

# Zivilschutz- Forschung

Schriftenreihe der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern  
Herausgegeben vom Bundesamt für Zivilschutz Neue Folge Band 13

H. Mönig, W. Oehlert, M. Oehlert, G. Konermann

## **Modifikation der Strahlenwirkung und ihre Folgen für die Leber**

ISSN 0343-5164



# Zivilschutz- Forschung

Schriftenreihe der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern

Herausgegeben vom Bundesamt für Zivilschutz Neue Folge Band 13

H. Mönig, W. Oehlert, M. Oehlert, G. Konermann

## **Modifikation der Strahlenwirkung und ihre Folgen für die Leber**

ISSN 0343-5164

Herausgeber: Bundesamt für Zivilschutz,  
Deutschherrenstraße 93-95, 53177 Bonn  
Schriftleitung und Redaktion: Carl Maier

Die Arbeiten geben die Meinung der Autoren wieder. Sie stellt keine  
Äußerung des Herausgebers dar und ist auch nicht als solche auszulegen.

# Inhalt

## **I. Der Einfluß von Strahlenschutzsubstanzen auf strahleninduzierte Spätschäden der Mäuseleber. . . . . 7**

*Wolfgang Oehlert und Hans Mönig*

### **Einleitung. . . . . 7**

### **Material und Methoden. . . . . 8**

Tiere. . . . . 8

Strahlenschutzsubstanzen. . . . . 9

Bestrahlung. . . . . 10

Histologie. . . . . 11

### **Ergebnisse. . . . . 12**

Altersbedingte Zell- und Gewebsveränderungen der Leber von nicht bestrahlten Mäusen. . . . . 12

Teilkörperbestrahlung im Leberbereich. . . . . 13

Ganzkörperbestrahlungen. . . . . 16

Histologie. . . . . 19

Strahlenbedingte Leberveränderungen am Gallengangssystem. . . . . 24

Veränderungen am Sternzellsystem. . . . . 24

Strahlenbedingte Veränderungen im Bereich der Sinusoide. . . . . 28

Strahlenbedingte Veränderungen in anderen Organen und Geweben. . . . . 33

### **Diskussion. . . . . 33**

### **Zusammenfassung. . . . . 39**

### **Literatur. . . . . 40**

<b>II. Über die Wirkung von Endotoxin auf vorbestrahlte Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit</b> . . . . .	<b>43</b>
<i>Hans Mönig, Wolfgang Oehlert, Michael Oehlert, Gerhard Konermann</i>	
<b>Einleitung</b> . . . . .	<b>43</b>
<b>Material und Methode</b> . . . . .	<b>44</b>
Versuchstiere . . . . .	44
Bestrahlung . . . . .	44
Endotoxin (Lipopolysaccharide) . . . . .	46
Histologische Untersuchungen . . . . .	46
Blutbild . . . . .	46
Chemilumineszenz-Messungen . . . . .	48
Zählung von Monozyten und Makrophagen aus dem Peritoneum . . . . .	48
<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>50</b>
Toxizität des Endotoxins (LPS von <i>S. abortus equi</i> ) bei nicht bestrahlten Tieren . . . . .	50
Letalität nach Bestrahlung und Injektion von Endotoxin . . . . .	52
Zusammenhang zwischen Letalität und Granulozytenwerten	53
Einfluß einer Vorbehandlung mit Cystanien auf Letalität und Granulozytenzahl . . . . .	54
Einfluß einer Vorbehandlung mit einer kleinen LPS-Menge auf Letalität und Granulozytenzahl . . . . .	56
Letaleffekt . . . . .	56
Granulozytenwerte . . . . .	56
Einfluß von Endotoxin oder Bestrahlung auf Monozyten und Makrophagen des Peritoneums . . . . .	58
Lipopolysaccharide . . . . .	58
Bestrahlung . . . . .	58
Histologische Untersuchungen . . . . .	59
Endotoxin-Injektion bis zu vier Tagen nach Bestrahlung	59
Endotoxin-Injektion 2 bis 24 Wochen nach Bestrahlung	65
Endotoxin-Injektion ein Jahr nach Bestrahlung . . . . .	66
Einfluß einer Vorbehandlung mit einer kleinen LPS-Menge . . . . .	71
<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>72</b>
<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>78</b>
<b>Literatur</b> . . . . .	<b>79</b>
<b>Die Autoren</b> . . . . .	<b>83</b>
Danksagung . . . . .	83

# I. Der Einfluß von Strahlenschutzsubstanzen auf strahleninduzierte Spätschäden der Mäuseleber

*Wolfgang Oehlert und Hans Mönig*

## Einleitung

Bei den überlebenden Atombombenopfern in Japan ist für die meisten Gewebe und Organe ein Anstieg der Tumorrates mit der Strahlendosis nachgewiesen (Shimizu et al., 1989). Für die Leber, die Gallenblase und den Gallengang bleibt dieser Zusammenhang rätselhaft. Wenn auf den Totenscheinen Lebertumoren als primäre Todesursachen angegeben werden, dann besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Anstieg der Dosis. Dagegen besteht eine Dosisabhängigkeit, wenn man die Fälle mit Lebertumoren, die nicht als primäre Todesursache angegeben sind, hinzurechnet (Schull et al., 1990). Dieses Verhalten spiegelt die Tatsache wider, daß in der Leber Sekundärtumoren bei strahlenbedingten Malignomen, z. B. in der Brust oder Lunge, zu beobachten sind (Schull et al., 1990). Auf Grund der neuen japanischen Krebsdaten hat sich die Internationale Strahlenschutzkommission (ICRP, 1991) veranlaßt gesehen, den Spätschaden für die Leber mit einem Wichtungsfaktor von 5 % für alle stochastischen Schäden zu berücksichtigen. Vor einigen Jahren hatte die ICRP (1977) die Leber noch als eines der Gewebe klassifiziert, bei dem ein nur geringes Strahlenkrebs-Risiko besteht. In Untersuchungen an der Rattenleber konnte nachgewiesen werden, daß eine Bestrahlung mit geringen Dosen zu einem latenten Schaden an der Leber führt, ohne daß die Leberfunktion beeinträchtigt wird. Zusätzliche nichtspezifische Stimuli, die eine verstärkte Leberregeneration hervorrufen, führen dann zu einer Manifestation dieses Schadens, was sich in einer vermehrten Tumorbildung äußert (Oehlert, 1978). Eine höhere strahlenbedingte Tumorrates der Leber konnte ferner nach chronischer (Nowell, Cole, 1965) und akuter (Davis et al., 1970; Maisin et al., 1978 a; Bitter et al., 1982; Covelli et al., 1984) Bestrahlung von Mäusen beobachtet werden. Andererseits traten nach Ganzkörperbestrahlungen von Mäusen mit 250 kV-Röntgenstrahlen bei einer Dosis von ca. 8 Gy gutartige und bösartige Hepatome nicht häufiger auf als bei unbestrahlten Tieren (Nowell und Cole, 1959). Auch Bestrahlungen mit schnellen Neutronen führten in einem Dosisbereich von 2,9 bis 5,8 Gy zu keiner erhöhten Inzidenz von Hepatomen. Möglicherweise lag bei

diesen Bestrahlungen die Dosis bereits in einem „therapeutischen“ Bereich, in dem transformierte Zellen abgetötet werden. Eine solche Abnahme der Tumorzinzidenz mit steigender Dosis konnte in einigen Fällen nach Ganzkörperbestrahlung von Ratten und Mäusen nachgewiesen werden (NCRP, 1989). Cole und Nowell (1965) beschreiben Anstieg und Absinken der Tumorraten mit der Dosis als Zusammenspiel zweier Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Tumorentstehung und Zellabtötung.

Die Problematik bei der Untersuchung, ob Schutzsubstanzen vor einer strahlenbedingten Tumorentstehung schützen, besteht darin, daß ungeschützte Tiere im allgemeinen sterben, bevor sich Neoplasien gebildet haben. Entsprechende Untersuchungsergebnisse sind nicht leicht zu deuten. Eine nachteilige Wirkung der Strahlenschutzsubstanzen könnte ferner darin bestehen, daß im hohen Strahlendosisbereich die oben angesprochene Abtötung von transformierten Zellen verhindert oder vermindert wird (Davis et al., 1970). So konnten Maisin et al. (1978 b) zeigen, daß bei Mäusen das Inzidenzmaximum von strahleninduzierten T-Zellen-Lymphomen, das bei ungeschützten Tieren bei 5 Gy liegt, durch AET auf 10 Gy verschoben wird. Bei diesem Vorgang verringerte sich die Inzidenzrate nicht. In einigen Arbeiten kommen die Autoren zu dem Schluß, daß Strahlenschutzstoffe die Bildung strahleninduzierter Tumoren nicht verhindern (zusammenfassende Darstellung s. Mönig et al., 1984). Allerdings konnten Maisin et al. (1978 a) mit Kombinationen von Schutzsubstanzen bei Mäusen eine Schutzwirkung, bezogen auf alle Neoplasien, nachweisen. Möglicherweise verhindert dieses Kombinationspräparat auch die Bildung von strahleninduzierten Lebertumoren.

Viele Fragen hinsichtlich der Entwicklung von Spätschäden nach Strahleneinwirkung im Zusammenwirken mit Strahlenschutzsubstanzen sind noch ungelöst. Deshalb wurden Untersuchungen speziell an der Leber durchgeführt. Die Ergebnisse werden in diesem Bericht mitgeteilt. Dabei wurden auch Schutzsubstanzen verwendet, die bisher für diese Fragestellungen noch nicht eingesetzt waren.

## Material und Methoden

### *Tiere*

Für die Versuche wurden zum Zeitpunkt der Bestrahlung zehn bis elf Wochen alte männliche Mäuse eines institutseigenen Auszuchtstamms (Heiligenberg-Stamm) verwendet. Das Tiergewicht lag im Mittel bei 31,7 g mit einer Standardabweichung von  $\pm 3,7$  g. Die Schwankungs-

breite betrug 18,9 bis 40,0 g. Ernährt wurden die Tiere mit einer Standarddiät Altromin der Altromin GmbH, Lage/Lippe. Mit HCl angesäuertes Trinkwasser stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Je 5 Tiere wurden in Makrolon-Käfigen gehalten. Die Tiere wurden täglich inspiziert.

### Strahlenschutzsubstanzen

In den Tabellen 1 a und b sind die wesentlichen Daten der verwendeten Strahlenschutzsubstanzen zusammengestellt. Als Cystamin wurde Cystaminiumchlorid zur Synthese der Firma Merck-Schuchardt, München, verwendet. Die Thiophosphate WR 638 und WR 2721 sowie Dextranskonjugate mit dem Thiophosphat WR 2721 wurden von H. Sedlmeier am Laboratorium für experimentelle Radiologie, Neuherberg, synthetisiert. Der Syntheseweg der Dextranskonjugate ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben (s. Mönig et al., 1990).

Tabelle 1 a. Bezeichnungen und Strukturformeln der verwendeten Strahlenschutzsubstanzen.

Substanz	Kurzbezeichnung	Strukturformel
Disulfid des 2-Mercaptoethylamins	Cystamin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{S} \\   \\ \text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{S} \end{array}$
S-(2-Aminoethyl)-thiophosphat	WR 638	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{SH}_2\text{PO}_3$
S-2(3-Aminopropylaminoethylthiophosphat	WR 2721	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SH}_2\text{PO}_3$
Dextran-(WR 2721)-Konjugat/Amin	DEX-WR-Amin	$\text{DEX} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \\ \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$ $\text{H}_2\text{C}-\text{NH}-\text{WR}$
Dextran-(WR 2721)-Konjugat/Schiffsche Base	DEX-WR-Base	$\text{DEX} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \\ \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$ $\text{HC}=\text{N}-\text{WR}$

Tabelle Ib. Verwendete Menge und Zeit der i.p.-Injektion vor der Bestrahlung. Cystamin wurde in aqua bidest., die Thiophosphate und Dextranskonjugate wurden in Phosphatpuffer nach Sørensen mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst. Die Verwendung eines Puffers mit einem pH-Wert von 7,4 macht das Thiophosphat WR 2721 gegenüber dem aqua bidest. als Lösungsmittel weniger toxisch (Mönig et al., 1986).

Kurzbezeichnung	Menge pro kg Tiergewicht	Zeit der Applikation vor der Bestrahlung
Cystamin	150 mg	5 min
WR 638	420 mg	10 min
WR 2721	500 mg	15 min
DEX-WR-Amin	500 mg	24 Stunden
DEX-WR-Base	500 mg	24 Stunden

### *Bestrahlung*

Die Bestrahlung erfolgte mit einem Röntgengerät Stabilipan 2 der Siemens AG, Erlangen. Folgende Parameter lagen für Ganzkörper- und für Teilkörper-Bestrahlungen vor: Röhrenspannung 250 kV, Stromstärke 15 mA, Filterung 1 mm Cu, HWD 2 mm Cu. Die Dosisleistung und Dosis wurden mit den Meßgeräten Dosimenter DL 4 und DI 4 der Physikalisch-Technischen Werkstätten Dr. Pychlau, Freiburg i. Br., gemessen und kontrolliert.

Bei den Ganzkörperbestrahlungen betrug die Dosisleistung in einem Fokus-Kammer-Abstand von 75 cm  $0,6 \text{ Gy min}^{-1}$ . Die Ionisationskammer des Dosimeters befand sich im Zentrum eines runden Plexiglas-käfigs. Bis zu sechs Tiere konnten gleichzeitig bestrahlt werden. Der Käfig war von einem Plexiglasring umgeben, um maximale Streubedingungen auch für die Tiere am Käfigrand zu erreichen. Durch Verwendung von Phantomen in der Größe von Mäusen, die mit einer Fricke-lösung (Fricke und Hart, 1966) gefüllt waren, konnte ein Umrechnungsfaktor von Ionendosis in Energiedosis ermittelt werden. 100 R entsprechen 0,95 Gy. Es wurden Ganzkörperdosen von 2,5 bis zu 15 Gy verabreicht.

Teilkörperbestrahlungen wurden im Bereich der Leber durchgeführt. Die Tiere wurden, nachdem sie vor der Bestrahlung 50 mg pro kg Körpergewicht Nembutal erhalten hatten, in ein Plexiglasrohr gelegt. Die Narkotisierung wurde vorgenommen, um eine Verlagerung der Tiere

im Bestrahlungsfeld zu verhindern. Die Narkotisierung hielt etwa 10 min an. In dem Plexiglasrohr befand sich eine Öffnung für die Bestrahlung im Leberbereich. Der übrige Teil des Plexiglasrohres wurde mit 6 mm Blei abgedeckt. Bei einem Fokushautabstand von 34 cm betrug die Dosisleistung 2 Gy min<sup>-1</sup>. Es wurden Teilkörperdosen von 5 Gy verabreicht.

### *Histologie*

Die Versuchstiere wurden unter Ethernarkose dekapitiert und anschließend obduziert. Dabei erfolgte jeweils eine makroskopische Beschreibung des Obduktionssitus, wobei vor allem auf Organvergrößerungen und herdförmige Veränderungen in den verschiedenen Organen gefahndet wurde. Lungen, Herz und kleine Segmente von Dünn- und Dickdarm sowie 5 mm dicke Scheiben der Leber, der Milz und der Nieren wurden in 8 %iger gepufferter Formalin-Lösung fixiert. Nach der Fixation erfolgte die Einbettung in Paraffin und die Herstellung etwa 10  $\mu\text{m}$  dicker Gewebsschnitte, die nach Entparaffinierung mit Hämatoxylin, mit der PAS-Reaktion und nach van Gieson zur Faserdarstellung angefärbt wurden.

Zwar wurden von allen entnommenen Organen und Organteilen histologische Untersuchungen durchgeführt, doch galt das Hauptinteresse der histologischen Untersuchung der Leber.

Vor allem bei der histologischen Klassifizierung präkanzeröser, adenomatöser und karzinomatöser Veränderungen des Lebergewebes wurde weitgehend eine Tumorklassifikation eingehalten, die von Byrd et al. (1990) erarbeitet wurde. In unseren eigenen Untersuchungen beobachteten wir neben den von Byrd et al. in die Klassifikation aufgenommenen durch chemische Karzinogene induzierten präkanzerösen und karzinomatösen Veränderungen, weitere primäre Lebertumoren. Diese sind offensichtlich für die chemische Karzinogenese bei der Maus nicht beschrieben oder unbekannt, lassen sich jedoch in der radiogenen Karzinogenese in dem von uns verwendeten Tierstamm relativ häufig nachweisen. Zu diesen Tumoren gehört einmal das Sternzellsarkom der Leber und zum zweiten das Hämangio-Endothelium sowie das Hämangio-Endotheliosarkom der Leber.

Die von uns beobachteten histologischen Veränderungen im Lungengewebe, im Gastrointestinaltrakt, in der Milz und in den Nieren entsprechen weitgehend den bereits bekannten, z.B. von Cottier (1961) beschriebenen radiogenen Früh- und Spätveränderungen bei der Maus. Auf diese histologischen Veränderungen wird deshalb nicht weiter eingegangen. Im Mittelpunkt stehen die zu verschiedenen Versuchszeiten bei unbestrahlten Tieren und zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung

auftretenden Zell- und Gewebsveränderungen in der Leber, wobei auch die Variation dieser Veränderungen bei Tieren untersucht wurde, die vor der Bestrahlung Strahlenschutzsubstanzen erhielten.

## Ergebnisse

### *Altersbedingte Zell- und Gewebsveränderungen der Leber von nicht bestrahlten Mäusen*

Tabelle 2. Altersverteilung von 104 nichtbestrahlten Mäusen zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung von Leber und Pankreas. Der Mittelwert des Alters betrug 556 Tage mit einer Standardabweichung von 214 Tagen. Die Schwankungsbreite lag zwischen 100 und 852 Tagen. Diese Verteilung gibt jedoch nicht den natürlichen Absterbeverlauf wieder, sondern ist durch den Versuchsansatz bedingt, indem Tiere dem Kollektiv für histologische Untersuchungen entnommen wurden. Einige der Tiere erhielten im Alter von 10 Wochen als Kontrollen zu bestrahlten Tieren physiologische NaCl-Lösung, Sörensen-Puffer (pH 7,4), Strahlenschutzsubstanzen (Cystamin, WR 638, WR 2721) oder Nembutal i.p. injiziert.

<u>Alter in Tagen</u>	<u>Anzahl Tiere</u>	<u>Histologie</u>
100–200	15	keine wesentlichen pathologischen Befunde
201–300	0	
301–400	13	mäßiggradige Kernpolymorphie geringgradige Aktivierung des RES
401–500	8	Abnahme des Glykogengehalts der Leberzellen Aktivierung des RES, Kernpolymorphie 100 %
501–600	2	Kernpolymorphie bei beiden Tieren
601–700	30	Kernpolymorphie 100 %, noduläre Hyperplasie 23 %
701–800	33	Kernpolymorphie 100 %, Sternzellaktivierung 80 %, noduläre Hyperplasien 80 %, 2 Leberzell-Karzinome
801–900	3	noduläre Hyperplasien (multipel) 100 %

Wie die Daten der Tabelle 2 erkennen lassen, entwickelten von 104 nicht bestrahlten Mäusen zwei Tiere Karzinome und 26 weitere Tiere noduläre Hyperplasien (bei insgesamt 33 Tieren) zwischen 701 und 800 Versuchstagen. Bei drei Mäusen mit einem Alter von 801 bis 900 Tagen konnten in allen Fällen noduläre Hyperplasien beobachtet werden. Aber auch in einem Alter zwischen 601 und 700 Tagen wiesen 23 % der Tiere noduläre Hyperplasien auf. Die nodulären Hyperplasien sollen bei der Beschreibung der Lebergewebsveränderung nach Bestrahlung definiert werden. Bei den Tumoren handelte es sich um typische hepatozelluläre Karzinome (Abb. 4, S. 23), die in ihrem histologischen Bild Ähnlichkeiten mit dem menschlichen hepatozellulären Karzinom aufwiesen. Kupfferzell-Sarkome, mixed Leber-Karzinome und Hämangioendotheliome wurden nur bei bestrahlten Tieren beobachtet.

Die Leberzellkarzinome und einige der nodulären Hyperplasien traten bei Tieren auf, die keine Behandlung im Sinne der oben erwähnten i.p.-Injektion im Alter von 10 Wochen erhielten. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die Vorbehandlung auch mit schwefelhaltigen Schutzsubstanzen zu keinen zusätzlichen Veränderungen führt.

### *Teilkörperbestrahlung im Leberbereich*

In Abb. 1 sind die Absterbeverläufe von nichtbestrahlten und von mit 5 Gy teilkörperbestrahlten Tieren dargestellt, die nicht mit Schutzsubstanzen behandelt wurden und in Abb. 2 Absterbeverläufe von Tieren, die vor der Scheinbestrahlung bzw. vor der Teilkörperbestrahlung mit 5 Gy Schutzsubstanzen erhielten. Wie der Abb. 1 entnommen werden kann, ergibt sich für die Überlebensraten zwischen unbestrahlten und bestrahlten Tieren, die keine Schutzsubstanzen erhalten haben, nur ein geringer Unterschied. Die Abweichungen sind größer bei Tieren, denen Schutzsubstanzen verabreicht wurden (s. Abb. 2), wobei die nichtbestrahlten Tiere bis zum 530. Tag eine größere Absterberate aufweisen als die bestrahlten Tiere. Allerdings sind die Unterschiede im Bereich von 400 Tagen und von 500 Tagen statistisch nicht signifikant. Die Kurve für die bestrahlten, mit Strahlenschutzsubstanzen behandelten Tiere (Abb. 2) verläuft weitgehend deckungsgleich mit den Kurven aus Abb. 1.

Die Tiere aus Tabelle 3 weisen mit Ausnahme der bestrahlten Cystamin-Gruppe im wesentlichen das gleiche Alter auf. Die nichtbestrahlten Tiere sind in der Tabelle 2 mit erfaßt. Bei den Befunden aus Tabelle 3 ist auffällig, daß bei den 24 nichtbestrahlten Tieren keine Tumoren gefunden wurden. Bei dieser Kontrollgruppe wurden jedoch bei vier Tieren noduläre Hyperplasien nachgewiesen. Dagegen konnten in allen Gruppen bestrahlter Tiere ohne und mit Strahlenschutzsubstanzen Tumoren

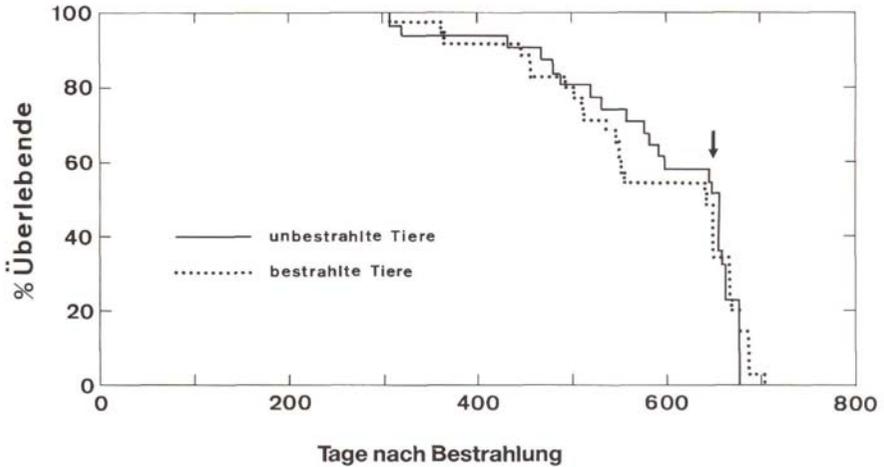


Abb. 1: Absterbeverlauf unbestrahlter (Kontrollen) und im Bereich der Leber mit 5 Gy lokalbestrahlter männlicher Mäuse. Die Tiere erhielten vor der Scheinbestrahlung (Kontrollen) bzw. Bestrahlung physiologische NaCl-Lösung oder Sörensen-Puffer. Zum Zeitpunkt der Scheinbestrahlung bzw. Bestrahlung waren die Tiere 70 bis 77 Tage alt. Der in der Abbildung eingezeichnete Pfeil am Tage 649 markiert die Entnahme von Tieren für histologische Untersuchungen. Insofern entspricht die Überlebensrate oberhalb dieses Zeitpunkts nicht mehr dem natürlichen bzw. strahlenbedingten Verlauf. Die Daten wurden aus 31 Kontrolltieren und aus 35 bestrahlten Tieren ermittelt.

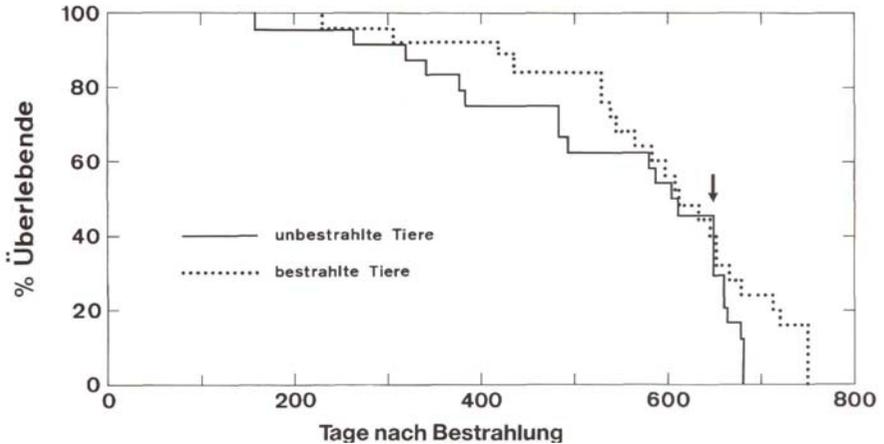


Abb. 2: Absterbeverlauf unbestrahlter (Kontrollen) und im Bereich der Leber mit 5 Gy lokalbestrahlter männlicher Mäuse. Die Tiere erhielten vor der Scheinbestrahlung bzw. vor der Bestrahlung die Strahlenschutzsubstanzen Cystamin, WR 638 oder WR 2721. Zum Zeitpunkt der Scheinbestrahlung (Kontrollen) bzw. Bestrahlung waren die Tiere 70 bis 77 Tage alt. Der in der Abbildung eingezeichnete Pfeil am Tage 650 markiert die Entnahme von Tieren für histologische Untersuchungen. Insofern entspricht die Überlebensrate oberhalb dieses Zeitpunkts nicht mehr dem natürlichen bzw. strahlenbedingten Verlauf. Die Daten wurden aus 24 Kontrolltieren und 25 bestrahlten Tieren ermittelt.

beobachtet werden. Alle 20 bestrahlten Tiere mit oder ohne Strahlenschutzsubstanzen wiesen Tumoren oder noduläre Hyperplasien an der Leber auf. Diese Tumorzinzidenz gegenüber nichtbestrahlten Tieren ist mit  $P < 0,001$  hochsignifikant (Vierfeldertest mit Yatescher Korrektur bei kleinen Häufigkeiten).

Tabelle 3. Histologische Befunde an der Leber bei geschützten und ungeschützten Mäusen nach Scheinbestrahlung oder Leberlokalbestrahlung mit 5 Gy. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung hatten die Tiere ein Alter von 70 bis 77 Tagen. (LZ-Ca = Leberzell-Karzinom)

Bestrahlung	Schutzsubstanz	Anzahl Tiere	Alter der Tiere in d	Histologischer Befund
-	—	7	749	Atrophie d. Leber, 100 % Kernpolymorphie mäßigen Grades 1 noduläre Hyperplasie
-	Cystamin	3	750	100 % Kernpolymorphie mäßigen Grades
+	—	2	749	Kernpolymorphie ausgeprägt 1 noduläre Hyperplasie, 1 mixed LZ-Ca
+	Cystamin	5	609/821	Kernpolymorphie 100 %, 3 noduläre Hyperplasien, 3 LZ-Ca
-	—	5	719	Atrophie d. Leber, 100 % Kernpolymorphie
-	WR 638	4	720	100 % Kernpolymorphie, 3 noduläre Hyperplasien
+	—	5	719	100 % Kernpolymorphie, 5 noduläre Hyperplasien, 2 Adenome, 2 LZ-Ca, 1 mixed LZ-Ca 1 Hämangio-Endotheliom + Hämangio-Endotheliosarkom
+	WR 638	2	719	1 noduläre Hyperplasie 1 Hämangio-Endotheliom + Hämangio-Endotheliosarkom
-	—	3	736	Atrophie d. Leber, 100 % Kernpolymorphie
-	WR 2721	2	729	Atrophie d. Leber, 100 % Kernpolymorphie
+	—	5	736/777	100 % Kernpolymorphie, 4 noduläre Hyperplasien, 1 LZ-Ca, 1 mixed LZ-Ca, 1 Kupferzell-Sarkom, 1 Hämangio-Endotheliom
+	WR 2721	1	736	Kernpolymorphie, noduläre Hyperplasie + Adenom

Bei den bestrahlten Tieren mit Schutzsubstanzen kamen nur 8 Tiere zur Untersuchung. Bei allen Tieren wurden Tumoren und noduläre Hyperplasien im Leberbereich gefunden. Demgegenüber wurden 12 bestrahlte Tiere ohne Strahlenschutzsubstanzen untersucht. In diesen Gruppen wiesen ebenfalls alle Tiere Lebertumoren oder noduläre Hyperplasien auf. Trotz der geringen Fallzahlen kann geschlossen werden, daß die verwendeten Schutzsubstanzen strahlenbedingte Spätschäden nicht verhindern.

