

**Esteraseaktivität, Proteingehalt und Gewicht der Milz  
röntgenganzkörperbestrahlter Ratten  
unter Berücksichtigung  
funktionsmorphologischer Gesichtspunkte**

**G. VALET, H. J. GROSS und G. RUHENSTROTH-BAUER**

Max-Planck-Institut für Biochemie, München (Direktor: Prof. Dr. A. BUTENANDT)

Eingegangen am 24. Juni 1968

*Esterase Activity, Protein Content and Weight of the Spleen of Whole-Body X-Ray Irradiated Rats with Consideration of Functional and Morphological Aspects*

*Summary.* 1. The esterase activity between pH 5.0 and 8.5 and the protein content of splenic extracts as well as the spleen weight of 500 R whole body X-ray irradiated rats were studied from the 1—18th day after irradiation. The results were checked for statistical significance.

2. The esterase activity/mg protein is significantly increased for pH 5.0 and 6.0 from the 1—9th day and for pH 6.5—8.5 from the 2—9th day. It is significantly decreased for pH 6.0—6.5 on the 18th day. The protein concentration of splenic extracts is significantly increased on the 1st day and significantly decreased from the 6—15th day. The weight of the spleen is significantly decreased, as compared with controls, from the 1—9th day and significantly increased on the 18th day after irradiation.

3. As regards the morphologic changes after irradiation, the results may be applied to individual splenic cells. There are decreases in cell size and in content and concentration of cell protein. The concentration of cell protein is maintained the longest and requires the most time for restoration. The content of cell esterase is decreased for all pH values from the 1—9th day, with the exception of an increase for pH 5.0 and 6.0 on the 1st and 2nd day after irradiation. The concentration of cell esterase is increased for all pH values from the 1—3rd day after irradiation, a result of the loss of non-esterase active protein from the cells. After the 3rd day it is decreased until the 9th day. The destroyed splenic cells contain distinct protein and esterase. The surviving cells of the spleen are richer in protein and show more esterase activity in their cell protein than do the destroyed cells.

4. The experiments show that biochemical results of studies on single cells of the irradiated rat spleen run parallel with corresponding histological and histochemical findings after irradiation.

*Zusammenfassung.* 1. Es werden die Esteraseaktivität zwischen pH 5,0 und 8,5 und der Proteingehalt von Milzextrakten sowie das Milzgewicht von 500 R-röntgenganzkörperbestrahlten Ratten vom 1.—18. Tag nach Bestrahlung untersucht und die Ergebnisse auf ihre statistische Signifikanz überprüft.

2. Die Esteraseaktivität/mg Protein ist für pH 5,0—6,0 vom 1.—9. Tag und für pH 6,5 bis 8,5 vom 2.—9. Tag nach Bestrahlung erhöht. Für pH 6,0—6,5 ist sie am 18. Tag erniedrigt. Die Proteinkonzentration der Milzextrakte ist am 1. Tag erhöht und vom 6.—15. Tag erniedrigt. Das Milzgewicht ist vom 1.—9. Tag gegenüber dem Normalwert erniedrigt und am 18. Tag nach Bestrahlung erhöht. Alle Werte sind statistisch signifikant.

3. Die Ergebnisse werden unter Berücksichtigung des morphologischen Bildes nach Bestrahlung auf die Organeinzelnzellen übertragen. Es treten Verminderungen der Zellgröße, des Zellproteingehalts und der Zellproteinkonzentration auf. Die Zellproteinkonzentration

wird einerseits am längsten aufrechterhalten, braucht andererseits aber auch am längsten zur Wiederherstellung. Der Zellesterasegehalt ist mit Ausnahme einer Erhöhung für pH 5,0 und 6,0 am 1. und 2. Tag nach Bestrahlung für die übrigen pH-Werte vom 1.—9. Tag dauernd erniedrigt. Die Zellesterasekonzentration ist infolge stärkeren Verlustes nicht esteraseaktiver Proteine aus der Zelle für alle pH-Werte vom 1.—3. Tag nach Bestrahlung erhöht, dann aber ebenfalls bis zum 9. Tag erniedrigt. Die untergegangenen Milzzellen weisen einen deutlichen Protein- und Esterasegehalt auf. Die überlebenden Milzzellen sind proteinreicher und zeigen einen höheren Anteil an Esteraseaktivität in ihrem Zellprotein als die untergegangenen Zellen.

4. Die Untersuchungen zeigen, daß die Übertragung biochemischer Befunde auf die einzelnen Organzellen in der Rattenmilz nach Bestrahlung zu Ergebnissen führt, die mit den entsprechenden histologischen und histochemischen Befunden in guter zeitlicher Übereinstimmung stehen.

Höhere tierische Organismen weisen eine deutliche Empfindlichkeit gegenüber Röntgenganzkörperbestrahlung auf (COTTIER, 1966 a; SCHERER, STENDER, 1963; BACQ, ALEXANDER, 1958; BLOOM, 1948). Es treten zahlreiche Auswirkungen im Stoffwechselablauf auf, die jedoch bis heute zu keinem abschließenden Verständnis der Strahlenschädigung geführt haben (MITCHELL, 1966; SCHERER, 1963).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Messung der Esteraseaktivität und des Proteingehaltes von Milzextrakten sowie des Milzgewichts bei 500 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 Anhalt für die in der Milz nach Bestrahlung morphologisch nachweisbaren Abbauvorgänge (COTTIER, 1966 b) dienen kann.

Bei der Interpretation von biochemischen Befunden, die aus Gewebshomogenaten oder Extrakten gewonnen wurden, ergeben sich Schwierigkeiten, wenn eine Übertragung auf die Organeinzelle 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 Zellzahl 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 Organeinzellen und damit ein funktionsmorphologisches Verständnis der cellulären Vorgänge nach Bestrahlung erlauben.

### Methodik

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Firma Gassner, München) mit einem Gewicht zwischen 90—110 g. Sie wurden in Gruppen zu je 10 Tieren verwendet. Die Tiere wurden mit „Ssniff“ Rattenfutter (Intermast, Bochum-Hövel) gehalten. Futter und Wasser waren ad libitum angeboten.

