Aus dem MAX-PLANCK-INSTITUT für BIOCHEMIE, München
Direktor: Professor Dr. A. BUTENANDT

Esteraseaktivität und Proteingehalt der Milz von ganzkörperbestrahlten Ratten unter Berücksichtigung funktionsmorphologischer Gesichtspunkte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Günter Valet
aus
München

Februar 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof.Dr.G.RUHENSTROTH-BAUER
Korreferent: Prof.Dr.A.BUTENANDT
Dekan: Prof.Dr.F.HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 2o.2.1968

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Herrn Prof.Dr.A.Butenandt und Herrn Prof.Dr.G.Ruhenstroth-Bauer danke ich sehr für die gestellte Aufgabe und die großzügige Förderung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr.J.Gross bin ich für wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft aufrichtig verbunden.

Die Rechenarbeiten konnten freundlicherweise im Leibniz-Rechenzentrum der bayrischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt werden.

Die Programmierung verdanke ich Herrn cand.rer.nat. H.W.Valet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik	2
a.Tiere	2
b.Bestrahlung	2
c.Organaufarbeitung	3
d.Messung der Esteraseaktivität	3
C. Versuche zur Methodik	4
a.Tiere	4
b.Bestrahlung	4
c.Homogenisieren	5
d.Umrechnung auf 1:1 Verdünnung	7
e.Zentrifugation	8
f.Proteinlösungen	8
g.Proteinbestimmung	8
h.Messung der Esteraseaktivität	8
i.Aktivitätserhaltung der Proteinlösungen	16
j.Esteraseaktivität bei pH 5.o und 8.5	17
D. Statistische Auswertung der Versuche	18
a.Datensammlung	18
b.Rechnerische Auswertung	18
c.Formelsammlung	21
E. Ergebnisse	22
a.Verhalten der bestrahlten Tiere	22
b.Letalität nach Bestrahlung	23
c.Milzgewicht	24
d.Proteinkonzentration der Milzextrakte	25
e.Esteraseaktivität der Milzextrakte	26
F. Besprechung der Ergebnisse	28
1.Milzaufbau	28
2.Morphologische Strahlenschäden	28
3.Biochemische Veränderungen	30
a.Auswertung der Milzproteinbefunde	30
-Milzgewicht,Gesamtprotein/Milz Proteingehalt/g Milzgewebe	31
-Zellgröße,Zellproteingehalt, Zellproteinkonzentration	33

Seite

b. Auswertung der Esteraseaktivitätsbefunde in der Milz 36
-Gesamtesteraseaktivität/Milz, Esteraseaktivität/g Milzgewebe 36
-Zellesterasegehalt, Zellesterase-konzentration 40
c. Bezugspunkte 43
d. NPA als Substrat 44
e. Andere Untersuchungen über Milzenzyme 45
f. Funktionsmorphologie 46

G. Zusammenfassung 48

H. Literaturverzeichnis 51

Esteraseaktivität und Proteingehalt der Milz von ganzkörperbestrahlten Ratten unter Berücksichtigung funktionsmorphologischer Gesichtspunkte

A. Einleitung

Höhere tierische Organismen weisen eine deutliche Empfindlichkeit gegenüber Röntgenganzkörperbestrahlung auf. Bei den gebräuchlichen Laboratoriumstieren genügen einmalige Dosen zwischen 15o-1ooo R, um schwere Schäden hervorzurufen (COTTIER 1966a, SCHERER, STENDER 1963, BLOOM 1948). Es entsteht das Bild der Strahlenkrankheit (BACQ, ALEXANDER 1958), die in den ersten Tagen nach Bestrahlung durch den sogenannten Strahlenkater mit verminderter Futter- und Wasseraufnahme, verbunden mit Gewichtsabnahme und Leistungsschwäche gekennzeichnet ist. Später kommt es zu Ernährungsstörungen, Hämorrhagien, Anämie und Infekten. Der Tod kann entweder nach 1-3 Wochen unter dem Bild allgemeiner Hämorrhagien und Infekte, oder bei höheren Strahlendosen bereits nach 3-4 Tagen auf Grund gastrointestinaler Störungen eintreten.

Die einzelnen Organe werden in Bau und Funktion verschieden stark beeinträchtigt. Morphologisch ergeben sich u.a. im Gastrointestinaltrakt, Knochenmark und lymphatischen System deutliche degenerative Veränderungen, die mit Zelluntergang und Gewebsumbau verbunden sind (COTTIER 1966a). Biochemisch sind zahlreiche Auswirkungen auf den Stoffwechselablauf beschrieben worden, die jedoch bis heute kein abschließendes Verständnis der Strahlenschädigung erlauben (MITCHELL 1966, SCHERER 1963).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Messung der Esteraseaktivität und des Proteingehalts von Milzextrakten, sowie des Milzgewichts bei 5oo R-ganzkörperbestrahlten Ratten vom 1.-18.

Tag nach Bestrahlung.Die Bestimmung der Esteraseaktivität erschien zweckmäßig,da die Esterasen unter Körperbedingungen vorwiegend spaltende Enzyme darstellen (AMMON,DIRSCHERL 1959, HOFFMANN-OSTENHOFF 1954),und ihre Aktivität als ein Maß für die in der Milz nach Bestrahlung morphologisch nachweisbaren Abbauvorgänge (COTTIER 1966b) angesehen werden kann.

Bei der Interpretation von biochemischen Befunden,die aus Gewebshomogenaten oder Extrakten gewonnen wurden entstehen Schwierigkeiten,wenn eine Übertragung auf die Organeinzelzelle durchgeführt werden soll.Vor allem trifft dies auf Enzymaktivitäten zu,die aus Gründen der Vergleichbarkeit im allgemeinen als Aktivität/g Gewebe,mg Protein oder mg Proteinstickstoff angegeben werden.Solche Ergebnisse besitzen für die Einzelzellen nur dann Verbindlichkeit,wenn Zellart und Zellgröße des untersuchten Gewebes nach Bestrahlung gleichbleiben.Da diese Bedingungen in der Milz nicht erfüllt sind,wurde nach Kriterien gesucht,die trotz der Gewebsveränderungen eine Übertragung der Befunde auf die Organeinzelzellen,und damit ein funktionsmorphologisches Verständnis der zellulären Vorgänge nach Bestrahlung erlauben.

B. Methodik

a. Tiere

Als Versuchstiere dienten 6-8 Wochen alte,weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht zwischen 9o-11o g.Sie wurden zur Verminderung der Individualstreuung und Gewinnung genügender Milzmengen in Gruppen von je 1o Tieren verwendet.Alle Versuche erfolgten als Parallelversuche zweier gleichbehandelter Gruppen. Die Tiere wurden in sägemehlgestreuten Plastikkäfigen mit "ssniff" Rattenfutter (Intermast,Bochum-Hövel) gehalten.Futter und Wasser waren ad libitum angeboten.

b. Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einem Siemens-Stabilipangerät bei 28o KV,1o mA,1 mm Cu-Filter,5o cm Distanz und einer Dosis-

leistung von 6o R/min.Es wurde mit 5oo R ganzkörperbestrahlt. Die Tiere waren dazu in einem runden Käfig aus Hostalen mit einem Dach aus 8 mm Plexiglas untergebracht und mit dem Kopf zum Zentrum mit Hilfe eines Zellstoffkissens fixiert.Das Dosimeter war in einem leeren Abteil des Käfigs in Höhe des Bauchraumes der Tiere angebracht.

c. Organaufarbeitung

In wechselnden Zeitabständen nach Bestrahlung erfolgte die Tötung der Tiere durch Nackenschlag.Nach Abspülen der Bauchwand mit Alkohol zur Vermeidung gröberer Verunreinigungen, wurde das Abdomen breit eröffnet,jedem Tier die Milz entnommen und die Gesamtmilzmengen von 1o Tieren auf o.1 g genau abgewogen.Sofortige Abkühlung des Gewebes im Eisbad,sowie Weiterverarbeitung im Kühlraum bei 4° sollten Abbauvorgänge möglichst gering halten.Die Milzen von je 1o Tieren wurden mit 1o ml aqua dest. versetzt und 5 min. in einem Potter-Glashomogenisator mit Teflonkolben bei 2ooo U/min. im Eisbad homogenisiert.Durch einstündige Ultrazentrifugation in einer Beckmann-Ultrazentrifuge bei o° und 5o ooo U/min. wurde eine weitgehende Sedimentierung der Partikel erreicht.Nach Absaugen der Überstände aus dem Zentrifugenröhrchen mittels einer Spritze wurden jeweils 2 ml Milzextrakt zur Proteinbestimmung in einem Uhrglas bei 1oo° auf einer Heizplatte eingedampft und das Uhrglas sofort nach dem Erkalten auf o.1 mg genau abgewogen.Sodann wurden die Milzextrakte mit aqua dest. auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml verdünnt,und die Proteinlösungen bis zur Messung ständig im Kühlraum bei 4° oder im Eisbad aufbewahrt.

d. Messung der Esteraseaktivität

Die Messung der Esteraseaktivität erfolgte mit einem selbstregistrierenden Beckmann-Spektrophotometer DK-2 zwischen pH 5.o-8.5 in Schritten von o.5 pH-Einheiten.Als Substrat diente p-Nitrophenolacetat (NPA,M=181.2),von dem jeweils am Meßtage durch Auflösen von 1o mg in 1oo ml aqua dest. eine Lösung der Konzentration 1oo µg/ml hergestellt wurde.Bei der enzymatischen Spaltung der Esterbindung wird p-Nitrophenol (NP,M=139.1) frei-

gesetzt,das im Sauren eine starke Absorptionsbande bei 317 mμ und im Alkalischen eine solche bei 397 mμ aufweist.Aus Intensitätsgründen wurde für die Aktivitätsmessung von pH 5.o-6.o die Bande bei 317 mμ und von pH 6.5-8.5 die Bande bei 397 mμ verwendet.Gemessen wurde in o.o5 m Phosphatpuffer.Die pH-Reihe wurde durch Mischen o.1m Stammlösungen von KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 hergestellt.Zur Konstanthaltung der Meßtemperatur von 3o° diente ein Thermostat mit Durchflußküvettenhalter,der Temperaturschwankungen unter ± o.o5° hielt.Als Behältnisse wurden 4ox1ox1o mm Quarzküvetten mit folgender Füllung benützt:

Meßküvette:	1.5ml	o.1m	Phosphatpuffer	pH 5.o-8.5
	1.5ml		Substratlösung	
	o.1ml		Proteinlösung	c_p=5 mg/ml
Vergleichsküvette:	1.5ml	o.1m	Phosphatpuffer	pH 5.o-8.5
	1.5ml		aqua dest.	
	o.1ml		Proteinlösung	c_p=5 mg/ml

c_p=Proteinkonzentration

Zum Pipettieren der Proteinlösungen diente eine Eppendorf-o.1ml-Druckpipette "Marburg".Zunächst wurden Phosphatpuffer und Proteinlösung in die Küvetten einpipettiert und abgewartet bis der Temperaturangleich erfolgt war.Die Zugabe der Substratlösung erfolgte unmittelbar vor Beginn der Messung.Die Meßdauer betrug pro Ansatz 5 min.Quantitativ wurde die während dieser Zeit freigesetzte NP-Menge aus der vom Schreiber aufgezeichneten Extinktionsänderung ΔE und dem molaren Extinktionskoeffizienten ε_{max} nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz berechnet (siehe S.11).

C. Versuche zur Methodik

a. Tiere

Bei der Auswahl der Tiere wurde auf möglichst gleiches Alter und Geweicht geachtet.Als mittleres Gewicht von 23o Tieren ergaben sich 99.3±1.4 g/Tier.

b. Bestrahlung

Die Ratten waren so gelagert,daß sie mit dem Becken nicht mehr

als 15 cm vom Zentrum des Strahlenkegels entfernt waren. Infolge des Intensitätsabfalls der Strahlung mit zunehmender Entfernung vom Zentralstrahl wurden verglichen zur Körpermitte auf Kopf und Becken 1o % mehr bzw. weniger eingestrahlt. Die Dosis wurde mit einem Duplex-Dosimeter (Dr. Pychlau, Freiburg/Br.) in Luft gemessen.

c. Homogenisieren

Das Homogenisieren der Milzen erfolgte zur Gewinnung leicht zentrifugierbarer und gut aufgeschlossener Homogenate unter Zusatz von aqua dest. Die Menge des Wasserzusatzes war einmal durch das Fassungsvermögen eines Ultrazentrifugenröhrchens von 14 ml gegeben, das zur Zentrifugation gefüllt sein mußte, und zum anderen durch das Bestreben eine möglichst hohe Proteinkonzentration in den Extrakten zu erzielen, um Fehler bei der Proteinbestimmung (siehe S.8) klein zu halten. Als günstiges Maß erwies sich die Zugabe von 1o ml aqua dest./1o Milzen. Bei einem Milzgewicht von ca. 5 g/1o Tiere bei unbestrahlten Ratten (Abb.9) ergaben sich 15 ml Homogenat. Nach Bestrahlung nahm das Milzgewicht beträchtlich ab, so daß teilweise nur noch 2 g Milzgewebe/1o Tiere vorhanden waren, die entsprechend zu 12 ml Homogenat führten. Infolge des unterschiedlichen Organgewichtes schwankte der Verdünnungsgrad der Homogenate zwischen minimal 1:2 und maximal 1:5. Es wurde deshalb untersucht, ob die aus dem Milzgewebe extrahierte Proteinmenge und die Esteraseaktivität der Milzextrakte durch den Verdünnungsgrad der Homogenate beeinflußt werden.

4o Ratten wurde die Milz entnommen und jeweils halbiert, wodurch zwei gleichgroße und in ihrer Zusammensetzung gleichartige Milzmengen entstanden. Ein Teil wurde 1:1 und der andere 1:5 mit aqua dest. versetzt homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren ergab sich eine Proteinkonzentration von 52.5 mg/ml für die 1:1 Verdünnung und von 17.5 mg/ml für die 1:5 Verdünnung. Der Quotient beider Werte beträgt 3. Die 1:5 Verdünnung ergibt 1+5=6 Teile, und die 1:1 Verdünnung 1+1=2 Teile homogenat. Der Quotient $\frac{(1+5)}{(1+1)}$ hat ebenfalls den Wert 3. Das Bedeutet, daß sich die Protein-

konzentrationen in den Milzextrakten wie die Verdünnungsgrade verhalten,und damit für gleiche Gewebsmengen bei 1:1 Verdünnung dieselbe Proteinmenge extrahiert wird wie bei 1:5 Verdünnung.Als Proportion geschrieben ergibt sich:

$$\frac{(1+5)}{(1+1)} = \frac{\text{Proteinkonz.bei 1:1 Verd.}}{\text{Proteinkonz.bei 1:5 Verd.}} \qquad (1)$$

oder verallgemeinert:

$$\frac{(1+x)}{(1+1)} = \frac{\text{Proteinkonz.bei 1:1 Verd.}}{\text{Proteinkonz.bei 1:x Verd.}} \qquad (2)$$

Der Verdünnungsgrad der Homogenate hat damit in den Grenzen des Versuchsrahmens keinen Einfluß auf die aus dem Milzgewebe extrahierte Proteinmenge.

Die Esteraseaktivität der Extrakte (Tab.1,Abb.1) wurde unter den angegebenen Versuchsbedingungen (siehe S.3) gemessen:

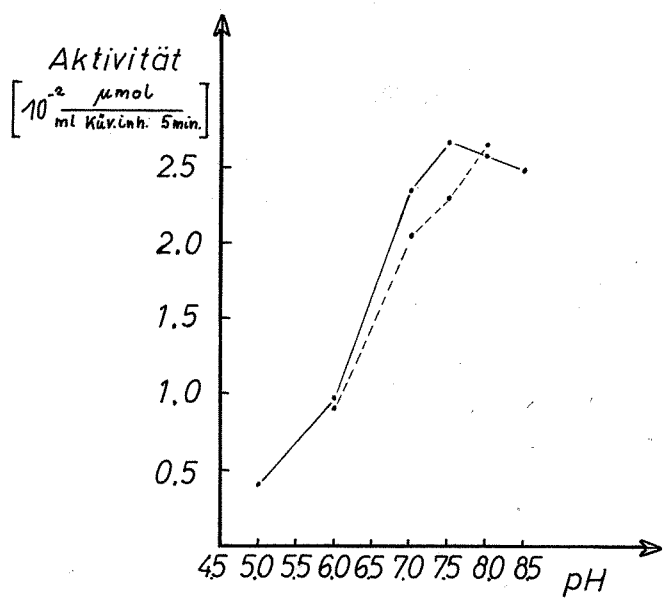


Abb.1 Esteraseaktivität von 1:1 und 1:5 mit aq.dest. verdünnten Milzhomogenaten

Im Rahmen der Meßgenauigkeit bei Einzelversuchen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Messungen.

Tab.1

Esteraseaktivität

$x10^{-2}$ µmol/ml Küv.inh.

	n \ pH	5.o	6.o	7.o	7.5	8.o	8.5
1:1 Verd.	1	o.41	o.99	2.36	2.68	2.59	2.5o
1:5 Verd.	1	-	o.91	2.o4	2.3o	2.64	-

n=Anzahl der Versuche

Die Esteraseaktivität der Milzextrakte kann deshalb in den Grenzen des Versuchsrahmens ebenfalls als unabhängig vom Verdünnungsgrad der Milzhomogenate gelten.