### *Ganzkörperbestrahlungen*

In Tabelle 4 sind histologische Befunde nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy in Abhängigkeit vom Alter der Tiere zusammengestellt.

Tabelle 4. Histologische Untersuchungen Befunde an der Leber von Mäusen zu verschiedenen Zeiten nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy. Ein Teil der Tiere erhielt vor der Bestrahlung Cystamin. Den Vergleichstieren wurde physiol. NaCl-Lösung i.p. injiziert. Das Alter der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Bestrahlung 70 Tage.

Cystamin	Anzahl Tiere	Alter der Tiere in d	Histologische Befunde
—	3	199	Kernpolymorphie: 3, Sternzellaktivierung: 3 noduläre Hyperplasie: 2
—	6	240	Kernpolymorphie: 6, Sternzellaktivierung: 4 Hämangioendotheliom: 1, noduläre Hyperplasie: 3 Cholangiom: 2
—	1	479	noduläre Hyperplasie
—	1	567	noduläre Hyperplasie, Cholangiom
—	3	569	Kernpolymorphie: 3, Sternzellaktivierung: 3 noduläre Hyperplasie: 2, hepatozelluläres Karzinom: 1 Kupfferzellsarkom: 1
+	3	199	Kernpolymorphie: 3, noduläre Hyperplasie: 2
+	6	240	Kernpolymorphie: 6, Sternzellaktivierung: 4, noduläre Hyperplasie: 4, Adenom: 1, hepatozellul. Karzinom: 3, hepatozellul. Karzinom mixed Typ: 1, Hämangioendotheliosarkom: 1
+	1	479	noduläre Hyperplasie: 1, hepatozell. Karzinom: 1, Adenom: 1
+	2	568	noduläre Hyperplasie: 2, hepatozelluläres Karzinom mixed Typ: 1
+	2	569	noduläre Hyperplasie: 1, hepatozelluläres Karzinom: 1 Kupfferzellsarkom: 1

Eine Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy führt bei dem von uns verwendeten Mäusestamm zu keinen akuten Todesfällen in den ersten 30 Tagen nach Bestrahlung (LD 0/30 d). Die Daten der Tabelle zeigen, daß sich bereits 130 Tage nach der Bestrahlung, d. h. in einem Alter von ca. 200 Tagen Präkanzerosen in Form von nodulären Hyperplasien entwickeln. Karzinome konnten 170 Tage nach der Strahlenexposition (Alter der Tiere 240 Tage) beobachtet werden. Demnach führt die Bestrahlung zu einer erheblich früheren Entwicklung von Tumoren verglichen mit dem Auftreten von Tumoren bei unbestrahlten Tieren (s. Tabelle 2). Die Ergebnisse der Tabelle 4 belegen ferner, daß die Schutzsubstanz Cystamin die strahlenbedingte Tumorentwicklung nicht verhindern kann. Man kann bei einem Vergleich der Befunde zwischen „geschützten“ und „ungeschützten“ Gruppen sogar zu der Auffassung gelangen, daß die Gabe von Cystamin vor der Bestrahlung die Entwicklung von Tumoren beschleunigt, da sich in der Cystamin-Gruppe 7 Karzinome und 10 noduläre Hyperplasien befinden, während in der Vergleichsgruppe 1 Karzinom und 9 noduläre Hyperplasien zu finden waren. Jedoch läßt sich dieser Unterschied wegen der kleinen Tierzahlen statistisch nicht sichern.

In Tabelle 5 sind Ergebnisse nach Ganzkörperbestrahlungen mit Dosen zwischen 6,4 und 8,4 Gy zusammengestellt. Als Strahlenschutzsubstanzen wurden Dextranskonjugate mit WR 2721 verwendet. Die LD 50/30 d für die Kontrolltiere lag bei 6,8 Gy. Der Dosisreduktionsfaktor für das Dextranskonjugat-Amin betrug  $1,10 \pm 0,03$ , wodurch sich die LD 50/30 d auf 7,5 Gy erhöhte. Beim Dextranskonjugat/Schiffsche Base ergab sich ein Dosisreduktionsfaktor von  $1,14 \pm 0,04$ , was zu einer LD 50/30 d der so behandelten Tiere von 7,75 Gy führte (Mönig et al., 1990).

Bei einigen mit Dextranskonjugaten behandelten Mäusen wurden 200 bis 600 Tage nach einer Bestrahlung mit 6,9 bis 8,4 Gy histopathologische Untersuchungen der Leber durchgeführt. Zum Vergleich dienten nicht geschützte Tiere, die Strahlendosen mit 6,4 bis 6,8 Gy erhielten. Wie die Ergebnisse zeigen, waren strahlenbedingte maligne Tumoren erst oberhalb von etwa 490 Tagen nach Bestrahlung (Alter der Tiere > 560 Tage) beobachtbar. Ob das Fehlen von präkanzerösen Veränderungen oder von Tumoren in der Gruppe der mit DEX-WR-Amine behandelten Tiere 410 bis 498 Tage nach der Bestrahlung (Alter der Tiere 480 bis 568 Tage) auf eine Wirkung des Polymerkonjugats zurückzuführen ist, läßt sich wegen der geringen Zahl der Tiere statistisch nicht absichern.

Tabelle 5. Histopathologische Befunde der Leber nach Ganzkörperbestrahlung von männlichen Mäusen, die vor der Bestrahlung Dextran-konjugate mit dem Thiophosphat WR 2721 erhielten. Zum Vergleich dienten Tiere, denen vor der Bestrahlung Phosphatpuffer, das Lösungsmittel für die Dextranskonjugate, injiziert wurde. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung betrug das Alter der Tiere 70 Tage. (LZ-Ca = Leberzell-Karzinom).

Substanz	Dosis (Gy)	Anzahl Tiere	Alter der Tiere in d	Befund
Phosphat-Puffer (Kontrollgruppe)	6,4		312	<b>Alle</b> Tiere Kernpolymorphie; Kernvakuolen; verstärkte mitot. Aktivität; Sternzellaktivierung; Glykogenverarmung; Zytoplasmahomogenisierung; 2 Tiere noduläre Hyperplasien
	6,8		487	Kernpolymorphie; Kern- + Zytoplasmavakuolen; herdförmige Nekrosen; noduläre Hyperplasie
	6,8		563-652	Noduläre Hyperplasien 100 %; 1 Adenom; 3 trabekuläre LZ-Ca; 1 Hämangiom; 2 prim. Leber-Ca mixed Typ; 1 Kupfferzellsarkom
			713-734	Noduläre Hyperplasien 100 %; 2 Adenome; 2 trabekuläre LZ-Ca
DEX-WR-Amin	6,9		480-568	3 noduläre Hyperplasien; 1 Peliosis hepat.; <b>keine</b> Adenome oder Karzinome
	7,3-7,9		272-312	Alle Tiere Kernpolymorphie; <b>Alle</b> Tiere Sternzellaktiv.; 2 noduläre Hyperplasien; <b>keine</b> Adenome oder Karzinome
DEX-WR-Base	7,3	1	679	Leberzelladenom + LZ-Ca
	8,4	1	263	Kernpolymorphie; Sinusektasien; Sternzellaktiv.

In der Tabelle 6 sind histologische Befunde von drei Tieren nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 15 Gy zusammengestellt. Die Tiere waren vor der Bestrahlung mit dem Thiophosphat WR 2721 behandelt worden. Bei der Ganzkörperbestrahlung mit der hohen Dosis von 15 Gy konnten die Tiere nur durch die Schutzsubstanz WR 2721 überleben. Deswegen fehlen bestrahlte Vergleichstiere ohne Schutzsubstanz. Die Befunde in Tabelle 6 zeigen, daß sich die Lebertumoren wie bei der Ganzkörper-

bestrahlung mit 2,5 Gy bereits unterhalb einem Lebensalter von 700 Tagen entwickelt haben.

Tabelle 6. Histologische Befunde an der Leber von Mäusen, die vor einer Ganzkörperbestrahlung mit 15 Gy das Thiophosphat WR 2721 erhielten. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung betrug das Alter der Tiere 70 Tage.

Schutzsubstanz	Alter der Tiere in d	Anzahl Tiere	Histologischer Befund
WR 2721	446	1 Tier	hepatozelluläres Karzinom
WR 2721	528	1 Tier	hepatozelluläres Karzinom
WR 2721	635	1 Tier	Adenom

Man vergleiche dieses Ergebnis mit den Daten bei unbestrahlten Tieren aus Tabelle 2. Auch aus diesem Versuch ist zu erkennen, daß kein Schutz vor der Entwicklung von strahlenbedingten Tumoren durch die Substanz WR 2721 hervorgerufen wird.

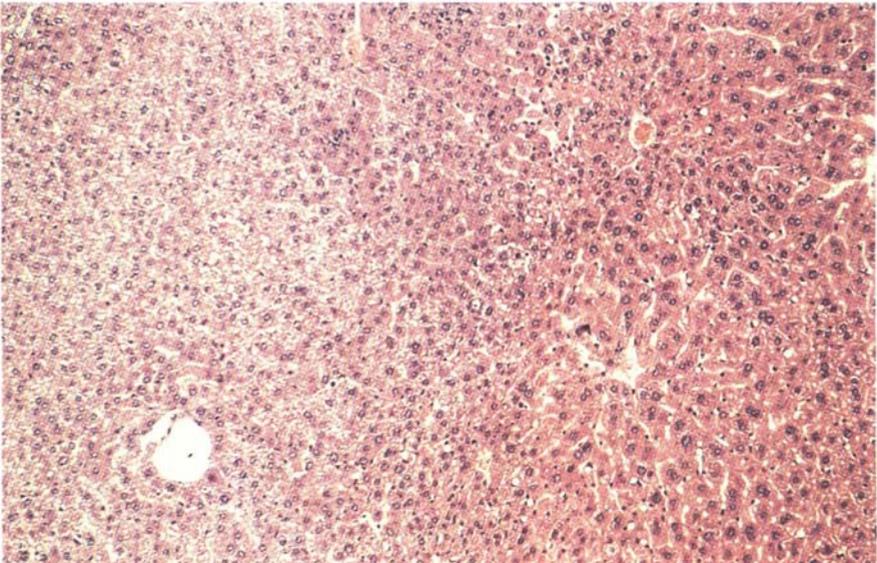
### *Histologie*

#### Feingewebliche Veränderungen des Leberparenchyms mit zunehmendem Lebensalter und nach Bestrahlung

Das glykogenreiche Leberparenchym der jungen Maus zeigt eine relativ geringfügige Kernpolymorphie. Im wesentlichen herrschen zwei Kerngrößenklassen vor, nämlich Kerne mit diploidem und Kerne mit tetraploidem Chromosomensatz, wobei letztere das doppelte Kernvolumen gegenüber diploiden Zellkernen aufweisen. Mit zunehmendem Alter der Tiere, vor allem jenseits des zweiten Lebensjahres, kommt es zu einer Verschiebung der Kerngrößenklassen in Richtung tetraploider Zellkerne und gleichzeitig zu einer geringgradigen Abnahme des Glykogenreichtums der Leberzelle. Selten beobachtet man in diesem Lebensalter auch großkernige Leberzellen, bei denen sehr wahrscheinlich oktaploide Chromosomensätze auftreten.

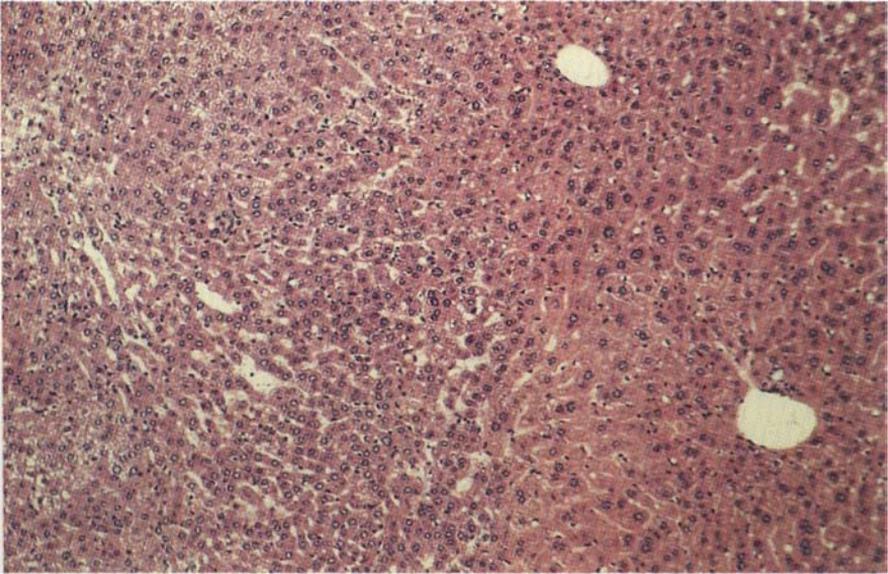
Ganz ähnlich stellen sich auch die feingeweblichen Lebergewebsveränderungen nach Bestrahlung dar. Der auffallendste Befund ist eine drastische Glykogenverarmung des Lebergewebes zwei bis vier Tage nach Leberlokal- oder Ganzkörperbestrahlung mit den von uns gewählten Strahlendosen (s. auch Lesch, 1976). Erst zu einem späteren Versuchszeitpunkt, aber weit früher als dies bei unbestrahlten Mäusen der Fall

ist, entwickelt sich eine ausgeprägte Kernpolymorphie, die bereits bei vergleichenden Untersuchungen ein Jahr nach Bestrahlung deutlich wird. Gleichzeitig findet man dabei Kernanomalien wie Kernvakuolisierungen, Veränderungen des typischen Chromatingerüsts der Leberzellkerne und im Zytoplasma bei einem zunehmenden Glykogenverlust, Homogenisierungen des Zytoplasmas mit zum Teil ausgeprägten Einlagerungen homogenen eiweißreichen Materials (Abb. 5 b, s. S. 25/26). Bei den nachweisbaren Mitosefiguren beobachtet man in zunehmendem Maße atypische Konfigurationen mit Chromosomenabsprengungen und -Verklumpungen. Es handelt sich dabei also um Veränderungen des Kerns und Zytoplasmas der Leberzelle, die zwar denen alternder Tiere ähnlich sind, aber eine weit stärkere Ausprägung aufweisen. Zu Versuchszeiten jenseits des 400. bis 500. Tages nach Bestrahlung kommt es zu einer weiteren Veränderung im Leberparenchym, der mit Sicherheit eine Bedeutung für die Karzinomentstehung zuzumessen ist. Es handelt sich dabei um Herdbildungen meist kleinkerniger Leberzellen, die in dem umgebendem polymorphkernigen Leberparenchym besonders deutlich auffallen und die außerdem vereinzelt eine vermehrte Glykogenbeladung im eher glykogenarmen Lebergewebe aufweisen (Abb. 3 a



**Abb. 3. a und b.: Noduläre Hyperplasien des Lebergewebes bei Mäusen 242 Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit 6,4 Gy.**

**a) Glykogenreiche noduläre Hyperplasie (linke Bildhälfte) mit relativ gleichmäßig kleinen Zellkernen und einem vakuolär aufgelockertem Zytoplasma nach Herauslösen des Glykogens bei der Gewebseinbettung. Ausgeprägte Kernpolymorphie im benachbarten Lebergewebe (rechte Bildhälfte). HE-Färbung, Vergrößerung 60 x.**



**b) Noduläre Hyperplasie mit glykogenarmen, basophilen Leberzellen (linke Bildhälfte) mit relativ kleinen Zellkernen, die sich gut gegen das in der Umgebung liegende Lebergewebe mit deutlicher Kernpolymorphie abgrenzen lassen. HE-Färbung, Vergrößerung 60X.**

und b). Diese teils glykogenreichen, teils aber auch glykogenarmen kleinkernigen Leberzellherde, von bestimmten Autoren als „neoplastic nodules“ bezeichnet, wurden auch bei der radiogenen Leberkarzinogenese in der Ratte beschrieben (Oehlert, 1978). In diesen „neoplastic nodules“, von uns entweder als glykogenreiche oder glykogenarme kleinkernige knotige Leberzellhyperplasien beschrieben, ist die für die Leber charakteristische Architektur mit Ausbildung von Leberzellplatten zwischen Lebersinusoiden zwar verwaschen, aber bei Silberfärbung noch deutlich erkennbar. Es ist also nicht gerechtfertigt, hier bereits von Adenomen oder gar beginnenden Karzinomen zu sprechen. In praktisch allen bestrahlten Tieren konnten derartige Knötchenbildungen beobachtet werden, auch in solchen, in denen an anderer Stelle bereits voll ausgebildete hepatozelluläre Karzinome entwickelt waren.

In allen Lebern bestrahlter Mäuse, in denen derartige noduläre hyperplastische Herde nachgewiesen wurden, konnten gleichzeitig auch schwere zytoplasmatische und Kernveränderungen am übrigen Parenchym beobachtet werden. Vereinzelt waren an anderer Stelle bereits Adenome oder gar hepatozelluläre Karzinome entwickelt.

Eine andere herdförmige Veränderung des Leberparenchyms ist das Leberzelladenom, das sich von den hyperplastischen Knoten dadurch

unterscheidet, daß die typische Läppchenarchitektur verloren gegangen ist und meist durch unregelmäßig nebeneinander angeordnete, trabekuläre Leberzellstränge ersetzt wird, zwischen denen entweder keine oder aber deformierte Sinusoide liegen. Gleichzeitig findet man in diesen Adenomen eine vermehrte zytoplasmatische Basophilie, eine Kernpolymorphie und meist auch eine vergrößerte mitotische Aktivität. Am auffallendsten bei diesen Adenomen ist jedoch das expansive Wachstum, das sich in der Druckatrophie des umgebenen erhaltenen Lebergewebes äußert (Abb. 3 c).

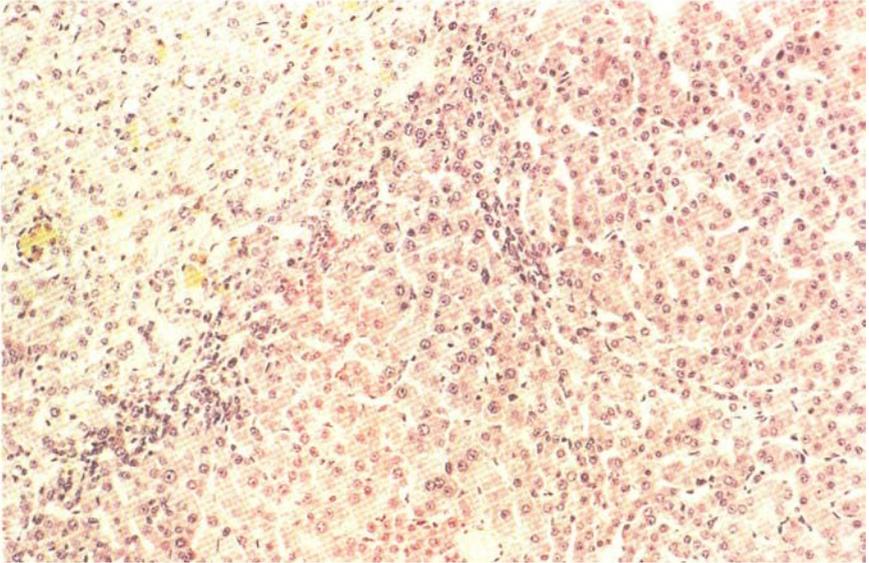


Abb. 3 c: Leberzelladenom 649 Tage nach Teilkörperbestrahlung mit 5 Gy.

Die rechte Bildseite wird von trabekulär angeordneten Zellsträngen eingenommen, zwischen denen unregelmäßig angeordnete und ungleichmäßig weitgestellte Bluträume liegen. Am linken Bildrand ist noch ein schmaler Saum erhaltenes Lebergewebe erkennbar. HE-Färbung, Vergrößerung 60 x.

In praktisch allen Tieren, bei denen ein voll ausgebildetes hepatozelluläres Karzinom bestand, konnten in der gleichen Leber in anderer Lokalisation Adenome von unterschiedlicher Größe beobachtet werden. Dennoch läßt sich daraus nicht die sichere Annahme ableiten, daß die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms bei der Maus nach Bestrahlung ausschließlich über das Stadium des Adenoms verläuft.

Bei den voll ausgebildeten hepatozellulären Karzinomen, die wir in unseren Versuchen beobachten konnten, handelt es sich ausschließlich um tubuläre bzw. trabekuläre Karzinome, wie sie auch nicht selten beim

Menschen beschrieben werden. Auffallend dabei sind die hyperplastischen Leberzellen, die zu unregelmäßigen Strängen bzw. zu azinären Gebilden beisammen liegen und in denen eine ausgeprägte Kernpolymorphie nachweisbar ist. Das Zytoplasma zeigt verschiedene Veränderungen, wobei vor allem Zytoplasmahomogenisierungen auffallen. Die Produktion von Gallepigment ist nicht selten und man findet dabei azinär zusammenliegende Tumorzellen mit zentralen Koazervaten von Gallepigment. Fast immer sind die trabekulären Verbände der Tumorzellen voneinander durch stark ausgedehnte, zum Teil sackförmige, meist mit Erythrozyten gefüllte Sinusoide getrennt (Abb. 4 a und b). Bei

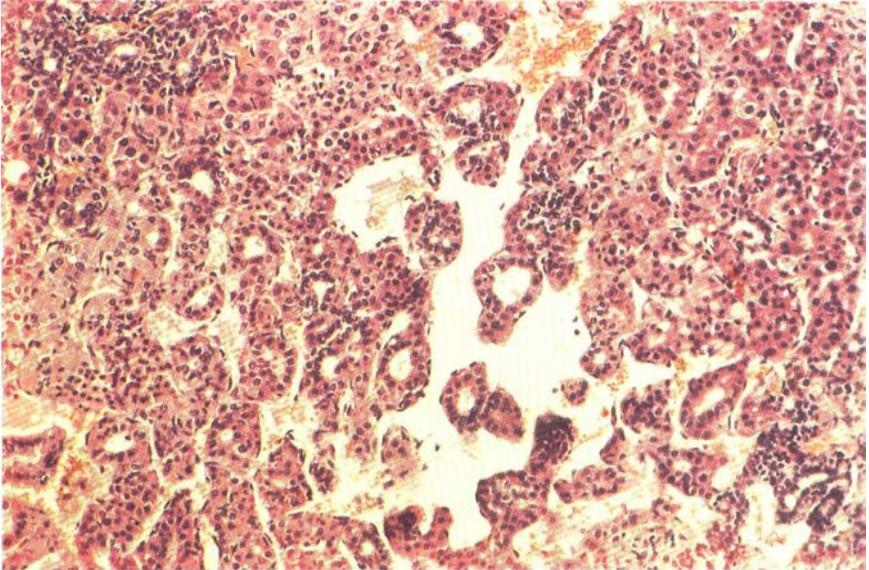
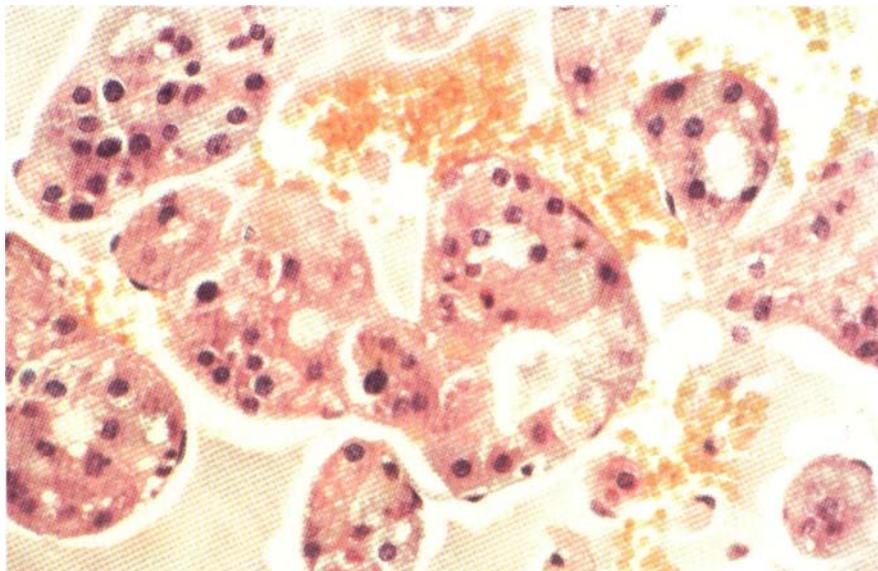


Abb. 4. Hapatocelluläres Karzinom 539 Tage nach Teilkörperbestrahlung mit 5 Gy nach Vorbehandlung mit Cystamin.

a) Teils trabekulär, teils azinär aufgebautes Leberzell-Karzinom mit den für diesen Tumor charakteristischen weiten Bluträumen. Die für die Leber charakteristische Architektur mit Leberzellplatten und dazwischen verlaufenden Sinusoiden ist vollständig verlorengegangen. Das hier gezeigte histologische Bild ist nicht von dem des hepatocellulären Karzinoms beim Menschen zu unterscheiden (s. rechte Abbildungshälfte). HE-Färbung, Vergrößerung 60 x..

denjenigen Tieren, die durch eine Blutung in die Bauchhöhle ad exitum gekommen waren, ließen sich unmittelbar subkapsulär gelegene Knoten hepatocellulärer Karzinome nachweisen mit derartigen sackförmig ausgedehnten Sinusoiden, welche durch die Faserkapsel hindurch in die Bauchhöhle perforiert waren.



b) Vergrößerter Ausschnitt aus dem in a) gezeigten Tumor. HE-Färbung, 86 x..

### Strahlenbedingte Leberveränderungen am Gallengangssystem

Bereits wenige Monate nach Bestrahlung kommen bei den zu diesem Zeitpunkt untersuchten Tieren auffallend stark verbreiterte Portalfelder zur Darstellung, in denen sich gewucherte Gallengänge mit einem dunkelkernigen Epithel nachweisen lassen (Abb. 5 a). Diese durch Gallengangswucherungen verbreiterten Portalfelder sind unscharf gegen das umgebende Parenchym begrenzt und man beobachtet dabei fingerartig in das benachbarte Lebergewebe hineinreichende sogenannte Gallengangswucherungen. Mit zunehmender Versuchsdauer steigt die Zahl derartiger adenomartiger Gallengangswucherungen, die auch in der menschlichen Pathologie als sogenannte Cholangiome zur Beobachtung kommen. Gleichzeitig findet man dabei eine zunehmende Basophilie der Gallengangsepithelien und verstärkte Proliferationstendenz. Eigenartigerweise gelang es in keinem Fall bei den von uns untersuchten Tieren Veränderungen nachzuweisen, die als cholangiäre oder cholangioläre Karzinome identifiziert werden konnten, sondern nur Leberzellkarzinome vom mixed Typ, bei denen neben hepatozellulären Strukturen, cholangiäre oder cholangioläre Strukturen nebeneinander bestehen (Abb. 5 a bis c).

### Veränderungen am Sternzellensystem

Bereits kurze Zeit nach einer Ganzkörper- oder Teilkörperbestrahlung mit Einschluß der Leber fällt eine Aktivierung des retikulo-endothelia-

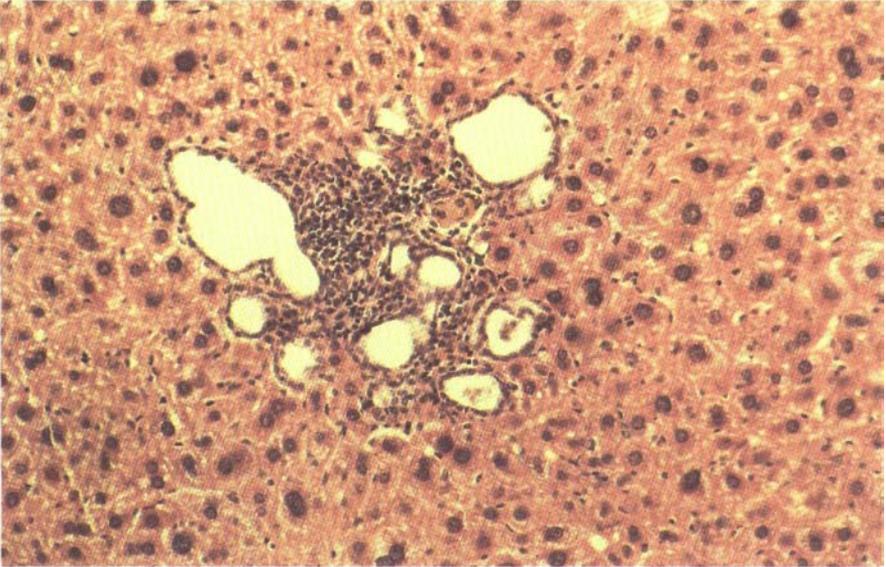


Abb. 5 a. Cholangiom der Mäuseleber 170 Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy. Neben der hier bereits sehr stark ausgeprägten Kernpolymorphie des Leberparenchyms findet sich ein glatt gegen das umgebende Gewebe begrenzter Herd, der sich aus unterschiedlich weit gestellten Gallengängen, Epithelproliferaten und Entzündungszellen zusammensetzt. Es handelt sich hier um ein sogenanntes Cholangiom, wie man es auch in der menschlichen Leber nach Bestrahlung oder als angeborene Fehlbildung beobachtet. HE-Färbung, Vergrößerung 68 x.