Die Bestrahlung erfolgte mit einem Siemens-Stabilipangerät bei 280 kV, 10 mA, 1 mm Cu-Filter, 50 cm Abstand und einer Dosisleistung von 60 R/min. Es wurde 500 R ganzkörperbestrahlt (LD 38/30). Die Tiere waren dazu in einem Drehkäfig aus Hostalen untergebracht. Die Dosis wurde mit einem Duplex Dosimeter (Dr. Psychlau, Freiburg i. Br.) in Luft gemessen.

Die Tötung der Ratten erfolgte etwa zur Hälfte durch Nackenschlag oder in Äthernarkose durch Entblutung von der Bauchorta. Die Milzen von je 10 Tieren wurden mit einer Schere

zerkleinert, mit 10 ml Aqua dest. versetzt und ca. 3 min in einem Potter 15 ml-Glasmogenisator bei 2000 U/min im Eisbad homogenisiert. Durch einstündige Ultrazentrifugation der Homogenate in einer Beckman-Spinco-L-Ultrazentrifuge bei 50000 U/min und 0° im Titan 50-Festwinkelrotor mit einer Beschleunigung von 165000 g in Röhrenmitte, wurde eine weitgehende Sedimentierung der Partikel erreicht (ANDERSEN u. GREEN, 1967). Zur Proteinbestimmung wurden jeweils 2 ml Milzextrakt in einem Uhrglas bei 105° (TAYLOR, 1953; BULL, 1944) eingedampft und der Rückstand abgewogen. Sodann wurden die Milzextrakte mit Aqua dest. auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml verdünnt. Die Organ- aufbereitung und Aufbewahrung der Proteinlösungen erfolgte im Kühlraum bei 4°.

Die Esteraseaktivität wurde mit einem selbstregistrierenden Beckman-Spektrophotometer DK-2A zwischen pH 5,0—8,5 in Schritten von 0,5 pH-Einheiten bestimmt. Organ- aufbereitung und Aktivitätsmessungen wurden stets am gleichen Tag durchgeführt. Als Substrat diente p-Nitrophenolacetat, von dem jeweils am Meßtage eine Lösung der Konzen- tration 100 µg/ml in Aqua dest. hergestellt wurde. Bei der enzymatischen Spaltung der Esterbindung wird p-Nitrophenol freigesetzt, das im Sauren eine deutliche Absorptionsbande bei 317 nm und im Alkalischen eine solche bei 397 nm aufweist. Aus Intensitätsgründen wurde für die Aktivitätsmessung von pH 5,0—6,0 die Bande bei 317 nm und von pH 6,5 bis 8,5 die Bande bei 397 nm verwendet (VALET, 1968). Gemessen wurde in 0,05 m Phosphat- puffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), bei 30°. Als Behältnisse dienten 45 × 10 × 10 mm Quarzcuvetten mit folgender Füllung:

Meßcuvette:	1,5 ml	0,1 m Phosphatpuffer	pH 5,0—8,5
	1,5 ml	Substratlösung	
	0,1 ml	Proteinlösung	5 mg/ml
Vergleichscuvette:	1,5 ml	0,1 m Phosphatpuffer	pH 5,0—8,5
	1,5 ml	Aqua dest.	
	0,1 ml	Proteinlösung	5 mg/ml

Zum Pipettieren der Proteinlösungen diente eine Eppendorf-0,1 ml-Druckpipette „Mar- burg“. Die freigesetzte NP-Menge wurde aus der vom Schreiber in 5 min aufgezeichneten Extinktionszunahme  $\Delta E/5$  min und dem zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{\max}$  von p-Nitrophenol mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes (SCOTT, 1964; JAFFE u. ORCHIN, 1962) berechnet:

$$\Delta c = \frac{\Delta E_{\text{gem.}}}{\epsilon_{\max} d}$$

$\Delta c$  = NP-Konzentrationsanstieg/ml in 5 min (mMol/ml);  $\Delta E_{\text{gem.}}$  = gemessene Ex- tinktionsänderung in 5 min;  $\epsilon_{\max}$  = molarer Extinktionskoeffizient von NP im Banden- timaximum (ml/mMol × cm); Lichtweg in der Cuvette  $d = 1$  cm.

Die so gewonnenen Werte wurden in internationale Enzym-Aktivitätseinheiten (U) umgerechnet, wobei 1 U dem Umsatz von 1 µMol Substrat/min bei 30° entspricht.

### Statistische Auswertung der Versuche

1. Für zusammengehörige Versuche wurden der Mittelwert  $\bar{x}$  und die Standardabweichung 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, normal- verteilt sind (Geigy-Tabellen 1962). Die Normalität der Stichproben wurde im Wahrscheinlichkeitspapier untersucht und war mit guter Näherung erfüllt (VALET, 1968). Zwei Mittelwerte wurden als signifikant voneinander verschieden betrach- tet, wenn die Wahrscheinlichkeit für Übereinstimmung  $2\alpha < 0,05$  betrug. Signi- fikant abweichende Werte sind in den folgenden Tabellen kursiv gedruckt.

**Ergebnisse***Milzgewicht*

Die Milz zeigt nach Bestrahlung eine deutliche Gewichtsabnahme, deren Maximum mit nur 30 % des Normalgewichtes am 5. Tag nach Bestrahlung auftritt (Tabelle 1).

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 nach Bestrahlung besteht eine Milzvergrößerung.

Tabelle 1. *Milzgewicht*

Tage	Tiere	Milzgewicht (g/Tier)	Tage	Tiere	Milzgewicht (g/Tier)
0	230	$0,53 \pm 0,03$	5	30	$0,15 \pm 0,02$
1	50	$0,25 \pm 0,02$	6	120	$0,20 \pm 0,02$
2	50	$0,21 \pm 0,01$	9	90	$0,27 \pm 0,02$
3	155	$0,19 \pm 0,03$	15	75	$0,55 \pm 0,04$
4	30	$0,20 \pm 0,06$	18	25	$0,79 \pm 0,12$

*Proteinkonzentration der Milzextrakte*

In Tabelle 2 ist die Proteinkonzentration im Überstand der zentrifugierten Milzhomogenate bezogen auf 1:1-Verdünnung der Homogenate mit Aqua dest. wiedergegeben:

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.