Zur Feststellung des Homogenisierungsgrades wurden bei 3 Versuchen Ausstriche von 1:1 mit aqua dest. verdünnten Milzhomogenaten angefertigt und nach May-Grünwaldt-Giemsa gefärbt.In keinem der Präparate konnten mehr unversehrte Zellen gefunden werden.Die Homogenisierung war damit unter den angegebenen Versuchsbedingungen (siehe S.3) bezüglich der Zellzerstörung vollständig.

d. Umrechnung auf 1:1 Verdünnung

Zum besseren Vergleich wurden die nach Bestrahlung bei verschiedenen Verdünnungsgraden in Milzextrakten gemessenen Proteinkonzentrationen auf 1:1 Verdünnung umgerechnet.Ausgehend von Formel (2) (siehe S.6) verhält sich der tatsächliche Verdünnungsgrad zur 1:1 Verdünnung wie die Proteinkonzentration bei 1:1 Verdünnung ($c_{p\ 1:1}$) zur tatsächlich extrahierten Proteinkonzentration ($c_{p\ extr.}$).Der tatsächliche Verdünnungsgrad errechnet sich aus der zum Homogenisieren zugesetzten aqua dest. Menge von 1o ml = 1o g aq.dest. und der entnommenen Milzmenge in g zu: $(1+\frac{1o\ g\ aq.dest.}{g\ Milzgewebe})$ Nach $c_{p\ 1:1}$ aufgelöst ergibt sich:

$$c_{p\ 1:1} = \frac{(1+\frac{1o\ g\ aq.dest.}{g\ Milzgewebe})}{(1+1)} \times c_{p\ extr.} \qquad (3)$$

Mit Formel (3) können Proteinkonzentrationen von Milzextrakten, die bei beliebigen Verdünnungsgraden in den Grenzen des Versuchsrahmens gemessen wurden auf 1:1 Verdünnung umgerechnet werden.

e. Zentrifugation

Die Zentrifugation bei 5o ooo U/min. im Titanrotor entspricht einer Beschleunigung von 144 ooo g in Röhrchenmitte. Innerhalb von 1 Std. wird dabei eine Sedimentierung erreicht, die neben Zellkernen, Zellmembranen und Mitochondrien auch die Ribosomen weitgehend einschließt (ANDERSEN, GREEN 1967). Der Bodensatz im Zentrifugenröhrchen war fest und von dunkelbraun-roter Farbe. Auf dem Überstand waren Spuren einer Lipidhaut sichtbar.

f. Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wiesen eine rote Farbe auf. Überstieg die Proteinkonzentration 35 mg/ml, so fiel nach 4-6 Std. ein roter, durch Verdünnung mit aqua dest. nicht wieder in Lösung gehender Niederschlag aus. Die Verdünnung der Extrakte erfolgte deshalb sofort nach der Proteinbestimmung, wodurch dieser Niederschlag verhindert werden konnte. Eine Pufferung der Proteinlösungen erübrigte sich, da der pH-Wert zwei Tage nach der Aufarbeitung unverändert pH 7.o betrug.

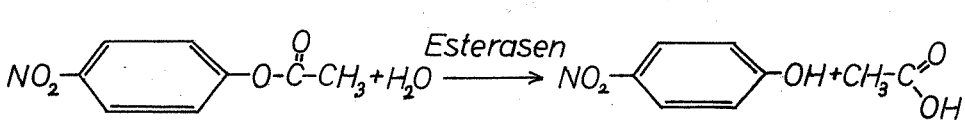
g. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Milzextrakten wurden jeweils 2 ml Extrakt in einem Uhrglas bei 1oo° (TAYLOR 1953, BULL 1944) auf einer Heizplatte eingedampft bis keine Gewichtsänderung mehr auftrat. Das so beschickte Uhrglas wurde sofort nach dem Erkalten gewogen, um hygroskopische Verfälschungen zu vermeiden. Die Feststellung der Meßgenauigkeit erfolgte durch Doppel- und Dreifachbestimmungen bei 1o Milzextrakten. Dabei ergaben sich für eingedampfte Proteinmengen von über 3o mg, wie sie auch nach Bestrahlung in 2 ml Extrakt immer vorhanden waren, Fehler in der Größenordnung von 1 %.

h. Messung der Esteraseaktivität

Prinzip

Das Substrat p-Nitrophenolacetat (NPA) wird von Esterasen in Acetat und p-Nitrophenol (NP) gespalten:



Die NP-Bildung wurde spektrophotometrisch registriert.

Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten ε_{max} von NP und NPA

Die Spektren von NP und NPA sind verschiedentlich gemessen worden (WHEELER,KAPLAN 1966,PHILLIPS,NACHROD 1963,KAMLET 196o,UNGNADE 196o).Da die veröffentlichten Daten teilweise merklich voneinander abweichen,erschien es zweckmäßig die Spektren von NP und NPA unter Bedingungen,die denen der Esteraseaktivitätsmessung weitgehend entsprachen in o.o5 m Phosphatpuffer bei 3o° zu vermessen.

NP-Spektren

NP-Spektren sind von MARTIN,GOLUBOW,AXELROD 1959,BERGMANN,RIMON, SEGAL 1958,STOCK,DONAHUE,AMSTUTZ 1958,DIXON,NEURATH 1957,BIGGS 1954,HARTLEY,KILBY 1954,1952,SCHROEDER,WILCOX,TRUEBLOOD,DEKKER 1951,TERESI 195o,DOUB,VANDENBELT 1947 und PRELOG,WIESNER 1947 bestimmt worden.Die eigenen Messungen ergaben folgende Bandenmaxima λ_{max} und molare Extinktionskoeffizienten ε_{max} (Tab.2, Abb.2):

Tab.2

λ_{max} und ε_{max} der NP-Spektren

λ_{max} \ pH	5.o	6.o	6.5	7.o	7.5	8.o	8.5	9.o
226 mμ	7100	7100	7100	6940	6700	6550	6550	6600
317 mμ	10350	9400	8390	5870	3520	2290	1960	1790
397 mμ	340	1960	5370	10800	16310	18800	20260	20700

NPA-Spektrum

Das NPA-Spektrum ist von GRAMMATICAKIS 1951 in Äthanol aufgenommen worden.Die eigenen Messungen ergaben folgende Werte (Tab.3, Abb.3A):

Tab.3

λ_{max} und ε_{max} des NPA-Spektrums

λ_{max} \ pH	5.o-8.5
212 mμ	7050
272 mμ	8600

Abb.2 NP-Spektren in o.o5 m Phosphatpuffer, 3o°, pH 5.o-9.o
c_{NP}=12.4 μg/ml (=8.94x1o^{-2} μmol/ml)

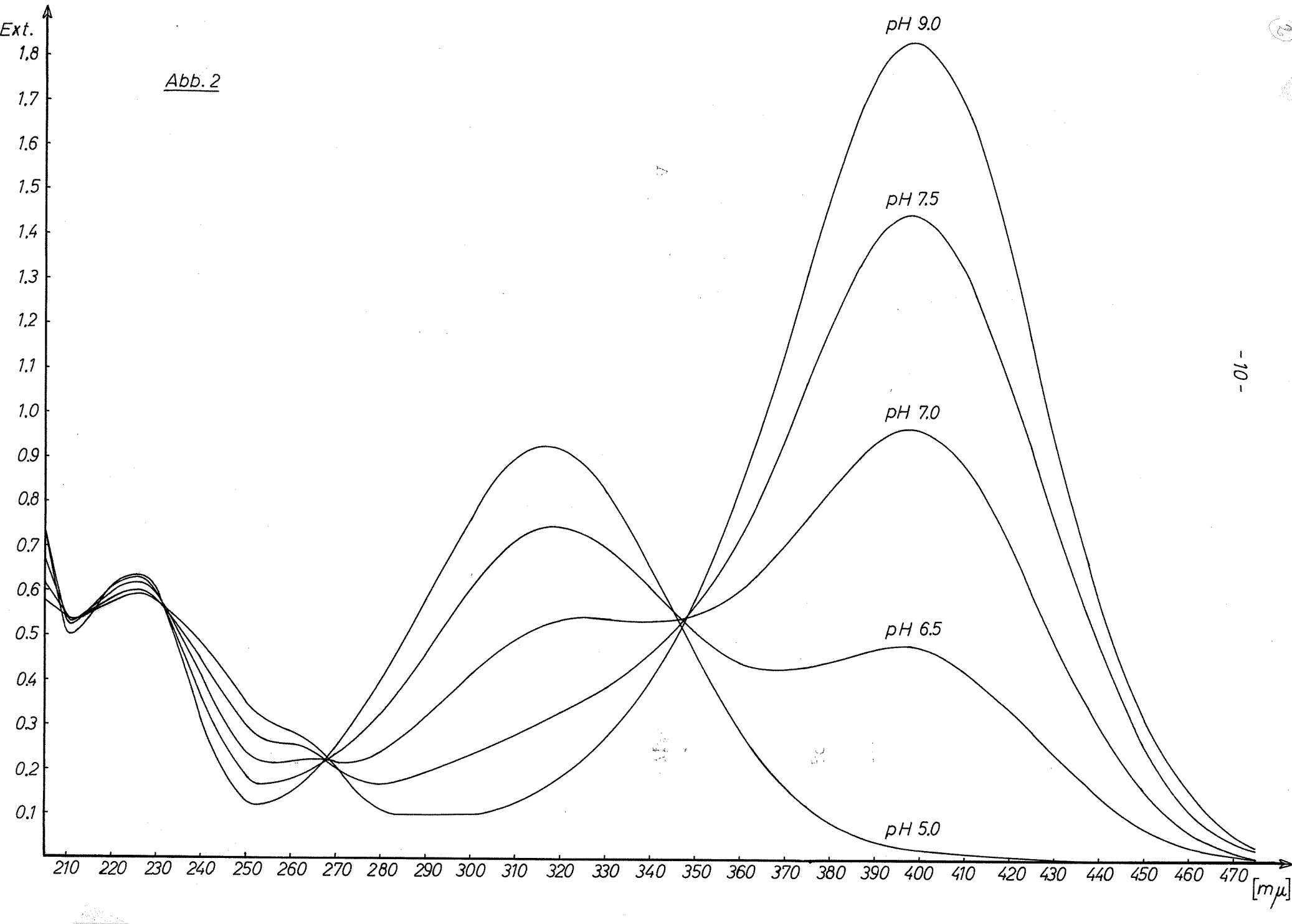


Abb. 2
Ext.
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
pH 9.0
pH 7.5
pH 7.0
pH 6.5
pH 5.0
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470
[mμ]

Durchführung der Esteraseaktivitätsmessung

Die Intensität der Banden im NP-Spektrum (Abb.2) ist infolge der Dissoziation der phenolischen OH-Gruppe stark pH-abhängig (pK=6.99 BIGGS 1954).Aus Empfindlichkeitsgründen wurden die Messungen für pH 5.o-6.o bei der 317 mμ Bande und für pH 6.5-8.5 bei der 397 mμ Bande durchgeführt.Das Spektrophotometer war so eingestellt,daß bei festgelegter Wellenlänge 317 mμ oder 397 mμ die Aufzeichnung von Extinktionsänderungen über längere Zeit möglich war.Auf der Zeitachse des eingelegten Papiers entsprach 1 cm = 1 min.,während die Extinktionsachse von o-1.o linear geteilt war.An die vom Schreiber in 5 min. aufgezeichnete Kurve, die mit guter Annäherung einer Geraden entsprach,wurde die Tangente gelegt,und aus der so ermittelten Extinktionszunahme $\Delta E/5$ min. und dem zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten ε_{max} mittels des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (SCOTT 1964,JAFFE, ORCHIN 1962) die freigesetzte NP-Menge berechnet:

$$\Delta c = \frac{\Delta E_{gem.}}{\varepsilon_{max} \cdot d}$$

Δc	NP-Konzentrationsanstieg/ml Küvetteninhalt in 5 min. (mmol/ml)
$\Delta E_{gem.}$	gemessene Extinktionsänderung in 5 min.
ε_{max}	molarer Extinktionskoeffizient von NP im Bandenmaximum (ml/mmolxcm)
d	Lichtweg in der Küvette d=1cm

Korrekturen

a. Korrektur bei pH 5.o-6.o

Bei der für die Esteraseaktivitätsmessung von pH 5.o-6.o verwendeten Bande 317 mμ fallen die Bandenausläufer der NPA-Hauptbande noch ins Gewicht (Abb.3A,B),wodurch jede bei diesen pH-Werten registrierte Extinktionsänderung das Ergebnis von NPA-Abnahme und NP-Zunahme in der Meßküvette ist.Für beide pH-Werte

---

Abb.3 A. NPA-Spektrum pH 5.o-8.5 , o.o5 m Phosphatpuffer , 3o°
c_{NPA}= 16.7 μg/ml (= 9.21x1o^{-2} μmol/ml)
B. NP-Spektrum pH 5.o o.o5 m Phosphatpuffer , 3o°
c_{NP} = 12.4 μg/ml (= 8.94x1o^{-2} μmol/ml)
C. NP-Spektrum pH 9.o o.o5 m Phosphatpuffer , 3o°
c_{NP} = 12.4 μg/ml (= 8.94x1o^{-2} μmol/ml)

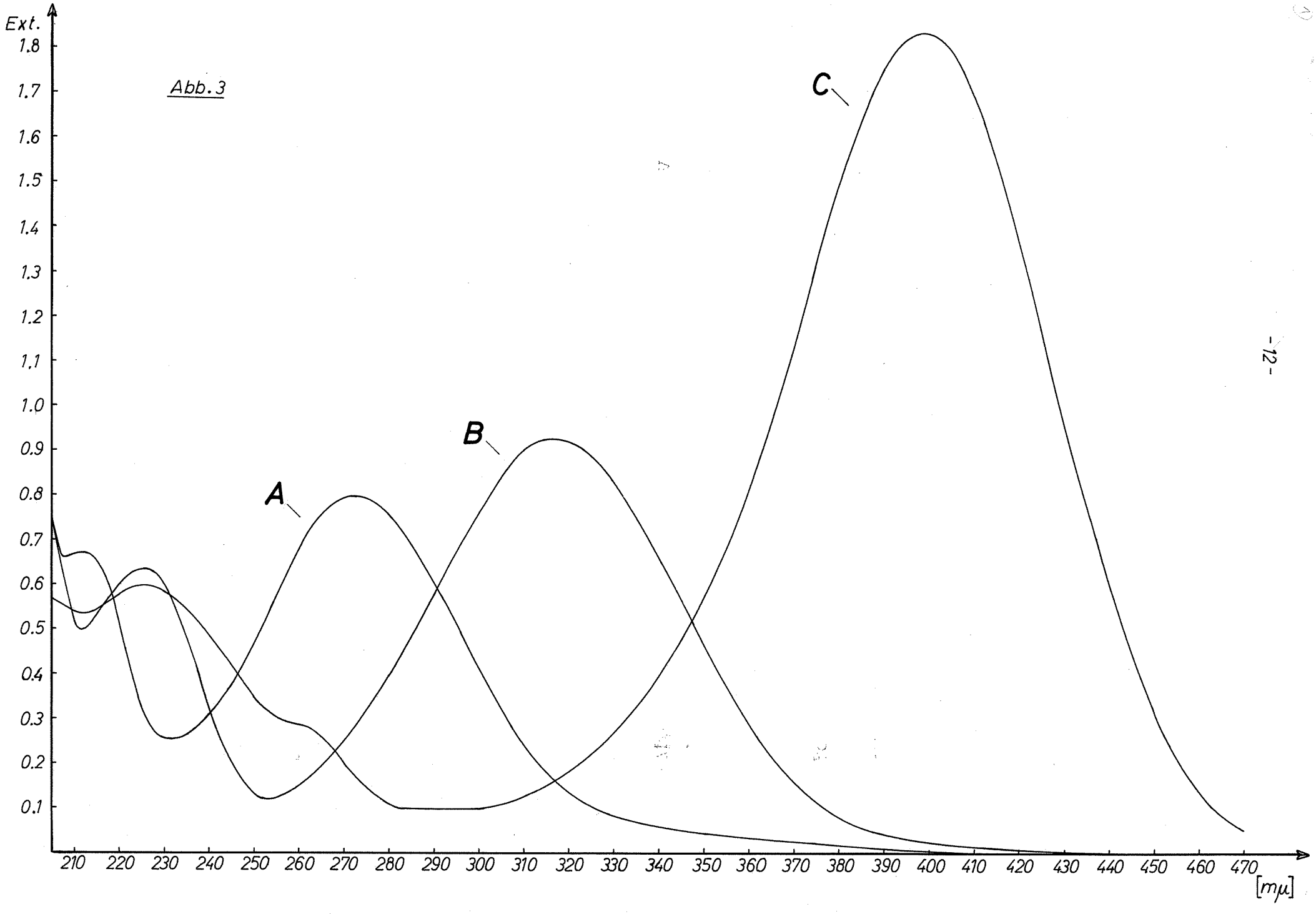


Abb. 3
Ext.
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
A
B
C
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470
[mμ]

wurde deshalb aus nachstehenden Überlegungen eine Gleichung zur Ermittlung der freigesetzten NP-Menge abgeleitet:

$$\Delta E_{NP} + \Delta E_{NPA} = \Delta E_{gem.}$$

$$\Delta c_{NP} = -\Delta c_{NPA}$$

$$\Delta E_{NPA} = \varepsilon_{NPA} \cdot \Delta c_{NPA}$$

$$\Delta E_{NP} = \varepsilon_{NP} \cdot \Delta c_{NP}$$

$\Delta E_{gem.}$	gemessene Extinktionsänderung
ΔE_{NPA}	Extinktionsänderung durch NPA-Abnahme
ΔE_{NP}	Extinktionsänderung durch NP-Zunahme
$-\Delta c_{NPA}$	Konzentrationsabnahme des NPA
Δc_{NP}	Konzentrationszunahme des NP
ε_{NPA}	molarer Extinktionskoeffizient des NPA bei 317 mμ
ε_{NP}	molarer Extinktionskoeffizient des NP bei 317 mμ

Die Zusammenfassung der vier Gleichungen führt zu:

$$\Delta c_{NP} = \frac{\Delta E_{gem.}}{(\varepsilon_{NP} - \varepsilon_{NPA})}$$

Der Nenner $(\varepsilon_{NP} - \varepsilon_{NPA})$ nimmt bei 317 mμ für pH 5.o und pH 6.o folgende Werte an:

pH	5.o	6.o
ε_{NP}	10350	9400
ε_{NPA}	1625	1625
$(\varepsilon_{NP} - \varepsilon_{NPA})$	8725	7775

Zur Berechnung der freigesetzten NP-Menge wird die bei pH 5.o und pH 6.o gemessene Extinktionsänderung $\Delta E_{gem.}$ durch das entsprechende $(\varepsilon_{NP} - \varepsilon_{NPA})$ dividiert.