Abb. 5 b.: Cholangiofibromatose neben Anteilen eines hepatozellulären Karzinoms 499 Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy.

Links im Bild erhaltenes Lebergewebe mit vakuolären Zytoplasmaveränderungen. In der Bildmitte ausgeprägte Gallengangswucherungen, die in das trabekulär angeordnete, tumorös veränderte Lebergewebe einstrahlen. Am rechten äußeren Bildrand weitere Gallengangsproliferate. HE-Färbung, Vergrößerung 60 x.

(siehe S. 26)

Abb. 5 c: Leberkarzinom des gemischten Typs 666 Tage nach Teilkörperbestrahlung mit 5 Gy.

Am linken Bildrand Verbände eines cholangiären Karzinoms, der rechte Bildabschnitt wird von Anteilen eines z. T. trabekulären, z. T. alveolären hepatozellulären Karzinoms (vgl. mit Abb. 4 a und b) eingenommen. HE-Färbung, Vergrößerung 60 x.

(siehe S. 26)

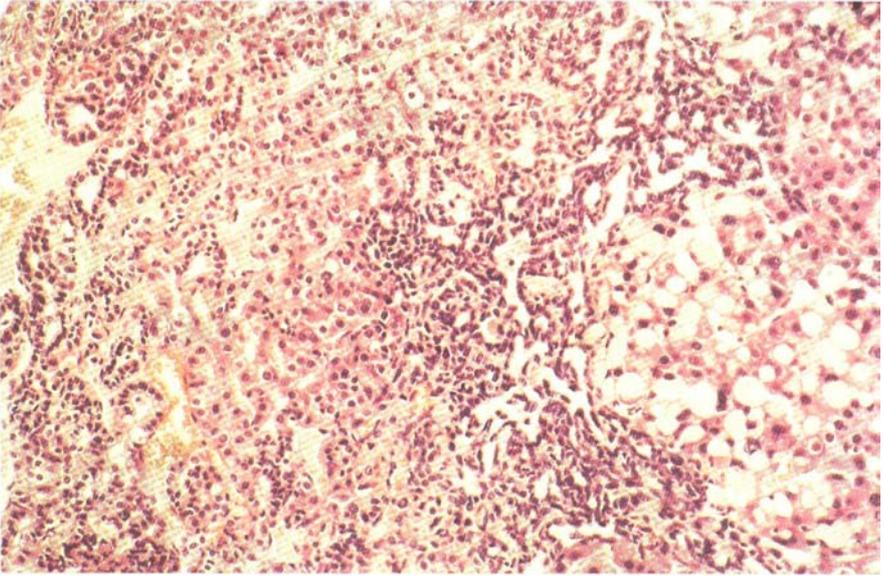


Abb. 5b

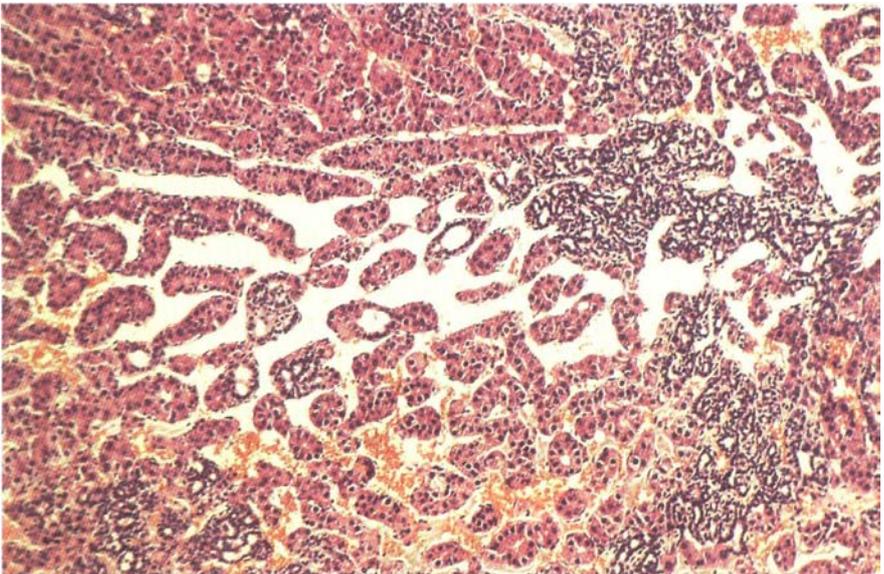


Abb. 5c

len Systems auf, die mit einer diffusen Sternzellvermehrung einhergeht. Es kommt dabei zu einer Zunahme der Zahl der Sternzellen, welche die unveränderten Lebersinusoide auskleiden, knopfartig in deren Lichtung hinein vorspringen und die sich auszeichnen durch ein dichtes Chromatingerüst in gegenüber der Norm vergrößerten Zellkernen. Diese Sternzellaktivierung bildet sich im allgemeinen mit zunehmendem Zeitraum nach der Bestrahlung zurück. Im Langzeitversuch konnten wir frühestens nach einem Versuchszeitraum von einem Jahr nach Bestrahlung eine erneute Aktivierung des Sternzellsystems beobachten, wobei unterschiedlich weitgestellte Lebersinusoide von stark vergrößerten Sternzellen tapetenförmig ausgekleidet werden. Letztere weisen eine deutliche Proliferationstendenz auf (Abb. 6 a). Zwischen

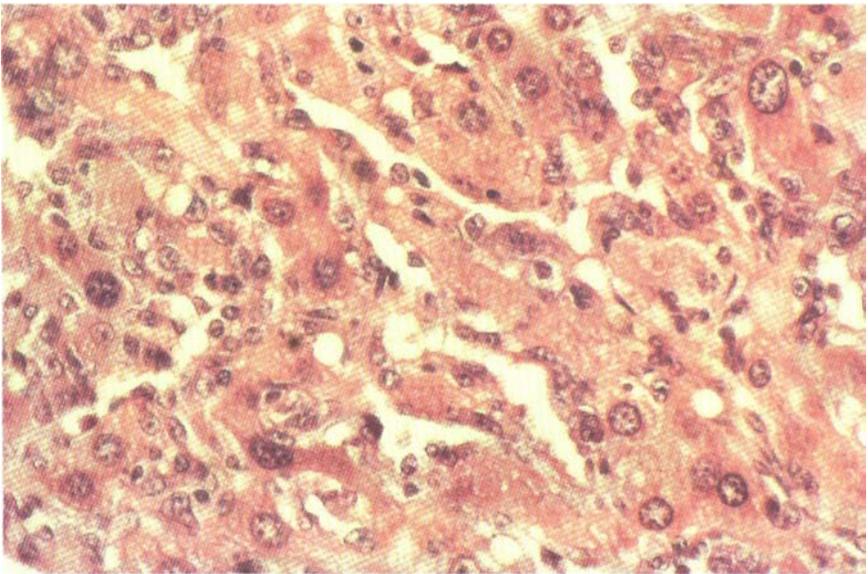


Abb. 6 a.: Beginnendes Sternzell-Sarkom (Kupfferzell-Sarkom) der Mäuseleber 649 Tage nach Teilkörperbestrahlung mit 5 Gy.

Prätumoröse Wucherung der Sternzellen mit tapetenartiger Auskleidung der Sinusoide durch großkernige Zellen, die zum Teil eine synzytiale Anordnung aufweisen. Im erhaltenen Lebergewebe massive Kernpolymorphie (linke untere Bildecke). HE-Färbung, Vergrößerung 90 x..

diesen gewucherten Sternzellen kommt es zu einer Verschmälerung der Leberzellplatten bis diese schließlich weitgehend druckatrophisch sind und nur noch breite Stränge atypisch gewuchelter Sternzellen das Bild beherrschen. Gleichzeitig entwickelt sich eine perisinusoidale Fibrose in den zelldichten Wandungen der unregelmäßig weitgestellten, zum Teil auch dilatierten Sinusoide. Diese Veränderungen gleichen in ihrem

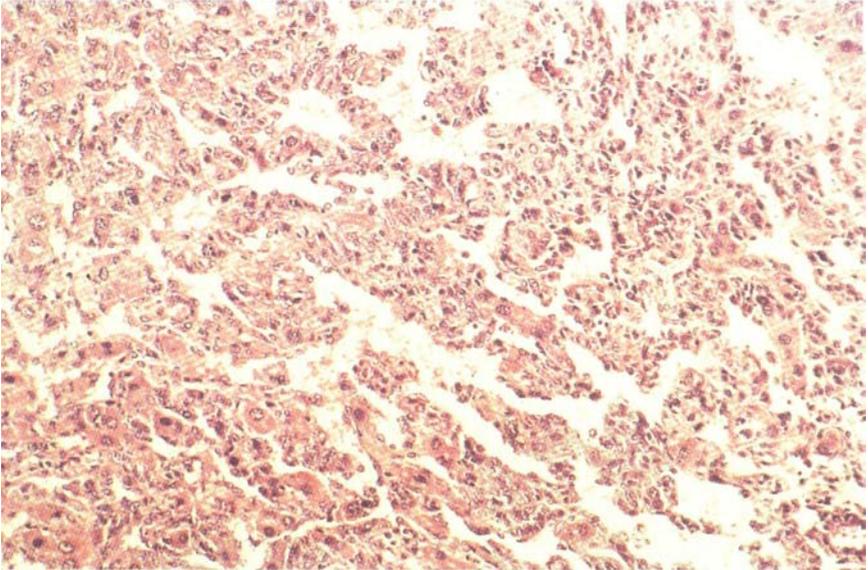


Abb. 6b.: Voll ausgebildetes Sternzell-Sarkom der Mäuseleber 666 Tage nach Teilkörperbestrahlung mit 5 Gy.

Unterschiedlich weit gesteuerte Bluträume werden von Zellverbänden atypisch konfigurierter, meist spindelnförmiger Zellen umgeben. Nur ganz selten findet man noch erhaltene Leberzellen. Das gezeigte histologische Bild gleicht weitgehend demjenigen des Sternzell-Sarkoms beim Menschen nach Vinylchlorid-Exposition. HE-Färbung, Vergrößerung 60 X.

feingeweblichen Bild (Abb. 6 b) denjenigen, die bei Arbeitern beobachtet wurden, die Vinylchlorid ausgesetzt waren und ähneln ebenfalls denen, die man nach Thorotrastexposition und Vergiftung mit arsenhaltigen Substanzen beobachtet hat (Patrick und McGee, 1980). Neben diesen recht eigentümlichen Bildern, hervorgerufen durch eine massive Proliferation der Sinusendothelien, lassen sich dann Gewebformationen erkennen, die in ihrem histologischen Aufbau dem Bild eines Angiosarkoms entsprechen (Abb. 6 c). Auch diese Entwicklung ist aus der menschlichen Pathologie bekannt als Folge einer Thorotrastexposition und nach Applikation arsenhaltiger Mittel sowie bei Arbeitern, die mit Vinylchlorid über längere Zeit zu tun hatten.

### Strahlenbedingte Veränderungen im Bereich der Sinusoide

Eine der frühesten durch Bestrahlung ausgelösten Gewebsveränderungen in der Leber, aber auch in anderen Organsystemen, sind Schädigungen am Kapillargefäßsystem. In der Leber kommt es dabei zu herdför-

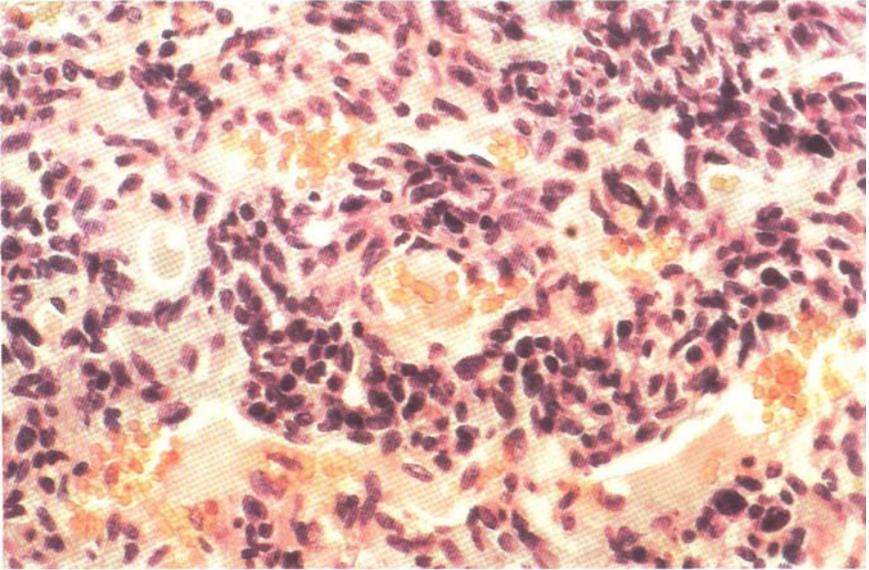


Abb. 6c: Histologisches Bild aus anderer Stelle des in Abb. 6 a gezeigten Tumors. Hier findet man spindelkernige Zellelemente ohne bestimmte Anordnung zwischen unterschiedlich weitgestellten Bluträumen. Bei dieser Vergrößerung ist eine Unterscheidung von einem Angiosarkom nicht möglich. HE-Färbung, Vergrößerung 90 x.

mig verteilten Sinusektasien, bevorzugt im Bereich der Zentralvenen (Abb. 7 a), wobei bei stärkerer Dosierung auch Thrombosierungen, vor allem der Zentralvenen, zum Beispiel bei der Ratte, beobachtet werden (Oehlert, 1978). Beim Patienten wurden derartige Veränderungen nach Leberlokalbestrahlung ebenfalls beobachtet (Kaplan und Bagshaw, 1968). In unseren Versuchen konnten wir dementsprechend bereits Monate nach einmaliger Leberlokal- oder Ganzkörperbestrahlung derartige Bezirke mit ektatischen Sinusoiden und dazwischen liegenden komprimierten Leberzellplatten so häufig nachweisen, daß diese Veränderung nicht in die Tabellen aufgenommen wurde. Zu anderen Versuchszeiten, zum Beispiel nach einem Jahr, hatte sich die Zahl derartiger ektatischer Bezirke reduziert. Demgegenüber konnten aber größere Areale beobachtet werden, in denen nicht nur Ektasien der Lebersinusoide aufgefunden wurden, die mit Erythrozyten angefüllt waren, sondern gleichzeitig eine vermehrte Zellproliferation von Sinusendothelien in der Auskleidung der ektatischen Bluträume, die mit einer Druckatrophie der hier vorher vorhandenen Leberzellen einherging (Abb. 7b). Es kam dann zur Ausbildung größerer Bluträume, die durchzogen wurden von Bindegewebssträngen, in denen sich atypische Zellelemente nachweisen ließen, wobei es gleichzeitig zur Ablagerung von Eisenpigment

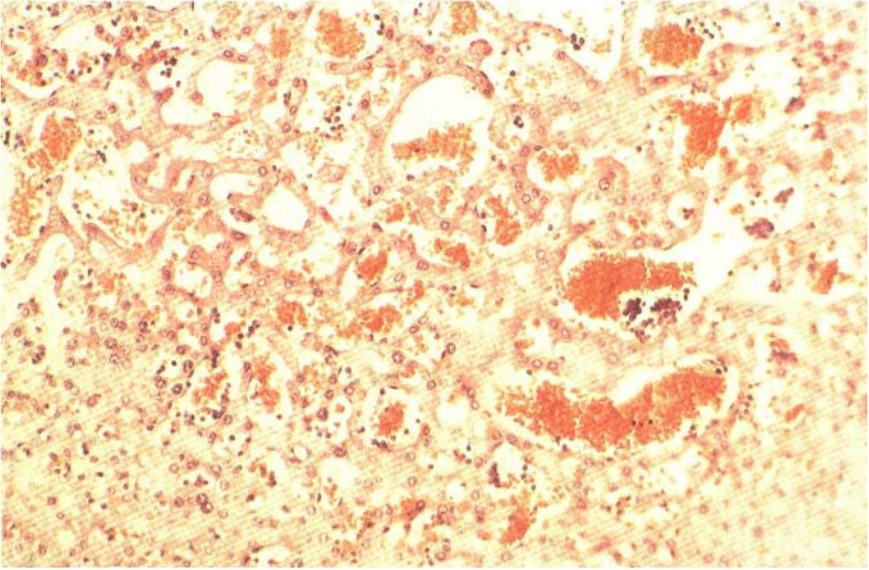


Abb. 7a.: Peliosis hepatis 129 Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy und Vorbehandlung mit Cystamin.

Sackförmige Ausweitung der Sinusoide, zwischen denen druckatrophische Leberzellplatten liegen. Das Bild entspricht den nach Bestrahlung auch beim Menschen auftretenden Kapillarektasien. Sie wurden in vielen Versuchstieren gefunden. HE-Färbung, Vergrößerung 60 x.

Abb. 7b.: Hämangioendotheliom der Leber 170 Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy.

Beim Vergleich mit Abb. 7a fällt hier eine Proliferation der Endothelzellen auf, welche perlschnurartig die unregelmäßig ausgeweiteten Bluträume auskleiden. Nur vereinzelt findet man innerhalb der zeldichten Wandungen der Bluträume einzelne Leberzellen. HE-Färbung, Vergrößerung 60 x.

(siehe S. 31)

Abb. 7c: Hämangioendotheliosarkom der Leber 170 Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy und Vorbehandlung mit Cystamin.

Unregelmäßig weit gestellte Bluträume werden von breiten Verbänden atypischer, spindelkerniger Zellen umschlossen. Im Gegensatz zum Hämangioendotheliom in Abb. 7 b steht hier die Proliferation atypischer Zellen im Vordergrund. HE-Färbung, Vergrößerung 60 x.

(siehe S. 31)

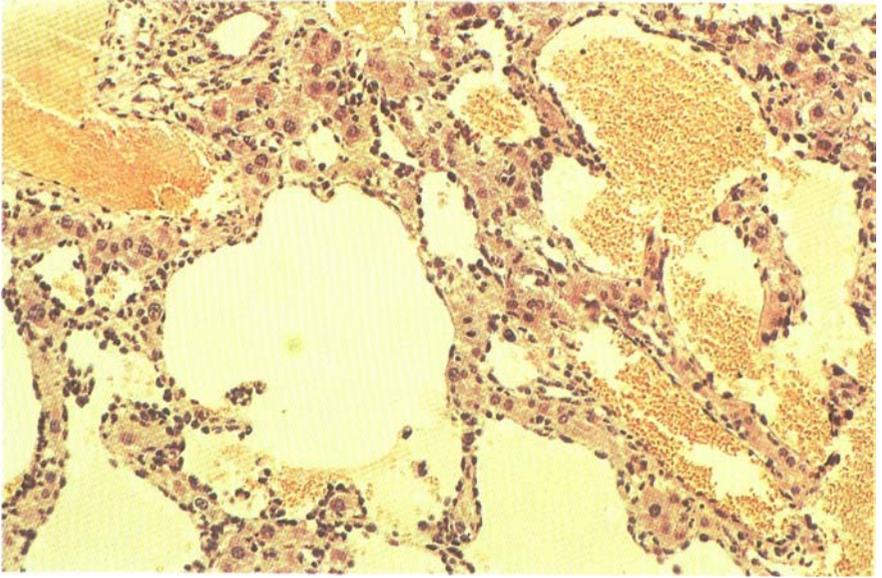


Abb. 7b.

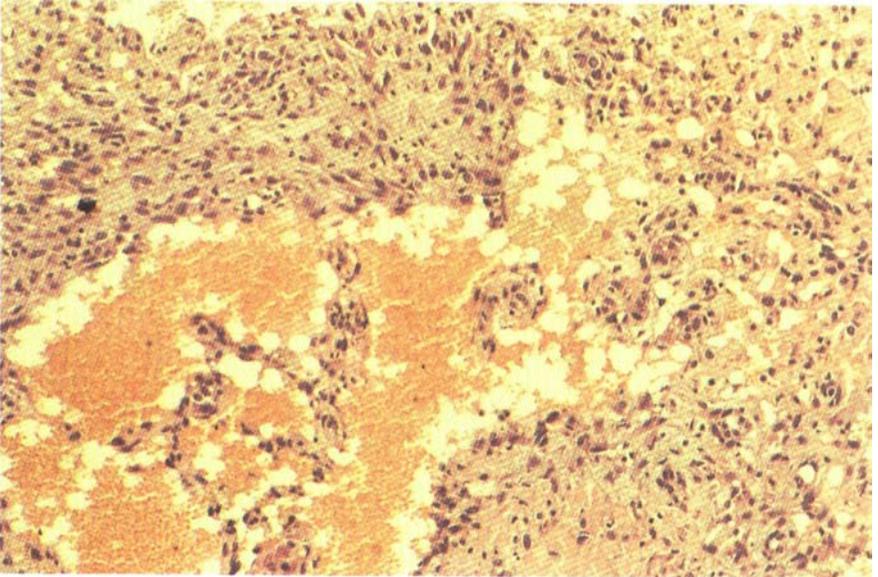


Abb. 7c.

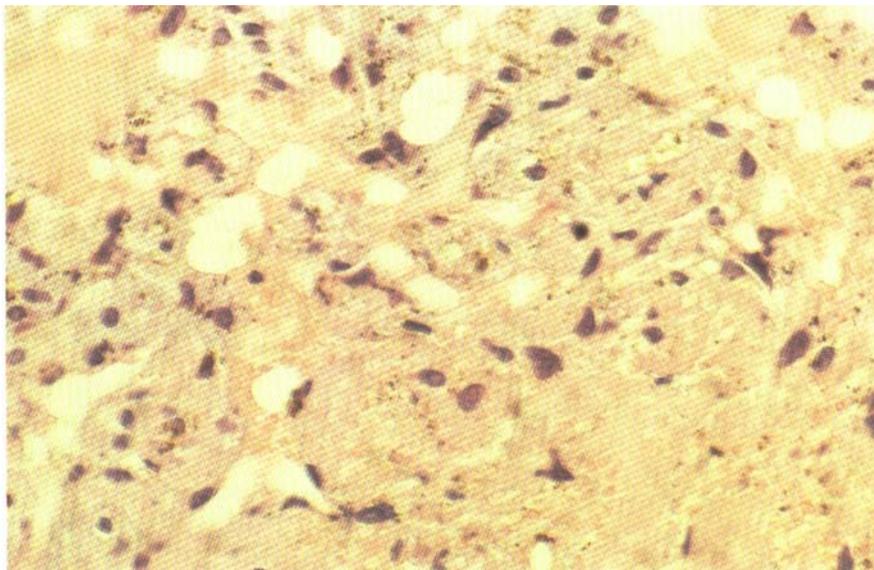


Abb. 7d.: Stärkere Vergrößerung aus dem in Abb. 7c gezeigten Tumor. Neben atypischen spindelkernigen Zellelementen, Blutungen und Nekrosen erkennt man die für das Hämangioendotheliosarkom charakteristischen Eisenspeicherungen und Eisenablagerungen im Tumorgewebe. HE-Färbung, Vergrößerung 90 x.

kam und schließlich auch vereinzelt extramedulläre Blutbildungsherde beobachtet werden konnten. Bei den längsten Versuchszeiten waren dann bereits makroskopisch große Teile der Leber einnehmende blutgefüllte Bezirke und Knoten beobachtbar, aus denen nicht selten auch intraperitoneale Blutungen erfolgt waren, die sich im histologischen Bild teils als kavernöse, teils als solide Areale zu erkennen gaben, wobei in den soliden Bezirken eine massive Proliferation atypischer Zellelemente bestand. Vom histologischen Bild her handelte es sich dabei zum Teil um Hämangioendotheliome, zum anderen aber um Hämangioendotheliosarkome, wie sie auch in der menschlichen Pathologie zur Beobachtung kommen (Abb. 7 c und d). Sowohl die bereits beschriebenen Kupferzellsarkome als auch die Hämangioendotheliosarkome beobachtet man bei Kindern als angeborene Tumoren, bei Erwachsenen als exogen bedingte Tumoren nach Exposition von Vinylchlorid, bei Thorotrastosen und bei Applikation arsenhaltiger Substanzen (Patrick und McGee, 1980).

## Strahlenbedingte Veränderungen in anderen Organen und Geweben

Die nach Plan abgetöteten Tiere und die spontan verstorbenen Tiere wurden, soweit es der Erhaltungszustand erlaubte, seziiert und die dabei entnommenen Organe (s. Material und Methoden, S. 11) histologisch untersucht. In erster Linie wurden, unserer Fragestellung entsprechend, die an der Leber beobachteten degenerativen und tumorösen Veränderungen untersucht und registriert. Bei den an den übrigen Organen gefundenen und durch Bestrahlung ausgelösten Spätschäden handelte es sich vor allem um partielle oder diffuse Lungenfibrosen, die in vielen Fällen den Tod im Versagen des rechten Herzens herbeigeführt hatten. Im übrigen wurden jedoch auch Leukämien und Tumoren des Magens und des Pankreas beobachtet. Bronchialkarzinome wurden dagegen in keinem der untersuchten Tiere gefunden.

## Diskussion

Unter Berücksichtigung der erhaltenen und hier beschriebenen Ergebnisse unserer Versuche an insgesamt 209 Mäusen mit einem maximalen Lebensalter von 900 Tagen kann man zunächst einmal feststellen, daß auch bei den nicht behandelten bzw. nicht bestrahlten Versuchstieren, d.h. bei den Kontrollen, altersbedingte Veränderungen in den Organen und vor allem in der Leber auftreten, die früher bereits von Cottier (1961) beschrieben wurden und die in ihrem histologischen Bild mit zunehmendem Lebensalter auch bestimmten präkanzerösen Leberzellveränderungen entsprechen. So beobachtet man z. B. mit zunehmendem Lebensalter eine Kernpolymorphie, z. T. mit Ausbildung chromatindichter Riesenerne, selten auch sogenannte Gallengangswucherungen, von den Portalfeldern ausgehend, und vereinzelt noduläre Regenerationsherde, wie wir sie auch aus den Ergebnissen anderer Untersucher als Vorläufer des Leberkrebses kennen (Mirsalis und Steinmetz, 1990). Außerdem konnten wir in einigen Tieren (s. Tabelle 2) primäre hepatozelluläre Karzinome nachweisen, die sich in ihrem histologischen Bild nicht von denen unterscheiden, die bei bestrahlten Tieren gehäuft nachgewiesen wurden. Die spontane Tumorentwicklung bei dem von uns verwendeten Heiligenberg-Stamm läßt die Vermutung zu, daß bei diesen Tieren mit der spontanen Entwicklung von primären Lebertumoren in einem allerdings geringgradigen Prozentsatz und bei Erreichen eines hohen Lebensalters zu rechnen ist.

Legt man die Art und den feingeweblichen Aufbau der von uns beobachteten primären Lebertumoren zugrunde, so kann festgestellt werden, daß es sich hierbei um Tumoren handelt, die in gleicherweise auch beim Menschen als primäre Lebertumoren beobachtet werden. Sowohl das

hepatozelluläre Karzinom und der Mischtyp des primären Leberkarzinoms mit hepatozellulären und cholangiären Anteilen als auch die vom Gefäßendothel und den Sternzellen ausgehenden Tumoren, wie Hämangioendotheliome und Hämangioendotheliosarkome, sowie die beim Menschen allerdings relativ seltenen Sternzell- oder Kupfferzell-Sarkome, die allerdings bei fortschreitendem Wachstum nicht mehr von Angiosarkomen zu unterscheiden sind, werden beim Menschen als Folgezustände der chronischen Virushepatitis B, aber auch als Folge exogener Schäden, wie z. B. der Thorotrasteinwirkung, der berufsbedingten Einwirkung von Vinylchlorid und nach chronischer Schädigung durch arsenhaltige Substanzen beobachtet (Patrick und McGee, 1980). Ein Vergleich der Letalitätsraten durch Bildung von Angiosarkomen der Leber nach berufsbedingter Einwirkung von Vinylchlorid und nach intravenöser Gabe von Thorotrast (Thoriumdioxid) findet sich im NCRP Report No. 96 (1989). Weitgehende Übereinstimmung des histologischen Bildes der in unseren Versuchen beobachteten primären Lebertumoren besteht auch mit den strahlenbedingten primären Lebertumoren der Ratte (Oehlert, 1978).

Das Auftreten der wenigen spontanen und der zahlreichen radiogenen Lebertumoren erfolgt nach für die Maus sehr langen Überlebenszeiten. Auch hierin sehen wir eine Übereinstimmung mit den Verhältnissen beim Menschen, bei dem für die Entstehung solider Tumoren nach einmaliger Strahlenexposition Latenzzeiten von zwei bis mindestens vier Jahrzehnten angenommen werden (Harder, 1992). Da hierbei ein Rückgang der strahlenbedingten Inzidenz in späteren Lebensjahren für solide Tumoren nicht beobachtet wird, muß angenommen werden, daß die durch einmalige oder mehrfache Bestrahlung transformierte Zelle nach dem genetisch fixierten Initiationsprozeß über lange Zeit in einer Ruhephase verbleiben kann.