Tabelle 2. *Proteinkonzentration*

Tage	Versuche	Proteinkonzentration (mg/ml)
0	21	$51,3 \pm 1,6$
1	5	$58,6 \pm 2,8$
2	4	$57,5 \pm 1,6$
3	15	$51,7 \pm 2,0$
4	3	$48,3 \pm 2,9$
5	3	$47,0 \pm 2,3$
6	12	$41,4 \pm 1,6$
9	8	$43,0 \pm 2,0$
15	5	$44,0 \pm 1,7$
18	2	$45,0 \pm 1,0$

*Esteraseaktivität der Milzextrakte*

In Abb. 1 ist die Esteraseaktivität von Milzextrakten (Tabelle 3) in Abhängigkeit vom pH-Wert für die verschiedenen Tage nach Bestrahlung wiedergegeben. Unbestrahlte Tiere zeigen eine eingipflige, ins Saure und Alkalische langsam

Tabelle 3. Esteraseaktivität der Milzextrakte in (U)  
(Meßtemperatur 30°; Esteraseaktivität in 10<sup>-2</sup> U/mg Protein)

T	n	pH						
		5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
0	19	0,65 ± 0,06	1,71 ± 0,05	2,20 ± 0,07	2,92 ± 0,12	3,42 ± 0,11	3,23 ± 0,19	3,17 ± 0,24
1	5	1,29 ± 0,12	2,18 ± 0,18	2,40 ± 0,15	3,30 ± 0,26	3,78 ± 0,24	3,66 ± 0,18	3,51 ± 0,29
2	4	1,45 ± 0,13	2,40 ± 0,10	2,66 ± 0,10	3,32 ± 0,08	4,30 ± 0,13	4,21 ± 0,20	3,85 ± 0,27
3	12	1,14 ± 0,11	2,60 ± 0,11	2,93 ± 0,17	3,54 ± 0,26	4,65 ± 0,27	4,31 ± 0,29	4,20 ± 0,25
4	3	1,26 ± 0,03	2,42 ± 0,25	2,86 ± 0,27	—	4,52 ± 0,06	—	—
5	3	1,04 ± 0,07	2,38 ± 0,15	2,66 ± 0,19	—	4,52 ± 0,04	—	—
6	12	1,04 ± 0,11	2,24 ± 0,09	2,68 ± 0,09	3,52 ± 0,29	4,22 ± 0,17	4,24 ± 0,22	3,94 ± 0,19
9	8	0,98 ± 0,06	2,10 ± 0,08	2,64 ± 0,08	3,51 ± 0,16	4,03 ± 0,17	4,12 ± 0,21	3,91 ± 0,15
15	5	0,66 ± 0,06	1,66 ± 0,06	2,14 ± 0,20	3,01 ± 0,05	3,72 ± 0,15	3,58 ± 0,09	3,84 ± 0,22
18	2	0,52 ± 0,04	1,43 ± 0,03	1,64 ± 0,12	2,43 ± 0,10	3,34 ± 0,02	3,08 ± 0,13	2,95 ± 0,21

T = Tage nach Bestrahlung; n = Anzahl der Versuche.

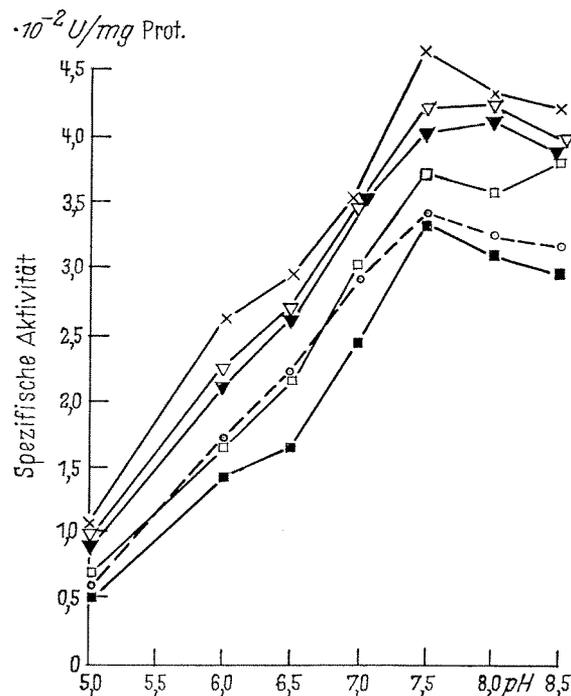


Abb. 1. Esteraseaktivität in Milzextrakten unbestrahlter ..... Ratten, sowie 3 Tage ×—×, 6 Tage ▽—▽, 9 Tage ▼—▼, 15 Tage □—□ und 18 Tage ■—■ nach 500 R Ganzkörperbestrahlung

abfallende Aktivitätskurve mit Maximum bei pH 7,5—8,0. Nach Bestrahlung erfolgt eine allgemeine Aktivitätszunahme ohne Lageveränderung des Aktivitätsmaximums. Zusätzlich tritt von pH 6,0—6,5 eine Schulter auf. Die Darstellung der Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 2) gestattet einen besseren Einblick in den zeitlichen Verlauf der strahlungsbedingten Aktivitätsänderungen. Die höchste Aktivität ergibt sich mit Ausnahme von pH 5,0 am 3. Tag nach Bestrahlung. Danach sinkt die Aktivität bei allen pH-Werten langsam ab, am 15. Tag ist eine weitgehende Normalisierung und nach 18 Tagen ein Absinken unter den Normalwert eingetreten.