b. Korrektur für die Spontanhydrolyse bei der Aktivitätsmessung

Neben der enzymatischen Spaltung des Substrats findet bei der Esteraseaktivitätsmessung eine Spontanhydrolyse statt, die jenseits pH 7.o rasch zunimmt. Wird sie nicht vom Meßwert subtrahiert, so liegt die berechnete Esteraseaktivität zu hoch. In Tab.4 und Abb.4 ist die experimentell bestimmte Spontanhydrolyse für pH 5.o-9.o wiedergegeben. Die Spontanhydrolyse ist von pH 5.o-6.o vernachlässigbar, nimmt von pH 6.5 an ständig zu und ist bei pH 9.o

bereits so hoch,daß sie bei der Aktivitätsmessung merklich ins Gewicht fällt.Geringe pH-Schwankungen machen sich in einer

Tab.4

NPA-Spontanhydrolyse

Meßdauer: 5 min.
Temperatur: 30°
Phosphatpuffer: 0.05 m
Substratkonz.in der Meßküvette: 50 µg/ml (=27.6x10^{-2} µmol/ml)

pH	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
n	2	2	4	5	8	11	34	18
NP	.05±.00	.06±.00	.07±.00	.13±.02	.18±.01	.35±.02	.77±.02	1.64±.1

n =Zahl der Versuche
NP=Spontanhydrolyse in 5 min. in: 10^{-2} µmol/ml

deutlichen Änderung der Hydrolyserate bemerkbar.Eine hinreichend genaue Bestimmung der Esteraseaktivität ist deshalb bei pH 9.0

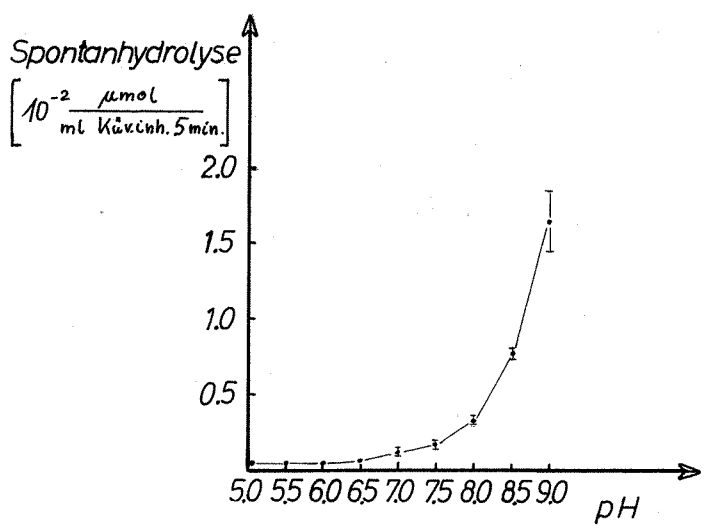


Abb.4 NPA-Spontanhydrolyse während der Zeit der Esteraseaktivitätsmessung (5 min.)

nicht mehr möglich.Der Meßbereich wurde aus diesem Grunde auf pH 5.0-8.5 beschränkt.

Genauigkeit der Esteraseaktivitätsmessung

Die Genauigkeit der Esteraseaktivitätsmessung wurde durch mehrmalige Herstellung eines Versuchsansatzes überprüft.Bei pH 7.0 ergaben sich unter den angeführten Versuchsbedingungen (siehe S.3)

für 9 Messungen der gleichen Proteinlösung folgende Esteraseaktivitäten/5 min.:

1.7o 1.6o 1.74 1.79 1.6o 1.74 1.71 1.74×10^{-2} µmol/ml

Der Mittelwert errechnet sich zu 1.70×10^{-2} µmol/ml Küv.inh. Die maximale Abweichung betrug $\pm 0.01 \times 10^{-2}$ µmol/ml Küv.inh., was ± 6 % entspricht.

Gültigkeit des BEER'schen Gesetzes

Der Berechnung der Esteraseaktivität aus den gemessenen Extinktionsänderungen liegt die Annahme zugrunde, daß zwischen freigesetzter NP-Menge und gemessener Extinktionsänderung Linearität besteht. Diese Annahme wurde experimentell dadurch überprüft, daß für die Aktivitätsmessung bei konstanter Substratkonzentration die Proteinkonzentration in der Meßküvette stufenweise gesteigert wurde. Das Ergebnis der Versuche ist in Tab.5 und Abb.5 zusammengestellt:

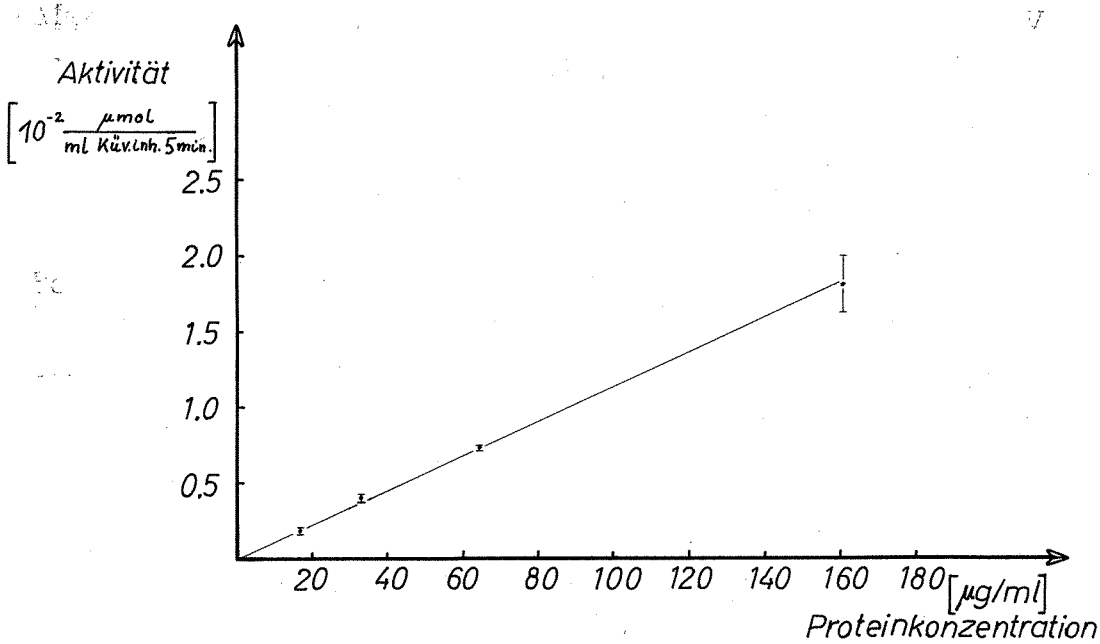


Abb.5 Gültigkeit des BEER'schen Gesetzes bei der Esteraseaktivitätsmessung

Mit guter Näherung wurden bei doppelter Proteinkonzentration auch doppelte NP-Mengen freigesetzt. Das BEER'sche Gesetz kann

Tab.5

Gültigkeit des BEER'schen Gesetzes

Meßzeit: 5 min.
Temperatur: 3o°
pH 7.5
Zahl der Versuche: n=2
Substratkonz.i.d.Meßküvette: 48.4 µg/ml (26.7x1o^{-2} µmol/ml)

Proteinkonz.i.d.Meßküv.	16.1	32.3	64.5	161.3	µg/ml
NP-Bildung	.18±.o1	.41±.o1	.74±.oo	1.8o±.18 x1o^{-2}	µmol/ml

damit im Rahmen der Versuchsbedingungen als erfüllt gelten.

i. Aktivitätserhaltung der Proteinlösungen

Die Organaufarbeitung und Aktivitätsmessung wurden stets an einem Tag durchgeführt.Die Aufarbeitung dauerte 5-6 Std.,die Aktivitätsmessung für 2 Parallelversuche (siehe S.2) etwa 2 Std.Bei mehreren Proteinlösungen wurde der zeitliche Aktivitätsabfall verfolgt,um festzustellen,ob während der Aufarbeitungszeit mit merklichen Aktivitätsänderungen zu rechnen ist.In Tab.6 und Abb.6

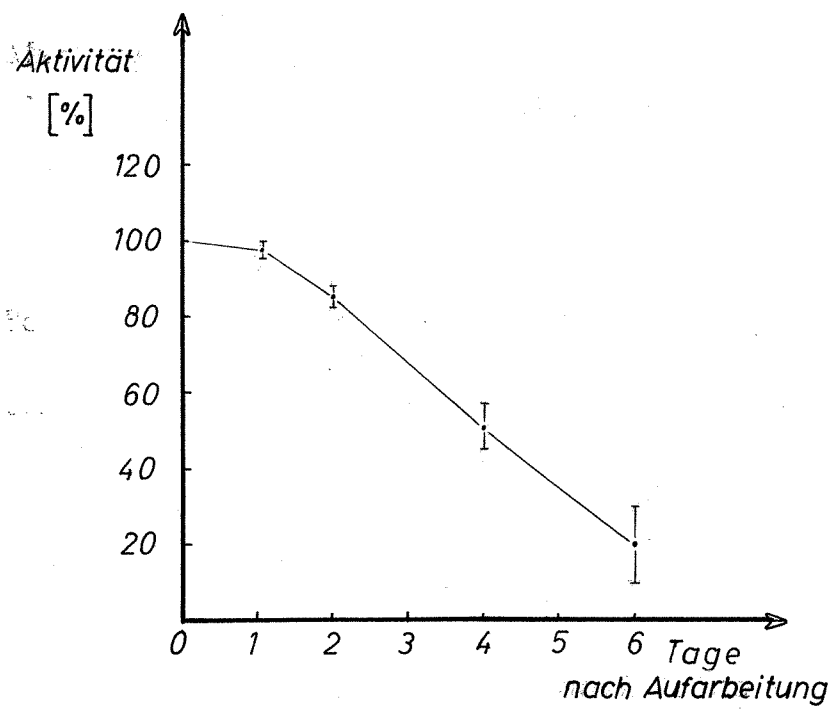


Abb.6 Zeitlicher Abfall der Esteraseaktivität von auf 5 mg/ml verdünnten Milzextrakten vom 1.-6.Tag nach Aufarbeitung der Milzen

Tab.6

Aktivitätsabfall von Milz-proteinlösungen

Tage n. Aufarb.	Versuche	Aktivität
o	6	100 %
1	2	98 ± 1%
2	6	85 ± 2%
4	2	51 ± 4%
6	2	21 ± 12%

ist die Aktivität von Proteinlösungen der Konzentration 5 mg/ml vom 1.-6.Tag in % der Werte am Aufarbeitungstag wiedergegeben. Die Aktivitätsmessungen erfolgten unter den angegebenen Versuchsbedingungen (siehe S.3) bei pH 7.5.Bis 24 Std. nach der Erstmessung ist die Esteraseaktivität nur unwesentlich verändert.Es kann damit auch für die Zeit der Aufarbeitung eine gleichbleibende Aktivität in den Milzextrakten angenommen werden.Nach dem 1.Tag sinkt die Aktivität merklich ab und beträgt am 6.Tag nur noch 21 % des Ausgangswertes.

j. Esteraseaktivität bei pH 5.o und 8.5

Bei pH 5.o trat in den Milzproteinlösungen während der Aktivitätsmessung eine opaleszierende Trübung auf.Für die Endpunkte des pH-Bereiches pH 5.o und pH 8.5 wurde deshalb untersucht,ob durch die Wasserstoffionenkonzentration bedingte irreversible Aktivitätsverluste auftraten.Jeweils 1 ml vom gleichen Milzextrakt wurde mit o.o2 m Phosphatpuffer von pH 5.o,7.o und 8.5 auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml verdünnt und 1 Std. lang bei 4° inkubiert.Anschließend wurde die Esteraseaktivität der 3 Proteinlösungen unter den angegebenen Versuchsbedingungen (siehe S.3) bei pH 7.o gemessen.In Tab.7 sind die Aktivitäten der bei pH 5.o und pH 8.5 inkubierten Proteinlösungen als Mittelwert aus 2 Versuchen in % der bei pH 7.o inkubierten wiedergegeben:

Tab.7

Aktivität nach Inkubation bei pH 5.o,7.o,8.5

pH	5.o	7.o	8.5
Aktivität	98%	100%	98%

Die Proteinlösungen weisen nach 1 stündiger Inkubation bei pH 5.o und pH 8.5 keine wesentlichen Aktivitätsverluste auf.Während der Zeit der Aktivitätsmessung von 5 min. ist deshalb ebenfalls mit keiner Verfälschung der Ergebnisse durch irreversible Aktivitätsverluste zu rechnen.

D. Statistische Auswertung der Versuche

a. Datensammlung

Alle Versuche wurden mit möglichst gleichartigen Ratten durchgeführt (siehe S.2 u.S.4).Durch Verwendung desselben Instrumentariums (Pipetten,Waagen,Uhrgläser,Spektrophotometer u.ä.) und gleicher Organaufbereitung bei allen Versuchen wurde die Vergleichbarkeit der Daten erreicht.Die einzelnen Versuche wurden in einem Zeitraum von 12 Monaten in wahlloser Reihenfolge durchgeführt,um einer einseitigen Beeinflussung der Ergebnisse durch zeitweise auftretende systematische Fehler (unterschiedliches Tiermaterial,Apparateeichung u.ä.) vorzubeugen.

b. Rechnerische Auswertung

1. Für zusammengehörige Versuche (=Stichprobe) wurden Mittelwert $\bar{x}$ und Standartabweichung des Mittelwertes $\bar{s}$ berechnet.
2. Jeder nach Bestrahlung errechnete Mittelwert wurde mittels des STUDENT-Tests daraufhin überprüft,ob er signifikant von dem entsprechenden Mittelwert für Normaltiere abweicht.

Die Anwendung des STUDENT-Tests setzt voraus,daß die Stichproben, denen die zu vergleichenden Mittelwerte entstammen,normalverteilt sind.Die Normalität der Stichproben vor und nach Bestrahlung wurde bei den Esteraseaktivitätsmessungen mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitspapiers untersucht.Die Stichproben wurden durch prozentuales Beziehen der einzelnen Meßwerte auf den jeweiligen Mittelwert untereinander vergleichbar gemacht und zu einer einzigen Gesamtstichprobe zusammengefaßt.Die Gesamtstichprobe wurde geordnet,in Klassen zu 1% eingeteilt und die Zahl der Werte/Klasse

festgestellt (Tab.8).Sodann wurde die kumulierte Häufigkeit der einzelnen Klassen berechnet (Tab.8) und im Wahrscheinlichkeitspapier aufgetragen (Abb.7):

Tab.8

kumulierte Häufigkeit der Gesamtstichprobe

Gesamtwertezahl: 1014 Esteraseaktivitätsmeßwerte

Klasse (% d.MW)	n	KH (%)	Klasse (% d.MW)	n	KH (%)	Klasse (% d.MW)	n	KH (%)
49-64	7	0.73	89	18	23.65	114	10	85.68
65	4	1.14	90	22	25.93	115	15	87.24
66	1	1.24	91	16	27.59	116	7	87.97
67	2	1.45	92	22	29.87	117	7	88.69
68	1	1.56	93	19	31.85	118	10	89.73
69	2	1.76	94	19	33.82	119	7	90.46
70	3	2.07	95	30	36.92	120	9	91.39
71	2	2.28	96	34	40.56	121	9	92.32
72	3	2.59	97	33	43.88	122	8	93.15
73	3	2.90	98	32	47.20	123	2	93.36
74	4	3.32	99	35	50.08	124	9	94.29
75	7	4.05	100	27	53.63	125	8	95.12
76	12	5.29	101	23	56.01	126	4	95.54
77	6	5.91	102	28	58.92	127	8	96.37
78	7	6.64	103	29	61.93	128	2	96.58
79	8	7.74	104	22	64.21	129	1	96.68
80	8	8.30	105	21	66.39	130	4	97.10
81	12	9.54	106	21	68.57	131	3	97.41
82	16	11.20	107	22	70.85	132	2	97.61
83	13	12.55	108	29	73.86	133	0	97.61
84	13	13.90	109	24	76.35	134	4	98.03
85	18	15.77	110	16	78.00	135	3	98.34
86	26	18.46	111	20	80.08	136-151	11	100.00
87	19	20.44	112	24	82.57			
88	13	21.78	113	20	84.65			

MW=Mittelwert der Gesamtstichprobe
n =Zahl der Einzelwerte/Klasse
KH=kumulierte Häufigkeit (1014 Werte = 100%)

Es ergibt sich vor allem im mittleren Teil der Kurve,in dem die größte Zahl der Einzelwerte lokalisiert ist,mit guter Näherung eine Gerade,die darauf hindeutet,daß die Gesamtstichprobe normalverteilt ist.Es kann deshalb mit ausreichender Sicherheit vermutet werden,daß die Einzelstichproben ebenfalls normalverteilt sind.Damit ist die Grundlage für die Anwendung des STUDENT-Tests zur Berechnung der Signifikanz der Mittelwerte gegeben.