Erst in einem zweiten Schritt mit einer Promotion durch unter Umständen unspezifische, die Zellproliferation anregende Schädigungen soll die in Richtung Tumorzelle erfolgende genetische Umwandlung und damit das progrediente Tumorzellwachstum ausgelöst werden (NCRP, 1989; Streffer, 1991). Über die Auswirkung einer zu verschiedenen Zeiten nach einmaliger Bestrahlung einsetzenden Erhöhung der Zellregenerationsrate als Promotionsfaktor und hierdurch bedingte Beschleunigung der Tumorentstehung konnte in Versuchen mit Ratten berichtet werden (Oehlert, 1978). Dabei wurde nach einmaliger Leberlokalbestrahlung eine durch Galaktosamin bedingte Hepatitis ausgelöst, die mit einer gesteigerten Zellproliferation einherging, durch welche der Zeitraum zwischen Bestrahlung und Tumorentstehung drastisch verkürzt werden konnte. Wenn wir auch in den vorliegenden Versuchen nicht ausschließen können, daß die Mäuse nach der Bestrahlung Infektionen durch-

gemacht haben, die als „Promoting Factor“ wirkten, so konnten wir bei der histologischen Untersuchung der bestrahlten Tiere und der Kontrollen zu verschiedenen Versuchszeiten derartige schwere Erkrankungen vor allem der Leber nicht beobachten. Gegen die Annahme solcher zusätzlicher Schädigungseffekte sprechen auch die relativ langen Latenzzeiten bis zur endgültigen Tumorentstehung.

Die Tumorrates nach Bestrahlung ist gegenüber nicht bestrahlten Tieren deutlich erhöht. Ferner ist die Latenzzeit für das Auftreten von Tumoren erheblich verkürzt (s. Tabelle 4). Während bei unbestrahlten Mäusen erst oberhalb von 700 Tagen Karzinome beobachtet werden konnten (s. Tabelle 2), traten Tumorbildungen bei bestrahlten Tieren bereits ab einem Alter von 240 Tagen in Erscheinung (s. Tabelle 4). Diese Beobachtungen an Mäusen stehen im Widerspruch zu Ergebnissen, die bei Untersuchungen an den überlebenden Atombombenopfern in Hiroshima und Nagasaki ermittelt wurden. Die Japan-Daten haben gezeigt, daß sich im allgemeinen strahleninduzierte solide Tumoren erst dann entwickeln, wenn das Alter erreicht wird (sog. Krebsalter), bei dem normalerweise auch ohne Strahlung Tumoren auftreten (Shimizu et al., 1991).

Die Untersuchungen wurden an erwachsenen Mäusen im Alter von 10 Wochen durchgeführt. Offensichtlich besteht eine Abhängigkeit der Tumorzinzidenz vom Alter bei der Bestrahlung, wie Versuche in verschiedenen Altersstadien gezeigt haben (Di Majo et al., 1990). In der zitierten Arbeit über die Altersabhängigkeit der Tumorzinduktion in der Mäuseleber nach Bestrahlung mit Neutronen wurden auch vergleichende Bestrahlungen mit 250 kV-Röntgenstrahlen vorgenommen. Erhielten 13 Wochen alte männliche Mäuse eine akute Ganzkörperbestrahlung, so beobachteten die Autoren für einen Dosisbereich von 2 bis 6 Gy eine gegenüber unbestrahlten Tieren höhere Inzidenz an Lebertumoren. Für die Abhängigkeit der Inzidenz mit der Dosis war für diese Gruppe eine linear-quadratische Kurve am besten angepaßt. Pränatale Bestrahlungen im Dosisbereich von 0,3 bis 2,1 Gy führten ebenfalls zu einer höheren Tumorrates in der Leber. Wurde dagegen die Bestrahlung in einem Alter von 19 Monaten durchgeführt, so lag die Tumorrates ähnlich hoch wie bei unbestrahlten Kontrollen.

Die erhöhte Tumorzinzidenz in der Leber konnte in unseren Versuchen sowohl nach einer Lokalbestrahlung im Leberbereich (s. Tabelle 3) als auch nach Ganzkörperbestrahlung (s. Tabelle 4) beobachtet werden. Nach den vorliegenden Daten entwickeln sich die Lebertumoren im wesentlichen primär. Eine Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy führt ab einem Alter von 240 Tagen zu einer praktisch 100 %igen Inzidenz an Präkanzerosen und Karzinomen in der Leber. Eine ebenfalls 100% ige Inzidenz ergab sich bei Ganzkörperbestrahlungen mit 6,8 Gy (s. Tabelle 5), so daß bei dem von uns verwendeten Tierstamm noch kein Dosisbereich

erreicht ist, in dem transformierte Zellen abgetötet werden. Eine praktisch 100%ige Tumorrates (noduläre Hyperplasien eingeschlossen) konnte auch nach der Lokalbestrahlung mit 5 Gy ermittelt werden. Das Alter der Tiere lag bei diesen Beobachtungen oberhalb von etwa 720 Tagen. Bei einem Vergleich der zeitlichen Entwicklung von Tumoren nach einer Bestrahlung mit 2,5 Gy (s. Tabelle 4) oder mit Dosen um 7 oder 15 Gy (s. Tabellen 5 und 6) muß auf die hohe Letalitätsrate bei den großen Strahlendosen hingewiesen werden, die zu einer Veränderung des Kollektivs führt.

Die Versuche mit Strahlenschutzsubstanzen zeigen, daß sowohl bei der Lokalbestrahlung der Leberregion als auch bei der Ganzkörperbestrahlung eine Verminderung der Tumorrates nicht auftritt. Für das Ausbleiben einer Strahlenschutzwirkung können Erklärungsversuche anderer Autoren herangezogen werden. So haben Untersuchungen an der perfundierten Rattenleber gezeigt, daß der Beitrag zur Biotransformation des Thiophosphats WR 2721 in diesem Organ gering ist und daß nur eine geringe Bioverfügbarkeit dieser Strahlenschutzsubstanz in der Leber besteht (Coleman, 1989). Offensichtlich greifen die zur Erklärung des Schutzeffekts herangezogenen Mechanismen bei der erwachsenen Leber nicht. Messungen des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus in die DNA von Leberzellen der Maus lassen nämlich nach Mitznegg (1973) darauf schließen, daß die Strahlenschutzwirkung des in diesen Versuchen verwendeten Cysteamins auf einer vorübergehenden Ruhigstellung der DNA beruht. Dadurch sollen Reparaturprozesse an der strahlengeschädigten DNA beschleunigt und erleichtert werden. Dieser Effekt ist jedoch in hohem Maße altersabhängig, da der Vorgang sich nur in den mitoseaktiveren Zellen jüngerer Tiere abspielt.

Bei der Verwendung eines Polymerkonjugats Dextran-(WR 2721)-Amin konnte eine Schutzwirkung beobachtet werden (s. Tabelle 5). Wegen der geringen Anzahl von Tieren läßt sich jedoch statistisch nicht absichern, ob diese Substanz wirksam ist. Im Bereich von 410 bis 498 Tagen nach Bestrahlung traten nach 6,9 Gy keine Adenome oder Karzinome auf. Ferner waren auch keine präkanzerösen Veränderungen zu beobachten. Dagegen fanden sich in einer „ungeschützten“ Kontrollgruppe mit einer Dosis von 6,9 Gy bei allen Tieren hepatozelluläre Adenome oder Karzinome. Trotzdem vermuten wir auf Grund ähnlicher Versuche mit anderen Schutzsubstanzen (Cystamin, WR 638, WR 2721), daß die Dextrankonjugate eine Tumorbildung nicht verhindern. Es gilt sogar, daß die Strahlenschutzsubstanz, die im Mittel zu einer längeren Überlebenszeit bei dem behandelten Tier führt, erst die Entwicklung strahlenbedingter Tumoren ermöglicht (Bitter et al., 1982).

Die oben erwähnten Erklärungen von Mitznegg (1973) gehen von der Annahme aus, daß eine primär karzinogene genotoxische Schädigung

der DNA nur dann für die Zukunft wirksam wird, wenn sie weder den Zelltod noch Veränderungen auslöst, die weitere Zellteilungen unmöglich machen oder bei denen weitere Zellteilungen zum Zelluntergang führen. Bei der Einwirkung hoher Strahlendosen oder erheblicher chemischer Einwirkungen auf die DNA muß mit dem Zelltod zahlreicher Zellen gerechnet werden, die als Mutterzellen für eine Krebsentstehung ausfallen, bei anderen werden genetische Schäden auftreten, die bei nachfolgenden Zellteilungen deletär wirken oder weitere regelrechte Zellteilungen nicht zulassen. Nur diejenige genotoxische Veränderung, die durch zahlreiche weitere Zellteilungen verstärkt wird, kann schließlich die Entstehung von Tumorzellen mit entsprechender zellulärer Entdifferenzierung und unbegrenzter Zellteilungsfähigkeit ermöglichen.

Nun gehört das Lebergewebe zu den sogenannten reversibel postmitotischen Zellpopulationen, bei denen unter normalen Bedingungen nur selten Zellteilungen ablaufen. D. h., im Vergleich zu anderen Zellen, z. B. des Magen-Darm-Trakts oder der Haut, befinden sich die Zellen der Leber in einer extrem langen  $G_1$ -Phase. Berücksichtigt man weiter, daß die Einwirkung einer genotoxisch wirksamen Substanz ihre größte Wirkung in der S- oder  $G_2$ -Phase entfaltet, so kann man davon ausgehen, daß sich in der Leber erwachsener Tiere zum Zeitpunkt einer kurz dauernden genotoxischen Schädigung nur verhältnismäßig wenige Zellen in diesen empfindlichen Phasen befinden. Hieraus resultiert, daß Tumoren des Lebergewebes im Vergleich zu anderen mitotisch aktiveren Geweben eine weit größere Latenzzeit bis zur Reaktivierung durchlaufen. Andererseits kann man sowohl die Anzahl der experimentell zu erzeugenden Tumoren vergrößern als auch deren Latenzzeit verkürzen, wenn die genotoxische Schädigung in einer Phase verstärkter mitotischer Aktivität des Lebergewebes erfolgt (Mirsalis und Steinmetz, 1990; Ward et al., 1990). Ebenso gelingt es, die Latenzzeit zwischen einmaliger genotoxischer Schädigung des Lebergewebes und der Tumorentwicklung zu verkürzen durch nach der initialen Schädigung provozierte vergrößerte Leberzellregeneration. Dies gelingt einmal durch Teilhepatektomie, zum anderen durch die zusätzliche Applikation die Zellteilungsrate erhöhender Substanzen, nämlich von sogenannten „Promoting Faktoren“. Dabei kann es sich auch um Substanzen handeln, von denen nachgewiesen wurde, daß ihnen keinerlei genotoxische Schädigung, sondern ausschließlich eine Vergrößerung der Zellproliferationsrate zugeschrieben wird. Entsprechende Versuche mit derartigen proliferationssteigernden Substanzen bei der Maus haben ergeben, daß es dabei in relativ kurzer Zeit zur Ausbildung nodulärer Hyperplasien kommt. Zwar entwickeln sich aus diesen nodulären Hyperplasien bei bestimmten Mäusestämmen mit bereits in der Norm erhöhter Lebertumorraterate auch hepatozelluläre Karzinome, doch nicht bei Tieren, die aus Stämmen mit einer niedrigen Spontantumorraterate stammen. Diese

Versuche geben Anlaß zu der Annahme, daß auch ohne eine primäre genotoxische Schädigung allein durch eine Vergrößerung der Proliferationsaktivität des Lebergewebes über längere Zeit Karzinome zur Entwicklung kommen. Dies wurde auch beim Menschen beobachtet, wenn z. B. durch langfristig durchgeführte medikamentöse Kontrazeption zwar noduläre Hyperplasien der Leber, aber keine Karzinome zur Entwicklung kommen. Allerdings kann bei derartigen Versuchen mit proliferationssteigernden, nicht genotoxischen Substanzen nie ausgeschlossen werden, daß bei den relativ langen Versuchszeiten zusätzlich exogene Schäden eintreten, die eine tumorinitiierende Wirkung auslösen, ohne daß dies nachgewiesen werden kann. Ganz ähnliche Verhältnisse müssen für die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms beim Menschen angenommen werden. So kennen wir z.B. primäre Leberkarzinome, die sich nach einer initialen genotoxischen Schädigung, z. B. durch Aflatoxin oder auch durch die Infektion mit dem Virus der Hepatitis B entwickeln. Andererseits beobachten wir bei der alkoholischen Leberschädigung über die Entstehung von Leberzirrhosen das gehäufte Auftreten von hepatozellulären und hepatocholangiolären Lebertumoren. Alkoholschädigung allein führt jedoch nach unseren bisherigen Kenntnissen nicht zu einer primären genotoxischen Schädigung der Leberzelle.

Die in unseren Versuchen festgestellten, für die Maus außerordentlich langen Tumorentwicklungszeiten nach einmaliger Ganzkörper- oder Lokalbestrahlung lassen somit die Annahme zu, daß bei der niedrigen Proliferationsrate des Leberparenchyms nur einige wenige Leberzellen in die Initiationsphase eintreten, wobei allerdings auch nach einigen Generationszeiten und nach einem Zeitpunkt von mehr als einem Jahr Anzeichen von DNA-Synthese-Störungen sich in Form des gehäuften Auftretens von Riesenkernen manifestieren. Die relativ geringe Anzahl von oktoploiden Zellkernen läßt darauf schließen, daß diese Zellen weitere Teilungen nicht mehr durchlaufen und für die folgende Tumorentstehung ausfallen. Erst nach relativ langen Versuchszeiten treten noduläre Hyperplasien auf, die sich aus kleinkernigen Zellelementen mit einem offensichtlich diploiden Chromosomensatz aufbauen, aus denen sich dann mit großer Wahrscheinlichkeit die hepatozellulären Tumoren entwickeln. Bei der verhältnismäßig geringen proliferativen Aktivität des Lebergewebes wird offensichtlich die für die endgültige Umwandlung des Leber- zur Tumorzelle notwendige Zeit bzw. die notwendige Zahl an Zellteilungen in einem Zeitraum durchlaufen der fast der normalen Lebensdauer der Maus entspricht. Auch hier ergibt sich eine Parallele zu den strahlenbedingten soliden Tumoren nach den Atomexplosionen in Hiroshima und Nagasaki, bei denen 10 bis 40 Jahre (und mehr) als Tumorentwicklungszeiten beschrieben werden. Andererseits müssen wir annehmen, daß kleine Strahlendosen mit der durch sie aus-

gelösten primären genotoxischen Schädigung wirksamer für die Tumorentstehung der Leber sind als höhere Bestrahlungsdosen. Einmal weil unter den höheren Dosen die bestrahlten Individuen an anderen Tumoren sterben, bevor die Entwicklung des Leberkarzinoms abgeschlossen ist, zum anderen weil durch hohe Strahlendosen mit der Folge von Zelluntergängen bzw. der Auflösung folgender deletärer Mitosen die Zahl der prospektiven Mutterzellen des Tumors reduziert wird.

Für die Belange des Zivil- und Katastrophenschutzes ergibt sich hieraus die Forderung, auch bei kleinen Strahlendosen an Spätschäden zu denken und vor allem zu berücksichtigen, daß auch nach einmaliger, niedrig dosierter Bestrahlung durch sogenannte Promotionsfaktoren die Tumorentstehung in der Leber sich noch zu Lebzeiten des bestrahlten Individuums entwickeln kann. Eine Reihe bisher bekannter Strahlenschutzsubstanzen, die den Verlauf der akuten Strahlenkrankheit günstig beeinflussen können, sind offensichtlich nicht in der Lage, die Bildung von Tumoren in der Leber zu verhindern oder zu vermindern. Andererseits stellt aus tierexperimenteller Sicht die Einnahme solcher Substanzen gegen akute Strahlenschäden kein Risiko für die Entstehung von Lebertumoren dar.

## Zusammenfassung

In Langzeitversuchen an männlichen Mäusen wurde der Einfluß verschiedener Strahlenschutzsubstanzen, wie Cystamin, WR 638, WR 2721 und von polymergebundenem WR 2721, auf die Bildung von Tumoren in der Leber nach Ganzkörperbestrahlung mit Dosen von 2,5 Gy, 7 bis 8 Gy sowie 15 Gy und nach Teilkörperbestrahlung der Leberregion mit 5 Gy histologisch untersucht. Frühestens 170 Tage nach der Bestrahlung entwickelten sich Tumoren im Leberbereich sowohl bei Tieren ohne als auch mit Schutzsubstanzen. Abgesehen von einem Dextran-(WR 2721)-Konjugat/Amin ergaben sich keinerlei Hinweise, daß die übrigen untersuchten Strahlenschutzstoffe die Bildung von strahleninduzierten Lebertumoren verhindern oder die Tumorraten vermindern. Am häufigsten traten hepatozelluläre Karzinome auf. Daneben wurden Hämangioendotheliome, Hämangiosarkome, Kupferzellsarkome, Cholangiome und Adenome beobachtet. Präkanzerosen wurden in Form von nodulären Hyperplasien gefunden. Nach den vorliegenden Daten entwickeln sich die Lebertumoren im wesentlichen primär. Bei den Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß die strahlenbedingten Lebertumoren der Mäuse histologisch weitgehend den durch toxische Stoffe oder durch Thorotrasteinwirkung beim Menschen entstandenen Lebertumoren entsprechen. Der Mechanismus der Tumorentstehung in der Leber wird ausführlich diskutiert.

# Literatur

*Bitter, A., O. Messerschmidt, H. Mönig, W. Oehlert (1982):*

Histologische Untersuchungen zur Wirkung von Strahlenschutzsubstanzen. Tagungsband der Schutzkommission beim BMI. Bonn 1982: 219-232.

*Byrd III, D. M., E. A. C. Crouch, R. Wilson (1990):*

Do mouse liver tumors predict rat tumors? A study of concordance between tumors induced at different sites in rats and mice. In: Mouse Liver Carcinogenesis. Mechanisms and Species Comparisons (Stevenson, D. E., J. A. Popp, J. M. Ward, R. M. McClain, T. J. Slaga, H. C. Pitot, Eds.). PP. 19-41. Wiley-Liss, New York

*Cole, L. J., P. C. Nowell (1965):*

Radiation carcinogenesis: The sequence of events. Science 150: 1782-1786

*Coleman, M. D., L. Fleckenstein, R. S. Geary, T. G. Brewer, G. A. Timony, D. J. Mangold (1989):*

The disposition of ethiofos (WR-2721) in the isolated perfused rat liver. Radiat. Res. 117: 334-341

*Cottier, H. (1961):*

Strahlenbedingte Lebensverkürzungen. Pathologische Anatomie somatischer Spätwirkungen der ionisierenden Ganzkörperbestrahlung auf den erwachsenen Säugetierorganismus. Springer-Verlag, Berlin

*Covelli, V., V. Di Majo, B. Bassani, S. Rebessi, M. Coppola, G. Silini (1984):*

Influence of age on life shortening and tumor induction after x-ray and neutron irradiation. Radiat. Res. 100: 348-364

*Davis, W. E., L. J. Cole, R. C. Nowell (1970):*

Late effects of x-irradiation in chemically protected mice: Alteration of tumor incidence after AET-treatment. Radiat. Res. 41: 400-408

*Di Majo, V., M. Coppola, S. Rebessi, V. Covelli (1990):*

Age-related susceptibility of mouse liver to induction of tumors by neutrons. Radiat. Res. 124: 227-234

*Fricke, H., E. J. Hart (1966):*

Chemical dosimetry. In: Radiation Dosimetry (F. H. Attix, W. C. Roesch, Eds.), Vol. II. pp. 167-239. Academic Press, New York

*Harder, D. (1992):*

Neue Erkenntnisse zum radiogenen Krebsrisiko. Linearer Anstieg des Risikos mit der Dosis. Therapiewoche 42: 2037-2038

*ICRP Publication 26 (1977):*

Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP 1 (No. 3). Pergamon Press, Oxford

*ICRP Publication 60 (1991):*

1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP 21 (No. 1-3). Pergamon Press, Oxford

*Kaplan, H. S., M. A. Bagshaw (1968):*

Radiation hepatitis: possible prevention by combined isotopic and external radiation therapy. Radiol. 91: 1214-1218

- Lesch, R. (1976):*  
Strahlenempfindlichkeit und die akute chronische Strahlenschädigung der Leber. Zivilschutz-Forschung Band 3. Osang-Verlag, Bad Honnef-Erpel
- Maisin, J. R., A. Declève, G. B. Gerber, G. Mattelin, M. Lambiet-Collier (1978 a):*  
Chemical protection against the long-term effects of a Single whole-body exposure of mice to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 74: 415-135
- Maisin, J. R., G. B. Gerber, G. Mattelin, M. Lambiet-Collier (1978 b):*  
Chemical protection against life shortening and causes of death after a single or fractionated whole-body exposure of mice to ionizing radiation. In: *Late Biological Effects of Ionizing Radiation*. Vol. II. pp. 483-495. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Mirsalis, J. C., K. L. Steinmetz (1990):*  
The role of hyperplasia in liver carcinogenesis. In: *Mouse Liver Carcinogenesis. Mechanisms and Species Comparisons* (Stevenson, D. E., J. A. Popp, J. M. Ward, R. M. McClain, T. J. Slaga, H. C. Pitot, Eds.). pp. 149-161. Wiley-Liss, New York.
- Mitznegg, R (1973):*  
Die Wirkung der Strahlenschutzsubstanz auf die Leber weißer Mäuse in Abhängigkeit vom Lebensalter. *Act. Geront* 3: 753-756
- Mönig, H., O. Messerschmidt, C. Streffer (1984):*  
Chemischer Strahlenschutz bei Säugetieren und beim Menschen. Zivilschutz-Forschung Band 17. Osang Verlag, Bonn
- Mönig, H., H. Sedlmeier, O. Messerschmidt (1986):*  
The influence of the solvent on the toxicity and radioprotective effect of thiophosphate WR 2721 in mice. *Strahlenther. Onkol.* 162: 134-137
- Mönig, H., H. Sedlmeier, W. Oehlert, G. Konermann, O. Messerschmidt (1990):*  
Prolonged radioprotective activity of WR-2721 linked to dextran. *Strahlenther. Onkol.* 166: 235-241
- NCRP Report No. 96 (1989):*  
Comparative carcinogenicity of ionizing radiation and chemicals. Recommendations of the National Council on Radiation Protection and Measurements. Bethesda, MD, U.S.A.
- Nowell, R C, L. J. Cole (1959):*  
Late effects of fast neutrons versus x-rays in mice: Nephrosclerosis, tumors, longevity. *Radiat. Res.* 11: 545-556
- Nowell, R C, L. J. Cole (1965):*  
Hepatomas in mice: Incidence increased after gamma Irradiation at low dose rates. *Science* 148: 96-97
- Oehlert, W. (1978):*  
Radiation-induced liver cell Carcinoma in the rat. In: *Primary Liver Tumors* (H. Remmer, H. M. Bolt, P. Bannasch, H. Popper, Eds.). pp. 217-225. MTP-Press, Lancaster, England.
- Patrick, R. S., J. O'D. McGee (1980):*  
Biopsy Pathology of the Liver. Chapman and Hall, London
- Schall, W. J., Y. Shimizu, H. Kato (1990):*  
Hiroshima and Nagasaki: New Doses, risks, and their implications. *Health Phys.* 59: 69-75

*Shimizu, Y, H. Kato, W. J. Schull (1991):*

Mortality among atomic bomb survivors. *J. Radiat. Res.* 32, S: 212-230

*Shimizu, Y, H. Kato, W. J. Schull, D. Preston, S. Fujita, D. A. Pierce (1989):*

Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 1. Comparison of risk coefficients for site specific mortality based on the DS86 and T65DR shielded kerma and organ doses. *Radiat. Res.* 118: 502-524

*Streffler, C. (1991):*

Stochastische und nichtstochastische Strahlenwirkungen. *Nucl.-Med.* 30: 198-205

*Ward, J. M., B. A. Diwan, R. A. Lubet, J. R. Henneman, D. E. Devor (1990):*

Liver tumor promoters and other mouse liver carcinogens. In: *Mouse Liver Carcinogenesis. Mechanisms and Species Comparisons* (Stevenson, D. E., J. A. Popp, J. M. Ward, R. M. McClain, T. J. Slaga, H. C. Pitot, Eds.). pp. 85-108. Wiley-Liss, New York.

# Über die Wirkung von Endotoxin auf vorbestrahlte Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit

*Hans Mönig, Wolfgang Oehlert,*

*Michael Oehlert, Gerhard Konermann*

## Einleitung

Die Durchführung der Versuche, deren Ergebnisse hier mitgeteilt werden, ergab sich aus Beobachtungen beim sogenannten „Kombinationsschaden“. Dieser ist definiert durch Entwicklung und Verlauf eines Krankheitsbildes, das sich bei bestrahlten Menschen oder Tieren nach zusätzlicher Einwirkung unterschiedlicher Noxen entwickelt und sich in seiner Form und Schwere weder durch die vorangegangene Bestrahlung noch durch die zusätzliche Noxe allein erklären läßt (Messerschmidt, 1975). In vor längerer Zeit durchgeführten Tierversuchen zeigte sich als eines der Grundphänomene des Kombinationsschadens bei vorbestrahlten Mäusen mit zusätzlichen Schädigungen im Sinne von Traumata eine Schocksymptomatik (Messerschmidt und Oehlert, 1968). Bei der histologischen Untersuchung der Organe entsprechender Tiere fanden sich nekrotische Leberschäden, erosive Veränderungen an den Schleimhäuten des Magen-Darm-Trakts und Lungenveränderungen, ähnlich wie beim anaphylaktischen Schock. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen beim Kombinationsschaden wiesen somit auf die Möglichkeit hin, daß hier Mechanismen eine Rolle spielen, die auch bei der Auslösung, des anaphylaktischen oder septischen Schocks wirksam werden.

Es ist schon seit längerem aus tierexperimentellen Untersuchungen bekannt, daß das Auftreten einer Bakteriämie bei bestrahlten Tieren zum vorzeitigen Tod führen kann (Miller et al., 1950). Diese Komplikationen haben u. a. nach Wegen suchen lassen, wie Infektionen bei bestrahlten Säugetieren verhindert werden können (Hammond, 1954; Wensick et al., 1957) oder wie eine Therapie möglich ist (Brook, 1988; Ledney et al., 1991; Brook und Ledney, 1992). Gaffin et al. (1985) weisen darauf hin, daß der Tod von Menschen durch Überexposition mit ionisierenden Strahlen im Dosisbereich von 3 bis 8 Gy wenigstens teilweise auf eine Toxinämie zurückzuführen ist, die durch den Eintritt gramnegativer Bakterien und/oder ihrer Lipopolysaccharide in das Blut hervorgerufen wird. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in

dem gezielten Einsatz von Endotoxinen bei subletal bestrahlten Mäusen, um die Wechselwirkung zwischen Strahlenwirkung und einer weiteren Noxe zu untersuchen. Bei Strahlenunfällen, die z.B. durch kern-technische Anlagen verursacht werden, sind neben der Strahlenexposition einzelner Personen oder von Teilen der Bevölkerung zusätzliche Belastungen des Organismus durch andere Noxen nicht auszuschließen. Hier muß vor allem an die erhöhte Infektanfälligkeit durch Schädigung des Immunsystems gedacht werden. In diesem Zusammenhang spielen Cytokine, die erst in den letzten Jahren in das Blickfeld der klinischen Forschung gerückt sind, eine große Rolle (s. z. B. Meager, 1990).