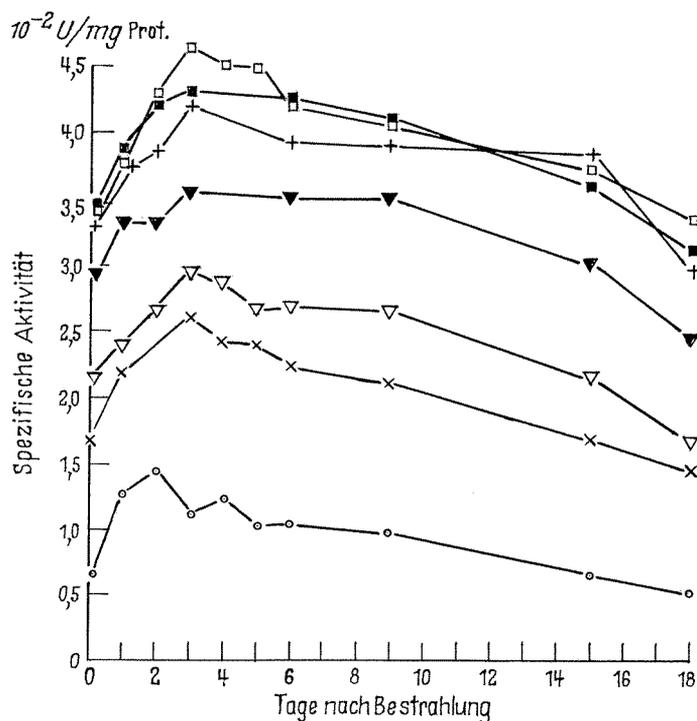


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Esteraseaktivität in Milzextrakten von Ratten bei pH 5,0 ○—○, 6,0 ×—×, 6,5 ▽—▽, 7,0 ▼—▼, 7,5 □—□, 8,0 ■—■ und 8,5 +—+ nach 500 R Ganzkörperbestrahlung

## Besprechung

### Milzaufbau

Die Rattenmilz gehört wie die menschliche Milz zu den lymphgewebsreichen Stoffwechsellitzen mit ausgeprägtem Sinussystem (COHRS u. SCHULZ, 1958; v. HERRATH, 1958; ANDREW, 1946). Neben schwach ausgebildetem bindegewebigem Kapsel- und Trabekelwerk enthält das Rattenmilzparenchym Lymphocyten (66%), Reticulumzellen (9%) sowie Myelocyten (12%), Erythroblasten (12%), Makrophagen und Megakaryocyten (insgesamt 1%) (KINDRED, 1942).

### Morphologische Strahlenschäden

Die Röntgenganzkörperbestrahlung ruft in der Rattenmilz (COTTIER, 1966b; STENDER, 1963; SCHERER, 1956; PAPE u. PIRINGER-KUCHINKA, 1956; PETERSEN, FITCH u. DUBOIS, 1955; PAPE u. JELLINEK, 1950, 1948; MURRAY, 1948; POHLE u. BUNTING, 1936; HEINEKE, 1903) ebenso wie in der Menschenmilz (COTTIER, 1966b) einen von den verschiedenen Autoren weitgehend übereinstimmend beschriebenen, tiefgreifenden Gewebsumbau hervor. Makroskopisch fällt der bereits von HEINEKE (1903) gefundene Gewichtsverlust der Milz auf. Mikroskopisch ergeben sich nach 600 R Ganzkörperbestrahlung von Ratten (MURRAY, 1948) folgende Veränderungen, die sich in diesem Zusammenhang in drei Stadien einteilen lassen:

a) *Destruktionsphase*. Die überwiegende Mehrzahl der Lymphocyten zerfällt innerhalb der ersten 3 Std nach Bestrahlung. Die Zelltrümmer werden phagocytiert und abgebaut. Nach 17—24 Std treten sie nicht mehr in Erscheinung.

Myelocyten, Erythroblasten und Megakaryocyten nehmen ebenfalls an Zahl ab. Ein Untergang von Reticulumzellen 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 Reticulumzellen. Von den Lymphocyten 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 Reticulumzellen und ihnen morphologisch nahestehenden Zellelementen bestehen.

c) *Regenerationsphase*. Vom 9. Tag nach Bestrahlung an nehmen die Lymphocyten, Myelocyten, Erythroblasten und Megakaryocyten zunächst zögernd, dann in verstärktem Maße an Zahl zu. Die Ausgangsarchitektur des Gewebes wird bis zum Ende der 3. Woche nicht vollständig wieder hergestellt.

### *Biochemische Veränderungen*

*Auswertung der Milzprotein- und Milzesterasebefunde*. Zur Auswertung stehen folgende Meßgrößen zur Verfügung:

1. das Milzgewicht;
2. die Proteinkonzentration der Milzextrakte;
3. die Esteraseaktivität der Milzextrakte.

Daraus werden zur Feststellung von Veränderungen des Milzprotein- und Milzesterasegehaltes folgende Größen berechnet:

4. das Gesamtprotein/Milz (g Protein/Milz);
5. das Protein/g Milzgewebe (g Protein/g Milzgewebe);
6. die Gesamtesteraseaktivität/Milz (U/Milz);
7. die Esteraseaktivität/g Milzgewebe (U/g Milzgewebe).

Zur Übertragung der Protein- und Esterasebefunde auf die Organeinzelle wird zusätzlich aus dem morphologischen Bild die Zeitspanne benötigt, während der in der Milz mit einer weitgehend homogenen und zahlenmäßig konstanten Zellbevölkerung gerechnet werden kann. Sie wird dargestellt durch

8. die histologische Ruhephase vom 1.—9. Tag nach Bestrahlung.

Aus den Daten 1. und 4.—8. lassen sich während der histologischen Ruhephase folgende Aussagen bezüglich der Organeinzellen 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 Gesamtprotein/Milz und der Gesamtesteraseaktivität/Milz ein Maß für Veränderungen des *Zellprotein-* bzw. des *Zellesterasegehalts*.