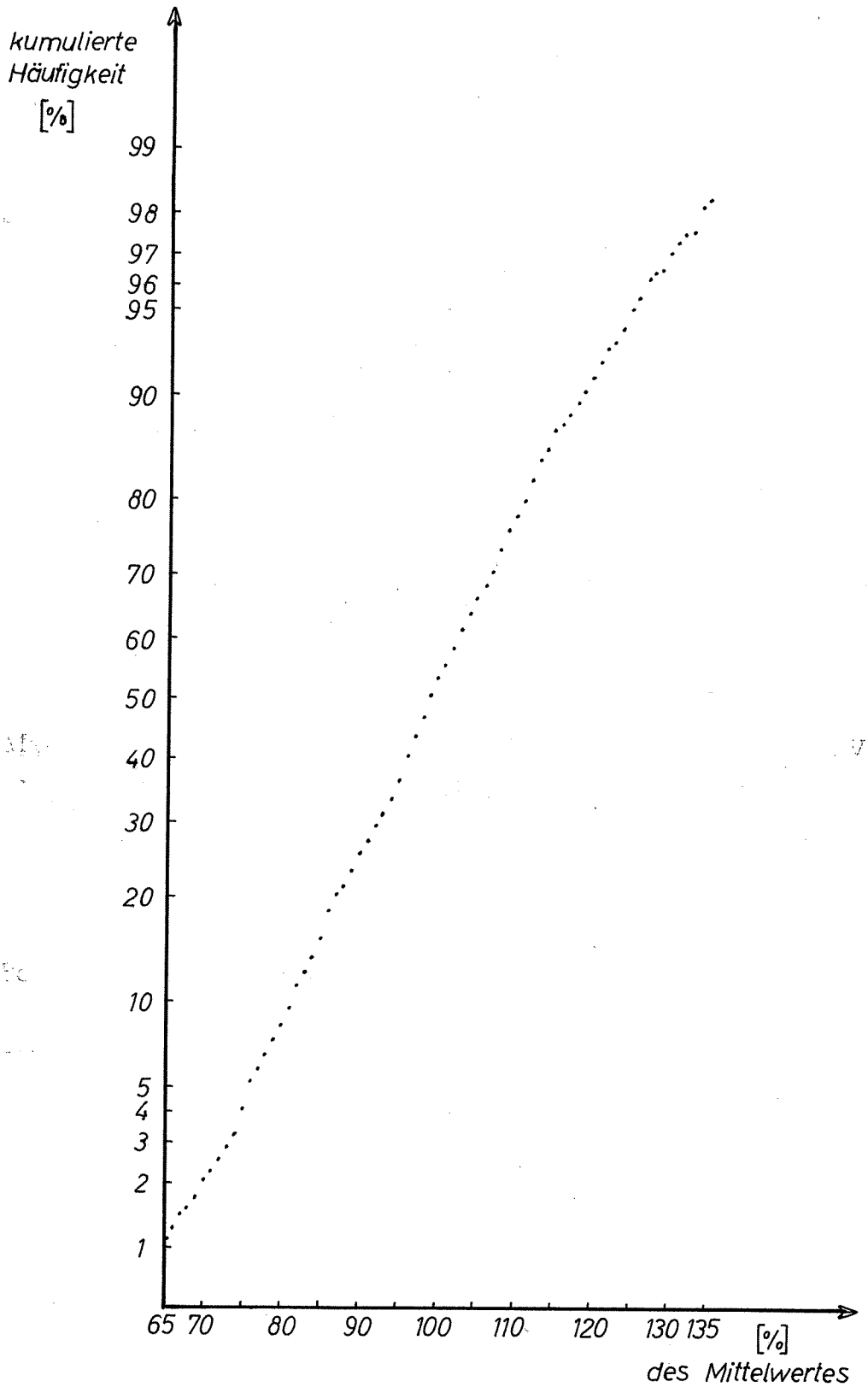


Abb.7 kumulierte Häufigkeit der Gesamtstichprobe

c. Formelsammlung

Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{x_1+x_2+..x_n}{N}$$

$\bar{x}$	Mittelwert der Stichprobe
$x_1, x_2 .. x_n$	Einzelwerte der Stichprobe (=Meßwerte)
N	Stichprobenumfang (=Zahl der Versuche)

Standartabweichung des Mittelwertes

$$\bar{s} = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

$\bar{s}$	Standartabweichung des Mittelwertes
x	Einzelwerte der Stichprobe (=Meßwerte)

Varianz des Mittelwertes

$$s^2 = \frac{\sum (x-\bar{x})^2}{(N-1)}$$

s^2	Varianz des Mittelwertes

Bezug der Einzelwerte auf den Mittelwert

$$Z = \frac{x \cdot 100}{\bar{x}}$$

Z	Einzelwert in % des Mittelwertes

STUDENT-Test

Für die Durchführung des STUDENT-Tests wird angenommen, daß die wahren Standartabweichungen σ_1, σ_2 der zu vergleichenden Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ einander gleich sind. Die Zulässigkeit dieser Annahme wird mit Hilfe der F-Verteilung überprüft. Es wird der Prüfquotient Q aus den Varianzen s_1^2 und s_2^2 der zu vergleichenden Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ gebildet:

$$Q = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Sodann wird aus der Tabelle (GEIGY-Tabellen 1962) entnommen, ob der Prüfquotient Q mit dem Freiheitsgrad $\nu_1 = N_1 - 1$ und $\nu_2 = N_2 - 1$ unter der Signifikanzschranke F (P=o.o5) bleibt. Dies ist für alle Mittelwerte der Fall. Es kann deshalb mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von P=o.o5 angenommen werden, daß die Standartabweichungen σ_1 und σ_2 der zu vergleichenden Mittelwerte gleich groß sind:

$\sigma_1 = \sigma_2$

Für den STUDENT-Test wird nun die Differenz $\underline{d}$ der zu vergleichenden Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ gebildet:

$$\underline{d} = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$$

Die gemeinsame Standartabweichung der zu prüfenden Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ beträgt:

$$s_\nu = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x}_1)^2 + \sum(x-\bar{x}_2)^2}{(N_1+N_2-2)}}$$

s_ν gemeinsame Standartabweichung von $\bar{x}_1, \bar{x}_2$

N_1, N_2 Zahl der Einzelwerte, aus denen $\bar{x}_1, \bar{x}_2$ berechnet wurden

Die Standartabweichung $s_{\nu d}$ der Mittelwertdifferenz $\underline{d}$ ergibt sich zu:

$$s_{\nu d} = s_\nu \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

Der Freiheitsgrad ν von $s_{\nu d}$ beträgt:

$$\nu_{s_{\nu d}} = N_1 + N_2 - 2$$

Aus $s_{\nu d}$ und $\underline{d}$ wird der Prüfquotient t_ν gebildet:

$$t_\nu = \frac{s_{\nu d}}{\underline{d}}$$

Dann wird für t_ν und $\nu_{s_{\nu d}}$ aus der STUDENT-Verteilung $f(t/\nu)$ die kumulierte Wahrscheinlichkeit ermittelt (GEIGY-Tabellen 1962), die angibt mit welcher Wahrscheinlichkeit die verglichenen Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ übereinstimmen. Zwei Mittelwerte werden als <u>signifikant</u> voneinander verschieden betrachtet, wenn die Wahrscheinlichkeit für Übereinstimmung $2\alpha < 0.05$ beträgt.

E. Ergebnisse

a. Verhalten der bestrahlten Tiere

In den ersten drei Tagen nach Bestrahlung war eine Abnahme der

allgemeinen Motilität festzustellen.Die Tiere lagen schläfrig herum,nahmen wenig Nahrung zu sich und bekamen ein struppiges Fell.Am 3.u.4.Tag traten Durchfälle auf.Nach Überwindung des Strahlenkaters am Ende der ersten Woche war äußerlich nur mehr wenig festzustellen.Im Laufe der zweiten Woche kam es vor allem im Bereich der Schädelkalotte zu Haarausfall.

b. Letalität nach Bestrahlung

Die Dosis von 5oo R war so hoch,daß einzelne Tiere nach verschieden langer Zeit starben.In einem Überlebensversuch mit 5o Ratten waren nach 3o Tagen 17 Tiere gestorben,was einer Überlebensrate von 66 % entspricht.In Tab.9 sind die Todesfälle von allen durchgeführten Versuchen in zeitlicher Reihenfolge aufgetragen:

Tab.9

Überlebensrate

Tage	Tiere	Todesf.	% Überl.	Tage	Tiere	Todesf.	% Überl.
o	675	o	1oo.o	11	15o	4	87.1
1	675	o	1oo.o	12	15o	6	83.1
2	625	o	1oo.o	13	15o	4	8o.4
3	575	2	99.7	14	15o	4	77.7
4	42o	4	98.7	15	15o	2	76.4
5	39o	5	97.4	16	75	1	75.1
6	36o	5	96.o	17	75	2	72.4
7	24o	3	94.8	19	5o	2	68.4
8	24o	9	91.o	22	5o	2	64.4
9	24o	3	89.8	29	5o	1	62.4
1o	15o	o	89.8	3o	5o	o	62.4

Die Überlebensrate wurde folgendermaßen berechnet:

Da die Zahl der bestrahlten Tiere nicht gleichblieb,sondern laufend eine Entnahme für Versuche erfolgte,wurden die an den einzelnen Tagen verendeten Tiere in % der an diesem Tag insgesamt vorhandenen Tiere ausgedrückt.Die so ermittelten Werte wurden im Gesamtzeitraum addiert und vom Ausgangswert vor Bestrahlung,der 1oo % beträgt,abgezogen.Die Überlebensrate ergab sich dann zu 62 % (Abb.8).Die gute Übereinstimmung der Überlebensrate beim Überlebensversuch mit 5o Ratten und der durch die Zusammenfassung aller Versuche ermittelten spricht für eine gleiche Strahlenempfindlichkeit der verwendeten Ratten

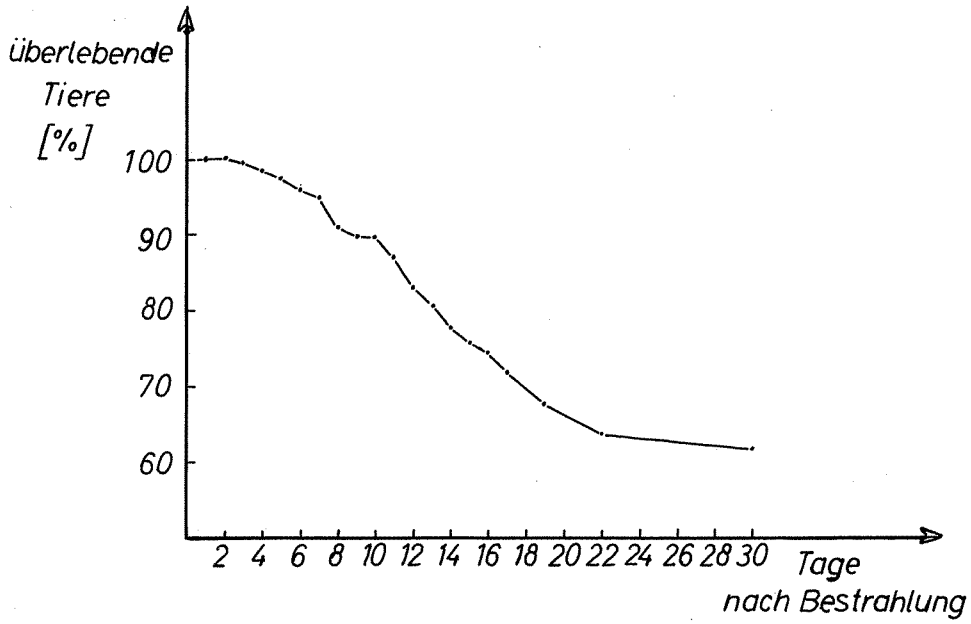


Abb.8 Überlebensrate der Ratten nach 5oo R Ganzkörperbestrahlung

im gesamten Versuchszeitraum von 12 Monaten.

c. Milzgewicht

Die Milz zeigt nach Bestrahlung eine deutliche Gewichtsabnahme, deren Maximum mit nur 3o % des Normalgewichtes am 5.Tag nach Bestrahlung auftritt (Tab.1o,Abb.9):

Tab.1o

Milzgewicht

bestrahlte Tiere:			unbestrahlte Tiere		
Tage	Tiere	Milzgew. (g/Tier)	Tage	Tiere	Milzgew. (g/Tier)
o	23o	o.53±.o3	o	23o	o.53±.o3
1	5o	o.25±.o2	6	5	o.48± -
2	5o	o.21±.o1	15	1o	o.58± -
3	155	o.19±.o3	18	1o	o.61± -
4	3o	o.2o±.o6			
5	3o	o.15±.o2			
6	12o	o.2o±.o2			
9	9o	o.27±.o2			
15	75	o.55±.o4			
18	25	o.79±.12			

Die unterstrichenen Werte weichen signifikant (=zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit $2\alpha < o.o5$) vom Mittelwert bei unbestrahlten Ratten ab.

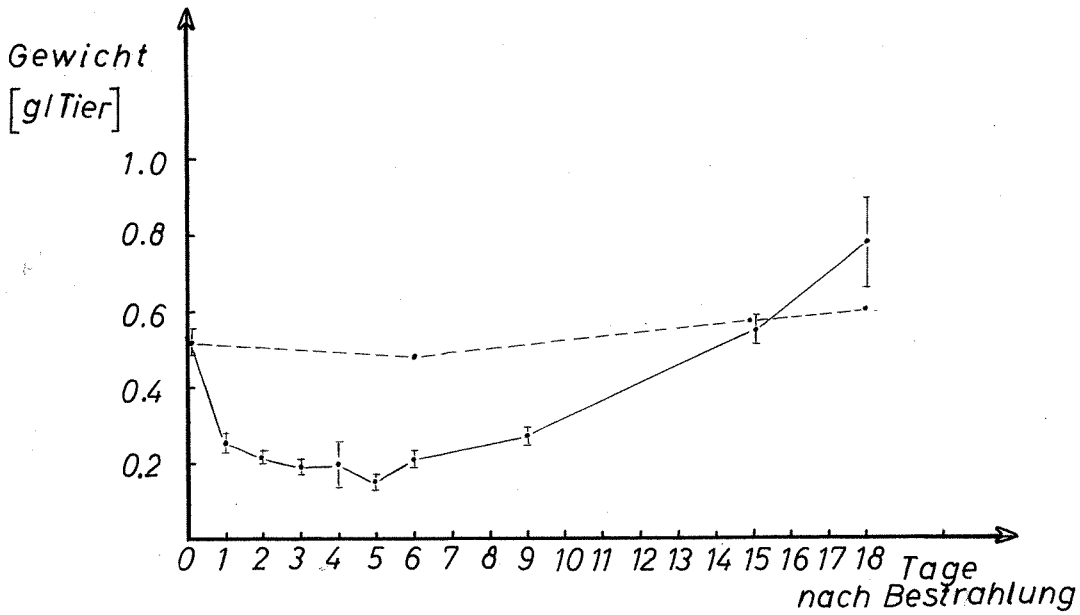


Abb.9 Milzgewicht von unbestrahlten und 5oo R-ganzkörperbestrahlten Ratten

Ab dem 6.Tag nimmt das Organ merklich an Gewicht zu und erreicht um den 15.Tag nach Bestrahlung den Ausgangswert wieder.Am 18. Tag besteht eine Milzvergrößerung.Bei Kontrolltieren tritt im Versuchszeitraum eine geringfügige Milzvergrößerung auf.

d. Proteinkonzentration der Milzextrakte

Die gemessenen Proteinkonzentrationen der Milzextrakte wurden mit Formel (3) (siehe S.7) auf 1:1 Verdünnung umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen (Tab.11,Abb.1o):

Tab.11
Proteinkonzentration

Tage	Versuche	Proteinkonz. (mg/ml)
o	21	51.3±1.6
1	5	58.6±2.8
2	4	57.5±1.6
3	15	51.7±2.o
4	3	48.3±2.9
5	3	47.o±2.3
6	12	41.4±1.6
9	8	43.o±2.o
15	5	44.o±1.7
18	2	45.o±1.o

Die unterstrichenen Werte weichen signifikant (=zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit $2\alpha < o.o5$) vom Mittelwert bei unbestrahlten Ratten ab.

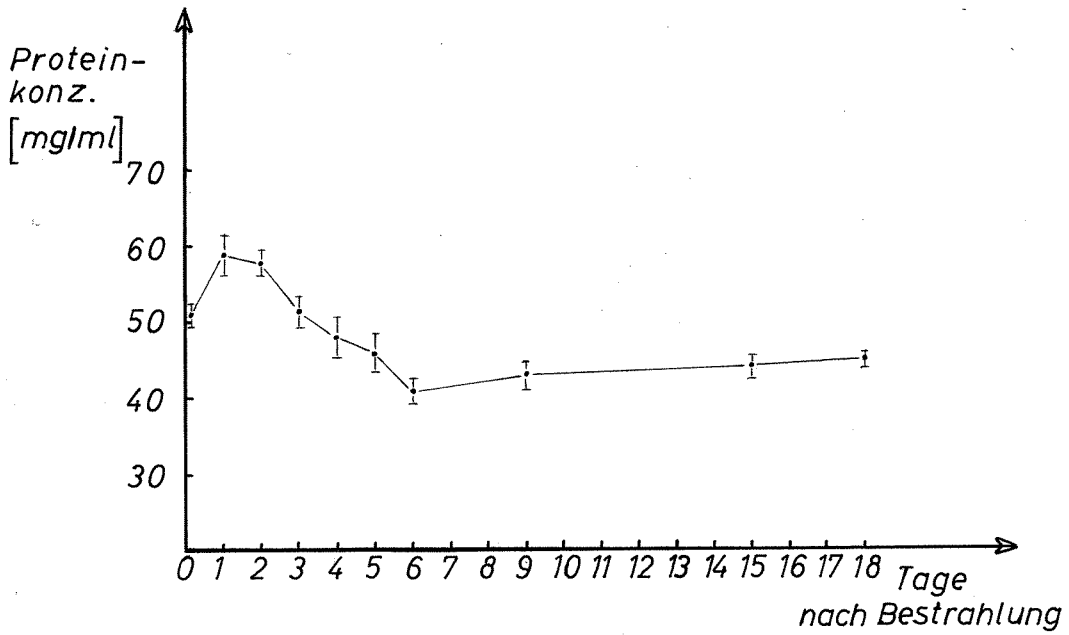


Abb.1o Proteinkonzentration in Milzextrakten aus 1:1 mit aqua dest. verdünnten Milzhomogenaten bei 5oo R-ganzkörperbestrahlten Ratten

Die Proteinkonzentration der Milzextrakte steigt am 1.-2.Tag auf übernormale Werte an,kehrt am 3.Tag zum Normalwert zurück und fällt bis zum 6.Tag nach Bestrahlung auf ein Minimum ab.In der Folgezeit beginnt ein langsamer Wiederanstieg,der bis zum 18.Tag nach Bestrahlung nicht bis zum Ausgangswert zurückführt.