## Material und Methode<sup>1)</sup>

### *Versuchstiere*

Verwendet wurden männliche Mäuse eines institutseigenen Aufzuchtstammes mit der Bezeichnung Heiligenberg-Stamm. Vor Beginn der Versuche wurde vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover ein serologischer Test durchgeführt, der lediglich Antikörper gegen das Hepatitisvirus der Maus mit überwiegend schwacher Immunofluoreszenz ergab. Eine histologische Untersuchung unbestrahlter und mit 2,5 Gy bestrahlter Tiere ergab keine histologischen Veränderungen, die auf bakterielle oder virale Infekte hätten zurückgeführt werden können. Insbesondere fehlten alle Anzeichen für das Vorliegen einer Mäusehepatitis. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung betrug das Alter der Tiere zehn Wochen (in einer Versuchsgruppe elf Wochen) und das mittlere Gewicht 33,2 g mit einer Standardabweichung von  $\pm 3,0$  g (Schwankungsbreite 25 bis 43 g). Ernährt wurden die Tiere mit einer Standarddiät Altromin der Altromin GmbH, Lage/Lippe. Mit HCl angesäuertes Trinkwasser stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

### *Bestrahlung*

Die Bestrahlung erfolgte mit einem Röntgengerät Stabilipan 2 der Siemens AG, Erlangen. Bei einer Röhrenspannung von 250kV, einer Stromstärke von 15 mA und einer HWD von 2 mm Cu und einem Fokus-Kammer-Abstand von 75 cm betrug die Dosisleistung 0,6 Gy/min. Die Dosisleistung und die Dosis wurden mit den Meßgeräten Dosimenter DL 4 und DI 4 der Physikalisch-Technischen Werkstätten Dr. Pychlau, Freiburg i.Br., kontrolliert. Die Ionisationskammer des Dosimeters

<sup>1)</sup> Der Versuchsablauf ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

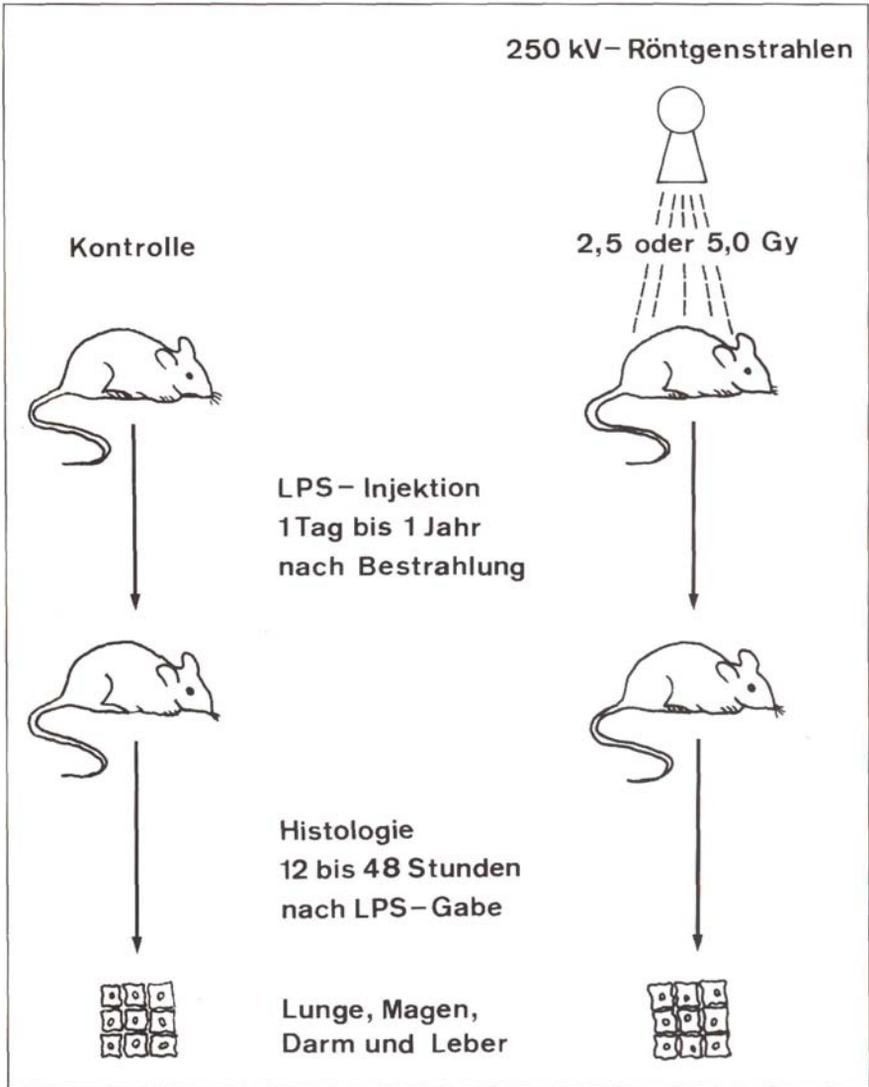


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

befand sich während der Bestrahlung der Versuchstiere im Zentrum eines runden Plexiglaskäfigs. Der Käfig war von einem Plexiglasring umgeben, um maximale Streubedingungen auch für die Tiere am Käfigrand zu erreichen. Durch Verwendung von Phantomen in der Größe von Mäusen, die mit einer FrickeLösung (Fricke und Hart, 1966) gefüllt waren, konnte ermittelt werden, daß 100 R Ionendosis einer Energie-

dosis von 0,95 Gy entsprachen. Die Tiere erhielten Ganzkörperbestrahlungen mit nichtletalen Strahlendosen von 2,5 oder 5,0 Gy (LD 0/30 d). Zum Vergleich dienten scheinbestrahlte Kontrollen. In einigen Versuchen erhielten die Tiere 5 bis 10 min vor der Bestrahlung Cystamin als Strahlenschutzsubstanz. Verwendet wurde Cystaminiumchlorid zur Synthese der Fa. Merck-Schuchardt, München. 150mg der Substanz wurden in 10 ml aqua bidest. gelöst und es wurden 150 mg pro kg Tiergewicht intraperitoneal injiziert.

### *Endotoxine (Lipopolysaccharide)*

Für die Endotoxingabe wurde das Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella abortus equi* (M6 N<sub>1</sub>TEN) verwendet, das von Dr. C. Galanos vom MPI für Immunbiologie Freiburg zur Verfügung gestellt wurde. Das LPS wurde in Dosen von 100, 200 oder 400 µg in 0,3 ml Phosphatpuffer (PBS) einmalig intraperitoneal zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung injiziert. Die Injektion erfolgte von 1 Tag bis zu 1 Jahr nach der Bestrahlung. In einem gesonderten Versuch erhielten die Tiere 3 Tage vor der eigentlichen LPS-Injektion 3 µg vom gleichen LPS in 0,1 ml PBS zur Sensibilitätsminderung (Freudenberg und Galanos, 1988). Zum Vergleich erhielten andere Tiere 0,1 ml pyrogenfreien PBS.

### *Histologische Untersuchungen*

Die histologischen Untersuchungen erfolgten 48 Stunden nach der Endotoxin-Injektion. In einigen Fällen wurden die Untersuchungen auch 12 Stunden oder 24 Stunden nach der Endotoxin-Injektion vorgenommen.

Untersucht wurden Leber, Lunge, Niere, Dünndarm und Magen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, PaS-Reaktion; van Gieson-Färbung.

### *Blutbild*

In einigen Versuchsreihen wurde bei bestrahlten und scheinbestrahlten Tieren 46 bis 48 Stunden nach Endotoxingabe eine Leukozytenzählung des peripheren Bluts in 0,5 %iger Essigsäure mit einer Neubauer-Kammer durchgeführt, und es wurden Differentialblutbilder (May-Grünwald-Lösung und Giemsa-Lösung) ausgewertet. Für 63 unbehandelte und unbestrahlte, 10 Wochen alte Tiere ergab sich eine mittlere Leukozytenzahl von 9 001 mit einer Standardabweichung von  $\pm 2 937$  und eine mittlere Granulozytenzahl von 2149 mit einer Standardabweichung von  $\pm 968$ . Die Häufigkeitsverteilungen der Blutzellen sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

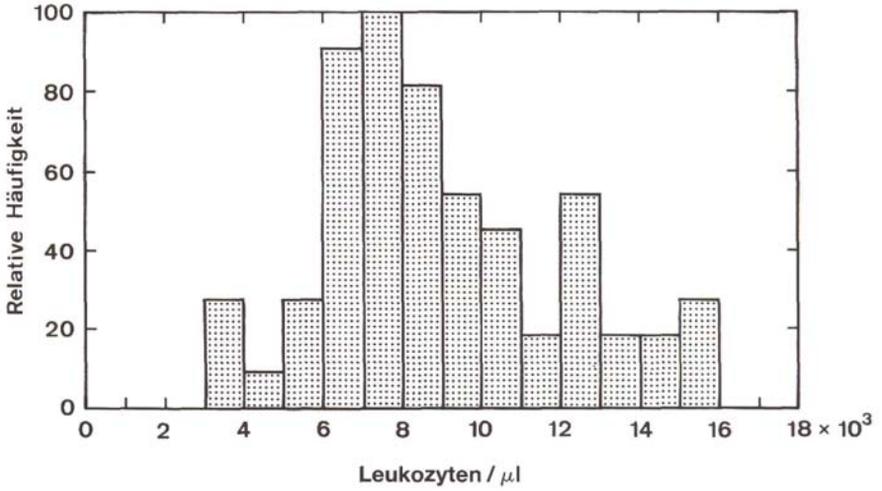


Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der Leukozyten im peripheren Blut von 63 unbestrahlten und unbehandelten Mäusen. Der Mittelwert mit Standardabweichung beträgt  $9001 \pm 2937$ .

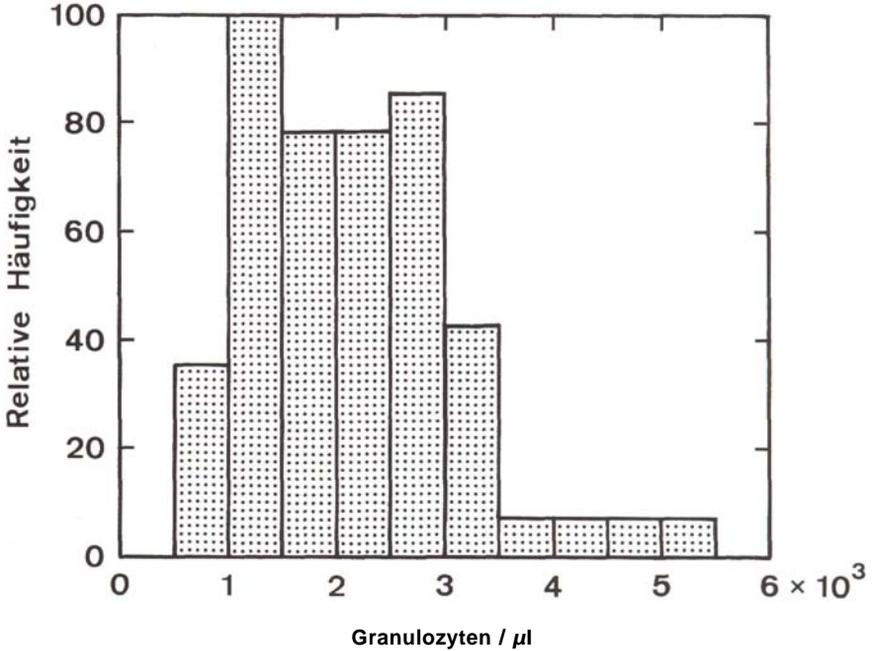


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung der Granulozyten im peripheren Blut von 63 unbestrahlten und unbehandelten Mäusen. Der Mittelwert mit Standardabweichung beträgt  $2149 \pm 968$ .

### *Chemilumineszenz-Messungen*

In einigen Versuchen wurden auch Chemilumineszenz-Messungen am verdünnten Vollblut der Tiere durchgeführt. 50  $\mu$ l Blut wurden 46 bis 48 Stunden nach der Endotoxingabe aus der Schwanzvene entnommen und mit Hank's Lösung sowie mit Luminol versetzt. Durch Hinzufügen von opsoniertem Zymosan wurden die Granulozyten stimuliert, die u. a. Sauerstoffmetabolite freisetzen. Die Metabolite reagierten mit Luminol und führten zur Entstehung von Chemilumineszenzlicht (CL). Die CL-Messung erfolgte mit einem Biolumat-Meßgerät LB 9505 der Fa. Prof. Berthold, Wildbad. Die Methode der Chemilumineszenz-Messung wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Mönig und Konermann, 1993). Für 33 unbestrahlte und unbehandelte Mäuse ergab sich eine mittlere CL (cpm) von 10 258 mit einer Standardabweichung von  $\pm 5 997$ , wobei der Mittelwert der Granulozytenzahl 2 069 mit einer Standardabweichung von  $\pm 785$  betrug. Da die CL-Ausbeute von der Granulozyten-Konzentration abhängig ist, wurde die jeweilige CL eines Tieres auf gleiche Granulozytenzahlen (CL pro 1000 Granulozyten) umgerechnet. Für die 33 Tiere ergab sich ein Mittelwert von 5596  $\pm 3 943$  cpm pro 1 000 Granulozyten.

### *Zählung von Monozyten und Makrophagen aus dem Peritoneum*

Den unter Ethernarkose abgetöteten Tieren wurden 7 ml Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) in den Peritonealraum injiziert. Etwa 2 bis 4 ml der Flüssigkeit konnten durch Absaugen dem Peritoneum entnommen werden. Die Peritonealflüssigkeit wurde in Neubauer-Zählkammern mit verdünnter Pelikan-Tusche (Verdünner: DMEM) bei 37° C für 30 min im Brutschrank inkubiert, wobei die Zählkammern in Petrischalen in feuchter Umgebung (DMEM) gehalten wurden, um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend konnten die Zellen unter dem Mikroskop gezählt werden. Bei 27 nichtbestrahlten und unbehandelten, 10 Wochen alten männlichen Mäusen ergaben sich folgende Mittelwerte mit Standardabweichungen pro  $\mu$ l Peritonealflüssigkeit: 348  $\pm$  165 (Schwankungsbreite: 113-725) für Monozyten und 1850  $\pm$  840 (Schwankungsbreite: 207-3 519) für Makrophagen. Die Häufigkeitsverteilungen für beide Zellarten sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Die Schwankungsbreite ist bei den Makrophagen relativ hoch. Es bestand keine Korrelation ( $r = 0,22$ ) zwischen der Anzahl der Monozyten und Makrophagen.

Bei fünf 34 Wochen alten nichtbestrahlten und unbehandelten männlichen Mäusen fanden sich folgende Mittelwerte mit Standardabweichungen pro  $\mu$ l Peritonealflüssigkeit: 405  $\pm$  276 für Monozyten und 1287  $\pm$  1076 für Makrophagen. Die Zellzahlen liegen demnach auch

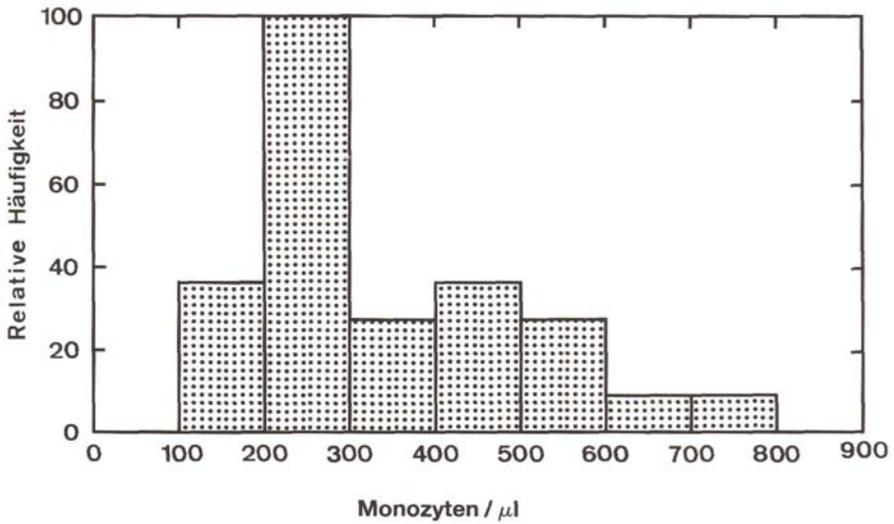


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der Monozyten im Peritoneum von *Zv* unbestrahlten und unbehandelten Mäusen. Der Mittelwert mit Standardabweichung beträgt  $348 \pm 165$  bei einer Schwankungsbreite von 113-725.

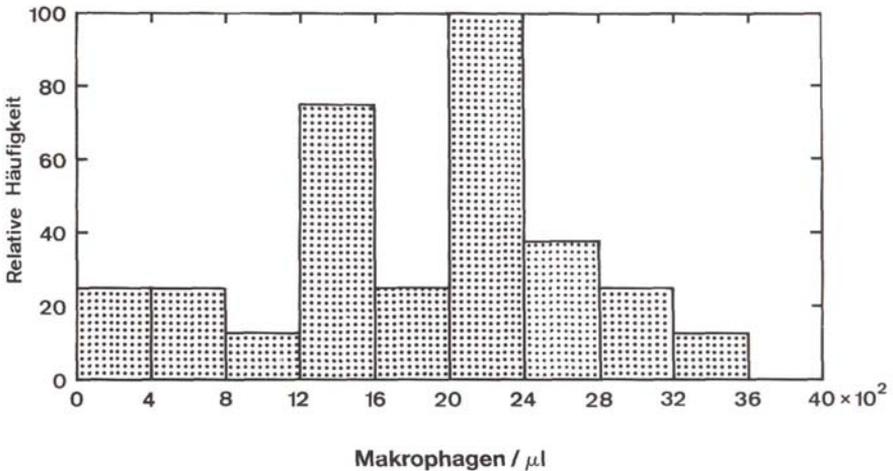


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der Makrophagen im Peritoneum von 27 unbestrahlten und unbehandelten Mäusen. Der Mittelwert mit Standardabweichung beträgt  $1850 \pm 840$  bei einer Schwankungsbreite von 207-3519.

für ältere Tiere noch im Bereich der für 10 Wochen alte Mäuse gefundenen Werte. Eine Korrelationsrechnung ergab den hohen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,93$ . Diese rechnerisch ermittelte starke Abhän-

gigkeit der Makrophagenzahl von der Monozytenzahl sollte allerdings wegen der geringen Tierzahl nicht überbewertet werden.

Es hat sich herausgestellt, daß die Monozyten und Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit sehr empfindlich auf äußere Einflüsse wie Lärm und/oder Staub reagieren. Während der Versuchsreihen wurden bei nichtbestrahlten und unbehandelten Mäusen diese Zellen immer wieder kontrolliert. Versuchsergebnisse wurden nur dann verwendet, wenn die Befunde der Kontrollen den oben genannten Werten entsprachen.

## Ergebnisse

### *Toxizität des Endotoxins (LPS von S. abortus equi) bei nichtbestrahlten Tieren*

Tabelle 1. Letalität durch LPS (*S. abortus equi*) bei männlichen Mäusen verschiedener Altersklassen des Heiligenberg-Stamms. Die Letalität wurde innerhalb eines Zeitraums von 48 Stunden nach LPS-Injektion registriert. Die Unterschiede in der Letalität zwischen den verschiedenen Altersklassen sind statistisch nicht gesichert (Vierfeldertafeltest).

Anzahl Tiere	Alter der Tiere	LPS-Dosis	Anzahl tote Tiere	Letalität in %
<b>14</b>	<b>11–34 Wochen</b>	<b>100 µg</b>	<b>0</b>	<b>≤ 1</b>
<b>25</b>	<b>10–62 Wochen</b>	<b>200 µg</b>	<b>3</b>	<b>12</b>
(11	10–18 Wochen	200 µg	0	0 )
(14	22–62 Wochen	200 µg	3	21,4)
<b>36</b>	<b>10–62 Wochen</b>	<b>400 µg</b>	<b>11</b>	<b>30,6</b>
( 7	10 Wochen	400 µg	1	14,3)
(29	16–62 Wochen	400 µg	10	34,5)

Einige Tiere, die Endotoxin erhielten, sind innerhalb von 48 Stunden gestorben. Dabei traten die meisten Todesfälle zwischen 24 und 48 Stunden auf. Von 45 unbestrahlten oder bestrahlten Tieren, die nach Endotoxininjektion starben, wurden 8 Fälle im Zeitraum bis zu 24 Stunden und 37 Fälle im Zeitraum 24 bis zu 48 Stunden registriert. Die Resultate über die Letalität bei dem verwendeten Lipopolysaccharid haben sich aus dem Versuchsansatz ergeben, in dem drei verschiedene Konzentrationen verwendet wurden, wobei auch nichtbestrahlte Tiere die entsprechenden Endotoxinmengen erhielten. Wie den Werten der Tabelle 1

zu entnehmen ist, ist die Letalität bei älteren Tieren größer. Allerdings läßt sich dieser Befund wegen der geringen Tierzahl statistisch nicht sichern. Die Tiere erhielten unabhängig vom Gewicht jeweils die gleiche Menge Endotoxin. Es hat sich jedoch gezeigt, daß im Mittel die Tiere, die starben, vor der Injektion ein höheres Gewicht aufwiesen als die überlebenden Tiere.

Die probitanalytische Auswertung der Daten über alle verwendeten Altersklassen führt bei Extrapolation der probitanalytischen Geraden zu einer LD 50 von ca. 620  $\mu\text{g}$  (s. Abb. 6). Möglicherweise ist die LD 50 für die Altersgruppe 10 bis 18 Wochen höher.

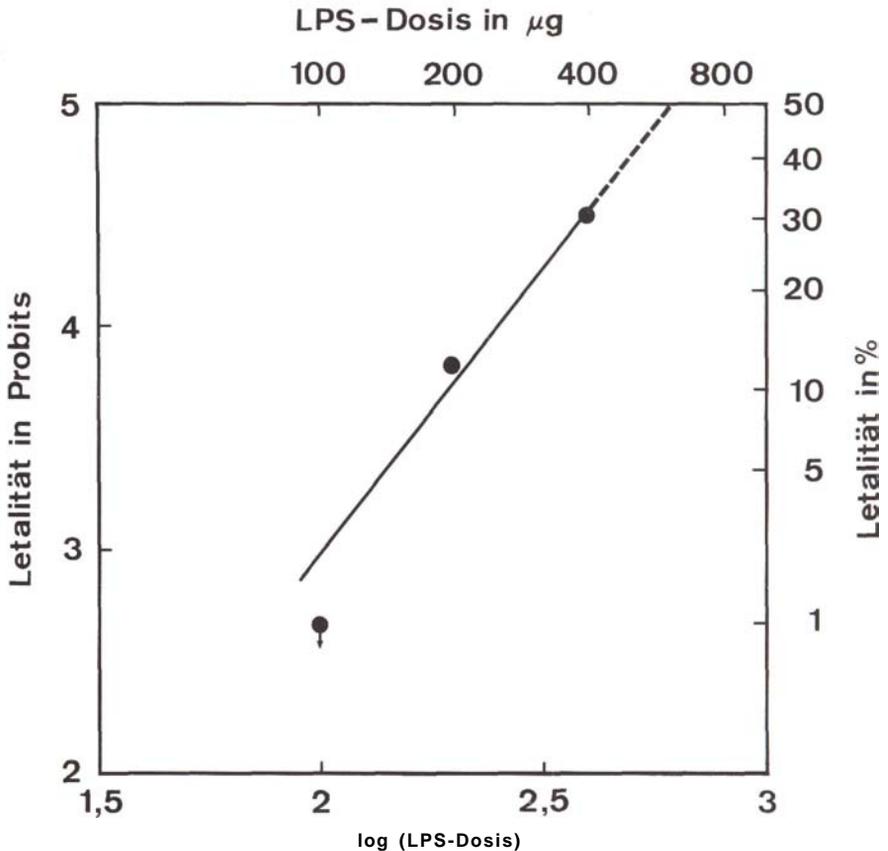


Abb. 6: Letalität durch LPS (*S. abortus equi*) bei männlichen Mäusen des Heiligenberg-Stamms. Die Letalität wurde innerhalb eines Zeitraums von 48 Stunden nach LPS-Injektion bei insgesamt 75 Tieren verschiedener Altersklassen (s. Tabelle 1) registriert. Die eingetragene Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde durch probitanalytische Auswertung ermittelt. Durch Extrapolation ergibt sich eine LD 50 von rund 620  $\mu\text{g}$ .

*Letalität nach Bestrahlung und Injektion von Endotoxin*

Tabelle 2. Letalität und Granulozytenwerte von Mäusen nach Bestrahlung und Injektion von 400 µg Endotoxin (LPS von *S. abortus equi*). Der Beobachtungszeitraum für die Letalität nach LPS-Gabe betrug 48 Stunden. SD = Standardabweichung. Werte in ( ) hinter SD = Anzahl Tiere für die Blutuntersuchung.

Zeit zw. Bestrahlung und LPS-Injektion	Dosis in Gy	Letalität Tot/Gesamt	Granulozyten/µl Mittelwert ± SD
4 Tage	0	0/5	16 608 ± 3 376 (2)
	2,5	0/5	13 527 ± 3 679 (2)
	5,0	0/5	2 716 ± 2 183 (2)
17 Wochen	0	3/5 <sup>1)</sup>	23 697 ± 8 084 (2)
	2,5	0/5	9 911 ± 3 035 (3)
	5,0	0/5	15 212 ± 2 981 (3)
24 Wochen	0	1/5	21 442 ± 13 749 (3)
	2,5	1/5	13 969 ± 2 585 (3)
	5,0	2/5	20 248 ± 3 545 (3)
1 Jahr	0	0/5	12 439 ± 9 431 (3)
	2,5	3/5	29 724 ± 4 293 (2)
	5,0	3/5	20 969 ± 2 253 (2)

!) Letalität gegenüber bestrahlten Tieren signifikant mit  $P < 0,05$  (Vierfeldertafeltest)

Aus den Werten der Tabelle 2 erhellt, daß die Letalität sehr stark vom zeitlichen Abstand der Endotoxingabe nach der Bestrahlung abhängig ist. Erfolgte die Injektion von LPS wenige Tage nach einer Bestrahlung, traten keine Todesfälle auf. Bei einem zeitlichen Abstand von 17 Wochen starb kein bestrahltes Tier. Bei diesem Versuch ist der Unterschied in den Letalitäten zwischen unbestrahlten und bestrahlten Tieren mit  $P < 0,05$  statistisch gesichert, wenn man beide Bestrahlungsgruppen (2,5 und 5,0 Gy) zusammenfaßt und der unbestrahlten Gruppe gegenüberstellt. Demnach übt für diesen Zeitraum die Bestrahlung eine „Schutzwirkung“ gegenüber der LPS-Toxizität aus.

Im Bereich von 24 Wochen zwischen der Bestrahlung und LPS-Injektion ist die Letalitätsrate in allen Gruppen etwa gleich groß. Bei Versuchen mit 200 µg LPS für diesen Zeitraum zeigten sich ähnliche Letalitätsraten. Hier erhielten jeweils 3 Tiere in jeder Gruppe LPS. In der Gruppe 0 Gy starb 1 Tier, in der Gruppe 2,5 Gy kein Tier und in der Gruppe 5 Gy 1 Tier innerhalb von 48 Stunden nach der LPS-Injektion.

1 Jahr nach der Bestrahlung wirkt sich die LPS-Injektion hinsichtlich der Letalität nur auf die strahlenbelasteten Tiere aus. Allerdings ist wegen der kleinen Tierzahlen der Unterschied zwischen den bestrahlten Gruppen und der unbestrahlten Gruppe statistisch nicht zu sichern.

### Zusammenhang zwischen Letalität und Granulozytenwerten

Den Werten der Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß die Endotoxingabe zu einer Granulozytose in allen Altersgruppen führt. Man vergleiche die Werte mit der Häufigkeitsverteilung der Granulozyten bei unbehandelten Tieren in Abb. 3. Die Granulozytose tritt mit einer Ausnahme auch bei den bestrahlten Tieren auf. Vier Tage nach der Bestrahlung mit 5 Gy wirkt die strahlenbedingte Granulozytopenie einem Anstieg der Granulozyten durch die Endotoxin-Gabe entgegen.

Die Gegenüberstellung der Letalitätsrate mit den Granulozytenwerten in Tabelle 2 läßt einen Zusammenhang zwischen beiden Parametern erkennen. Findet man in den jeweiligen Gruppen hohe Letalitäten, so sind auch die Granulozytenwerte hoch. In Abb.7 ist diese Abhängigkeit

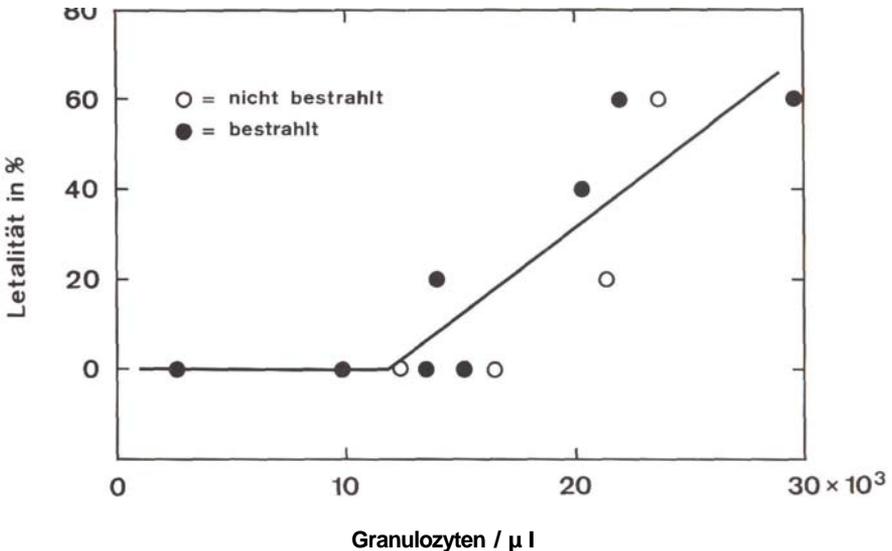


Abb. 7: Zusammenhang zwischen der Letalität und der Granulozytenzahl bei unbestrahlten und bestrahlten Mäusen (2,5 und 5,0 Gy), die zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung (Scheinbestrahlung) 400  $\mu\text{g}$  LPS erhielten. Aufgetragen ist die Letalität bei Gruppen zu 5 Tieren und die mittlere Granulozytenzahl bei den in der gleichen Gruppe 48 Stunden nach der LPS-Injektion überlebenden Tieren. Die eingezeichnete Regressionsgerade wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate unter Weglassung des Wertepaares  $2,7 \cdot 10^3 - 0\%$  ermittelt. Als Korrelationskoeffizient ergibt sich für die bei der Regressionsrechnung verwendeten Wertepaare  $r = 0,85$ .

graphisch dargestellt. Es wurde ein zweiphasiger Verlauf angenommen. Dabei wurde davon ausgegangen, daß Tiere mit geringen Granulozytenwerten nicht sterben. Für die Berechnung der Regressionsgeraden wurden mit Ausnahme der Gruppe, die 4 Tage nach der Bestrahlung mit 5 Gy eine LPS-Injektion erhielt, die anderen Parameter der Tabelle 2 verwendet. Der Schnittpunkt für beide Geraden liegt bei 11900 Granulozyten. Die kritische Grenze für den Anstieg der Letalität dürfte jedoch unter Berücksichtigung der Standardabweichungen eher bei etwa 18 000 Granulozyten pro  $\mu$ l liegen. Bei dieser Zahlenangabe muß allerdings beachtet werden, daß die Blutuntersuchungen immer 46 bis 48 Stunden nach der LPS-Injektion an überlebenden Tieren durchgeführt wurden. Es ist also durchaus möglich, daß bei den gestorbenen Tieren weitaus höhere Granulozytenzahlen vorlagen, obwohl im Abschnitt „Einfluß einer Vorbehandlung mit einer kleinen LPS-Menge auf Letalität und Granulozytenzahl“ (s. S. 56) ein Fall beschrieben wird, bei dem es sich umgekehrt verhält.

