totaldosis oder die relativ hohe initiale Dosisleistung im Skelettsystem entscheidend ist. Ein Vergleich chemisch identischer α -strahlender Isotope des Radiums mit erheblichen Unterschieden in der Halbwertszeit sollte in dieser Richtung Aufschlüsse geben, auch wegen der unterschiedlichen Strahlenenergien der Nuklide und ihrer jeweiligen Tochterprodukte, die bezüglich ihrer Dosisverteilung und unter Umständen ihrer RBW nicht völlig identisch sind.

Seit Jahrzehnten liegen ausführliche klinische und experimentelle Daten über die Resorption, Verteilung, Ausscheidung und Spättschäden nach Inkorporation des langlebigen Nuklides Radium ²²⁶ vor, so daß die Untersuchungen mit Radium ²²⁴ darauf aufgebaut werden konnten. Außerdem können bisherige Ergebnisse eines laufenden Versuchsprogrammes der Universi-

tät Utah an Hunden verwertet werden.

Darüber hinaus haben die durch Radium 224 hervorgerufenen Strahlenschäden eine praktische Bedeutung, da Nachuntersuchungen von Kindern, die vor etwa 15 Jahren wegen Knochentuberkulose mit diesem Nuklid behandelt worden waren, in einem ungewöhnlich hohen Prozentsatz Wachstumsstörungen und auch Osteosarkome gezeigt haben (SPIESS). Außerdem wurde und wird auch jetzt noch Thorium X zur Behandlung des M. Bechterew benutzt. Voraussetzung für diese Studien waren radiochemische Untersuchungen, sowie Untersuchungen über die Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung und Strahlenbelastung bei Zufuhr von Radium 224 an Mäusen und Ratten. Nach orientierenden Untersuchungen über die akute Mortalität nach Zufuhr unterschiedlich hoher Dosen von Radium 224 wurde eine größere Versuchsserie von bisher insgesamt 3000 Mäusen und 138 Ratten angesetzt, in der eine sich über Jahre erstreckende, noch nicht abgeschlossene Kontrolle aller exponierten Tiere hinsichtlich Lebenserwartung und Krebsentstehung erfolgte. Die pathologisch-anatomische Verfolgung der Tumorgenese erforderte vergleichende Untersuchungen der Strahlenveränderungen im Knochen bei Bestrahlung von außen. Daraus entwickelte sich im Laufe des Programmes ein gesondertes Arbeitsprogramm, das sich ganz generell mit der Pathogenese akuter und chronischer Strahlenschäden im Säugetierorganismus befaßte. Die Resultate der, wie gesagt, noch nicht abgeschlossenen Studien lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- b) Physikalische Messungen über Verteilung und Ausscheidung von Ra 224 und die mit der Inkorporation verbundene Strahlenbelastung der verschiedenen Gewebe:

Durch Ganzkörpermessungen am lebenden Tier und durch Radioaktivitätsmessungen an Organproben und Exkrementen mittels Szintillationszählern wurde der Radioaktivitätsverlauf nach Inkorporation von Ra 224 (20 und 50 μ Ci/kg Körpergewicht) intraperitoneal in Calciumchlorid-Lösung

verfolgt. Die Ausscheidung durch Faeces und Urin wurde gemessen. Mittels γ -Spektroskopie wurden Ra ²²⁴ selbst und sein langstlebige Folgeprodukt Pb ²¹² und das Verhältnis der beiden in den verschiedenen Organen und zu verschiedenen Zeiten nach Inkorporation ermittelt. Ganzkorperzahlungen und Ausscheidungsmessungen ergeben, daß der Gehalt an Ra ²²⁴ in den ersten 2,5 Tagen auf die Hälfte abfällt. Im weiteren Verlauf klingt die Aktivität nur entsprechend der physikalischen Halbwertszeit ab. In den Organen findet sich die höchste spezifische Ra ²²⁴-Aktivität vom 3. Tage ab im Knochen, ferner zeigt die Milz eine beträchtliche Anreicherung des Nuklides. Alle anderen Organe haben eine um zwei Größenordnungen niedrigere Aktivität. Der Gehalt an Pb ²¹² ist ebenfalls im Knochen am höchsten, dann folgt die Niere, während alle übrigen Organe wesentlich geringeren Radio-Bleigehalt zeigen. Aus dem Aktivitätsverlauf in den verschiedenen Organen und den physikalischen Daten über die emittierte Strahlenart und -energie wurden die Strahlendosen berechnet, die bis zum völligen Zerfall der inkorporierten Substanz und ihrer Tochterprodukte auftreten. Die Skelettdosis beträgt bei angenommener gleichmäßiger Verteilung im Skelett 28 rad/ μ Ci/kg. Die Anfangsdosisleistung ist dabei 8 rad/Tag/ μ Ci/kg. Alle anderen Organe außer der Milz sind mit Dosen von etwa 1 % der Skelettdosis belastet. Die mikroskopische Verteilung der Radionuklide im Knochen und anderen Geweben wurde autoradiographisch untersucht. Wie zu erwarten, fand sich eine besondere Anreicherung in der Mineralisationszone der Röhrenknochen, der roten Pulpa der Milz und überraschenderweise initial in den Speicheldrüsen. Quantitative Auswertung dieser Autoradiographien zur Bestimmung des mikroskopischen Dosisverteilungsmusters ist vorgesehen.