e. Esteraseaktivität in Milzextrakten

In Abb.11 ist die Esteraseaktivität von Milzextrakten (Tab.12) in Abhängigkeit vom pH-Wert für die verschiedenen Tage nach Bestrahlung wiedergegeben.Unbestrahlte Tiere zeigen eine eingipflige,ins Saure und Alkalische langsam abfallende Aktivitätskurve mit Maximum bei pH 7.5.Nach Bestrahlung erfolgt eine allgemeine Aktivitätszunahme ohne Lageveränderung des Aktivitätsmaximums.Zusätzlich tritt von pH 6.o-6.5 eine Schulter auf. Bei pH 7.o bildet sich ein vom 3.-9.Tag nach Bestrahlung bestehender Punkt gleicher Aktivität heraus.Die Darstellung der Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit (Abb.12) gestattet einen besseren Einblick in den zeitlichen Verlauf der strahlungsbedingten Aktivitätsänderungen.Die höchste Aktivität ergibt sich

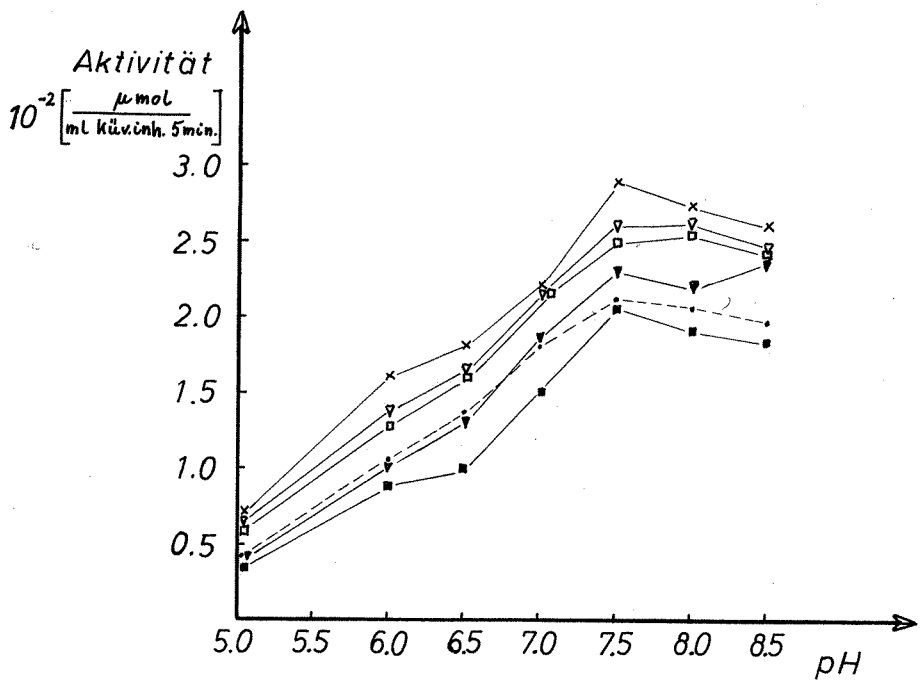


Abb.11 Esteraseaktivität von Milzextrakten unbestrahlter Ratten, sowie 3 Tage, 6 Tage, 9 Tage, 15 Tage und 18 Tage nach 500 R Ganzkörperbestrahlung

Tab.12

Meßzeit: 5 min.
Temperatur: 30°
Substratkonz.i.d.Meßküvette: 48.4 µg/ml (=26.7x10^{-2} µmol/ml)
Proteinkonz.i.d.Meßküvette: 161.3 µg/ml
Esteraseaktivität pH 5.0-8.5 in: 10^{-2} µmol/ml Küv.inh.5 min.

		pH						
T.	n	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
0	19	0.40±.04	1.06±.03	1.37±.04	1.81±.08	2.12±.07	2.07±.12	1.97±.15
1	5	0.80±.07	1.35±.11	1.49±.09	2.05±.16	2.35±.15	-	-
2	4	0.90±.08	1.49±.06	1.65±.06	2.06±.00	2.67±.08	-	-
3	12	0.71±.07	1.61±.07	1.82±.10	2.20±.16	2.89±.17	2.74±.18	2.61±.15
4	3	0.78±.01	1.50±.15	1.78±.17	-	2.81±.04	-	-
5	3	0.64±.04	1.48±.09	1.65±.12	-	2.81±.03	-	-
6	12	0.64±.07	1.39±.06	1.66±.06	2.19±.18	2.62±.11	2.63±.14	2.45±.12
9	8	0.61±.04	1.30±.05	1.64±.05	2.18±.10	2.50±.10	2.56±.13	2.43±.09
15	5	0.41±.04	1.03±.04	1.33±.13	1.87±.03	2.31±.09	2.22±.05	2.39±.13
18	2	0.32±.03	0.89±.02	1.02±.08	-	2.07±.01	-	-

T.=Tage nach Bestrahlung
n =Zahl der Versuche
Unterstrichene Aktivitätswerte weichen signifikant (=zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit $2\alpha < 0.05$) vom Mittelwert für Extrakte bei unbestrahlten Ratten ab.

mit Ausnahme von pH 5.o am 3.Tag nach Bestrahlung.Danach sinkt die Aktivität bei allen pH-Werten langsam ab,am 15.Tag ist eine

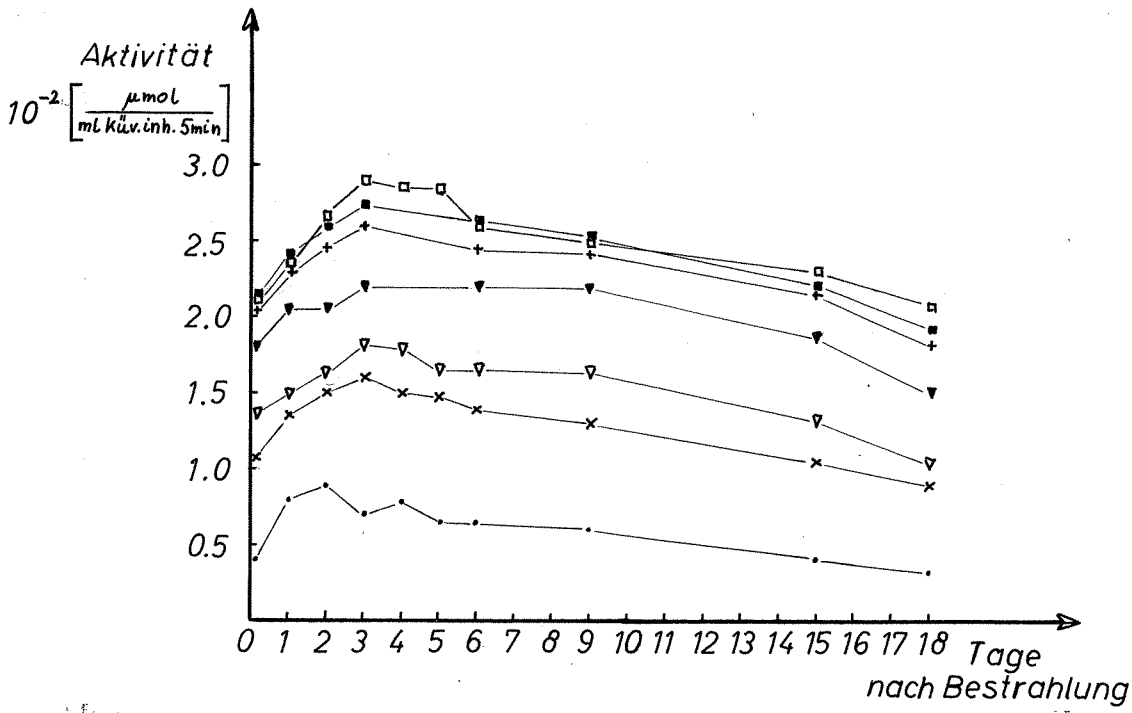


Abb.12 Zeitlicher Verlauf der Esteraseaktivität in Milzextrakten von Ratten bei pH 5.o,6.o,6.5,7.o,7.5, 8.o und 8.5 nach 5oo R Ganzkörperbestrahlung

weitgehende Normalisierung und nach 18 Tagen ein Absinken unter den Normalwert eingetreten.

F. Besprechung der Ergebnisse

1. Milzaufbau

Die Rattenmilz gehört wie die menschliche Milz zu den lymphgewebsreichen Stoffwechselmilzen mit ausgeprägtem Sinussystem (COHRS,SCHULZ 1958,v.HERRATH 1958).Neben schwach ausgebildetem bindegewebigem Kapsel- und Trabekelwerk enthält das Rattenmilzparenchym Lymphozyten (66%),Retikulumzellen (9%),sowie Myelozyten (12%),Erythroblasten (12%),Makrophagen und Megakaryozyten (insgesamt 1%) (KINDRED 1942).

2. Morphologische Strahlenschäden

Die Röntgenganzkörperbestrahlung ruft in der Rattenmilz (COTTIER

1966b,STENDER 1963,SCHERER 1956,PAPE,JELLINEK 1948,MURRAY 1948, POHLE,BUNTING 1936,HEINEKE 19o3,19o4),ebenso wie in der Menschenmilz (COTTIER 1966b) einen tiefgreifenden Gewebsumbau hervor,der von den verschiedenen Untersuchern weitgehend übereinstimmend beschrieben wird.Makroskopisch fällt der bereits von HEINEKE 19o3 gefundene Gewichtsverlust der Milz auf.Mikroskopisch ergeben sich nach 6oo R Ganzkörperbestrahlung von Ratten (MURRAY 1948) folgende Veränderungen,die sich in diesem Zusammenhang in drei Stadien einteilen lassen:

a. Destruktionsphase — Die überwiegende Mehrzahl der Lymphozyten zerfällt innerhalb der ersten 3 Std. nach Bestrahlung.Die Zelltrümmer werden phagozytiert und abgebaut.Nach 17-24 Std. treten sie nicht mehr in Erscheinung.Myelozyten, Erythroblasten und Megakaryozyten nehmen ebenfalls an Zahl ab.Ein Untergang von Retikulumzellen wird dagegen nicht beobachtet.

b. Ruhephase — Vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung zeigt das morphologische Bild eine Phase der relativen Ruhe,in der eine weitgehende Hemmung der Zellteilungsvorgänge festzustellen ist.Es überwiegen die strahlenresistenten und protei reichen Retikulumzellen.Von den Lymphozyten und anderen Zellen sind nur wenige übrig geblieben.Die Wiederbevölkerung des Gewebes ist nur gering.Es liegt damit in der histologischen Ruhephase vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung eine nach Art und Zahl weitgehend gleichbleibende Zellbevölkerung vor,die in ihrer Zusammensetzung relativ homogen ist,da die überlebenden Zellen vorwiegend aus Retikulumzellen und ihnen morphologische nahestehenden Zellelementen bestehen.

c. Regenerationsphase — Vom 9.Tag nach Bestrahlung an nehmen die Lymphozyten,Myelozyten,Erythroblasten und

Megakaryozyten zunächst zögernd,dann in verstärktem Maße an Zahl zu.Die Ausgangsarchitektur des Gewebes wird allerdings bis zum Ende der 3.Woche nicht vollständig wieder hergestellt.

Die quantitative Auszählung der Gesamtzellzahl der Milz von 1ooo R-ganzkörperbestrahlten Ratten (ERNST 1962) ergibt in Übereinstimmung mit den beschriebenen qualitativen Veränderungen den Hauptzellschwund ebenfalls innerhalb der ersten 24 Std. nach Bestrahlung (Tab.13):

Tab.13

Milzzellverlust

ERNST 1962						eigene Versuche		
Tage	Tiere	Milzgewicht (g/Tier)	(%)	Zellen/Organ ($x10^7$)	(%)	Tiere	Milzgewicht (g/Tier)	(%)
o	136	o.47	1oo	138.o	1oo	23o	o.53	1oo
1	125	o.29	62	68.5	5o	7o	o.25	47
2	9o	o.21	45	52.5	38	6o	o.21	4o

Der Zellverlust geht dabei der Organgewichtsabnahme parallel.

Die eigenen Befunde ergeben ein ähnliches Bild:
Das Milzgewicht beträgt am 1.Tag 47 % und am 2.Tag 4o % der Norm. Die zusätzliche Gewichtsabnahme am 2.Tag ist gering.Es kann deshalb angenommen werden,daß der Zellschwund in der Milz nach 5oo R Ganzkörperbestrahlung am 1.Tag nach Bestrahlung im wesentlichen abgeschlossen ist.

3. Biochemische Veränderungen

a. Auswertung der Milzproteinbefunde

Zur Auswertung stehen folgende Meßgrößen zur Verfügung:

(1) die Proteinkonzentration der Milzextrakte (siehe S.25)

(2) das Milzgewicht (siehe S.24)

Daraus werden zur Feststellung von Veränderungen des Milzproteingehaltes folgende Größen berechnet:

(3) das Gesamtprotein/Milz (g Protein/Milz)

(4) der Proteingehalt/g Milzgewebe (g Protein/g Milzgeweb

Zur Übertragung von Gesamtprotein/Milz und Proteingehalt/g Milz-

gewebe auf die Verhältnisse in der Organeinzelzelle wird zusätzlich aus dem morphologischen Bild die Zeitspanne benötigt, während der in der Milz mit einer praktisch homogenen und zahlenmäßig konstanten Zellbevölkerung gerechnet werden kann. Sie wird dargestellt durch die

(5) histologische Ruhephase vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung.

Aus den Daten (2)-(4) lassen sich während der histologischen Ruhephase folgende Aussagen bezüglich der Organeinzelzellen machen:

(I) Bei homogener und zahlenmäßig konstanter Zellbevölkerung sind Organgewichtsveränderungen ein Maß für Veränderungen des Zellgewichtes,und da die Dichte biologischer Flüssigkeiten und Gewebe innerhalb enger Grenzen konstant ist, auch der Zellgröße.

(II) Bei homogener und zahlenmäßig konstanter Zellbevölkerung sind Veränderungen des Gesamtproteins/Organ ein Maß für Veränderungen des Zellproteingehaltes.

(III) Bei homogener und zahlenmäßig konstanter Zellbevölkerung sind Veränderungen des Proteingehaltes/g Milzgewebe ein Maß für Veränderungen der Zellproteinkonzentration.

Milzgewicht (2),Gesamtprotein/Milz (3),Proteingehalt/g Milzgewebe (4)

In Abb.13 ist der Verlauf von Milzgewicht,Gesamtprotein/Milz und Proteingehalt/g Milzgewebe vom 1.-18.Tag nach Bestrahlung in % der Normalwerte wiedergegeben.Milzgewicht und Gesamtmilzprotein fallen nach Bestrahlung deutlich ab,und weisen am 3. bzw. 6.Tag minimale Werte auf.In der Folge beginnt ein Wiederanstieg,der am 15.Tag zu einem normalen Milzgewicht bei noch erniedrigtem Gesamtprotein führt.Am 18.Tag liegen beide Größen über dem Normalwert.Der Proteingehalt/g Milzgewebe steigt am 1.-2.Tag über den Normalwert an,sinkt auf ein Minimum am 6.Tag ab und steigt vom 6.-18.Tag nur langsam an,ohne den Ausgangswert zu erreichen.

Aus den Kurven läßt sich Folgendes ableiten:

1. Die Gewichtsabnahme der Milz am 1.Tag kann als Ausdruck des

Zelluntergangs angesehen werden.

2. Die Verminderung des Gesamtprotein/Milz am 1.Tag spricht dafür,daß die untergegangenen Lymphozyten einen deutlichen Proteingehalt aufweisen.

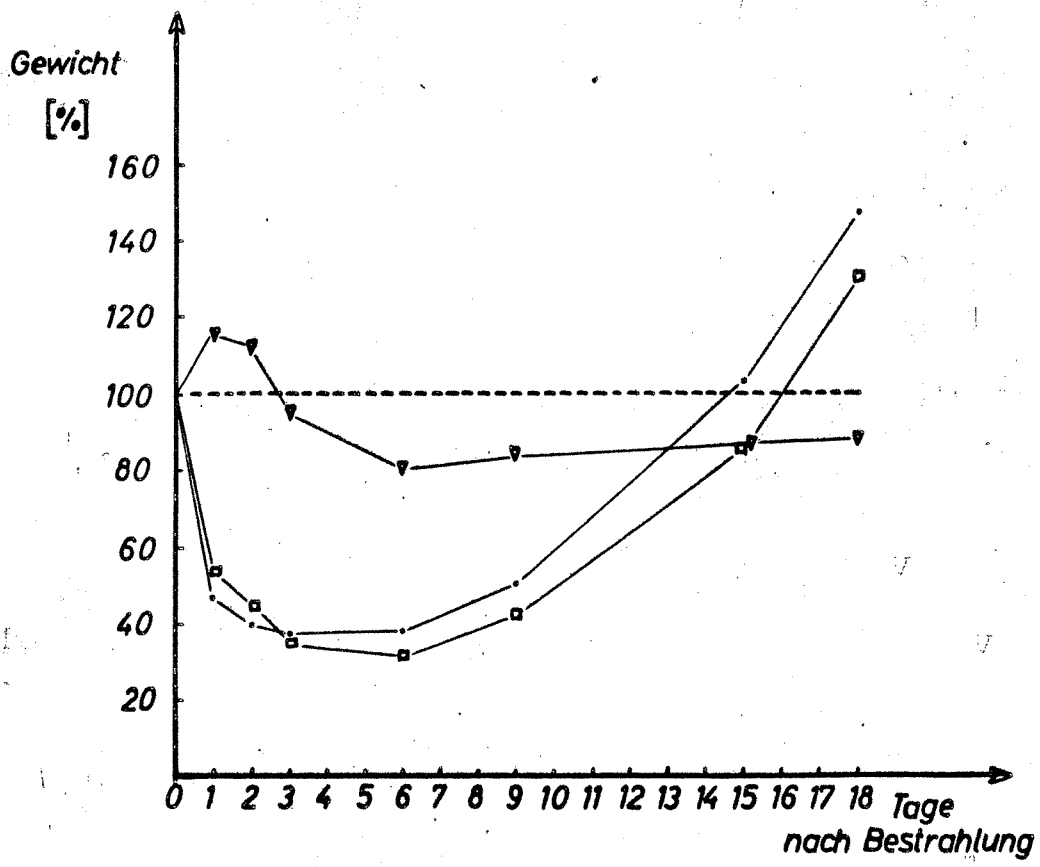


Abb.13 Milzgewicht,Gesamtprotein/Milz und Proteingehalt/g Milzgewebe bei 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

3. Die Verminderung des Gesamtprotein/Milz am 1.Tag zeigt weiterhin,daß das Protein der untergegangenen Zellen nicht in der Milz gespeichert,sondern bis zum 1.Tag abgebaut und ausgeschwemmt wird.