Für die Wertepaare der Regressionsgeraden ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,85$  (der Korrelationskoeffizient unter Einbeziehung aller 12 Wertepaare der Abb. 7 beträgt 0,80). Das aus dem Korrelationskoeffizienten  $r$  errechnete Bestimmtheitsmaß  $B = 0,7203$  ( $B = r^2$ ) weicht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,001$  wesentlich von Null ab. Ein Zusammenhang zwischen Granulozytenzahl und Letalität ist demnach statistisch gesichert. Mit dieser Aussage soll jedoch nicht behauptet werden, daß hohe Granulozytenzahlen die alleinige Todesursache sind.

In einigen Fällen wurden Chemilumineszenzmessungen am verdünnten Vollblut von unbestrahlten und bestrahlten Tieren durchgeführt, die 48 Stunden vor der Blutentnahme 200 oder 400  $\mu$ g LPS erhalten hatten. Trotz des Anstiegs der Granulozytenzahl fanden sich im Vergleich zu unbestrahlten und unbehandelten Kontrollen keine Änderungen in der Ausbeute des Chemilumineszenzlichts, wenn man die Werte auf gleiche Granulozytenzahlen bezog. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß keine in der Freisetzung von Sauerstoffmetaboliten verschiedene Subpopulationen von Granulozyten durch die unterschiedliche Vorbehandlung freigesetzt werden.

### *Einfluß einer Vorbehandlung mit Cystamin auf Letalität und Granulozytenzahl*

In Tabelle 3 sind Werte zusammengestellt, die sich aus Bestrahlungsversuchen ergaben, bei denen die Tiere vor der Bestrahlung Cystamin als Strahlenschutzsubstanz erhielten. Da bei den mit Cystamin vorbehandelten und mit 5,0 Gy bestrahlten Tieren (16-Wochen-Versuch, Tabelle 3)

von 5 Tieren 4 innerhalb von 48 Stunden sterben, muß angenommen werden, daß hier die Schutzsubstanz gewirkt hat und zu ähnlichen Verhältnissen führt wie bei den nichtbestrahlten Kontrolltieren. Der Unterschied zwischen der mit 2,5 Gy bestrahlten Gruppe gegenüber der mit 5,0 Gy bestrahlten Gruppe läßt sich allerdings bedingt durch die kleinen Tierzahlen statistisch nicht absichern.

Faßt man andererseits die beiden mit 2,5 Gy bestrahlten Gruppen aus dem 16-Wochen-Versuch mit dem 17-Wochen-Versuch ohne Cystamin (s. Tabelle 2) zusammen, so ist der Unterschied in den Letalitäten zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Tieren mit  $P < 0,05$  statistisch signifikant. Bei dieser Betrachtung setzt man allerdings voraus, daß sich die Wirkung des Cystamins bei einer Bestrahlung mit 2,5 Gy nicht ausgewirkt hat.

Die Granulozytenwerte entsprechen mit einer Ausnahme dem oben beschriebenen und in Abb. 7 dargestellten Zusammenhang mit der Letalität. Das Tier, das die LPS-Injektion 16 Wochen nach einer Bestrahlung mit 5Gy überlebt hat (s. Tabelle 3), besitzt dagegen einen auffallend niedrigen Granulozytenwert. Möglicherweise hat dieses Tier aus diesem Grund die Kombinationswirkung überlebt.

Tabelle 3. Letalität und Granulozytenwerte von Mäusen nach Bestrahlung und Injektion von 400  $\mu$ g Endotoxin (LPS von *S. abortus equi*). Der Beobachtungszeitraum für die Letalität nach LPS-Gabe betrug 48 Stunden. SD = Standardabweichung. Werte in () hinter SD = Anzahl Tiere für die Blutuntersuchung. Alle Tiere erhielten 5 bis 10 min vor der Bestrahlung (oder Scheinbestrahlung) 150 mg Cystamin pro kg Körpergewicht.

Zeit zw. Bestrahlung und LPS-Injektion	Dosis in Gy	Letalität Tot/Gesamt	Granulozyten/ $\mu$ l Mittelwert $\pm$ SD
4 Tage	5,0	0/2	13 293 $\pm$ 3 572 (2)
16 Wochen	0	2/5	19 430 $\pm$ 7 128 (3)
	2,5	0/5	13 529 $\pm$ 5 942 (5)
	5,0	4/5	3 535 (1)
24 Wochen	0	1/5	10 244 $\pm$ 7 074 (3)
	2,5	2/5	27 784 $\pm$ 3 632 (3)
	5,0	1/5	17 107 $\pm$ 10 362 (3)

## *Einfluß einer Vorbehandlung mit einer kleinen LPS-Menge auf Letalität und Granulozytenzahl*

### Letaleffekt

Nach Freudenberg und Galanos (1988) führt eine Vorbehandlung von Mäusen mit kleinen Mengen Lipopolysaccharid zu einer Sensibilitätsminderung gegenüber Letaleffekten von Endotoxin. Deshalb erhielten unbestrahlte und bestrahlte Tiere drei Tage vor einer Injektion mit 400/µg LPS 3 µg vom gleichen LPS in 0,1 ml Phosphatpuffer. Zum Vergleich wurde anderen unbestrahlten und bestrahlten Tieren 0,1 ml pyrogenfreier Phosphatpuffer injiziert. Von 14 bestrahlten oder nichtbestrahlten Tieren, die keine Vorbehandlung mit 3 µg LPS erhielten, starben 10 Tiere innerhalb von 48 Stunden nach der Injektion von 400 µg LPS. Dagegen überlebten alle 15 bestrahlten oder nichtbestrahlten Tiere mit 3µg LPS-Vorbehandlung die Injektion von 400 µg. Der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen ist mit  $P < 0,001$  statistisch hochsignifikant (Vierfeldertafel-Test; s. Tabelle 4).

Tabelle 4. Einfluß einer Vorbehandlung mit 3µg Endotoxin auf die Letalität von Mäusen, die 26 Wochen nach Bestrahlung (oder Scheinbestrahlung) 400 µg Endotoxin erhielten. Von den 14 Tieren (ursprünglich 15 Tiere, 1 Tier starb wenige Minuten nach der PBS-Injektion), die nur Phosphatpuffer (PBS) erhielten, starben 3 aus der nichtbestrahlten, 3 Tiere aus der mit 2,5 Gy bestrahlten und 4Tiere aus der mit 5,0 Gy bestrahlten Gruppe.

Anzahl Tiere	3 µg LPS	PBS
lebend	15	4
tot	0	10
Gesamtzahl	15	14

### Granulozyten werte

Bei den Ergebnissen, die in Tabelle 5 zusammengestellt sind, fällt auf, daß die Granulozytenwerte bei nicht mit LPS vorbehandelten Tieren höher sind als bei Tieren, die mit 3 µg LPS vorbehandelt wurden. Dies gilt sowohl für die nichtbestrahlten als auch für die bestrahlten Tiere. Allerdings sind die Unterschiede bei den mit 5 Gy bestrahlten Tiere zwischen Vorbehandlung mit LPS oder PBS nicht sehr groß. Die Werte lie-

gen mit Ausnahme der 2,5 Gy-Gruppe für die mit 3  $\mu\text{g}$  LPS vorbehandelten Tiere immer noch höher als die Normalwerte (Mittelwert: 2170; s. Text der Tabelle 5). Bei den mit 2,5 Gy bestrahlten und mit 3  $\mu\text{g}$  LPS vorbehandelten Tiere wurden Granulozytenzahlen ermittelt, die im Bereich der Normalwerte liegen.

Tabelle 5. Mittelwerte der Granulozyten  $\pm$  Standardabweichung von je zwei bestrahlten und nichtbestrahlten männlichen Mäusen, denen 26 Wochen nach der Bestrahlung 400  $\mu\text{g}$  Endotoxin (LPS von *S. abortus equi*) injiziert wurden. Die Tiere erhielten 3 Tage vor der Endotoxin-Gabe 3  $\mu\text{g}$  (in 0,1ml PBS) vom gleichen Endotoxin oder 0,1ml pyrogenfreies PBS. Der Mittelwert der Granulozyten für drei nichtbestrahlte und unbehandelte 10 Wochen alte Tiere betrug  $2170 \pm 730$ . Wegen der geringen Tierzahlen lassen sich die Unterschiede in den Granulozytenwerten zwischen den verschiedenen Vorbehandlungen statistisch nicht sichern.

Dosis in Gy	Granulozyten-Werte	
	PBS	3 $\mu\text{g}$ Endotoxin
0	35 304 $\pm$ 9 299	10 685 $\pm$ 705
2,5	33 809 (1 Tier)	3 840 $\pm$ 2 728
5,0	20 713 $\pm$ 7 637	17 821 $\pm$ 10 350

Aus der mit 5 Gy bestrahlten und mit PBS vorbehandelten Gruppe starb 1 Tier kurz nach der Blutentnahme aber noch innerhalb des 48-Stunden-Intervalls. Daher ist für Tabelle 4 nur ein überlebendes Tier für diese Gruppe angegeben.

Es ist interessant, daß das kurz nach der Blutentnahme gestorbene Tier eine Granulozytenzahl von nur 15 313 aufwies, während für das andere aus der gleichen Gruppe überlebende Tier ein Wert von 26113 ermittelt wurde. Aus dieser Gegenüberstellung geht hervor, daß die Granulozytenzahl nicht allein Ursache für die Letalität sein kann.

Die Lichtausbeute der Chemilumineszenz, bezogen auf je 1000 Granulozyten, lag in allen Gruppen für bestrahlte und unbestrahlte Tiere sowie bei Vorbehandlung mit LPS oder PBS im Bereich des mittleren Normalwerts von  $5596 \pm 3943\text{cpm}$ . Dieser Befund deutet darauf hin, daß keine in der Freisetzung von Sauerstoffmetaboliten verschiedenen Subpopulationen von Granulozyten durch die unterschiedliche Vorbehandlung aktiviert werden.

*Einfluß von Endotoxin oder Bestrahlung auf Monozyten und Makrophagen des Peritoneums*

Lipopolysaccharide

Tabelle 6. Anzahl Monozyten und Makrophagen pro  $\mu\text{g}$  Peritonealflüssigkeit bei 10 Wochen alten männlichen Mäusen nach LPS-Behandlung. Die Tiere erhielten  $200 \mu\text{g}$  LPS (*S. abortus equi*) in 0,3 ml PBS. Zum Vergleich wurden Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die nur 0,3 ml pyrogenfreies PBS bekamen. Aufgelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Zeit zwischen Injektion und Untersuchung	Behandlung	Anzahl Tiere	Monozyten	Makrophagen
1 Tag	LPS	2	$213 \pm 54$	$416 \pm 31$
1 Tag	PBS	1	450	2219
2 Tage	LPS	2	$523 \pm 438$	$682 \pm 292$
2 Tage	PBS	1	313	1894
4 Tage	LPS	2	$766 \pm 393$	$414 \pm 18$
4 Tage	PBS	1	282	2750
8 Tage	LPS	1	188	144
8 Tage	PBS	2	$360 \pm 4$	$1897 \pm 75$

Die Werte der Tabelle 6 lassen erkennen, daß eine LPS-Behandlung zu einer Verminderung der Makrophagenzahl führt, die auch noch 8 Tage nach der Injektion zu beobachten ist. Dagegen steigt die Monozytenzahl 2 und 4 Tage nach der LPS-Injektion an, um 8 Tage später wieder im Normalbereich zu liegen. Die beobachteten Verschiebungen sind möglicherweise auf die von Brugger et al. (1991) beschriebene Hemmung der Differentiation menschlicher Monozyten zu Makrophagen zurückzuführen. Die Injektion von pyrogenfreiem Phosphatpuffer (PBS) wirkt sich nicht aus. Die mit PBS ermittelten Werte liegen im Bereich der unbehandelten Kontrollen (s. Material und Methode). Von den 7 Mäusen, die eine LPS-Injektion erhielten, starb kein Tier innerhalb des angegebenen Beobachtungszeitraums.

Bestrahlung

Wie den Werten der Tabelle 7 zu entnehmen ist, führt eine Bestrahlung zu einer Verminderung der Monozyten und Makrophagen; sie ist in den

ersten Tagen nach der Bestrahlung besonders stark. Bei den Makrophagen ist in den ersten 8 Tagen eine Erholungsphase erkennbar. Insgesamt bleibt – jedenfalls in den untersuchten Zeitintervallen – die Makrophagenzahl auch 16 Wochen nach der Bestrahlung unter den Kontrollwerten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es in anderen Zeitintervallen zu überschießenden Reaktionen kommt, wie es ähnlich bei den Monozyten zu beobachten ist.

Tabelle 7. Anzahl Monozyten und Makrophagen pro  $\mu\text{l}$  Peritonealflüssigkeit bei männlichen Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 oder 5,0 Gy. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Bestrahlung 10 Wochen alt. Aufgelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. In ( ) sind die relativen Werte bezogen auf unbestrahlte Kontrollen (= 100%) angegeben.

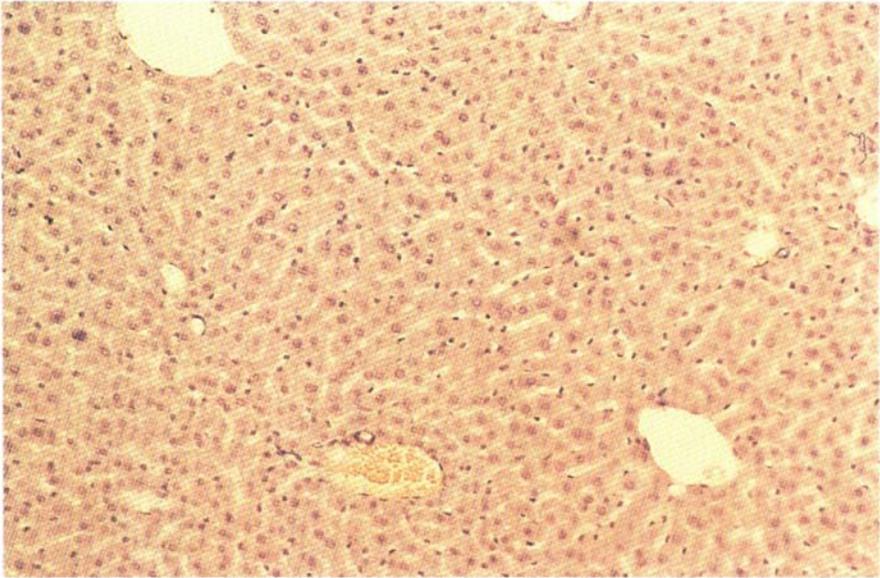
Dosis in Gy	Zeit nach Bestrahlung	Anzahl Tiere	Monozyten	Makrophagen
5,0	2 Tage	1	32 (9,2%)	194 (10,5%)
2,5	4 Tage	2	104 ± 31 (29,9 ± 8,9%)	541 ± 199 (29,2 ± 10,8%)
5,0	4 Tage	3	186 ± 128 (53,4 ± 36,8%)	790 ± 539 (42,7 ± 29,1%)
5,0	8 Tage	4	116 ± 68 (33,3 ± 19,5%)	1 232 ± 403 (66,6 ± 21,8%)
5,0	14 Tage	2	70 ± 26 (20,1 ± 7,5%)	732 ± 177 (39,6 ± 9,6%)
2,5	8 Wochen	2	654 ± 261 (187,9 ± 75,0%)	775 ± 80 (41,9 ± 4,3%)
5,0	16 Wochen	2	479 ± 22 (137,6 ± 6,3%)	988 ± 44 (53,4 ± 2,4%)

### *Histologische Untersuchungen*

#### Endotoxin-Injektion bis zu vier Tagen nach Bestrahlung

Tiere, die zwischen dem 1. und 4. Tag nach Bestrahlung mit 5 Gy eine LPS-Dosis von 200  $\mu\text{g}$  erhielten, zeigten 12 Stunden nach der Injektion ein anderes histologisches Bild als die unbestrahlten Tiere nach der

Injektion gleicher LPS-Mengen. Während bei den Kontrollen eine sehr deutliche Sternzellvermehrung erkennbar war, wobei gleichzeitig die Kernvolumina der Sternzellen zugenommen hatten und nicht selten auch Mitosefiguren in Sternzellen nachweisbar waren, war die Sternzellaktivierung bei den vorbestrahlten Tieren unabhängig vom Versuchsintervall des 1. bis 4. Tages deutlich reduziert. Bei den Kontrollen konnten in Einzelfällen Aggregate von Granulozyten, Degranulation der in ausgeweiteten Lebersinusoiden gelegenen Granulozyten und teilweise auch Verschlüsse der Sinusoide beobachtet werden. Noch deutlicher war der Unterschied, wenn die histologischen Untersuchungen 48 Stunden nach der LPS-Gabe durchgeführt wurden (s. Abb. 8a und b). Diese



**Abb. 8a:** Vermehrung und Schwellung der Endothelien im Lebergewebe einer unbestrahlten Maus, 48 Stunden nach Applikation von 200  $\mu\text{g}$  LPS, Glykogenentspeicherung der Parenchymzellen. HE-Färbung, Vergrößerung: 25 mal.

Veränderungen fehlten bei den vorbestrahlten Tieren. Ähnliche Veränderungen konnten auch am Leberparenchym selbst beobachtet werden. Die bestrahlten Tiere zeigten einen geordneten Aufbau des Leberparenchyms mit regelmäßig weitgestellten Lebersinusoiden und eine gleichmäßige Kerngröße der Leberparenchymzellen mit den für diese charakteristischen lockeren Kernchromatingerüsten. Während sich bei den unbestrahlten Tieren Einzel- und Gruppennekrosen von Leberzellen 12 Stunden nach Applikation von LPS nachweisen ließen, fehlten derartige Veränderungen bei den bestrahlten Tieren vollständig.

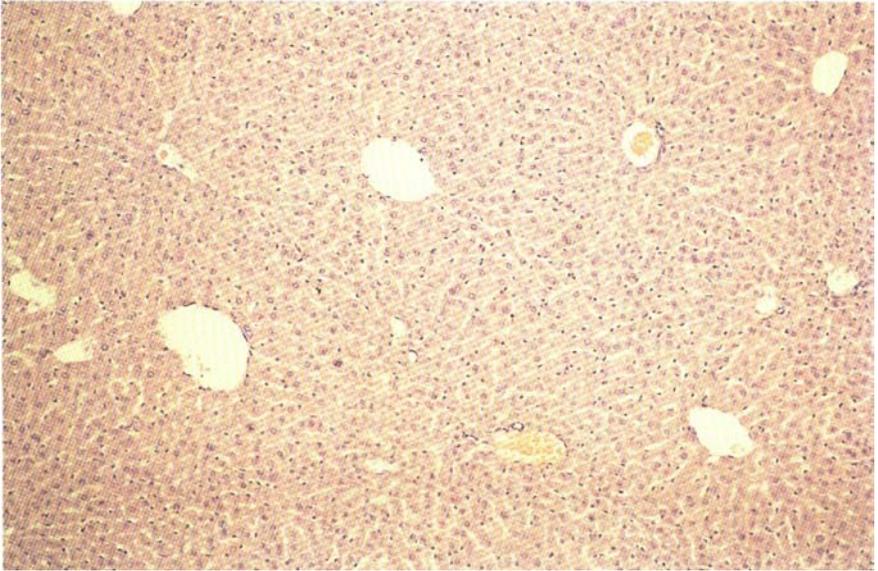


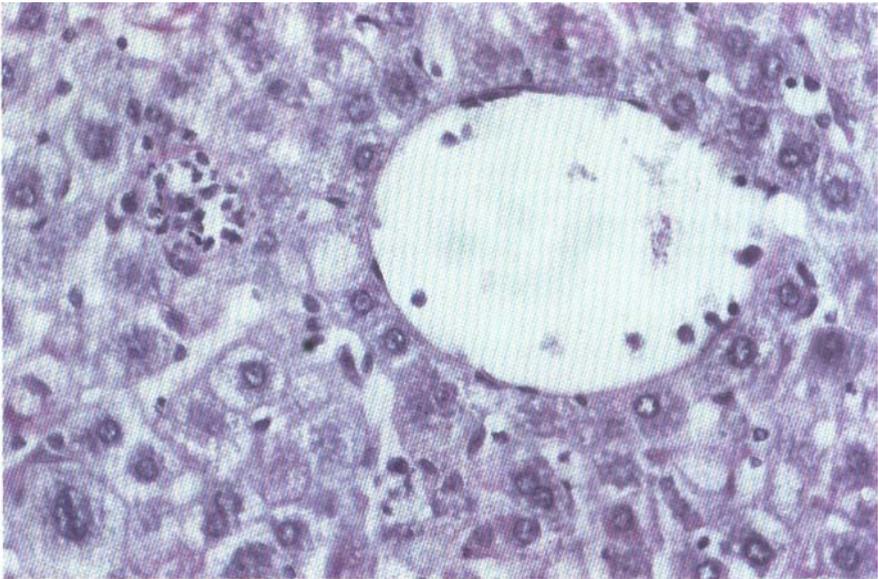
Abb. 8b: Leber einer Maus, die 4 Tage nach Bestrahlung mit 5Gy eine Injektion von 200 µg LPS erhielt. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach der LPS-Gabe. Gegenüber Abb. 8a deutlich geringere Reaktion der Endothel- und Sternzellen. Im Parenchym aber neben Glykogen Verarmung bereits deutlich Kernschwellungen. HE-Färbung, Vergrößerung: 25mal.

Andererseits konnte bei den bestrahlten Tieren eine deutliche Vergrößerung der Zellkerne, verbunden mit einem Kernödem, beobachtet werden. Wir haben dies bereits früher als Bestrahlungsfolge beschrieben (Oehlert, 1973). In beiden Versuchsgruppen war es in gleicher Weise 12 Stunden nach Injektion von LPS zu einem fast vollständigen Abbau des zytoplasmatischen Glykogens der Leberzellen gekommen. Auch diese Veränderungen konnten wir bereits in früheren Versuchen erkennen und ist als Bestrahlungsfrühfolge im Leberparenchym zu bewerten. Den gleichen Effekt beobachtet man jedoch auch nach Injektion von LPS, wobei auf den Mechanismus dieser Stoffwechselveränderungen später noch eingegangen werden soll.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß innerhalb der ersten vier Tage nach Bestrahlung ein gegenüber unbestrahlten Tieren verringerter Effekt der LPS-Injektion auf das Lebergewebe zu beobachten ist. Dabei stehen bei den vorbestrahlten Tieren die Reduktion der Sternzellaktivierung und die Verringerung des Granulozyteneinstroms und der Granulozytenadhäsion im Bereich der Sinusoiden im Vordergrund. Als Folge davon lassen sich nur bei den unbestrahlten Tieren in größerem Umfang Einzel- und Gruppennekrosen des Lebergewebes

nachweisen. Der Glykogenverlust des Leberparenchyms ist zu diesem Zeitraum sowohl bei bestrahlten als auch bei unbestrahlten Tieren nach LPS-Injektion nachweisbar.

Deutlicher noch als nach einer Versuchszeit von 12 Stunden lassen sich 48 Stunden nach LPS-Injektion die unterschiedlichen Reaktionen am Leberparenchym bei vorbestrahlten und unbestrahlten Tieren beobachten. Während in Läppchenzentren massiv aufgeblähte granuliert Leberepithelien imponieren, zeigen die vorbestrahlten Tiere derartige Veränderungen nicht. Hier ist das Leberparenchym weitgehend erhalten; es hat bereits ein Neuaufbau von Glykogen begonnen und auch die Kernschwellungen sind schon deutlich gegenüber dem Vorversuch zurückgegangen (s. Abb. 9a und b).



**Abb. 9 a:** Lebergewebe der Maus mit vollständiger Glykogenentspeicherung der Leberparenchymzellen, deutlicher Aktivierung des RES mit Sternzellvermehrung und beginnende Granulozytenaggregation in Lebersinusoiden mit Einzelnekrosen der Leberzellen. Unbestrahlte Maus 48 Stunden nach Injektion von 200  $\mu$ g LPS. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 100 mal.

Wir können feststellen, daß innerhalb von 12 bis 48 Stunden mit 2,5 oder 5,0 Gy 1 bis 4 Tage vor einer LPS-Injektion vorbestrahlte Tiere sowohl hinsichtlich der Aktivierung des RES als auch hinsichtlich der Leberparenchymveränderungen deutlich weniger ausgeprägte Schäden aufweisen als die unbestrahlten Kontrollen (s. Abb. 10a und b). Auf die Ursachen dieses Verhaltens soll später eingegangen werden.

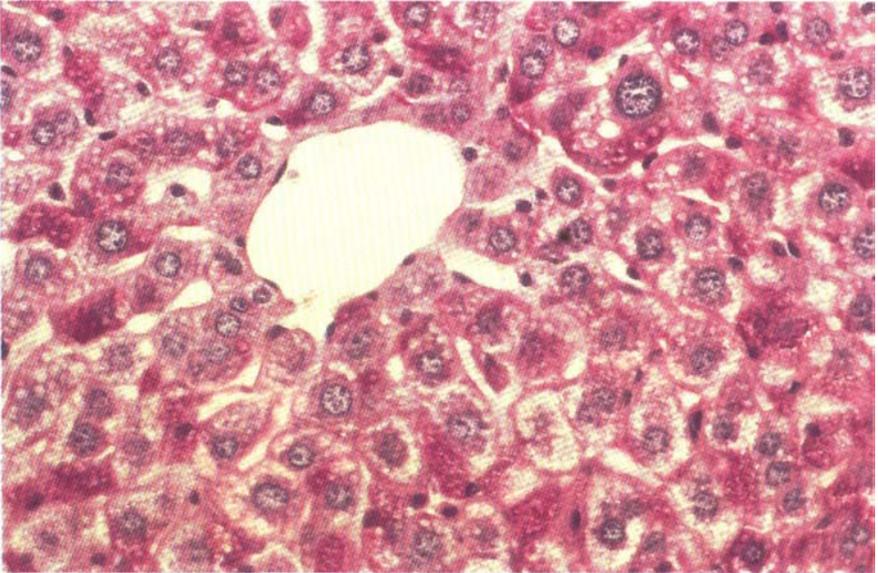
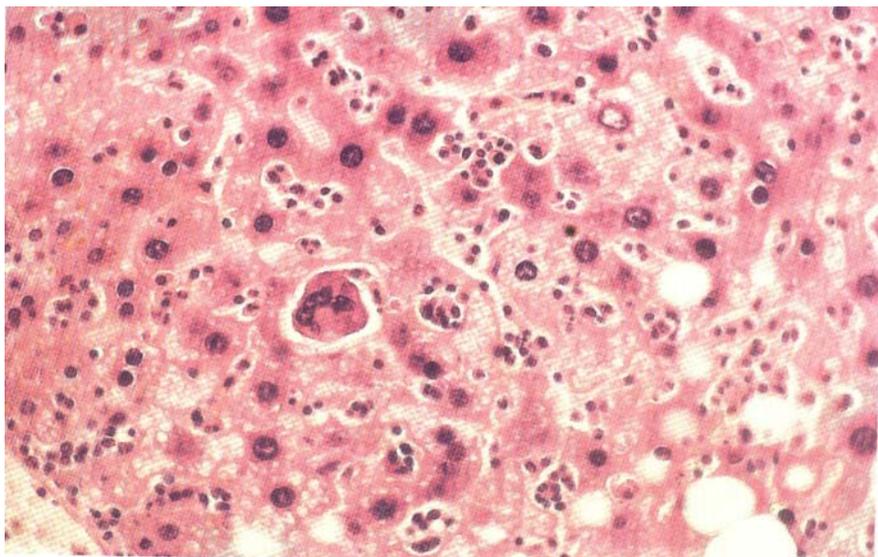


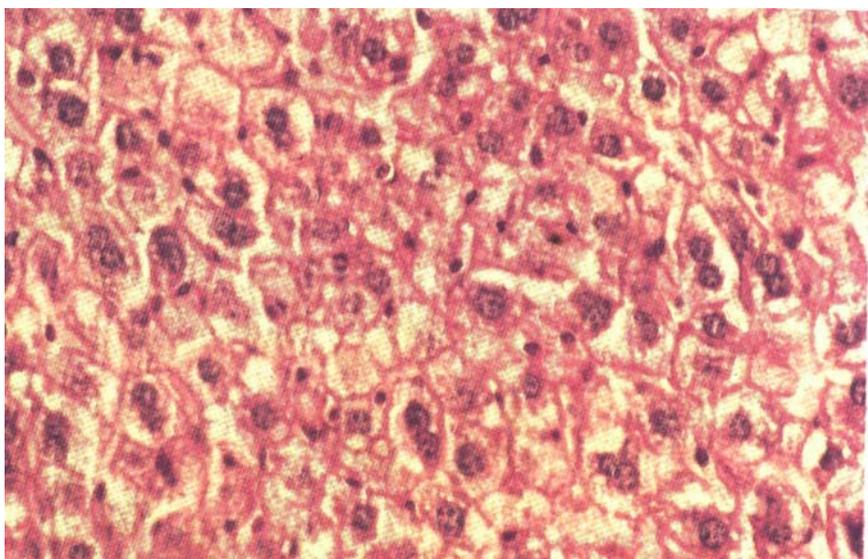
Abb. 9b: Lebergewebe aus dem Lappchenzentrum mit nur herdförmiger Glykogenverarmung der Parenchymzellen. Nur unwesentliche Aktivierung des RES. Die Maus erhielt 4 Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy eine Injektion von 200  $\mu$ g LPS. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach der LPS-Gabe. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 100 mal.