c) Orientierende Versuche über die akute Mortalität bei Inkorporation von Ra ²²⁴:

Untersucht wurde die Wirkung einer einmalig zugeführten Menge des Ra ²²⁴-Isotops bei Wistar-Ratten und NMRI-Mäusen.

Die Ratte ist dabei, bezogen auf $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ Körpergewicht, wesentlich strahlenempfindlicher als die Maus. Die $\text{LD}_{50/14\text{d}}$ betrug bei den Mäusen $155 \mu\text{Ci}/\text{kg}$, bei Ratten $25 \mu\text{Ci}/\text{kg}$. Eine 100 %ige akute Letalität wird bei Mäusen innerhalb von 14 Tagen ab $300 \mu\text{Ci}/\text{kg}$, bei Ratten mit ca. $40 \mu\text{Ci}/\text{kg}$ erreicht. Dem Tod geht jeweils ein innerhalb der ersten 5 Tage nach der Injektion einsetzender kontinuierlicher Gewichtsverlust voraus. Überlebende Tiere zeigen nach einiger Zeit zwar wieder eine Gewichtszunahme, bleiben aber dann im weiteren Verlauf 20 - 25 % unter dem Gewicht von Kontrolltieren. Bei der Untersuchung von ca. 100 Tieren fanden sich keine signifikanten Unterschiede der akuten Letalität zwischen beiden Geschlechtern und bei Variation des Alters zwischen 4 und 12 Wochen.

d) Untersuchungen über die Spätwirkungen von Ra^{224} bei Mäusen und Ratten:

Für die einmalige Zufuhr von 5 - 200 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ Körpergewicht und Einzelversuche mit fraktionierter Applikation von 5 x 50 und 5 x 100 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ Körpergewicht wurden die Überlebenskurven ermittelt. Da der Versuch in Etappen aufgebaut wurde, sind diese Versuche noch nicht abgeschlossen. Der bisherige Verlauf zeigt bei Dosen von 5 - 25 μCi keine signifikante Abweichung von den Kurven der Kontrolltiere. Mit den höheren Dosen verkürzt sich die Lebenserwartung in steigendem Maße. Bei Dosen über 100 μCi einmalig oder fraktioniert gegeben überleben nur wenige Tiere die Versuchszeit von 10 Monaten.

Bisher sind bei den im Versuch befindlichen, mit Ra^{224} inkorporierten 2499 Tieren in allen Dosisgruppen insgesamt 88 Knochentumoren aufgetreten, die beim Tod oder kurz vor Tötung der Tiere festgestellt wurden. 26 % der Tumoren fanden sich in männlichen, 74 % in weiblichen Tieren. Bevorzugt von Tumoren befallen ist das Achsen skelett (Wirbelsäule, Beckengürtel und Schwanz, Unterkiefer und Schädel). Die kürzeste Latenzzeit nach Inkorporation betrug 5 Monate, das Maximum der Tumorzinzidenz liegt bei 17 - 18 Monaten. Während in ca. 500 Kontroll-