4. Der Anstieg des Proteingehalts/g Milzgewebe am 1.u.2.Tag nach Bestrahlung deutet darauf hin,daß die überlebenden strahlenresistenten Zellen proteinreicher sind als die untergegangenen Lymphozyten.Die überlebenden Zellen rücken näher zusammen und bewirken dadurch die Erhöhung des Protein-

gehalts/g Milzgewebe über die Norm.

5. Vom 1.-6.Tag sinkt das Gesamtprotein/Milz stärker ab als das Milzgewicht,was für eine fortschreitende Proteinverarmung der Milz spricht.
6. Die Ausgangswerte von Milzgewicht und Gesamtprotein/Milz sind zwischen dem 15.-18.Tag erreicht,dagegen wird das Ausgangsverhältnis der einzelnen Größen zueinander bis zum 18.Tag nicht wieder hergestellt.Der Ausgangswert des Proteingehalts/g Milzgewebe wird bis zum 18.Tag nach Bestrahlung nicht wieder erreicht.

Zellgröße (I),Zellproteingehalt (II),Zellproteinkonzentration (III)

Vom 1.-9.Tag nach Ganzkörperbestrahlung liegt in der Milz eine annähernd homogene und zahlenmäßig konstante Zellbevölkerung vor (siehe S.29 u.S.3o).Bezieht man Milzgewicht,Gesamtprotein/Milz und Proteingehalt/g Milzgewebe vom 2.-9.Tag auf die Werte des 1.Tages nach Bestrahlung,so ergeben sie ein Maß für die jeweilige Zellgröße,den Zellproteingehalt und die Zellproteinkonzentration (siehe S.31 (I)-(III)).

In Abb.14 sind Milzgewicht,Gesamtprotein/Milz und Proteingehalt/g Milzgewebe vom 2.-9.Tag nach Bestrahlung in % der Werte des 1.Tages wiedergegeben.Zellgröße und Zellproteingehalt nehmen vom 1.Tag an ab und erreichen am 3. bzw. 6.Tag minimale Werte.Der anschließende Wiederanstieg führt bei der Zellgröße bis zum 9.Tag zum Normalwert zurück,während der Zellproteingehalt zu diesem Zeitpunkt noch erniedrigt ist.Die Zellproteinkonzentration ist bis zum 2.Tag unverändert,nimmt in der Folge bis zum 6.Tag ab,steigt nur langsam wieder an und erreicht den Ausgangswert bis zum 9.Tag nicht wieder.

Aus den Kurven läßt sich Folgendes ableiten:

1. Der bestimmende Vorgang bei den auftretenden Veränderungen ist der Zellproteinverlust,der vom 1.-6.Tag zunehmend fortschreitet und zunächst zu einer Abnahme von Zellproteingehalt und Zellgröße und ab dem 2.Tag auch der Zellproteinkonzentration führt.

2. Die Zellproteinkonzentration ist der Wert, der nach Bestrahlung am längsten unverändert bleibt, aber auch am längsten braucht, um wiederhergestellt zu werden.

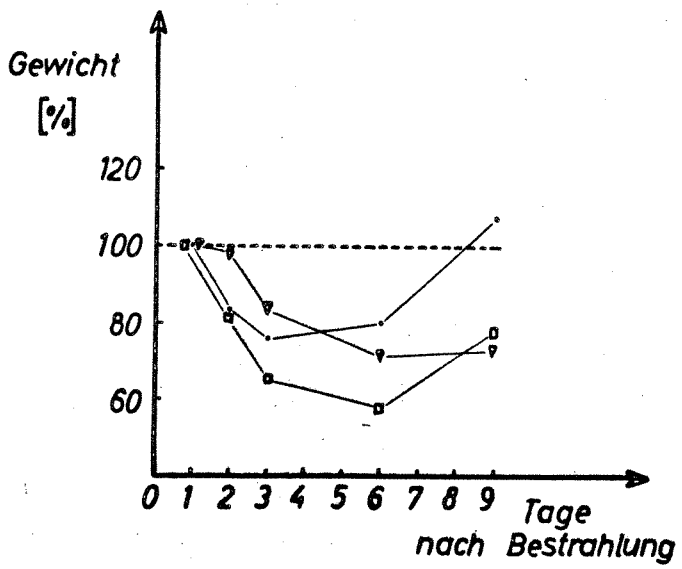


Abb.14 Zellgröße, Zellproteingehalt und Zellproteinkonzentration von Milzzellen bei 5oo R-ganzkörperbestrahlten Ratten.

Es erhebt sich die Frage, inwieweit die gefundenen Zellgrößenveränderungen auch im morphologischen Bild nachweisbar sind. Mit deutlich sichtbaren Änderungen des Zelldurchmessers ist nicht zu rechnen, da eine Verminderung der Zellgröße auf 8o %, wie sie am 3. Tag nach Bestrahlung auftritt (Abb.14), nur eine der 3. Wurzel entsprechende Radiusänderung auf 93 % der Norm verursacht. Im Einzelnen werden nach Ganzkörperbestrahlung folgende Befunde beschrieben (Tab.14):

Tab.14
Zellgrößenveränderungen
nach Bestrahlung

3.Std. Auftreten heller Herde in den Follikeln mit großen Zellen, die einen bläschenförmigen Kern und einen großen Protoplasmaleib aufweisen (HEINEKE 19o4, Ratten, keine Dosisangabe).

1.Tag Sehr prominente epitheloide Massen von Retikulumzellen in den Zentren der Milzfollikel (MURRAY 1948, Kaninchen und Ratten,4oo,6oo,8oo R)
Helle Follikel (PAPE,JELLINEK 1948,Ratten,3oo R)
Epitheloide Retikulumzellen (COTTIER 1966,Mäuse,6oo R)

2.Tag Prominente epitheloide Massen (MURRAY 1948,w.o.)

4.Tag Epitheloide Massen verschwinden langsam (COTTIER 1966,w.o.)

5.Tag kontrahierte epitheloide Massen (MURRAY 1948,w.o.)

6.Tag Epitheloide Zellen verschwinden langsam (COTTIER 1966,w.o.)

9.Tag Noch keine Lymphozyten (MURRAY 1948,w.o.)

1o.Tag stellenweise treten reichlicher epitheloide Zellen um die Follikel in Erscheinung (PAPE,JELLINEK 1948,w.o.)

In Tab.15 sind die morphologisch erschließbaren Zellgrößenveränderungen der Tab.14 denen gegenübergestellt,die sich aus den Milzgewichtsveränderungen der eigenen Versuche ergeben (Abb.14):

Tab.15
Zellgrößenveränderungen
nach Bestrahlung

Tage n. Bestr.	Morphologisch (epitheloide Zellen)	Biochemisch (eigene Versuche)
1	sehr prominent (MURRAY 1948) durch Abbildung demonstriert	Der 1.Tag nach Bestrahlung dient als Bezugspunkt
2	prominent (MURRAY 1948) durch Abbildung demonstriert	Zellverkleinerung
5	kontrahiert (MURRAY 1948) durch Abbildung demonstriert	verkleinerte Zellen
1o	stellenweise reichlicher (PAPE,JELLINEK 1948)	Zellvergrößerung

Der Vergleich zeigt,daß die in den eigenen Versuchen bestimmten Zellgrößenveränderungen in zeitlicher Übereinstimmung auch im histologischen Bild gefunden werden.Damit ist am Beispiel der

Zellgröße gezeigt,daß die Übertragung biochemischer Befunde auf die Einzelzellen der Milz auch nach Bestrahlung möglich sein kann.

b. Auswertung der Esteraseaktivitätsbefunde in der Milz

Zur Auswertung stehen folgende Meßwerte zur Verfügung:

(1) die Esteraseaktivität in Milzextrakten (siehe S.26)
(2) die Proteinkonzentration in Milzextrakten (siehe S.25)
(3) das Milzgewicht (siehe S.24)

Daraus werden zur Feststellung von Veränderungen des Milzesterasegehalts folgende Größen berechnet:

(4) die Gesamtesteraseaktivität/Milz (µmol NP/Milz 5min.)
(5) die Esteraseaktivität/g Milzgewebe (µmol NP/g Milzgewebe 5min.)

Zur Übertragung von Gesamtesteraseaktivität/Milz und Esteraseaktivität/g Milzgewebe auf die Organeinzelzelle wird zusätzlich aus dem morphologischen Bild die Zeitspanne benötigt,während der in der Milz mit einer annähernd homogenen und zahlenmäßig konstanten Zellbevölkerung gerechnet werden kann.Sie wird dargestellt durch:

(6) die histologische Ruhephase vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung

Aus den Daten (3)-(5) lassen sich während der histologischen Ruhephase bezüglich der Organeinzelzelle folgende Aussagen machen:

(I) Bei homogener und zahlenmäßig konstanter Zellbevölkerung sind Veränderungen der Gesamtesteraseaktivität/Milz ein Maß für Veränderungen des Zellesterasegehaltes.

(II) Bei homogener und zahlenmäßig konstanter Zellbevölkerung sind Veränderungen der Esteraseaktivität/g Milzgewebe ein Maß für Veränderungen der Zellesterasekonzentration.

Gesamtesteraseaktivität/Milz (4),Esteraseaktivität/g Milzgewebe (5)

In Abb.15 ist der Verlauf der Gesamtesteraseaktivität/Milz für pH 5.o-8.5 vom 1.-18.Tag nach Bestrahlung in % der Normalwerte wiedergegeben.Zusätzlich ist das Gesamtprotein/Milz (Abb.13) als Vergleichswert eingezeichnet.Die Aktivitätskurven sind dadurch gekennzeichnet,daß sie mit Ausnahme von pH 5.o für

alle anderen pH-Werte einen ähnlichen Verlauf aufweisen.Am 1.Tag kommt es zu einem steilen Abfall,der vom 2.-6.Tag zunehmend flacher wird.Am 6.Tag ist das Aktivitätsminimum erreicht.In der Folge nimmt die Aktivität wieder zu und erreicht für alle pH-Werte zwischen dem 15.-18.Tag den Normalwert.

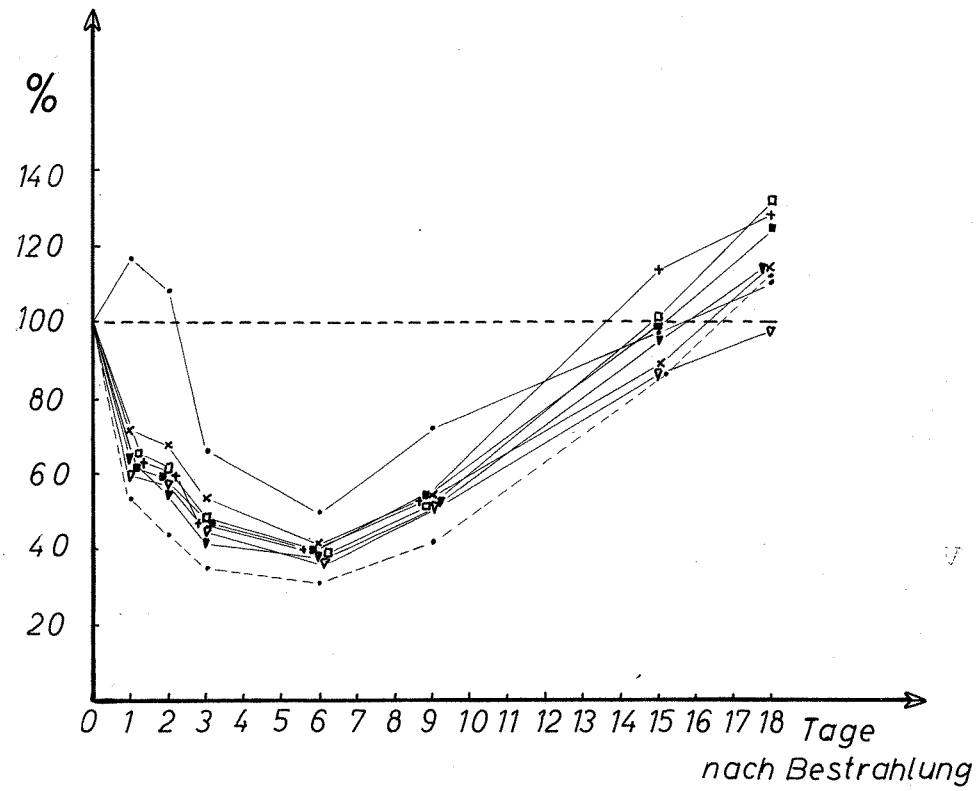


Abb.15 Gesamtesteraseaktivität/Milz bei pH 5.o,6.o,6.5, 7.o,7.5,8.o,8.5 und Gesamtprotein/Milz von 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

Aus den Kurven läßt sich Folgendes ableiten:

1. Der beträchtliche Abfall der Esteraseaktivität bei pH 6.o-8.5 am 1.Tag nach Bestrahlung spricht dafür,daß die untergegangenen Lymphozyten eine deutliche Esteraseaktivität aufweisen.
2. Eine besondere Beachtung verdient das Verhalten der Esteraseaktivität bei pH 5.o.Trotz Milzgewichts- und Proteinverlusts (Abb.13)ist sie am 1.u.2.Tag im Gegensatz zu den übrigen pH-Werten über den Grundwert hinaus erhöht.Es dürfte

sich hierbei um eine aktive Leistung der überlebenden Zellen handeln,da bei den beträchtlichen Zellverlusten eine Aktivitätszunahme über den Normalwert hinaus anderweitig schwer erklärbar ist.

3. Die selektive Zunahme der Esteraseaktivität im Sauren spricht dafür,daß in den Milzextrakten mehrere Esterasen gemessen wurden.

In Abb.16 ist der Verlauf der Esteraseaktivität/g Milzgewebe für pH 5.o-8.5 vom 1.-18.Tag nach Bestrahlung in % der Normalwerte wiedergegeben.Zum Vergleich ist der Proteingehalt/g Milzgewebe (Abb.13) eingezeichnet.Nach einem Aktivitätsanstieg am 1.Tag tritt einheitlich ein Maximum am 2.Tag nach Bestrahlung auf.Vom 2.-6.Tag fällt die Aktivität ab und erreicht am 6.Tag wieder Normalwerte.Vom 6.-9.Tag liegt sie bei pH 6.o-8.5 im Normalbereich und fällt vom 9.-18.Tag langsam auf unternormale Werte ab.Für pH 5.o zeigt die Esteraseaktivität/g Milzgewebe in Übereinstimmung mit den bei der Gesamtesteraseaktivität/Milz erhobenen Befunden (siehe S.36) gegenüber den anderen pH-Stufen vom 1.-9.Tag deutlich erhöhte Werte.Vom 1.-3.Tag nimmt außerdem die Aktivität bei pH 6.o über die Aktivität der anderen pH-Werte hinaus zu.

Aus den Kurven läßt sich Folgendes ableiten:

1. Beim Vergleich von Esteraseaktivität/g Milzgewebe und Proteingehalt/g Milzgewebe fällt die Parallelität des Kurvenverlaufes auf.Sie spricht dafür,daß die Erhöhung der Esteraseaktivität gegenüber dem Proteingehalt zwischen pH 6.5-8.5 vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung keine aktive Leistung der überlebenden Milzzellen darstellt,sondern dadurch zustande kommt,daß die überlebenden Milzzellen von vorneherein einen höheren Anteil esteraseaktiver Proteine in ihrem Zellprotein aufweisen als die untergegangenen Lymphozyten.Dafür spricht auch die Tatsache,daß die Wiederbesiedlung der Milz mit Lymphozyten ab dem 9.Tag nach Bestrahlung zu einer fortschreitenden Absenkung der Esteraseaktivität/g Milzgewebe führt.Die esteraseärmeren Lymphozyten gleichen dem-

nach in dem Maße, wie sie an Zahl zunehmen die relative Aktivitätserhöhung wieder aus.