Abb. 10a: Unbestrahlte Maus, 48 Stunden nach Injektion von 400  $\mu$  LPS. Ausgeprägte Schockreaktion der Leber mit ausgedehnten Lebersinusoiden, die mit aktivierten Sinusendothelien angefüllt sind und ausgeschwemmte Megakaryozyten in ausgedehnten Lebersinusoiden. Zahlreiche zugrundegehende Leberepithelien mit umgebender granulöser Reaktion. HE-Färbung, Vergrößerung: 60mal.  
(siehe S. 64)

Abb. 10b: Vorbestrahlte Maus, 48 Stunden nach Applikation von 400  $\mu$  LPS. Die LPS-Gabe erfolgte 4 Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy. Glykogenentspeicherung der Leberzellen und massive Schwellung des Zytoplasmas mit deutlicher Einengung der Lebersinusoiden. Mäßiggradig ausgeprägte Kernpolymorphie. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 60mal.  
(siehe S. 64)



**Abb. 10 a**



**Abb. 10 b**

## Endotoxin-Injektion 2 bis 24 Wochen nach Bestrahlung

Andere Verhältnisse als oben beschrieben beobachten wir, wenn die Injektion von LPS 2 bis 24 Wochen nach einer Ganzkörperbestrahlung erfolgt. In diesen Fällen ist die typische Leberstruktur vollkommen aufgehoben und man beobachtet eine bienenwabenähnliche Struktur mit den sich in der PAS-Färbung darstellenden perisinusoidalen Räumen, welche die außerordentlich enggestellten Lebersinusoiden begrenzen. Die Engstellung der Sinusoide ist bedingt durch eine extreme Aufblähung der Leberepithelien, deren Zytoplasma eine feingranuläre Umstrukturierung erkennen läßt. Gleichzeitig fällt auf, daß die Zahl der doppelkernigen Leberepithelien drastisch zugenommen hat und daß außerdem eine erhebliche Vergrößerung des Kernvolumens der Leberzellen besteht. Nicht selten lassen sich Kernvakuolen nachweisen, an anderen Stellen auch riesig vergrößerte Nukleolen als Ausdruck einer gesteigerten Stoffwechselleistung der Leberzellen. Als Folge der Kompression der Lebersinusoiden durch die aufgeblähten Leberzellen kommt es zu einem reduzierten Blutabfluß bzw. Blutdurchfluß durch die Leberläppchen, was sich im histologischen Bild in einer extremen Weitstellung der Zentralvenen manifestiert (s. Abb. 11a). Vereinzelt lassen

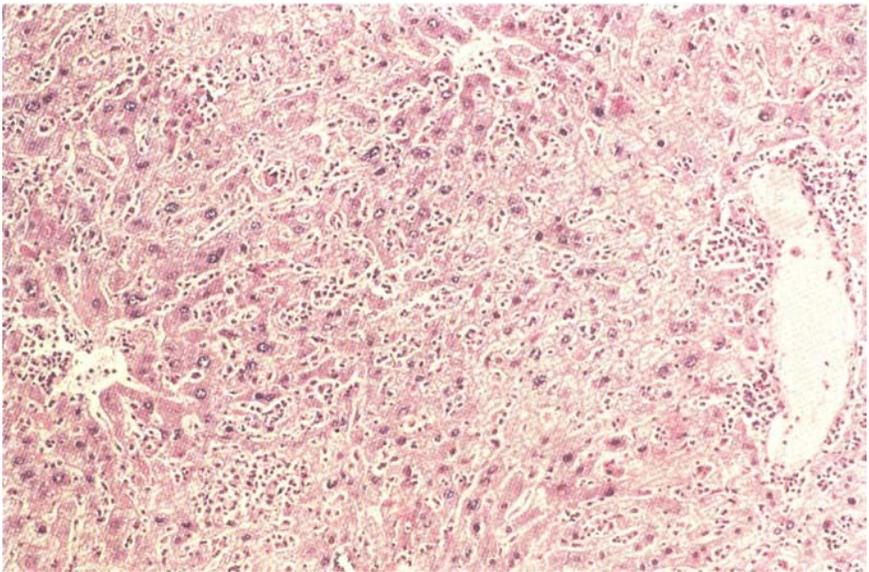
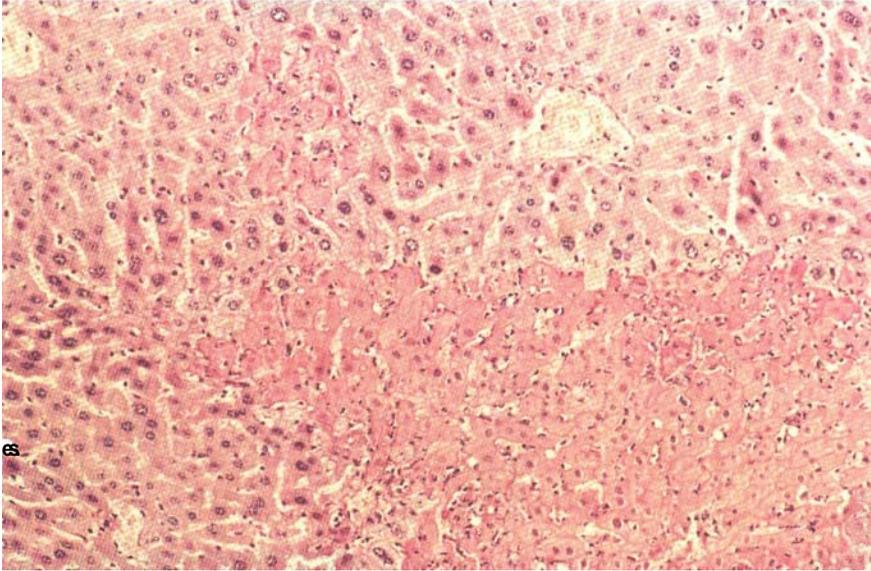


Abb. 11a: Lebergewebsveränderungen bei einer Maus 48 Stunden nach Injektion von 200  $\mu\text{g}$  LPS. Die LPS-Gabe erfolgte 24 Wochen nach einer Scheinbestrahlung. Deutliche schockbedingte Veränderungen am Leberparenchym mit praktisch vollständiger Glykogenspeicherung aber mit Einzelnekrosen von Leberzellen und Dilatation der Lebersinusoiden, in denen aktivierte Endothelzellen liegen. Perivaskuläre Granulozytenaggregation. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 40mal.

sich zu diesem Zeitpunkt auch bereits Nekrosezonen, vor allem im Bereich der Läppchenperipherie nachweisen. Noch schwerer ausgeprägte Leberzellveränderungen mit Ausbildung von Massennekrosen haben wir nach LPS-Injektion praktisch nur bei Tieren beobachten können, denen 2 bis 24 Wochen vor der LPS-Injektion 2,5 oder 5 Gy verabreicht worden waren (s. Abb. 11 b).



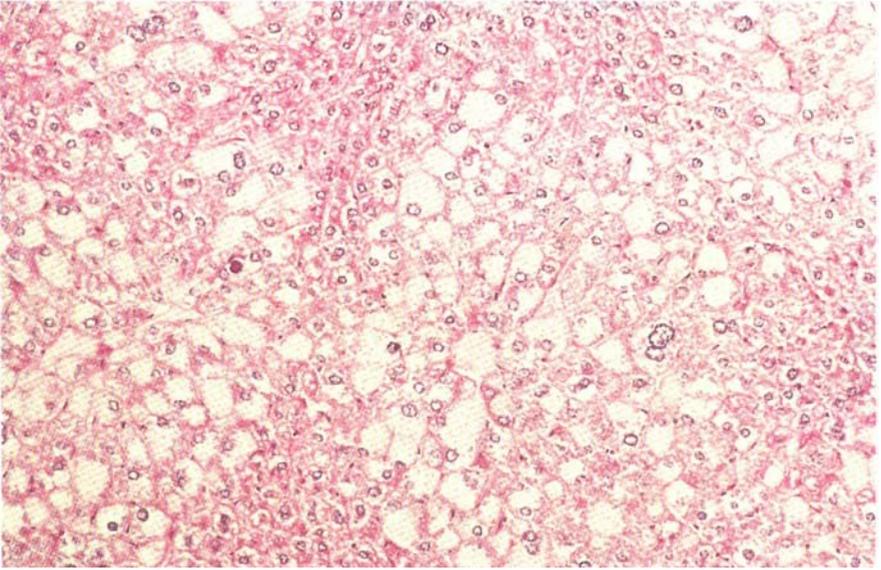
**Abb. 11b: Massennekrose des Lebergewebes mit umgebender granulozytärer Reaktion. Praktisch vollständige Glykogenspeicherung der Leberparenchymzellen, ganz ausgeprägte Kernpolymorphie im Lebergewebe. 24 Wochen nach Bestrahlung mit 5 Gy erhielt die Maus 200  $\mu\text{g}$  LPS. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach LPS-Applikation. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 40maL.**

Im Lungengewebe sind deutliche Leukozytenaustritte im Bereich der Alveolarsepten zu beobachten. Das Endothel kleiner Gefäße ist geschwollen und man findet hier adhärenente Granulozyten.

Bestrahlungen, bei denen den Tieren vorher Cystamin-Injektionen verabreicht wurden (s. Tabelle 3), hatten mäßiggradig gesteigerten Effekt auf die verstärkte Wirkung von LPS (s. Abb. 12 a und b).

#### Endotoxin-Injektion 1 Jahr nach Bestrahlung

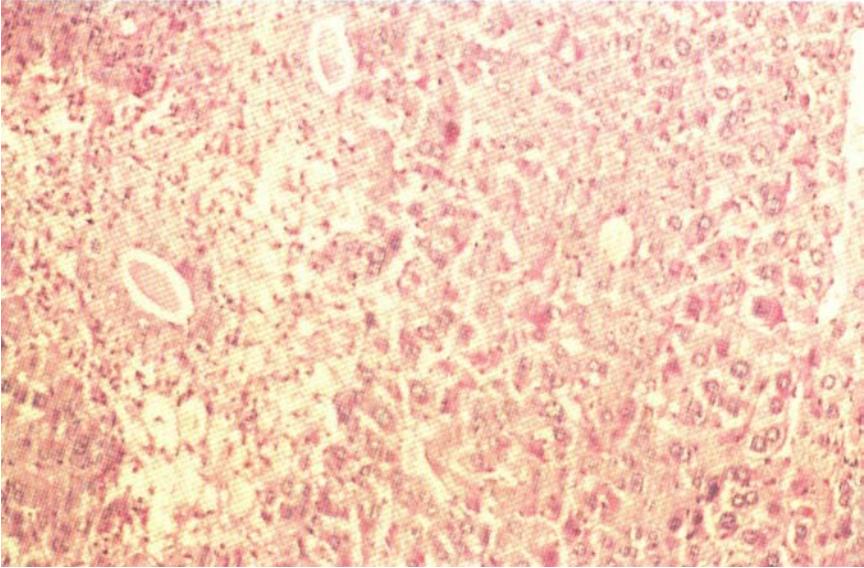
In einer weiteren Gruppe von Versuchstieren erfolgte die LPS-Injektion 1 Jahr nach der Bestrahlung mit 2,5 bzw. 5 Gy. Bei diesen Tieren hatten sich bereits vereinzelt Tumoren entwickelt, und das Lebergewebe zeigt



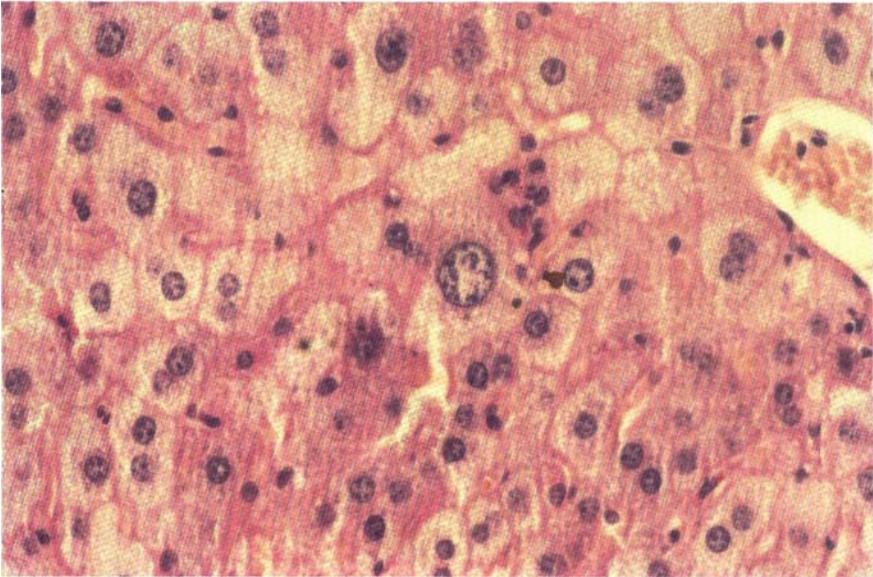
**Abb. 12 a:** Lebergewebe einer Maus, die vor einer Bestrahlung mit 5 Gy Cystamin erhielt. 24 Wochen nach der Bestrahlung erhielt das Tier eine Injektion von 200  $\mu$ -g LPS. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach der LPS-Gabe. Kernpolymorphie im Lebergewebe und fast vollständige Glykogenspeicherung. Auffallende Aufblähung der Leberepithelien ohne Nachweis größerer Nekroseherde. Nur mäßiggradig ausgeprägte Aktivierung des RES. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 40mal.

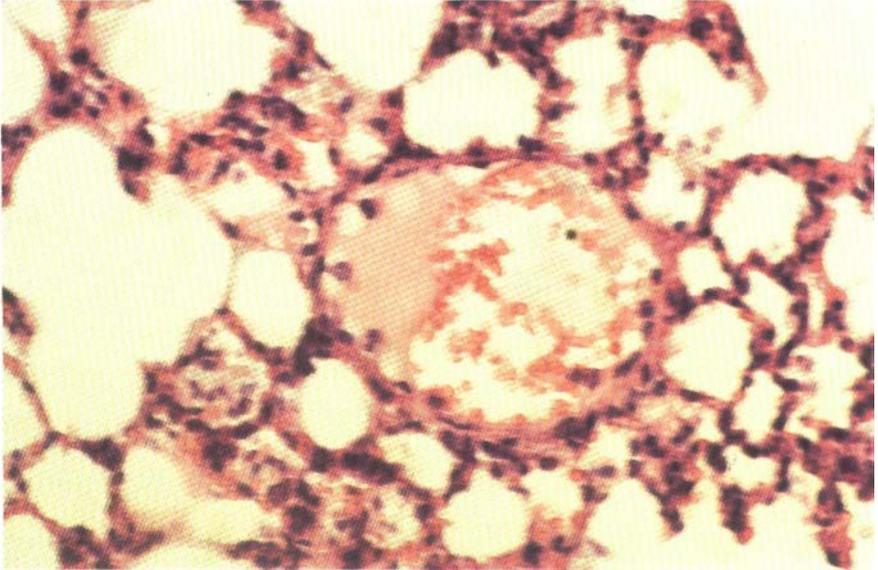
die für einen chronischen Strahlenschaden charakteristischen Veränderungen. Dabei stehen Kernveränderungen ganz im Vordergrund (s. Abb. 13). Neben einer ausgeprägten Kernpolymorphie beobachtet man Verklumpungen und Veränderungen des Kernchromatins, das Auftreten atypischer Mitosen bei einer allgemeinen Vermehrung der mitotischen Aktivität sowie andere Zeichen einer Steigerung des zellulären Eiweiß- und Nukleinstoffwechsels als deren Ausdruck eine vermehrte Basophilie des Zytoplasmas angesehen werden kann. Bei anderen Tieren hatten sich bereits Leukämien entwickelt. Auch am Sternzellensystem der Leber fanden sich Veränderungen im Sinne von Kernvergrößerungen, Kernverklumpungen und einer vermehrten mitotischen Aktivität mit Nachweis atypischer Mitosefiguren.

Die Injektion von 200  $\mu$ g LPS zeigte im Vergleich zu den beschriebenen Veränderungen der Tiere im Versuch mit einem 24-Wochen-Intervall ähnliche Effekte. Es erfolgte eine weitere Abnahme des ohnehin schon reduzierten Glykogengehalts der Leberzellen. Jedoch konnten die vor allem in der vorher beschriebenen Versuchsgruppe (24-Wochen Intervall) gezeigten Zytoplasmaveränderungen nicht in der Ausprägung nachgewiesen werden.



**Abb. 12b:** Leberveränderungen einer Maus nach Bestrahlung mit 5 Gy *ohne* Cystaminvorbehandlung. 24 Wochen nach der Bestrahlung erhielt das Tier eine Injektion von 200  $\mu\text{g}$  LPS. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach der LPS-Gabe. Flächenhafte Leberzellnekrosen in der linken Bildhälfte, ausgeprägte Kernpolymorphie, Glykogenhafte Leberzellnekrosen in der linken Bildhälfte, ausgeprägte Kernpolymorphie, Glykogenhafte Leberzellnekrosen und Aktivierung des RES der Leberzellen in der rechten Bildhälfte. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 40mal.

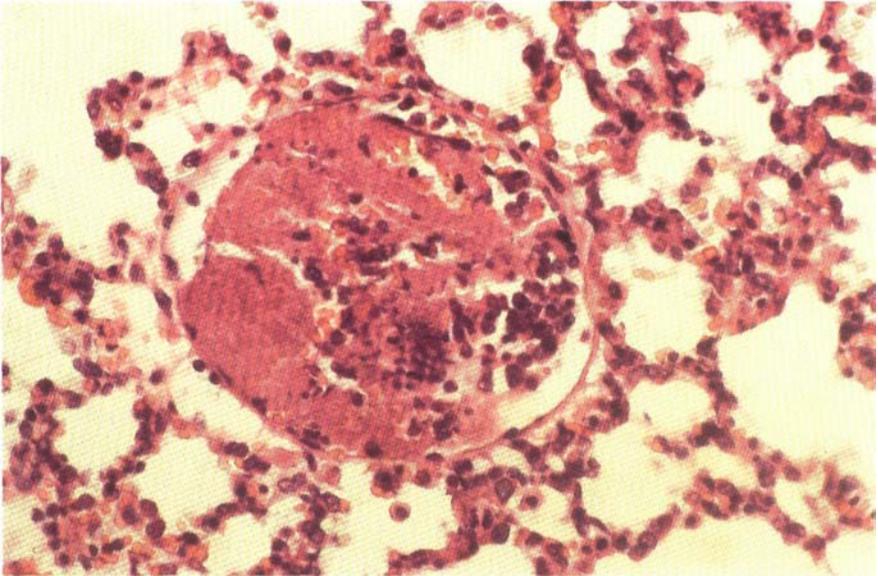




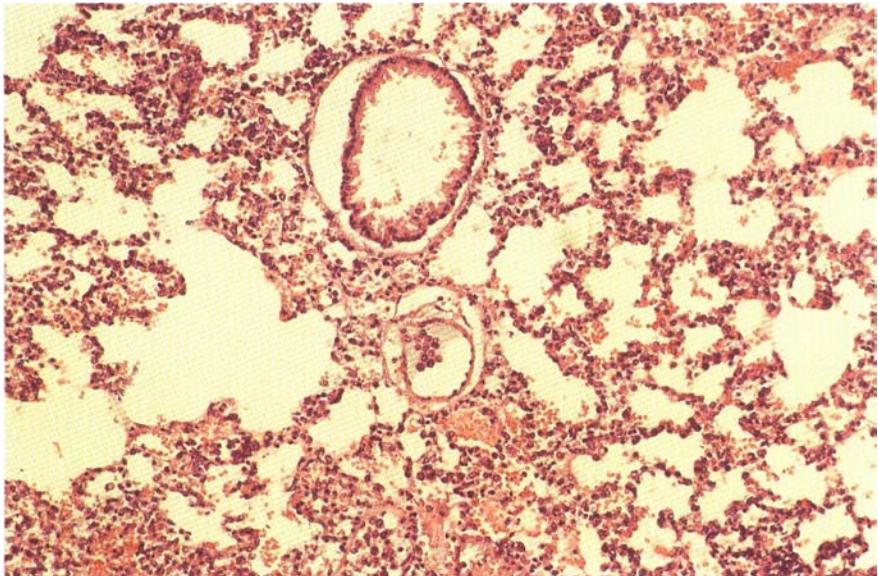
**Abb. 14a:** Lungengewebe mit kleinem Gefäß bei einer unbestrahlten Maus 48 Stunden nach Injektion von 400 µg LPS. Die LPS-Gabe erfolgte 1 Jahr nach Scheinbestrahlung. Deutliche Granulozytenaggregation an der Gefäßwand, beginnende Plättchentromben in der oberen Hälfte des Gefäßes. Granulozytenaggregation innerhalb der ödematös aufgelockert und verbreiterten Alveolarsepten. HE-Färbung, Vergrößerung: 100mal.

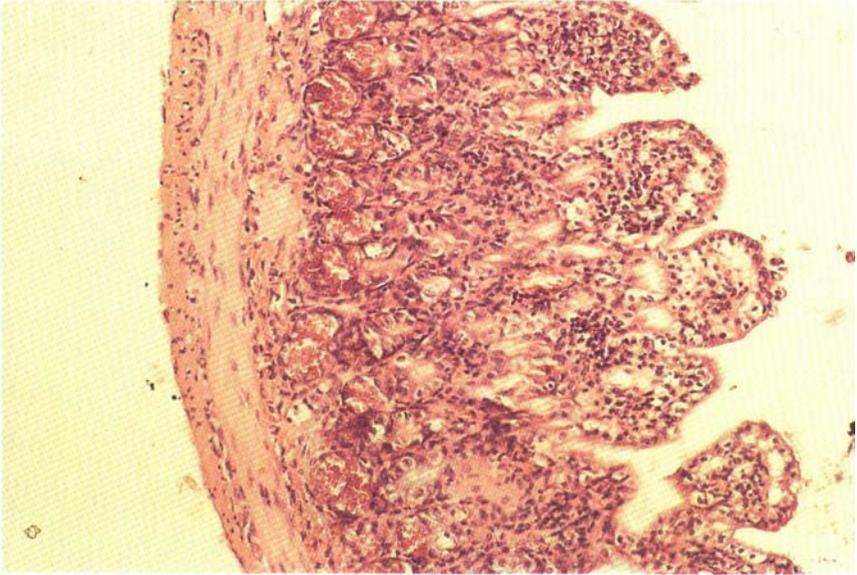
Mäuse, denen 1 Jahr nach der Bestrahlung 400 µg Endotoxin injiziert wurde, zeigten eine hohe Absterberate (s. Tabelle 2). Bei den überlebenden Tieren konnten schwere Lungenveränderungen mit Ausbildung von Mikrothromben beobachtet werden (s. Abb. 14a, b und c). Auch die Darmschleimhaut wies schwere histologische Veränderungen auf (s. Abb. 15), die bei dieser Versuchszeit mit für die hohe Absterberate verantwortlich zu machen sind. Im Lebergewebe waren Massennekrosen ähnlich wie in Abb. 13 vorhanden, daneben fanden sich Mikrothromben und Blutungen.

**Abb. 13:** Lebergewebe der Maus, 1 Jahr nach Bestrahlung mit 5 Gy, 48 Stunden nach Applikation von 400 µg LPS. Deutlich erkennbare Kernpolymorphie als Bestrahlungsfolge, Zytoplasmaveränderungen und Aggregation von Granulozyten als Folge der LPS-Behandlung. PAS-Reaktion, Vergrößerung: 63mal.



**Abb. 14b:** Mikrothromben in kleinen Lungengefäßen einer Maus, die 1 Jahr nach Bestrahlung mit 5 Gy eine Injektion von 400  $\mu\text{g}$  LPS erhielt. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach der LPS-Gabe. Thrombotischer Verschuß eines kleinen Lungengefäßes. Die Gefäßlichtung wird ausgefüllt von thrombotischem Material, das z. T. aus Blutplättchen, aber auch aus Granulozyten besteht. Deutliche Aktivierung und Kernpolymorphie der Endothelien in den Alveolarsepten des umgebenden Lungengewebes. HF-Färbung, Vergrößerung: 100mal.





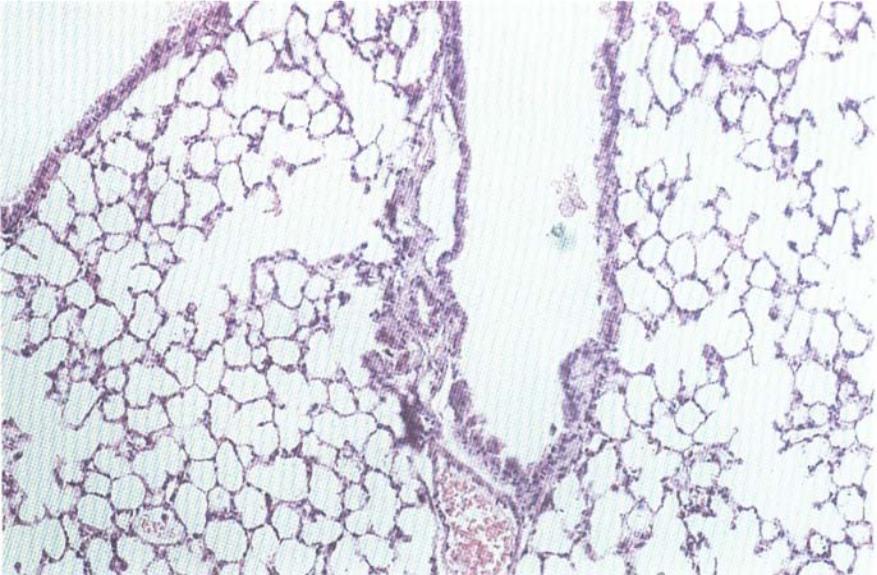
**Abb. 15:** Zottenatrophie, interstitielles Ödem und oberflächliche Epitheldefekte im Bereich der Zottenspitze bei einer Maus, die 1 Jahr nach Bestrahlung mit 5 Gy 400 µg LPS erhielt. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach der LPS-Injektion. Im Kryptenbereich erkennt man eine Vermehrung und Vergrößerung der Panethschen Körnerzellen, die z. T. degranuliert sind. HE-Färbung, Vergrößerung: 25mal.

### Einfluß einer Vorbehandlung mit einer kleinen LPS-Menge

In einem zusätzlichen Versuch, basierend auf Ergebnissen anderer Autoren, die durch Applikation bestimmter Substanzen, wie kleine Dosen von Lipopolysacchariden oder intrakutane Injektion von Terpeninöl, einen Schutzeffekt gegenüber der Wirkung von Endotoxin erzielen konnten, erhielten Mäuse nach einer 26 Wochen vorher erfolgten Bestrahlung 3 Tage vor Injektion von 400 µg Endotoxin eine einmalige Dosis von 3 µg LPS (s. auch S. 56). Bei den unbestrahlten und bestrahl-



**Abb. 14c:** Lungengewebe einer Maus, die 1 Jahr nach Bestrahlung mit 5 Gy eine Injektion von 400 µg LPS erhielt. Die Präparation erfolgte 48 Stunden nach der LPS-Gabe. Verbreiterung der Alvearsepten durch Ödem und Infiltration durch Granulozytensticking in kleinen Gefäßen. Reduktion des Lumens der Alveolarlichtungen, Blutungen im Parenchym (Mitte, unterer Bildrand), Kernpolymorphie der Alveolardeckzellen. HE-Färbung, Vergrößerung: 25mal.



**Abb. 16a:** Lungengewebe einer Maus, die 26 Wochen nach einer Bestrahlung mit 5 Gy 400  $\mu\text{g}$  LPS erhielt. Vor der LPS-Gabe erfolgte eine Vorbehandlung mit 3  $\mu\text{g}$  LPS. Die Präparation wurde 48 Stunden nach der Injektion von 400  $\mu\text{g}$  LPS durchgeführt. Praktisch normales Lungengewebe mit luftgefüllten Alveolarlichtungen, schmalen Alveolarsepten ohne granulozytäre Infiltration. HE-Färbung, Vergrößerung: 25mal.

ten Tieren war vor allem in den Lungen ein deutlicher Schutzeffekt erkennbar. Dieser bezog sich insbesondere auf die Reduktion der Aktivierung des RES, auf den Einstrom von Granulozyten und auf die Ausbildung von Mikrothromben (vergleiche Abb. 16 a mit Abb. 16 b). Weniger deutlich war ein derartiger Schutzeffekt am Leberparenchym. Auffallend ist vielleicht, daß bei unbestrahlten Tieren, denen vor der Erfolgseinjektion von Endotoxin eine kleine Dosis von LPS verabreicht worden war, in der Leber zahlreiche Knochenmarkselemente aufgefunden werden konnten, insbesondere Megakaryozyten, die möglicherweise auf eine verstärkte Ausschüttung von Knochenmarkselementen in das periphere Blut anzusehen sind.