III. Bei homogener und zahlenmäßig konstanter Zellbevölkerung sind Veränderungen des Protein/g Milzgewebe und der Esteraseaktivität/g Milzgewebe ein Maß für Veränderungen der *Zellprotein-* bzw. der *Zellesterasekonzentration*.

In Analogie zum Zellproteingehalt und der Zellproteinkonzentration sprechen wir von Zellesterasegehalt und Zellesterasekonzentration, obwohl streng genommen nur die Esteraseaktivität gemessen wurde.

*Milzgewicht, Gesamtprotein/Milz, Protein/g Milzgewebe.* In Abb. 3 ist der Verlauf von *Milzgewicht, Gesamtprotein/Milz* und *Protein/g Milzgewebe* vom 1.—18. Tag nach Bestrahlung in Prozent der Normalwerte wiedergegeben. Milzgewicht und Gesamtmilzprotein fallen nach Bestrahlung deutlich ab und weisen

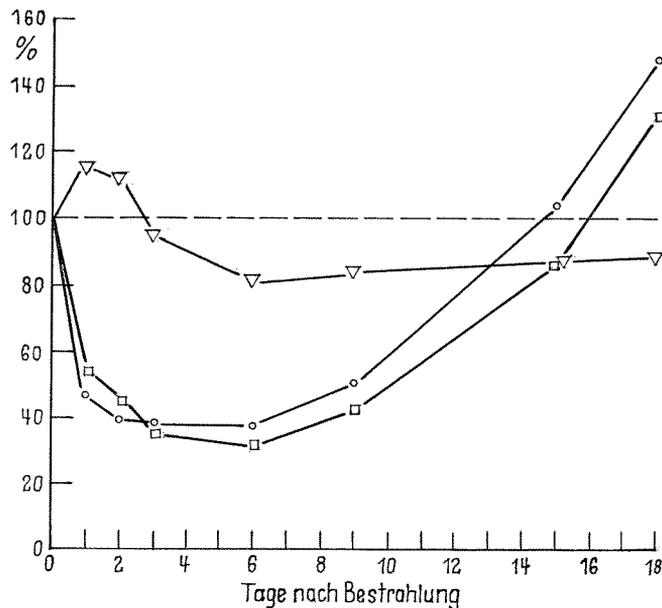


Abb. 3. Milzgewicht  $\circ$ — $\circ$ , Gesamtprotein/Milz  $\square$ — $\square$  und Protein/g Milzgewebe  $\nabla$ — $\nabla$  bei 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

am 3. bzw. 6. Tag die niedrigsten 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. Das Protein/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 nach Bestrahlung angesehen werden.

2. Die Verminderung des Gesamtprotein/Milz am 1. Tag ist ein Hinweis dafür, daß das Protein der untergegangenen Zellen nicht in der Milz gespeichert wird.

3. Der Anstieg des Protein/g Milzgewebe am 1. und 2. Tag nach Bestrahlung deutet darauf hin, daß die überlebenden strahlenresistenten Zellen proteinreicher sind als die untergegangenen Lymphocyten und durch ihr Zusammenrücken die Erhöhung des Protein/g Milzgewebe über den Ausgangswert bewirkt wird.

4. Das Ausgangsverhältnis von Milzgewicht, Gesamtprotein/Milz und Protein/Milzgewebe zueinander wird bis zum 18. Tag nicht wiederhergestellt.

*Zellgröße, Zellproteingehalt, Zellproteinkonzentration.* Vom 1.—9. Tag nach Ganzkörperbestrahlung liegt in der Milz eine annähernd homogene und zahlen-

mäßig konstante Zellbevölkerung vor. Bezieht man Milzgewicht, Gesamtprotein/Milz und Protein/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* (I.—III.).

In Abb. 4 sind Milzgewicht, Gesamtprotein/Milz und Protein/g Milzgewebe vom 2.—9. Tag nach Bestrahlung in Prozent 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.

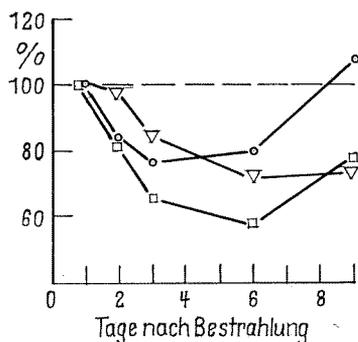


Abb. 4. Zellgröße ○—○, Zellproteingehalt □—□ und Zellproteinkonzentration ▽—▽ von Milzzellen bei 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

Aus den Kurven läßt sich folgendes ableiten:

1. Kennzeichnend für die 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.

Diese aus biochemischen Werten erschlossene Zellgrößenänderung müßte auch morphologisch nachweisbar sein. Eine Verminderung der Zellgröße auf 76% am 3. Tag nach Bestrahlung (Abb. 4) würde nämlich zu einer der 3. Wurzel entsprechenden Radius- bzw. Durchmesseränderung auf 91% des Ausgangswertes führen. Histologisch wurde in der Tat eine Zellverkleinerung beschrieben. In Tabelle 4 sind die morphologisch beobachteten Zellgrößenänderungen denen gegenübergestellt, die sich aus den eigenen Versuchen ergeben (Abb. 4):

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

*Gesamtesteraseaktivität/Milz, Esteraseaktivität/g Milzgewebe.* In Abb. 5 ist der Verlauf der *Gesamtesteraseaktivität/Milz* für pH 5,0—8,5 vom 1.—18. Tag nach Bestrahlung in Prozent der Normalwerte wiedergegeben. Zusätzlich ist das

Tabelle 4. Größenänderungen der Milzzellen nach Bestrahlung

Tage nach Bestrahlung	Epitheloide Zellen	Eigene Versuche
1.	<i>Sehr prominent</i> (MURRAY, 1948)	Der 1. Tag nach Bestrahlung dient als Bezugspunkt
2.	<i>Prominent</i> (MURRAY, 1948)	Zellverkleinerung
5.	<i>Kontrahiert</i> (MURRAY, 1948)	Verkleinerte Zellen
10.	<i>Stellenweise reichlicher</i> (PAPE u. JELLINEK, 1948)	Zellvergrößerung