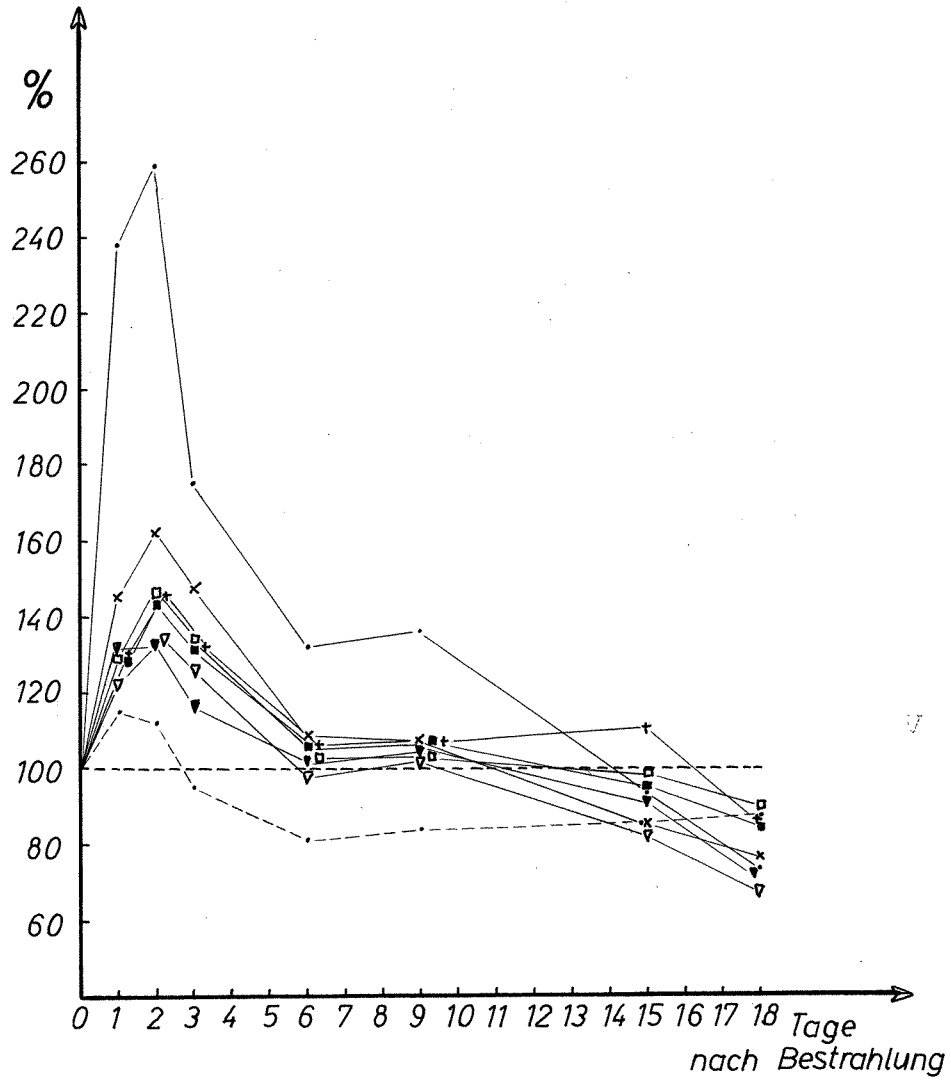


Abb.16 Esteraseaktivität/g Milzgewebe bei pH 5.0, 6.0 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 und Proteingehalt/g Milzgewebe von 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

2. Am 15.Tag nach Bestrahlung stimmen Esteraseaktivität/g Milzgewebe und Proteingehalt/g Milzgewebe zahlenmäßig überein. Dies spricht dafür, daß ein Zahlenverhältnis zwischen überlebenden Milzzellen und wiedergebildeten Lymphozyten besteht, das etwa dem Ausgangszustand entspricht. Damit steht im Einklang, daß am gleichen Tag auch das normale Milzgewicht wieder

erreicht wird (Abb.13).

3. Am 18.Tag spricht die Absenkung der Esteraseaktivität/g Milzgewebe unter den Proteingehalt/g Milzgewebe dafür,daß es zu einer reaktiven Lymphozytenüberbesiedlung der Milz gekommen ist.In die gleiche Richtung deutet das am 18.Tag gegenüber der Norm deutlich erhöhte Milzgewicht (Abb.13).

Zellesterasegehalt (I),Zellesterasekonzentration (II)

Vom 1.-9.Tag nach Ganzkörperbestrahlung liegt in der Milz eine annähernd homogene und zahlenmäßig konstante Zellbevölkerung vor.(siehe S.29 u.S.3o).Bezieht man die Gesamtesteraseaktivität/Milz und die Esteraseaktivität/g Milzgewebe vom 2.-9.Tag

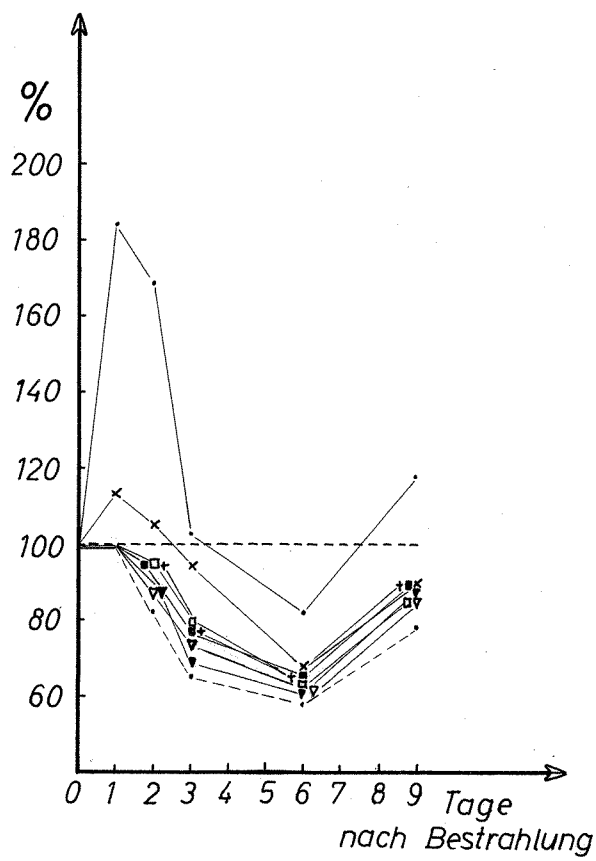


Abb.17 Zellesterasegehalt bei pH 5.o 6.o,6.5,7.o,7.5,8.o,8.5 und Zellproteingehalt der Milz von 5oo R-ganzkörperbestrahlten Ratten

auf die Werte des 1.Tages nach Bestrahlung,wobei die Aktivitätswerte von pH 6.5-7.5,die gleichartig verändert sind,als Bezugsniveau dienen,so ergibt sich daraus ein Maß für den jeweiligen Zellesterasegehalt und die Zellesterasekonzentration (siehe S.36 (I)-(II)).

In Abb.17 ist die Gesamtesteraseaktivität/Milz für pH 5.o-8.5 vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung in % der Werte des 1.Tages wiedergegeben.Zum Vergleich ist der Zellproteingehalt (Abb.14) eingezeichnet.Der Zellesterasegehalt zeigt für pH 5.o-6.o am 1.u.2. Tag eine deutliche Erhöhung mit einem Maximum am 1.Tag nach der Bestrahlung.Bereits am 3.Tag treten wieder Normalwerte auf.Vom 3.-6.Tag nimmt der Esterasegehalt ständig ab und führt zu minimalen Werten am 6.Tag.Der Wiederanstieg vom 6.-9.Tag ergibt für pH 5.o am 9.Tag übernormale,für pH 6.o unternormale Aktivitätswerte.Für pH 6.5-8.5 sinkt der Zellesterasegehalt vom 1.-6. Tag fortschreitend ab und steigt nach Erreichen des Minimums am 6.Tag vom 6.-9.Tag an,ohne bis zum 9.Tag zum Normalwert zurückzuführen.

Aus den Kurven läßt sich Folgendes ableiten:

1. Die bereits als aktive Leistung der überlebenden Zellen charakterisierte Erhöhung der Esterasen im Sauren (siehe S.37 u. S.38) tritt beim Zellesterasegehalt am 1.u.2.Tag zwischen pH 5.o-6.o deutlich in Erscheinung.
2. Für die pH-Werte 6.5-8.5 ist der Zellesterasegehalt vom 1.-9. Tag nach Bestrahlung dauernd erniedrigt.
3. Der ursprüngliche Zellesterasegehalt wird mit Ausnahme von pH 5.o bis zum 9.Tag nach Bestrahlung nicht wieder erreicht.

In Abb.18 ist der Verlauf der Esteraseaktivität/g Milzgewebe für pH 5.o-8.5 vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung in % der Werte des 1.Tages wiedergegeben.Zum Vergleich ist die Zellproteinkonzentration (Abb.14) eingezeichnet.Die Zellesterasekonzentration ist für pH 5.o-8.5 vom 1.-3.Tag mit einem Maximum am 2.Tag einheitlich erhöht.Vom 2.-6.Tag fällt sie bei allen pH-Werten fortschreitend ab und führt mit Ausnahme von pH 5.o am 6.Tag

zu unternormalen Werten,die vom 6.-9.Tag nahezu unverändert erhalten bleiben.Der Ausgangswert wird bis zum 9.Tag mit Ausnahme von pH 5.o nicht wieder erreicht.

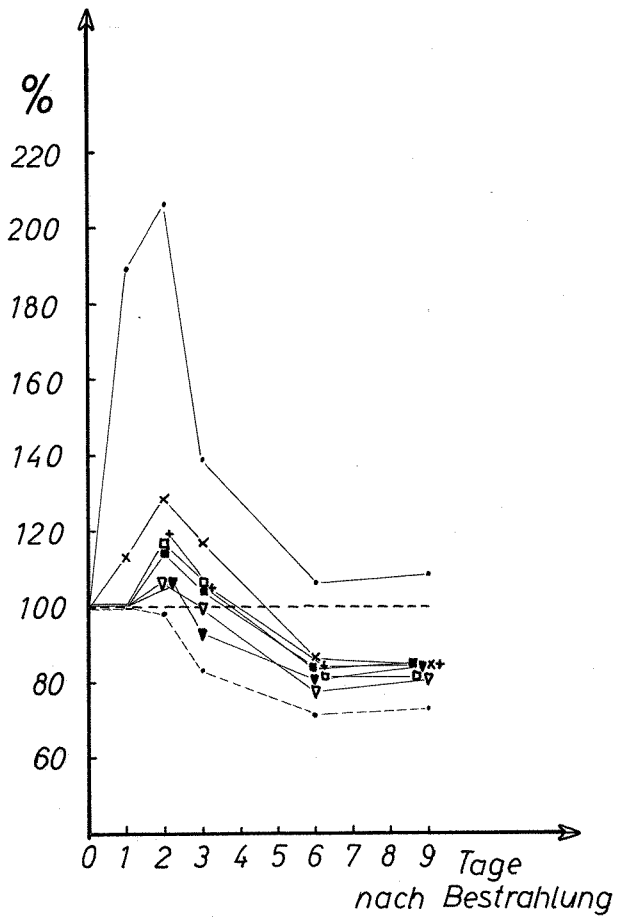


Abb.18 Zellesterasekonzentration bei pH 5.o,6.o,6.5,7.o,7.5,8.o,8.5 und Zellproteinkonzentration der Milz von 5oo R-ganzkörperbestrahlten Ratten

Aus dem Kurvenverlauf läßt sich Folgendes ableiten:

1. Die maximale Zellesterasekonzentration tritt für alle pH-Werte am 2.Tag nach Bestrahlung auf.Berücksichtigt man,daß der maximale Zellesterasegehalt schon am 1.Tag erreicht ist und am 2.Tag teilweise bereits unternormale Werte festzustellen sind (Abb.17),so spricht dies dafür,daß die esterase-aktiven Proteine in den überlebenden Milzzellen bis zum

2.Tag stärker zurückgehalten werden,als die nicht esterase-aktiven.

2. Dadurch kommt es zu einer relativen Anreicherung esterase-aktiver Proteine,die trotz Abnahme von Zellprotein- und Zellesterasekonzentration vom 2.-9.Tag erhalten bleibt.

c. Bezugspunkte

Die Milzprotein- und Milzesterasebefunde nach Bestrahlung wurden auf den 1.Tag nach Bestrahlung bezogen (siehe S.32 u. S.4o),da dann die vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung in Zahl und Art weitgehend homogene und gleichbleibende Zellbevölkerung (siehe S.29 u. S.3o) eine Übertragung der Ergebnisse auf die Organeinzelzelle zu ermöglichen scheint (siehe S.31 u. S.36). Es bleibt die Frage zu klären,ob die Bezugspunkte dem Normalzustand der überlebenden,strahlenresistenten Milzzellen vor der Bestrahlung entsprechen,oder ob sie am 1.Tag bereits verändert sind.

Zellgröße

Die qualitativen morphologischen Beschreibungen der Strahlenschädigung geben bezüglich der Zellgröße am 1.Tag nach Bestrahlung keine eindeutige Antwort.COTTIER 1966b (Mäuse,6oo R,GK) beschreibt 24 Std. nach Bestrahlung geschwellte Retikulumzellen in der Gestalt von Epitheloiden,während PAPE,JELLINEK 1948 (Ratten,3oo R,GK) annehmen,daß das Auftreten epitheloider Zellen lediglich als Ausdruck des Zusammenrückens der Retikuloendothelien zu verstehen ist.Von der quantitativen Seite her spricht die weitgehende Parallelität von Organgewichts- und Organzellveränderungen (ERNST 1962,Tab.13) gegen eine nennenswerte Schwellung der überlebenden Zellen.Es ist deshalb anzunehmen,daß die überlebenden Zellen am 1.Tag nach Bestrahlung in ihrer Größe nicht wesentlich vom Normalzustand vor Bestrahlung verschieden sind.

Zellproteingehalt

Die Gleichartigkeit von Milzgewichts- und Gesamtproteinabfall (Abb.13) spricht dafür,daß der Zellproteingehalt am 1.Tag nicht wesentlich von der Norm verschieden ist.

Zellproteinkonzentration

Die Zellproteinkonzentration verändert sich vom 1.-2.Tag nach Bestrahlung nicht wesentlich (Abb.14).Es kann deshalb angenommen werden,daß sie am 1.Tag dem Normalzustand entspricht.

Zellesterasegehalt,Zellesterasekonzentration

Als Bezugsniveau wurden die Aktivitäten bei den pH-Werten 6.5-7.5 verwendet,die sich bis zum 1.Tag gleichartig verändert haben.Da die Veränderungen bei diesen pH-Werten keine aktive Leistung der überlebenden Zellen darstellen (siehe S.38),ist anzunehmen,daß sie weitgehend dem Normalzustand vor Bestrahlung entsprechen.

Zusammengefaßt sprechen diese allerdings nur auf indirektem Wege durchführbaren Überlegungen dafür,daß die Bezugspunkte am 1.Tag nach Bestrahlung dem Normalzustand der Zellen vor Bestrahlung weitgehend entsprechen.Die vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung festgestellten zellulären Veränderungen würden demnach als Abweichungen vom normalen Zellzustand aufzufassen sein.

d. NPA als Enzymsubstrat

Das für die Esteraseaktivitätsmessungen verwendete Substrat p-Nitrophenolacetat (NPA) ist zur Prüfung des Substratmusters von Esterasen mehrfach verwendet worden.Die Untersuchungen

Tab.16

NPA als Substrat

Enzym	Präparat	Messungen bei	
δ-Chymotrypsin	gereinigt	pH 5.o,6.o	DIXON,NEURATH 1957
Serumesterasen der Ratte (A u. B-Esterasen)	ungereinigt	pH 7.o	ALDRIDGE 1953a,1953b
Cholinesterase	gereinigt	pH 5.o-1o.o	BERGMANN et al.1958
α-Chymotrypsin	gereinigt	pH 6.54,7.74	GUTFREUND et al.1956
Ali-Esterasen, Lipid-hydrol. Enzyme im Rattenpankreas	ungereinigt	pH 6.7	MYERS et al.1955
Chymotrypsin	gereinigt	pH 7.6	HARTLEY,KILBY 1952,1954

wurden meist mit gereinigten Enzympräparaten oder bei einem festen pH-Wert durchgeführt. Es zeigt sich, daß NPA von verschiedenen Esterasen und Proteasen gespalten wird (Tab. 16). Angesichts der geringen Substratspezifität vieler Esterasen (BOYER, LARDY, MYRBÄCK 1960) ist deshalb zu vermuten, daß bei den durchgeführten Esteraseaktivitätsmessungen mehrere esteraseaktive Proteine gemessen wurden. Ein Hinweis dafür ist durch die selektive Zunahme des Zellesterasegehaltes bei pH 5.0-6.0 vom 1.-2. Tag nach Bestrahlung gegeben (siehe S. 40).

e. Andere Untersuchungen über Milzenzyme

Das Verhalten von Milzenzymen bei ganzkörperbestrahlten Ratten ist verschiedentlich untersucht worden. In Tab. 17 sind Arbeiten über hydrolytisch wirkende Milzenzyme zusammengestellt:

Tab. 17

Milzenzyme nach Bestrahlung

Enzym	Tiere Bestr.	Zeit (Tage)	max. Akt. (Tag)	min. Akt. (Tag)	(A)	
Alkal. Phosph.	Mäuse 640R GK	0-11	1-11 (alle Messungen ausgemittelt)	-	mg Gewebe	ASHWELL, HICKMAN 1952
ATPase	Ratten 640R GK	0-3	1-3 (alle Messungen ausgemittelt)	-	mg Gewebe	MAXWELL, ASHWELL 1953
ATPase	Ratten 50-400R GK	0-14	3	-	mg Gewebe	DUBOIS, PETERSEN 1954
5-Nukleotidase	Ratten 100-800R GK	0-14	3	-	mg Gewebe	DUBOIS, PETERSEN 1954
Alkal. Phosph.	Mäuse 600R GK	0-7	7	-	histochem.	SCHERER 1956
Kathepsin	Mäuse 750, 3000R GK	0-1	1	-	g Gewebe	HAGEN 1958a
Kathepsin	Mäuse 750, 3000R GK	0-1	16 Std.	-	Organ	HAGEN 1958a

Kathep-sin	Mäuse 4ooR GK	o-7	3	-	g Gewebe	HAGEN 1958b
ATPase	Mäuse 2oo-6ooR GK	o-2	2	-	mg Gewebe	BREUER,PARCHWITZ 1959
Saure Phosph.	Ratten 2oo, 1oooR GK	o-2 o-2	2 -	- 2	mg-N Gesamtor-gan-N	RAHMAN 1962
β-Gluc-uroni-dase	Ratten 2oo, 1oooR GK	o-2 o-2	2 -	- 2	mg-N Gesamtor-gan-N	RAHMAN 1962
Prote-asen	Ratten 6ooR GK	o-1	1	-	mg-N	FURLAN 1965

GK =Ganzkörperbestrahlung
(A)=Enzymaktivität angegeben als Aktivität pro:

Weitgehend einheitlich wird die maximale Aktivität,soweit der Versuchszeitraum lang genug ist,am 2.u.3.Tag nach Bestrahlung gefunden.Danach fällt sie langsam ab und erreicht um den 6.-9. Tag nach Bestrahlung wieder Normalwerte.Die Ergebnisse sind als Aktivität/g bzw. mg Gewebe,Aktivität/mg-N oder Gesamtorgan-N und Aktivität/Organ angegeben und deshalb mit den entsprechenden eigenen Versuchsdaten Esteraseaktivität/Milz und Esteraseaktivität/g Milzgewebe (Abb.15,Abb.16) vergleichbar.Hinsichtlich des zeitlichen Auftretens der Veränderungen besteht eine gute Übereinstimmung mit den eigenen Versuchen.

f. Funktionsmorphologie

Vergleicht man den Verlauf von Zellgröße (Abb.14),Zellproteingehalt (Abb.14),Zellproteinkonzentration (Abb.14),Zellesterasegehalt (Abb.17) und Zellesterasekonzentration (Abb.18) wie er auf Grund der funktionsmorphologischen Betrachtungsweise für die Einzelzellen abgeleitet wurde mit den für das Organgeschehen kennzeichnenden Größen wie Milzgewicht (Abb.13),Gesamtprotein/Milz (Abb.13),Proteingehalt/g Milzgewebe (Abb.13),Gesamtesteraseaktivität/Milz (Abb.15),Esteraseaktivität/g Milzgewebe (Abb.16) und Esteraseaktivität/o.16 mg Protein (Abb.11,

Abb.12),so ergibt sich,daß mit keiner dieser Größen Übereinstimmung besteht.Dies soll im Folgenden stellvertretend an drei Beispielen näher gezeigt werden:

1. Die Esteraseaktivität/g Milzgewebe (Abb.16) ist vom 1.-6.Tag erhöht,während Zellesterasegehalt und Zellesterasekonzentration dies nur vom 1.-3.Tag sind und für manche pH-Werte sogar vom 1.-15.Tag dauernd unternormale Werte auftreten (Abb.17, Abb.18).
2. Die Esteraseaktivität/o.16 mg Protein (Abb.11,Abb.12) ist vom 1.-15.Tag erhöht,während Zellesterasegehalt und Zell_esterasekonzentration dies nur vom 1.-3.Tag sind und für manche pH-Werte sogar vom 1.-15.Tag dauernd unternormale Werte auftreten (Abb.17,Abb.18).
3. Der Proteingehalt/g Milzgewebe (Abb.13) ist vom 1.-2.Tag erhöht,während die Zellproteinkonzentration und der Zellproteingehalt vom 1.-9.Tag dauernd erniedrigt sind (Abb.14).