## Diskussion

Lipopolysaccharide, in der Zellwand gramnegativer Bakterien lokalisiert, zeichnen sich durch vielfältige Aktivitäten aus. Sie stellen die O-Antigene der Bakterien dar. Sie sind hochwirksame Endotoxine und fungieren als Rezeptoren für Bakteriophagen (Galanos et al., 1977).

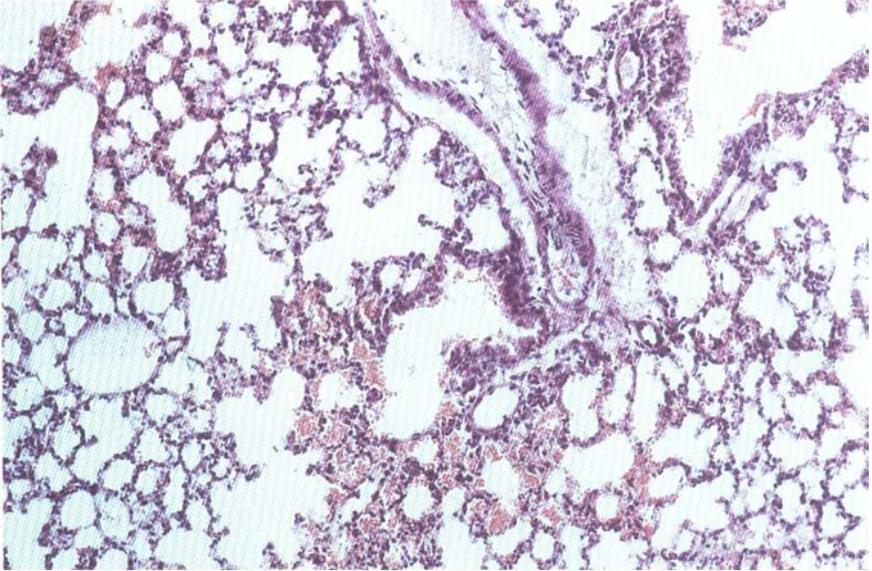


Abb. 16b: Lungengewebe einer Maus, die 26 Wochen nach einer Bestrahlung mit 5 Gy 400  $\mu$ g LPS erhielt. *Keine* Vorbehandlung mit LPS. Im Gegensatz zum histologischen Bild der Abbildung 16 a findet man neben Blutungen (Bildmitte) eine deutliche Verbreiterung der Alveolarepten durch Ansammlung von Granulozyten und Eiweiinsudation. HE-Färbung, Vergrößerung:25mal.

Außerdem üben sie, in kleinen Mengen vor der Bestrahlung an Sugertiere verabreicht, eine strahlenschutzende Wirkung aus (Behling, 1983).

Bei nichtbestrahlten Tieren führen 400  $\mu$ g LPS von *S.abortus equi*, gemittelt über alle Altersgruppen des von uns verwendeten Musestamms, zu ca. 30% Todesfällen innerhalb von 48 Stunden durch Endotoxinschock (s. Abb. 6). Allerdings scheinen 10 Wochen alte Tiere weniger empfindlich zu sein (LD 0) als ältere Tiere (s. Tabelle 1). Die Versuche, die sich bis zu einem Jahr nach der Bestrahlung erstreckten, haben gezeigt, daß es Phasen sehr unterschiedlicher Sensibilität bei der Endotoxingabe gibt. Dieses Verhalten ist anhand unterschiedlicher Letalitätsraten, aber auch auf Grund histologischer Befunde zu beobachten. Außerdem haben die histologischen Untersuchungen ergeben, daß in diesem Zeitraum deutliche regeneratoische Veränderungen, vor allem in der Leber, in der Dunnarmschleimhaut und in der Magenschleimhaut ablaufen, wobei die Zahl der ausdifferenzierten Zellen gegenüber den mitotisch aktiven Zellen reduziert ist.

Zur Erklärung der Befunde können Wirkungsmechanismen herangezogen werden, die in der Literatur beschrieben sind. Endotoxine induzie-

ren die Bildung von hochaktiven Mediatoren (Friedman et al., 1989). Eine unterschiedliche Letalität durch verschiedene Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Fähigkeit der Cytokin-Bildung dieser Endotoxine zurückzuführen (Loppnow et al., 1990). Ein besonders wirksames Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 45 000, der Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ), wird von Monozyten und Makrophagen nach Endotoxinexposition synthetisiert und freigesetzt (Beutler und Cerami, 1986). Lymphozyten setzen ebenfalls einen Tumornekrosefaktor, TNF- $\beta$ , frei (Meager, 1990). TNF- $\alpha$  (Cachectin) ruft vielfältige biologische Aktivitäten hervor (Vilcek und Lee, 1991). So konnte u. a. gezeigt werden, daß TNF- $\alpha$  die Hydroxyl-Konzentration in Säugetierzellen steigert (Yamauchi et al., 1989).

Von Interesse sind Untersuchungen über die Wirkung des Tumor-Nekrose-Faktors in Verbindung mit Bestrahlungen. So konnten Wong et al. (1991) nachweisen, daß die Bestrahlung von Zellen die Produktion von TNF- $\alpha$  induziert. Andererseits bewirkt TNF- $\alpha$  bei Mäusen und multipotenten Stammzellen des Bluts einen Strahlenschutz, wenn die Substanz vor der Bestrahlung gegeben wird (Neta et al., 1988; Slordal et al., 1989; Warren et al., 1990). Das ebenfalls durch LPS induzierte Interleukin IL-1 (Meager, 1990) wirkt auch als Strahlenschutzsubstanz; allerdings nur, wenn es Mäusen vor der Bestrahlung injiziert wird (Wu et al., 1989; Schwartz et al., 1990). Deshalb ist in unseren Untersuchungen kein Schutzeffekt durch endotoxininduziertes TNF oder IL-1 nach der Bestrahlung zu erwarten. Bei Patientinnen mit Brustkrebs konnte nachgewiesen werden, daß die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch Monozyten nach der Bestrahlung höher ist als vor der Bestrahlung (Wasserman et al., 1991).

Kupffer-Zellen stellen die größte Population von Makrophagen im Körper dar. Endotoxin wird speziell von Kupffer-Zellen aufgenommen, die dadurch aktiviert werden und u. a. Prostaglandine, Thromboxane, Interleukine, den Tumornekrosefaktor und Sauerstoffradikale ausscheiden (Wisse et al., 1989). Auch bei in vitro Untersuchungen an Leberzell-Kulturen ergab sich, daß LPS die Hepatozyten schädigt, wenn funktionell intakte Kupffer-Zellen anwesend sind (Hartung, Wendel, 1991). Insofern kommt der Betrachtung der Leber bei der Beurteilung der durch Strahlung in Kombination mit Endotoxinen gesetzten Schäden eine große Bedeutung zu.

Galanos und Mitarb. (1988) konnten in tierexperimentellen Versuchen mit Mäusen zeigen, daß die durch LPS von *S. abortus equi* hervorgerufene Letalität von Makrophagen ausgeht, die den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ ) freisetzen. In anderen tierexperimentellen Versuchen an Mäusen konnten Harmsen und Havell (1990) darlegen, daß TNF eine Akku-

mulation von Neutrophilen hervorruft. In vitro Versuche mit menschlichen peritonealen Makrophagen haben ergeben, daß LPS auch zu einer Ausschüttung eines Proteins aus diesen Zellen führt, das kein TNF oder ein anderes der bekannten Cytokine ist (Megyeri et al., 1990). Auch dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 45000-60000 kann sehr wirksam die Infiltration von Granulozyten induzieren.

Bei der Bedeutung, die Monozyten bzw. Makrophagen einerseits und Granulozyten andererseits für den Ablauf einer Endotoxinreaktion zukommt, wird klar, daß die Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung einen entscheidenden Einfluß auf diese Vorgänge besitzt. Charakteristisch nach Ganzkörperbestrahlungen sind oszillierende Verläufe der Zellzahlen, die auf kompensatorisch regenerative Prozesse zurückzuführen sind (Fliedner, 1973). 24 bis 48 Stunden nach Bestrahlung besteht bei den Tieren eine Granulozytopenie. Vier Tage nach einer Bestrahlung mit 5 Gy ist nach Endotoxin-Gabe die Granulozytenzahl nicht wesentlich erhöht (s. Tabelle 3). Ferner ist die Anzahl der Monozyten und Makrophagen in den ersten Tagen nach der Bestrahlung deutlich erniedrigt (s. Tabelle 7). Auch bei der Untersuchung der alveolären Makrophagen der Maus (Gross, 1977) und der Ratte (Sablonniere et al., 1983) konnte nach Bestrahlung der Tiere eine frühzeitige Abnahme der Zellzahl mit anschließender Erholung beobachtet werden. Das Ausbleiben der durch LPS ausgelösten Reaktionen in den ersten Tagen nach der Bestrahlung sollte vor allen Dingen auf die verminderte Zellzahlen der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen zurückzuführen sein. In ähnlicher Weise haben Rothstein und Schreiber (1988) beschrieben, daß eine  $\gamma$ -Bestrahlung von Mäusen mit 6,5 Gy die durch aufeinanderfolgende Gabe von LPS und Tumor-Nekrose-Faktor ausgelöste hämorrhagische Nekrose (Shwartzmann Reaktion) durch Leukopenie verhindert. Andererseits war die Letalitätsrate nach Endotoxingabe bei Mäusen gesteigert, wenn die Tiere 5 Tage vorher eine Bestrahlung mit der sehr hohen Dosis von 10 Gy erhielten, wodurch eine schwere Granulozytopenie hervorgerufen wurde (Walker und Sheil, 1976).

In der Folgezeit kommt es zu einer Normalisierung der Werte der Blutzellzahlen oder zu überschießenden Reaktionen. Besonders drastisch wirkt sich das Endotoxin 1 Jahr nach der Bestrahlung aus (s. Tabelle 2). Der Zusammenhang zwischen der Letalitätsrate und den Zellzahlen der Granulozyten, Monozyten sowie Makrophagen geht auch aus dem Versuch mit einer Vorbehandlung der Tiere mit einer kleinen LPS-Menge hervor (s. Tabellen 4, 5 und 6). Immer wenn die Zellzahlen verhältnismäßig gering sind, ist auch die Letalitätsrate klein.

Nach den oben beschriebenen Reaktionen muß angenommen werden, daß der Tumornekrosefaktor eine erhöhte Adhärenz der Granulozyten in der Mikrozirkulation bewirkt, die letztlich über die Sequestration

zum Multiorganversagen, einem septischen Schock und zum Tode führt. Möglicherweise spielen auch noch weitere Vorgänge eine Rolle für eine Kombinationswirkung zwischen Strahlung und Endotoxin. So konnte in einer klinischen Studie gezeigt werden, daß eine TNF-Reaktion nur in bestrahltem Tumor-Gewebe zu beobachten ist (Aboulafia et al., 1990). Dieser Befund läßt die Autoren vermuten, daß die Bestrahlung zu einem verstärkten Effekt des TNF führt.

Die in den histologischen Untersuchungen gefundenen feingeweblichen Veränderungen bei Mäusen nach Injektion von Endotoxin lassen sich in folgender Weise zusammenfassend darstellen.

Feingewebliche Veränderungen nach Injektion von Endotoxin	
Kapillar-Gefäßsystem	Parenchym
Endothelschwellung (1), Zellneubildung Granulozyteneinstrom Granulozyten-, „Sticking“ (2) Mikrothromben (3)	Glykogenverlust (Leber) (4)  Nekrosen, Blutungen Anurie Durchfälle Lebersversagen Lungenblähung Rechtskardiales Herzversagen

(1): s. Abb. 8a und b; (2): s. Abb. 14c; (3): s. Abb. 14a und b; (4): Abb. 9a und b

Bei der Besprechung und Erklärung der von uns erhaltenen Ergebnisse kann zunächst einmal festgestellt werden, daß Befunde über gleichartige Untersuchungen bisher nicht vorliegen. Andererseits existieren Versuche, in denen der durch Injektion von Lipopolysacchariden in Gang gesetzte Schädigungsmechanismus vor allem an der Leber untersucht wird (s. z. B. Wisse et al., 1989), wobei ebenfalls durch die zusätzliche Applikation anderer Substanzen einmal eine Schutz- zum anderen eine Verstärkerwirkung gefunden werden konnte. Eine Verstärkerwirkung konnte dabei für Galaktosamin nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für den neutrophilen Influx in die Leber als auch für das Ausmaß

der Leberparenchymschädigung, gemessen am Alaninaminotransferase-Anstieg im Serum. Durch Galaktosamin erfolgt somit eine Sensibilisierung des Leberparenchyms gegenüber Lipopolysacchariden. Shiratori et al. (1990) können in tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, daß Galaktosamin Hepatozyten für eine Schädigung durch Sauerstoffradikale prädisponiert, die durch LPS-aktivierte Makrophagen erzeugt werden. Unter den Mediatoren, welche eine Aktivierung des neutrophilen Systems mit Granulozyteninflux, Granulozytenzerfall und so genanntem Granulozytensticking auslösen, spielt offensichtlich der Tumornekrosefaktor eine entscheidende Rolle. Seine Freisetzung erfolgt offensichtlich über eine Stimulation und Aktivierung von Endothelzellen, wobei die Kupfferschen Sternzellen in der Leber eine wesentliche Rolle spielen. Das gleiche gilt auch für die Wirkung von Endotoxin auf die Glykogenolyse in der Leber, die stimuliert wird durch die Nichtparenchymzellen der Zellen, vor allem die Kupfferschen Sternzellen. Hierbei dürfte eine Aktivierung und eine Zunahme der Produktion von Prostaglandin-D2 innerhalb der Kupfferschen Sternzellen mit nachfolgender Glykogenolyse und Glukoseproduktion der Parenchymzellen erfolgen. Damit lassen sich zwei der von uns beobachteten Phänomene durch eine Stimulation und Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen erklären, und wir müssen annehmen, daß die verminderte Sensibilität der vorbestrahlten Leber nach 1 bis 4 Tagen über eine Veränderung des Makrophagensystems bzw. der Kupfferschen Sternzellen in der Leber als Bestrahlungsfolge abläuft.

Unsere Versuchsergebnisse haben erneut evident gemacht, daß enge Zusammenhänge bestehen zwischen der Wirkung von Mediatoren der Entzündung, zu denen neben Histamin und bestrahlungsbedingten Gewebeschäden die Lymphokine und auch der Tumornekrosefaktor zu zählen sind. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, daß auch noch lange Zeit nach einer einmaligen Bestrahlung Veränderungen im System desjenigen Zellpools existieren, der für die Produktion von Mediatoren verantwortlich gemacht wird. Außerdem haben vor allem die an der Leber erhaltenen Versuchsergebnisse bewiesen, daß auch an mitotisch nicht aktiven Geweben durch die Bestrahlung Veränderungen gesetzt werden, die sich über viele Zellpopulationen hinweg auswirken, insbesondere im Sinne von Stoffwechselveränderungen. Dies betrifft hauptsächlich den Glykogenumsatz, aber auch Kernveränderungen mit Ausbildung chromatinreicher Riesenkerne, die auf eine Polyploidisierung hinweisen. Alle bisher als Kombinationsschaden beschriebenen Phänomene lassen sich auf diese Veränderungen im Pool der mediatorproduzierenden Zellelemente und auf Spätveränderungen im Parenchym zurückführen. Diese Veränderungen lösen bei einem zusätzlich zu einer früher erlittenen Bestrahlung gesetzten Schaden Reaktionen aus, die durch den weiteren Schaden allein nicht erklärbar sind.

Für Fragen des Zivil- und Katastrophenschutzes sind die in unseren Versuchen erhaltenen Ergebnisse deshalb von besonderer Bedeutung, weil sie darauf hinweisen, daß in einer Population, die einer-wenn auch nur kleinen – Bestrahlungsexposition ausgesetzt war, durch zusätzliche Schädigungen wie Infektionen oder altersbedingte degenerative Erscheinungen mit von der Norm abweichenden Reaktionsabläufen zu rechnen ist. Von besonderem Interesse für weitere Untersuchungen und vor allem für die Anwendbarkeit der Ergebnisse im Katastrophen- und Zivilschutz ist die Beobachtung, daß selbst noch ein Jahr nach einmaliger Ganzkörperbestrahlung der Maus Veränderungen im Immunsystem existieren, welche den Reaktionsverlauf zusätzlicher Noxen, wie Infektionen oder Verwundungen, drastisch beeinflussen und den Krankheitsverlauf verschlechtern. Daraus ergibt sich die Forderung, daß Personen nach einer einmaligen Strahlenexposition des ganzen Körpers schon im Dosisbereich von 1 Sv unbedingt bakterielle Infektionen oder größere Verletzungen selbst ein Jahr nach dem Strahleninsult vermeiden sollten. Bei der Dosisangabe von 1 Sv wird die größere Strahlenempfindlichkeit des Menschen gegenüber der Maus berücksichtigt (s. z. B. Van Bekkum, 1991).

## Zusammenfassung

Erwachsene Mäuse erhielten eine nichtletale Ganzkörperbestrahlung mit Dosen von 2,5 oder 5,0 Gy. Als Kontrollen dienten nichtbestrahlte Tiere. 1 Tag bis zu 1 Jahr nach der Bestrahlung bekamen die Tiere (einschl. Kontrollen) einmalig Endotoxin (LPS von *S. abortus equi*), wobei Dosen von 100, 200 oder 400µg verwendet wurden. 12 bis 48 Stunden nach der LPS-Gabe wurden die Tiere getötet und sezirt. Leber, Lunge, Niere, Dünndarm und Magen wurden zu histologischen Präparaten aufgearbeitet und untersucht. Histologisch läßt sich nachweisen, daß die Todesursache bei bestrahlten und unbestrahlten Tieren unterschiedlich ist.

Die Versuche haben gezeigt, daß es nach der Bestrahlung Phasen sehr unterschiedlicher Sensibilität hinsichtlich der Endotoxinreaktion gibt. Dieses Verhalten ist anhand unterschiedlicher Letalitätsraten, aber auch auf Grund histologischer Befunde zu beobachten. Außerdem haben die histologischen Untersuchungen ergeben, daß in diesem Zeitraum deutliche regenerationsartige Veränderungen, vor allem in der Leber, in der Dünndarmschleimhaut und in der Magenschleimhaut ablaufen, wobei die Zahl der ausdifferenzierten Zellen gegenüber den mitotisch aktiven Zellen reduziert ist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 bis 5 Gy nach Wochen bis

Monaten einen zusätzlich gesetzten Schaden im Sinne einer Endotoxininjektion in ihrer Wirkung verstärkt. Im Gegensatz dazu führt eine Vorbestrahlung innerhalb von wenigen Tagen vor der Endotoxingabe zu einem „Schutzeffekt“ gegen die Wirkung des Endotoxins. Zur Erklärung der Befunde können Wirkungsmechanismen herangezogen werden, die in der Literatur beschrieben werden, wonach Endotoxine die Bildung von hochaktiven Mediatoren, insbesondere den Tumor-Nekrose-Faktor induzieren.

## Literatur

*Aboulafia, D., S. A. Miles, R. Mitsuyasu (1990):*

Tumor necrosis factor and external beam radiation: preliminary clinical observations. AIDS 4: 1163-1164.

*Behling, U. H. (1983):*

The radioprotective effect of bacterial endotoxin. In: Beneficial Effects of Endotoxins (A. Nowotny, Ed.) pp. 127-148. Plenum Press, New York und London.

*Beutler, B., A. Cerami (1986):*

Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature 320: 584-588.

*Brook, I. (1988):*

Use of antibiotics in the management of postirradiation wound infection and sepsis. Radiat. Res. 115: 1-25.

*Brook, L., G. D. Ledney (1992):*

Short and long courses of Ofloxacin therapy of *Klebsiella pneumoniae* sepsis following Irradiation. Radiat. Res. 130: 61-64.

*Brugger, W., D. Reinhardt, C. Galanos, R. Andreesen (1991):*

Inhibition of *in vitro* differentiation of human monocytes to macrophages by lipopolysaccharides (LPS): phenotypic and functional analysis. Int. Immun. 3: 221-227.

*Fliedner, T. M. (1973):*

Pathophysiologie der Strahlenempfindlichkeit des Knochenmarks. Strahlenschutz in Forschung und Praxis 13: 38-48.

*Freudenberg, M. A., C. Galanos (1988):*

Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pre-treatment with LPS is mediated by macrophages. Infect. Immun. 56: 1352-1357.

*Fricke, H., E. J. Hart (1966):*

Chemical dosimetry. In: Radiation Dosimetry Vol. II (F. H. Attix, W. C. Roesch, Eds.), pp. 167-239. Academic Press, New York.

- Friedmann, H., T.W. Klein, M. Nakano, A. Nowotny (Eds.) (1989):*  
Endotoxin  
Plenum Publ. Corp., New York.
- Gaffin, S. L., M. Wells, J. P Jordan (1985):*  
Anti-lipopolysaccharide toxin therapy for whole body X-irradiation overdose.  
Brit. J. Radiol. 58: 881-884.
- Galanos, C, M. A. Freudenberg, A. Coumbos, M. Matsuura, V. Lehmann, J. Bartholeyns (1988):*  
Induction of lethality and tolerance by endotoxin are mediated by macrophages through tumor necrosis factor.  
In: Tumor Necrosis Factor/Cachectin and Related Cytokines (B. Bonavida, G. E. Gifford, H. Kirchner, L. J. Old, Eds).  
Karger, Basel.
- Galanos, C, O. Lüderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal (1977):*  
Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with Special reference to their lipid A component. In: Biochemistry of Lipids II, Vol. 14 (T. W. Goodwin, Ed.) pp. 239-335.  
University Park Press, Baltimore.
- Gross, N. J. (1977):*  
Alveolar macrophage number: An index of the effect of radiation on the lungs.  
Radiat. Res. 72: 325-332.
- Hammond, C. W. (1954):*  
Treatment of post-irradiation infection.  
Radiat. Res. 1: 448-458.
- Harmsen, A. G., E. A. Havell (1990):*  
Roles of tumor necrosis factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophils in cutaneous air pouches.  
Infect. Immun. 58: 297-302.
- Härtung, T., A. Wendel (1991):*  
Endotoxin-inducible cytotoxicity in liver cell cultures-I.  
Biochem. Pharmacol. 42: 1129-1135.
- Ledney, G. D., G. S. Madonna, T. B. Elliott, M. M. Moore, W. E. Jackson HI (1991):*  
Therapy of infections in mice irradiated in mixed neutron/photon fields and inflicted with wound trauma: A review of current work.  
Radiat. Res. 128: S18-S28.
- Loppnow, H., P. Libby, M. Freudenberg, J. H. Krauss, J. Weckesser, H. Mayer (1990):*  
Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS.  
Infect. Immun. 58: 3743-3750.
- Meager, A. (1990):*  
Cytokines.  
Open University Press, Buckingham, UK.
- Megyeri, E, J. Sadowska, T. B. Issekutz, A. C. Issekutz (1990):*  
Endotoxin-stimulated human macrophages produce a factor that induces polymorphonuclear leucocyte infiltration and is distinct from interleukin-1, tumour necrosis factor  $\alpha$  and chemotactic factors.  
Immunol. 69: 155-161.

- Messerschmidt, O. (1975):*  
 Kombinationsschäden als Folge nuklearer Explosionen.  
 In: Chirurgie der Gegenwart (R. Zenker, F. Deucher, W. Schink, Hrsg.). Band 4,  
 Unfallchirurgie, S. 1-54.  
 Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien.
- Messerschmidt, O., W. Oehlert (1968):*  
 Untersuchungen über Kombinationsschäden: Histopathologische Untersuchungen an  
 Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung in Kombination mit offenen Hautwunden.  
 Strahlentherapie 136: 229-236.
- Miller, C. R., C.W. Hammond, M. Tompkins (1950):*  
 The incidence of bacteremia in mice subjected to total body x-radiation.  
 Science 111: 540-541.
- Mönig, H., G. Konermann (1993):*  
 Strahlenbedingte Änderung der Chemilumineszenz von Granulozyten als biologischer  
 Dosisindikator.  
 In: Biologische Dosimetrie zur Erfassung akuter Strahlenschäden (Hrsg. Bundesamt  
 für Zivilschutz).  
 Zivilschutz-Forschung Neue Folge Band 12, Bonn.
- Neta, R., J. J. Oppenheim, S. D. Douches (1988):*  
 Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin 1 $\alpha$ ,  
 tumor necrosis factor- $\alpha$ , granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombi-  
 nant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.  
 J. Immunol. 140: 108-111.
- Oehlert, W. (1973):*  
 Zur Strahlenempfindlichkeit der Leber.  
 Strahlenschutz in Forschung und Praxis 13: 89-98.
- Rothstein, J. L., H. Schreiber (1988):*  
 Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic ne-  
 crosis and lethal shock in normal mice.  
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 607-611.
- Sablonniere, B., J. Nicolas, Y. Neveux, J. Drouet (1983):*  
 Effect of whole-body irradiation on phagocytic activity of rat alveolar macrophages.  
 Int. J. Radiat. Biol. 44: 575-584.
- Schwartz, G. N., M. L. Patchen, R. Neta, T. J. MacVittie (1990):*  
 Radioprotection of mice with interleukin-1: Relationship to the number of erythroid  
 and granulocyte-macrophage colony-forming cells.  
 Radiat. Res. 121: 220-226.
- Shiratori, Y, M. Tanaka, K. Hai, T. Kawase, S. Shiina, T. Sugimoto (1990):*  
 Role of endotoxin-responsive macrophages in hepatic injury.  
 Hepatol 13: 183-192.
- SlØrdal, L., M. O. Muench, D. J. Warren, M. S. Moore (1989):*  
 Radioprotection by murine and human tumor-necrosis factor. Dose-dependent effects  
 on hematopoiesis in the mouse.  
 Europ. J. Haematol. 43: 428-434.

- Van Bekkum, D. W. (1991):*  
Radiation sensitivity of the hemopoietic stem cell.  
Radiat. Res. 128: S4-S8.
- Vilcek, J., T. H. Lee (1991):*  
Tumor Necrosis Factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions.  
J. Biol. Chem. 266: 7313-7316.
- Walker, R. L, J. M. Sheil (1976):*  
Contribution of granulocytopenia to endotoxin sensitivity of mice irradiated or undergoing graft-versus-host reaction.  
Exp. Hemat. 4: 329-338.
- Warren D. J., L. SlØrdal, M. A. S. Moore (1990):*  
Tumor-necrosis factor induces cell cycle arrest in multipotential hematopoietic stem cells. A possible radioprotective mechanism.  
Europ. J. Haematol. 45: 158-163.
- Wasserman, J., B. Petrini, G. Wölk, I. Vedin, U. Glas, H. Blomgren, H. -P. Ekre, Ö. Stranegård (1991):*  
Cytokine release from mononuclear cells in patients irradiated for breast Cancer.  
Anticancer Res. 11: 461-464.
- Wensick, F., D.W. van Bekkum, H. Renaud (1957):*  
The prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections in irradiated mice and rats.  
Radiat. Res. 7: 491-499.
- Wisse, E., A. Geerts, L. Bouwens, H. van Bossuyt, K. Vanderkereken, F. van Goethem (1989):*  
Cells of the hepatic sinusoid anno 1988. An attempt to review the IVth international Kupffer cell Symposium. In: Cells of the hepatic Sinusoid (E. Wisse, D. L. Knook, K. Decker, Eds.). Vol. 2, pp. 1-9.  
The Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, The Netherlands.
- Wong, G. H. W., T. McHugh, R. Weber, D. V. Goeddel (1991):*  
Tumor necrosis factor  $\alpha$  selectively sensitizes human immunodeficiency virus-infected cells to heat and radiation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4372-4376.
- Wu, S.-G., A. Tuboi, T. Miyamoto (1989):*  
Radioprotection of C3H mice by recombinant human interleukin-1 $\alpha$ .  
Int. J. Radiat. Biol. 56: 485-492.
- Yamauchi, N., H. Kuriyama, N. Watanabe, H. Neda, M. Maeda, Y. Nütsu (1989):*  
Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells invitro.  
Cancer Res. 49: 1671-1675.

## Die Autoren

*Wolfgang Oehlert*

Professor Dr. med.  
Institut für Pathologie, Histologie und Zytologie  
Rosastraße 9  
79098 Freiburg i. Br.

*Michael Oehlert*

Dr. med.  
Institut für Pathologie, Histologie und Zytologie  
Rosastraße 9  
79098 Freiburg i. Br.

*Hans Mönig*

Professor Dr. rer. nat.  
Ehemals Institut für Biophysik und Strahlenbiologie  
der Albert-Ludwig-Universität  
Albertstraße 23  
79104 Freiburg i. Br.

*Gerhard Konermann*

Professor Dr. rer. nat.  
Institut für Biophysik und Strahlenbiologie  
der Albert-Ludwig-Universität  
Albertstraße 23  
79104 Freiburg i. Br.

## Danksagung

Herrn Dr. C. Galanos vom MPI für Immunbiologie in Freiburg haben wir für die Überlassung der Lipopolysaccharide und für Diskussionen herzlich zu danken. Frau Bettina Mayer gilt unser Dank für die Mithilfe bei der Durchführung von Versuchen und für die Anfertigung der Abbildungen.