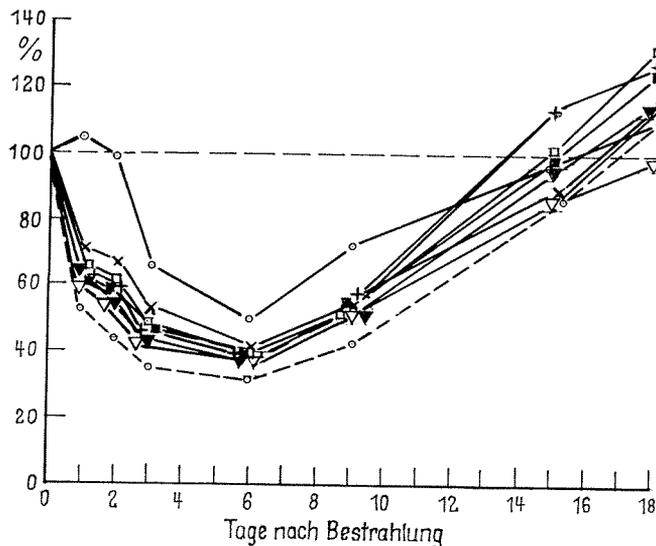


Abb. 5. Gesamtesteraseaktivität/Milz bei pH 5,0  $\circ$ — $\circ$ , 6,0  $\times$ — $\times$ , 6,5  $\nabla$ — $\nabla$ , 7,0  $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ , 7,5  $\square$ — $\square$ , 8,0  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , 8,5  $+$ — $+$  und Gesamtprotein/Milz  $\circ$ — $\circ$  von 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

Gesamtprotein/Milz (Abb. 3) als Vergleichswert eingezeichnet. Die Aktivitätskurven sind dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Ausnahme von pH 5,0 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 Ausgangswert.

Aus den Kurven läßt sich folgendes ableiten:

1. Der Abfall der Esteraseaktivität bei pH 6,0—8,5 am 1. Tag nach Bestrahlung steht in zeitlichem Zusammenhang mit dem Zelluntergang. Ob die Erniedrigung durch den Wegfall einer Lymphocytenesteraseaktivität oder die Abnahme der Esteraseaktivität überlebender Zellen zustande kommt, geht aus den Versuchen nicht unmittelbar hervor. Die Tatsache, daß die Wiederbesiedlung der Milz mit Lymphocyten zu einem Anstieg der Gesamtesteraseaktivität/Milz führt, würde für eine Esteraseaktivität der Milzlymphocyten sprechen.

2. Besondere Beachtung verdient das Verhalten der Esteraseaktivität bei pH 5,0. Trotz Milzgewichts- und Proteinverlust (Abb. 3) ist sie am 1. und 2. Tag im Gegensatz zu den übrigen pH-Werten über den Grundwert hinaus erhöht. Es dürfte sich hierbei um ein reaktives Verhalten der überlebenden Zellen handeln, da

bei den beträchtlichen Zellverlusten eine Aktivitätszunahme über den Normalwert hinaus anderweitig schwer erklärbar ist.

3. Das unterschiedliche Verhalten der Esteraseaktivität bei pH 5,0 spricht dafür, daß in den Milzextrakten mehrere Esterasen gemessen wurden.

In Abb. 6 ist der Verlauf der *Esteraseaktivität/g Milzgewebe* für pH 5,0—8,5 vom 1.—18. Tag nach Bestrahlung in Prozent der Normalwerte wiedergegeben. Zum Vergleich ist das Protein/g Milzgewebe (Abb. 3) eingezeichnet. Nach einem

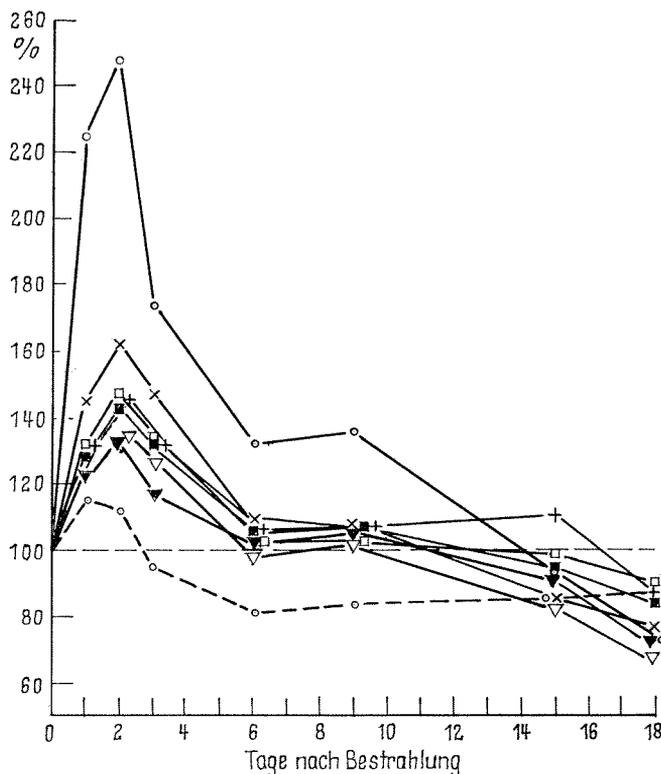


Abb. 6. Esteraseaktivität/g Milzgewebe bei pH 5,0  $\circ$ — $\circ$ , 6,0  $\times$ — $\times$ , 6,5  $\nabla$ — $\nabla$ , 7,0  $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ , 7,5  $\square$ — $\square$ , 8,0  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , 8,5  $+$ — $+$  und Protein/g Milzgewebe  $\circ$ — $\circ$  von 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

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 6,0—8,5 im Normalbereich und fällt vom 9.—18. Tag langsam auf unternormale Werte ab. Für pH 5,0 zeigt die Esteraseaktivität/g Milzgewebe vom 1.—9. Tag deutlich erhöhte Werte.