tieren kein einziger Knochentumor beobachtet wurde, traten solche schon nach Dosen von 5 μCi und bis zu Dosen von 25 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ in einigen Prozent der behandelten Tiere auf. Innerhalb dieser Dosisbereiche ist kein signifikanter Gang mit der Dosis zu erkennen. Das Maximum der Tumorzinzidenz liegt bei 50 und 100 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ und beträgt hier um 5 % nach 12 Monaten mit einem weiteren Anstieg bei Verlängerung der Beobachtungszeit. Bei Dosen über 100 μCi einmal oder fraktioniert gegeben ist der Effekt geringer, vor allem wegen der geringen Zahl von Tieren, welche die Latenzzeit bis zum Auftreten von Tumoren erleben. Bei insgesamt 138 Ratten, die 5 - 40 $\mu\text{Ci Ra}^{224}/\text{kg}$ Körpergewicht erhalten hatten, traten bisher 26 Knochentumoren auf, d.h. in 19,9 % der behandelten Tiere. Die anatomische Verteilung der Tumoren mit Bevorzugung des Achsenskeletts entspricht annähernd der bei den Mäusen, die kürzeste Latenzzeit betrug 12 Monate, das Maximum lag bei 19 Monaten. Das Auftreten von Weichteiltumoren wird laufend mit verfolgt. Alle Knochentumoren wurden histologisch und histochemisch untersucht. Bei den Knochentumoren handelt es sich durchgehend um osteoplastische Sarkome. Histologisch, histochemisch und autoradiographisch wurden die räumliche Verteilung von Radium 224 im Knochen und in anderen Geweben und Organen, sowie die initialen Veränderungen im Knochen-system studiert. Insbesondere wurde dabei die Wirkung auf die Knochenbildung und Knochenresorption durch histochemische Untersuchungen der alkalischen und der sauren Phosphatase verfolgt (GÖSSNER und SCHWABE).

Vergleichend dazu wurden enzymhistochemische Untersuchungen des wachsenden Knochens nach Bestrahlung mit Dosen von 2000 und 3000 R am Kniegelenk der Ratte vorgenommen. Diese pathologisch-anatomischen Studien nach Inkorporation von Ra^{224} wurden zu einem umfassenden Programm über die Pathohistologie und -histochemie der akuten und chronischen Strahlenveränderungen ausgebaut. Die Untersuchungen konzentrieren sich z.Zt. im übrigen auf Strahlenschäden der Dünndarmschleimhaut (GÖSSNER und LUZ) und der Milz.

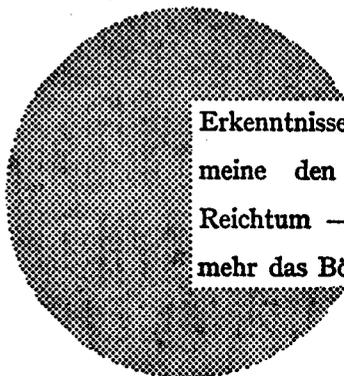
AN UNSERE LESER

Alle Wissenschaftliche und technische Berichte werden nach Erscheinen in der von der Zentralstelle für Information und Dokumentation (CID) herausgegebenen Monatszeitschrift „euro abstracts“ angezeigt. Abonnement (1 Jahr : DM 60, BF 820) und Probehefte sind erhältlich bei :

Handelsblatt GmbH
„euro abstracts“
Postfach 1102
D 4 Düsseldorf 1 (Germany)

oder

**Office de vente des publications officielles
des Communautés européennes**
37, rue Glesener
Luxembourg



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.

VERTRIEBSSTELLE DER AMTLICHEN VERÖFFENTLICHUNGEN DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN

37, rue Glesener, Luxembourg (Compte chèque postal N° 191-90)

BELGIQUE — BELGIË

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

LUXEMBOURG

OFFICE DE VENTE
DES PUBLICATIONS OFFICIELLES
DES COMMUNAUTES EUROPEENNES
37, rue Glesener - Luxembourg

DEUTSCHLAND

BUNDESANZEIGER
Postfach - 5000 Köln 1

NEDERLAND

STAATSDRUKKERIJ
Christoffel Plantijnstraat - Den Haag

FRANCE

SERVICE DE VENTE EN FRANCE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTES EUROPEENNES
26, rue Desaix - 75 Paris 15^e

ITALIA

LIBRERIA DELLO STATO
Piazza G. Verdi, 10 - 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 Aldringer
L u x e m b o u r g