Die funktionsmorphologische Betrachtungsweise zeigt damit deutlich die Problematik der Direktübertragung biochemischer Organbefunde auf die Einzelzellen,sobald durch die Bestrahlung stärkere morphologische Gewebsveränderungen verursacht werden. Sie weist auf die Notwendigkeit hin bei der Interpretation biochemischer Befunde das histologische Bild zu berücksichtigen und führt möglicherweise zu einem besseren Verständnis des zellulären Geschehens nach Ganzkörperbestrahlung.

G. Zusammenfassung

1. Es wird die Esteraseaktivität von pH 5.o-8.5 und der Proteingehalt der Milz,sowie das Milzgewicht von 5oo R-ganzkörperbestrahlten Ratten (LD 38/3o) vom 1.-18.Tag nach Bestrahlung untersucht.
2. Die Ergebnisse werden auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft und unter Heranziehung des morphologischen Bildes im Sinne einer funktionsmorphologischen Betrachtungsweise auf die Organeinzelzelle übertragen.
3. Das Milzgewicht fällt vom 1.-3.Tag ab,steigt vom 3.-15.Tag zunächst langsam,dann schneller an und erreicht am 15.Tag den Ausgangswert.Am 18.Tag ist eine deutliche Erhöhung über den Normalwert hinaus feststellbar.
4. Das Gesamtprotein/Milz sinkt vom 1.-6.Tag ab,steigt vom 6.-18.Tag an und erreicht den Ausgangswert zwischen 15.-18. Tag wieder.
5. Der Proteingehalt/g Milzgewebe steigt vom 1.-2.Tag über den Normalwert an,sinkt vom 2.-6.Tag auf unternormale Werte ab, nimmt vom 6.-18.Tag langsam zu und erreicht den Ausgangswert bis zum 18.Tag nicht wieder.
6. Die Gesamtesteraseaktivität/Milz zeigt für pH 5.o am 1.-2. Tag eine Erhöhung über den Normalwert hinaus.Für pH 6.o-8.5 ergeben sich dagegen vom 1.-9.Tag nur unternormale Werte.Das Aktivitätsminimum wird für alle pH-Werte am 6.Tag erreicht. Zwischen dem 15.-18.Tag kehrt die Gesamtesteraseaktivität/ Milz zum Ausgangswert zurück.
7. Die Esteraseaktivität/g Milzgewebe ist für pH 5.o-8.5 vom 1.-6.Tag mit einem Maximum am 2.Tag erhöht.Vom 6.-9.Tag liegt sie im Normalbereich.Vom 9.-18.Tag sinkt sie langsam auf unternormale Werte ab.Der Ausgangswert wird bis zum 18.Tag nicht wieder erreicht.
8. In der histologischen Ruhephase vom 1.-9.Tag nach Bestrahlung liegt in der Milz eine weitgehend homogene und zahlenmäßig konstante Zellbevölkerung vor.Während dieser Zeit können Veränderungen von Milzgewicht,Gesamtprotein/Milz,Proteingehalt/

g Milzgewebe,Gesamtesteraseaktivität/Milz und Esteraseaktivität/g Milzgewebe mit hoher Wahrscheinlichkeit als Maß für Veränderungen von Zellgröße,Zellproteingehalt,Zellproteinkonzentration,Zellesterasegehalt und Zellesterasekonzentration der überlebenden Milzzellen angesehen werden. Im Einzelnen ergeben sich folgende Aussagen:

9. Die Zellgröße nimmt vom 1.-3.Tag ab,bleibt vom 3.-6.Tag erniedrigt,steigt vom 6.-9.Tag an und erreicht den Ausgangswert am 9.Tag wieder.Die biochemisch gefundenen Zellgrößenänderungen sind mit guter zeitlicher Übereinstimmung auch im histologischen Bild nachweisbar.
10. Der Zellproteingehalt nimmt vom 1.-6.Tag ab,erreicht am 6.Tag ein Minimum und steigt vom 6.-9.Tag an,ohne bis zum 9.Tag den Ausgangswert zu erreichen.
11. Die Zellproteinkonzentration bleibt vom 1.-2.Tag unverändert, fällt vom 2.-6.Tag ab und steigt vom 6.-9.Tag langsam an,ohne den Ausgangswert bis zum 9.Tag zu erreichen.
12. Die Zellproteinkonzentration ist die Größe,die einerseits am längsten (bis zum 2.Tag) aufrecht erhalten wird,andererseits aber auch am längsten braucht,um wiederhergestellt zu werden.
13. Der bestimmende Vorgang bei den Veränderungen von Zellgröße, Zellproteingehalt und Zellproteinkonzentration ist der Zellproteinverlust.
14. Der Zellesterasegehalt zeigt für pH 5.o-6.o vom 1.-2.Tag eine deutliche Erhöhung,die als aktive Leistung der überlebenden Milzzellen aufzufassen ist.Im Bereich von pH 6.5-8.5 treten vom 1.-9.Tag nur Erniedrigungen des Esterasegehaltes auf.Das Minimum ergibt sich einheitlich am 6.Tag.Mit Ausnahme von pH 5.o werden die Ausgangswerte bis zum 9.Tag nicht wieder erreicht.
15. Die Zellesterasekonzentration ist für pH 5.o-8.5 vom 1.-3.Tag mit einem Maximum am 2.Tag über den Normalwert hinaus erhöht.Vom 2.-6.Tag kommt es mit Ausnahme von pH 5.o zu einer Verminderung unter den Normalwert,die vom 6.-9.Tag nahezu unverändert bestehen bleibt.Der Ausgangswert wird mit Aus-

nahme von pH 5.o bis zum 9.Tag nicht wieder erreicht.

16. Die untergegangenen Lymphozyten der Milz weisen einen deutlichen Protein- und Esterasegehalt auf.
17. Die Abbauprodukte der untergegangenen Lymphozyten werden bis zum 1.Tag nach Bestrahlung ausgeschwemmt.
18. Die überlebenden Milzzellen,vorwiegend Retikulumzellen und ihnen morphologisch nahestehende Zellen sind proteinreicher und mit einem höheren Anteil esteraseaktiver Proteine in ihrem Zellprotein ausgestattet als die untergegangenen Lymphozyten.
19. Die Proteinverluste der überlebenden Milzzellen betreffen bis zum 2.Tag vorwiegend nicht esteraseaktive Proteine,was zu ihrer relativen Anreicherung in den Zellen führt,die vom 2.-9.Tag bestehen bleibt.
2o. Das Zahlenverhältnis zwischen überlebenden Milzzellen und wiedergebildeten Lymphozyten entspricht am 15.Tag nach Bestrahlung etwa dem Ausgangszustand.
21. Am 18.Tag nach Bestrahlung kommt es in der Milz zu einer reaktiv überschießenden Lymphozytenüberbesiedlung.
22. Vergleicht man den Verlauf von Zellgröße,Zellproteingehalt, Zellproteinkonzentration,Zellesterasegehalt und Zellesterasekonzentration wie er auf Grund der funktionsmorphologischen Betrachtungsweise für die Einzelzellen abgeleitet wurde mit dem Verlauf der für das Organgeschehen kennzeichnenden Größen wie Milzgewicht,Gesamtprotein/Milz,Proteingehalt/g Milzgewebe,Gesamtesteraseaktivität/Milz und Esteraseaktivität/g Milzgewebe,so ergibt sich,daß mit keiner dieser Größen Übereinstimmung besteht.Die funktionsmorphologische Betrachtungsweise zeigt deutlich die Problematik der Direktübertragung biochemischer Organbefunde auf die Einzelzellen,sobald durch die Bestrahlung stärkere morphologische Gewebsveränderungen verursacht werden.Sie weist auf die Notwendigkeit hin bei der Interpretation biochemischer Befunde das histologische Bild zu berücksichtigen und führt möglicherweise zu einem besseren Verständnis des zellulären Geschehens nach Ganzkörperbestrahlung.

H. Literaturverzeichnis

1. ALDRIDGE W.N. — Biochem.J. 53(1953a)11o
2. ALDRIDGE W.N. — Biochem.J. 53(1953b)117
3. AMMON R.,W.DIRSCHERL — Fermente,Hormone,Vitamine Georg Thieme Verlag Stuttgart 1959,Band I S.99
4. ANDERSEN N.G.,J.G.GREEN — The Soluble Phase of the Cell,in D.B.Roodyn,Enzyme Cytology, Academic Press,New-York London 1967 S.475
5. ASHWELL G.,J.HICKMAN — Proc.Soc.exp.Biol. 8o(1952)4o7
6. BACQ Z.M.,P.ALEXANDER — Grundlagen der Strahlenbiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1958 S.286-295
7. BERGMANN F.,S.RIMON,R.SEGAL — Biochem.J. 68(1958)493
8. BESSEY O.A.,R.H.LOVE — J.Biol.Chem. 196(1952)175
9. BIGGS A.J. — Trans.Far.Soc. 5o(1954)8oo
1o. BLOOM W. — Histopathology of Irradiation from External and Internal Sources, McGraw-Hill Book Comp.,Inc.New-York Toronto 1948
11. BOYER P.D.,H.LARDY,K.MYRBÄCK — The Enzymes Vol.4(196o)475
12. BREUER H.,H.K.PARCHWITZ — Strahlentherapie 1o8(1959)53
13. BULL H.B. — J.Am.chem.Soc. 66(1944)1499
14. COHRS P.,L.Cl.SCHULZ — Die Milz,in P.Cohrs,R.Jaffé,H. Meesen Pathologie der Laboratoriumstiere,Springer Verlag Berlin 1958, Band I S.33o
15. COTTIER H. — in A.Zuppinger,Handbuch der medizinischen Radiologie,Springer Verlag Berlin 1966a Band II/2 S.35-85
16. COTTIER H. — Die Milz,in A.Zuppinger,Handbuch der medizinischen Radiologie, Springer Verlag Berlin 1966b, Band II/2 S.96-1oo
17. DIXON G.H.,NEURATH H.J. — J.biol.Chem. 255(1957)1o49
18. DOUB L.,J.M.VANDENBELT — J.Am.chem.Soc. 69(1947)2714
19. DUBOIS K.P.,D.F.PETERSEN — Am.J.Physiol. 176(1954)282
2o. ERNST H. — Z.Naturf. 17b(1962)3oo
21. FURLAN F. — Z.Naturw. 52(1965)515
22. GEIGY — Wissenschaftl.Tab.6.Aufl.1962 S.146
23. GRAMMATICAKIS P. — Bull.Soc.Chim.Franc.(5)18(1951)534
24. GUTFREUND H.,J.M.STURTEVANT — Biochem.J. 63(1956)656
25. HAGEN U. — Strahlentherapie 1o6(1958a)277
26. HAGEN U.,H.ERNST,H.LANGENDORFF — Strahlentherapie 1o7(1958b)426
27. HARTLEY B.S.,B.A.KILBY — Biochem.J. 5o(1952)672
28. HARTLEY B.S.,B.A.KILBY — Biochem.J. 56(1954)288
29. HEINEKE H. — Mü.med.Wschr. (19o3)2o9o
3o. HEINEKE H. — Mü.med.Wschr. (19o4)1382
31. v.HERRATH E. — Bau und Funktion der normalen Milz Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1958 S.8o

32. HOFFMANN-OSTENHOFF O. Enzymologie,Springer Verlag Wien 1954 S.171

33. JAFFE H.H.,M.ORCHIN Theory and Application of Ultraviolet Spectroscopy,John Wiley and Sons,Inc.,New York London 1962 S.1-15

34. KAMLET M.J. Organic Electronic Spectral Data, Interscience Publ. New-York London Vol.I (196o) S.8o u. S.181

35. KINDRED I.E. Am.J.Anatomy 71(1942)2o7

36. MARTIN C.J.,J.GOLUBOW, A.E.AXELROD J.Biol.Chem. 234(1959)294

37. MAXWELL E.,G.ASHWELL Arch.Biochem. 43(1953)389

38. MITCHELL J.S. Some Aspects of Radiation on the Metabolism of Tissues and Tumors, in A.Zuppinger,Handbuch der medizinischen Radiologie,Springer Verlag Berlin Band II/1 S.355-486

39. MURRAY R.G. The Spleen,in W.Bloom,Histopathology of Irradiation from External and Internal Sources, McGraw-Hill Book Comp.,Inc. New York Toronto 1948 S.243-347

4o. MYERS D.K.,A.SCHOTTE,H.BOER, H.BORSJE-BAKKER Biochem.J. 61(1955)521

41. PAPE R.,N.JELLINEK Radiologica Austrica 1(1948)59

42. PHILLIPS J.P.,F.C.NACHROD Organic Electronic Spectral Data, Interscience Publishers New York London Vol.IV 1963 S.65

43. POHLE E.A.,C.H.BUNTING Strahlentherapie 57(1936)121

44. PRELOG V.,K.WIESNER Helv.Chim.Acta 3o(1947)1465

45. RAHMAN Y.E. Proc.Soc.Exp.Biol. 1o9(1962)378

46. SCHERER E.,H.St.STENDER Strahlenpathologie der Zelle, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1963

47. SCHERER E. Strahlentherapie 1oo(1956)211

48. SCHERER E. Cytoplasma und Mitochondrien, in E.Scherer,H.St.Stender,Strahlenpathologie der Zelle,Georg Thieme Verlag Stuttgart 1963 S.47-68

49. SCHROEDER W.A.,P.E.WILCOX, K.N.TRUEBLOOD,A.O.DEKKER Anal.Chem. 23(1951)174o

5o. STENDER H.St. Milz und Lymphknoten,in E.Scherer, H.St.Stender,Strahlenpathologie der Zelle,Georg Thieme Verlag Stuttgart 1963 S.149-18o

51. SCOTT I. Interpretation of the Ultra-Violet Spectra of Natural Products,Pergamon Press Oxford 1964 S.1-14

52. STOCK A.M.,W.E.DONAHUE, E.D.AMSTUTZ J.Org.Chem. 23(1958)184o

53. TAYLOR J.F. The Proteins Vol.1A(1953)14

54. TERESI H.E. J.Am.chem.Soc. 72(195o)3972

55. UNGNADE H.E. Org.Electr.Spectr.Data,Intersc.Publ. New-York London 196o Vol.II S.55

56. WHEELER O.H.,L.A.KAPLAN Org.Electr.Spectr.Data,Intersc.Publ. New-York London 1966 Vol.III S.59

Lebenslauf

Am 25.4.1941 wurde ich als Sohn des Dr.med.Walter Valet und seiner Ehefrau Brigitte,geb.Bothner,zu München geboren.Nach vierjähriger Volksschulzeit trat ich 1951 in das Neue Realgymnasium München ein,wo ich 1960 die Reifeprüfung ablegte. Von Oktober 1960 bis Dezember 1961 leistete ich vorzeitig meinen Wehrdienst ab.Im Winter 1961/62 und Sommer 1962 studierte ich an der Technischen Hochschule München Physik.Während dieser Zeit war ich im ASTA der TH als Sozialreferent tätig.Eine Volontärzeit von insgesamt vier Monaten verbrachte ich bei der Firma Siemens München im Halbleiterentwicklungslabor und bei den Königlich Niederländischen Hochofen- und Stahlfabriken KNHS in Ijmuiden,Holland in der Abteilung für Hochofenentwicklung. Vom Winter 1962/63 an begann ich an der Universität München das Studium der Medizin,das ich im Sommer 1963 an der Universität Freiburg fortsetzte.Nach der Rückkehr aus Freiburg im Winter 1963/64 legte ich im Sommer 1964 die ärztliche Vorprüfung an der Universität München ab.Während des Winters 1964/65 hatte ich Gelegenheit im anatomischen Präparierkurs bei Herrn Prof. Dr.T.v.Lanz und im physiologischen Praktikum bei Herrn Prof.Dr. R.Wagner als Co-Assistent mitzuarbeiten.Im Sommer 1965 folgte ein Auslandssemester in Frankreich an der Universität Montpellier. Von November 1965 bis Oktober 1967 arbeitete ich am Max-Planck-Institut für Biochemie München an meiner medizinischen Doktorarbeit.In diese Zeit fällt ein dreimonatiger Aufenthalt in Kanada am Kitchener-Waterloo-Hospital in Kitchener,Ontario. Meine medizinischen Studien schloß ich am 14.2.68. an der Universität München mit dem medizinischen Staatsexamen ab.