Aus den Kurven läßt sich folgendes ableiten:

1. Beim Vergleich von Esteraseaktivität/g Milzgewebe und Protein/g Milzgewebe fällt die Parallelität des Kurvenverlaufs auf. Sie spricht dafür, daß die Erhöhung der Esteraseaktivität gegenüber dem Proteingehalt zwischen pH 6,5—8,5 vom 1.—9. Tag nach Bestrahlung zu einem Teil dadurch zustande kommt, daß die überlebenden Milzzellen einen höheren Anteil esteraseaktiver Proteine in ihrem Zellprotein aufweisen als die untergegangenen Lymphocyten. Dafür spricht auch die Tatsache, daß die Wiederbesiedlung der Milz mit Lymphocyten ab dem 9. Tag nach Bestrahlung zu einer fortschreitenden Absenkung der Esteraseaktivität/g Milzgewebe führt. Die esteraseärmeren Lymphocyten gleichen

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

2. Am 15. Tag nach Bestrahlung stimmen Esteraseaktivität/g Milzgewebe und Protein/g Milzgewebe zahlenmäßig überein. Dies spricht dafür, daß ein Verhältnis zwischen überlebenden Milzzellen und wiedergebildeten Lymphocyten hergestellt ist, das etwa dem Ausgangszustand entspricht. Damit steht im Einklang, daß am gleichen Tag das normale Milzgewicht wieder erreicht wird (Abb. 5).

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

*Zellesterasegehalt, Zellesterasekonzentration.* Vom 1.—9. Tag nach Ganzkörperbestrahlung liegt in der Milz eine annähernd homogene und zahlenmäßig konstante Zellbevölkerung vor. Bezieht man die Gesamtteraseaktivität/Milz und die Esteraseaktivität/g Milzgewebe vom 2.—9. Tag auf die Werte des 1. Tages nach Bestrahlung, wobei die Aktivitätswerte von pH 6,5—8,5, die gleichartig verändert sind, als Bezugsniveau dienen, so ergibt sich daraus ein Maß für den jeweiligen *Zellesterasegehalt* und die *Zellesterasekonzentration* (II.—III).

In Abb. 7 ist die Gesamtteraseaktivität/Milz für pH 5,0—8,5 vom 1.—9. Tag nach Bestrahlung in Prozent der Werte des 1. Tages wiedergegeben. Zum Vergleich ist der Zellproteingehalt (Abb. 4) eingezeichnet. Der *Zellesterasegehalt* zeigt für pH 5,0—6,0 am 1. und 2. Tag eine deutliche Erhöhung mit einem Maximum am 1. Tag nach der Bestrahlung. 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 5,0 am 9. Tag übernormale, für pH 6,0 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.

In Abb. 8 ist der Verlauf der Esteraseaktivität/g Milzgewebe für pH 5,0—8,5 vom 1.—9. Tag nach Bestrahlung in Prozent der Werte des 1. Tages wiedergegeben. Zum Vergleich ist die Zellproteinkonzentration (Abb. 4) eingezeichnet. Die *Zellesterasekonzentration* ist für pH 5,0—8,5 vom 1.—3. Tag mit einem Maximum am 2. Tag erhöht. Vom 2.—6. Tag fällt sie bei allen pH-Werten fortschreitend ab und führt mit Ausnahme von pH 5,0 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 5,0 nicht wieder erreicht.

Aus dem Kurvenverlauf läßt sich folgendes ableiten:

Die höchste *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. 7), so spricht dies dafür, daß die esterasesaktiven Proteine in den überlebenden Milzzellen bis zum 2. Tag stärker zurückgehalten werden, als die nicht esterasesaktiven. Dies führt zu einer relativen Anreicherung esterasesaktiver Proteine, die vom 2.—9. Tag erhalten bleibt.

*Bezugspunkte.* Die Milzprotein- und Milzesterasebefunde nach Bestrahlung wurden auf den 1. Tag nach Bestrahlung bezogen, da dann die vom 1.—9. Tag

nach Bestrahlung in Zahl und Art weitgehend gleichbleibende und homogene Zellbevölkerung eine Übertragung der Ergebnisse auf die Organeinzelle zu ermöglichen scheint. Es bleibt die Frage zu klären, ob die Bezugspunkte dem Normalzustand der überlebenden Milzzellen vor der Bestrahlung entsprechen, oder ob sie am 1. Tag bereits verändert sind.

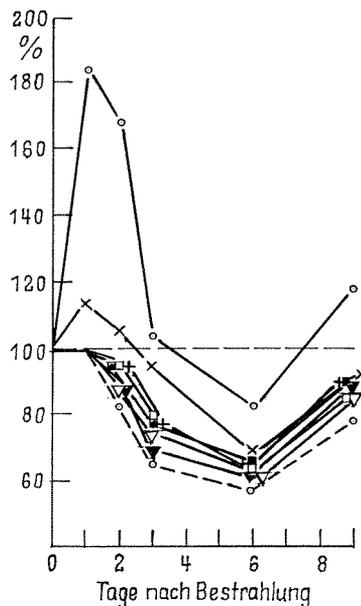


Abb. 7

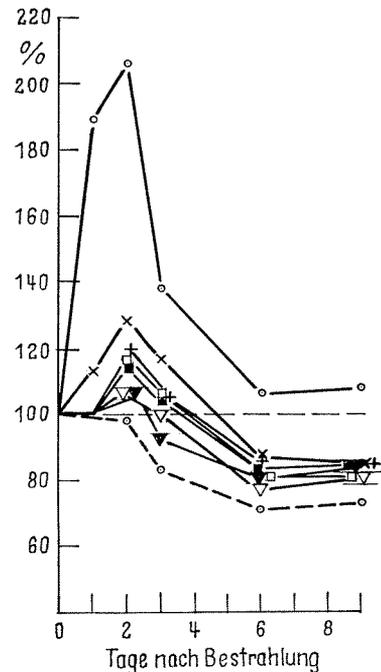


Abb. 8

Abb. 7. Zellesterasegehalt bei pH 5,0  $\circ$ — $\circ$ , 6,0  $\times$ — $\times$ , 6,5  $\nabla$ — $\nabla$ , 7,0  $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ , 7,5  $\square$ — $\square$ , 8,0  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , 8,5  $+$ — $+$  und Zellproteingehalt  $\circ$ — $\circ$  von Milzzellen bei 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

Abb. 8. Zellesterasekonzentration bei pH 5,0  $\circ$ — $\circ$ , 6,0  $\times$ — $\times$ , 6,5  $\triangle$ — $\triangle$ , 7,0  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ , 7,5  $\square$ — $\square$ , 8,0  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , 8,5  $+$ — $+$  und Zellproteinkonzentration  $\circ$ — $\circ$  von Milzzellen bei 500 R-ganzkörperbestrahlten Ratten

*Zellgröße.* Die qualitativen morphologischen Beschreibungen der Strahlenschädigung geben bezüglich der Zellgröße am 1. Tag nach Bestrahlung keine eindeutige Antwort, COTTIER (1966b) (Mäuse, 600 R-Ganzkörperbestrahlung) beschreibt 24 Std nach Bestrahlung geschwellte Reticulumzellen in der Gestalt von Epitheloiden, während PAPE u. JELLINEK (1948) (Ratten, 300 R-Ganzkörperbestrahlung) annehmen, daß das Auftreten epitheloider Zellen lediglich als Ausdruck des Zusammenrückens der Reticuloendothelien zu verstehen ist. Von der quantitativen Seite her spricht die weitgehende Parallelität von Organgewichts- und Organzellzahlveränderungen (ERNST, 1962) 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 am 1. Tag nach Bestrahlung (Abb. 3) 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. 4). 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—8,5 verwendet, die sich bis zum 1. Tag gleichartig verändert haben. Da die Veränderungen bei diesen pH-Werten als Konzentrierungseffekt der enzymreicheren überlebenden Zellen anzusehen sind, 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 ziemlich weitgehend entsprechen. Die vom 1.—9. Tag nach Bestrahlung festgestellten cellulären Veränderungen würden demnach als Abweichungen vom normalen Zellzustand aufzufassen sein.

Eine Aussage darüber, ob die Zunahme der Esteraseaktivität durch eine Enzymneubildung, eine Loslösung strukturgebundener Enzyme oder durch Aktivierung erfolgt, kann aufgrund der Versuche nicht gemacht werden.

#### *Funktionsmorphologie*

Vergleicht man den Verlauf von Zellgröße (Abb. 4), Zellproteingehalt (Abb. 4), Zellproteinkonzentration (Abb. 4), Zellesterasegehalt (Abb. 7) und Zellesterasekonzentration (Abb. 8), wie er aufgrund der funktionsmorphologischen Betrachtungsweise für die Einzelzellen abgeleitet wurde, mit den für das Organgeschehen kennzeichnenden Größen, wie Milzgewicht (Abb. 3), Gesamtprotein/Milz (Abb. 3), Protein/g Milzgewebe (Abb. 3), Gesamtsteraseaktivität/Milz (Abb. 5), Esteraseaktivität/g Milzgewebe (Abb. 6) und Esteraseaktivität/mg Protein (Abb. 1 und 2), so ergibt sich, daß mit keiner dieser Größen Übereinstimmung besteht. Dies weist auf die Notwendigkeit hin, bei der Interpretation biochemischer Befunde das histologische Bild zu berücksichtigen, und soll im folgenden stellvertretend an drei Beispielen näher gezeigt werden:

1. Die *Esteraseaktivität/g Milzgewebe* (Abb. 6) 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. 7 und 8).

2. Die *Esteraseaktivität/mg Protein* (Abb. 1 und 2) ist vom 1.—15. 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. 7 und 8).

3. Das *Protein/g Milzgewebe* (Abb. 3) ist vom 1.—2. Tag erhöht, während die Zellproteinkonzentration und der Zellproteingehalt vom 1.—9. Tag dauernd erniedrigt sind (Abb. 4).

#### **Histochemische Befunde**

Im folgenden sollen unsere Befunde mit den histochemischen Esterasenachweisen (PEARSE, 1961a; GÖSSNER, 1958) in der Milz nach Bestrahlung verglichen werden. Das von uns verwendete Substrat p-Nitrophenolacetat wird vorzüglich von unspezifischen Esterasen gespalten (HUGGINS u. MOULTON, 1948). Überlappungen mit spezifischen Esterasen sind aber nicht auszuschließen (PEARSE,

1961 b). In der Milz sind unspezifische Esterasen nach Bestrahlung histochemisch wenig untersucht, eingehender sind die saure und alkalische Phosphatase bearbeitet worden, weshalb sie hier mitbetrachtet werden sollen. Zwei Punkte sind bei diesem Vergleich zu beachten:

1. Die Fixation histochemischer Präparate beeinflusst die Enzymaktivität der Gewebsschnitte teilweise deutlich (ARVY, 1965; PEARSE, 1961 a).

2. Die Übertragung der biochemischen Befunde aus der Rattenmilz nach Bestrahlung auf die Einzelzellen stellt nur eine Annäherung dar, da die Zellbevölkerung zwar weitgehend (PAPE u. PIRINGER-KUCHINKA, 1956), aber nicht völlig homogen ist.

Beiden Verfahren haften damit Unsicherheiten an, die in der Methodik begründet sind und bei der Interpretation der Befunde im Auge behalten werden müssen.

Im einzelnen werden folgende Befunde beschrieben:

#### *Normale Milz*

*Unspezifische Esterasen* werden in der Rattenmilz vorwiegend in den Reticulumzellen der roten und weißen Pulpa sowie in den Zellen der Sinuswände, den abgelösten Retothelien, den Megakaryocyten, in der Kapsel, den Trabekeln und den Wänden der Zentralarterien (LÖFFLER, 1960; GÖSSNER, 1958; SMITH, WHARTON u. GERHARDT, 1958), in der Menschenmilz je nach verwendetem Substrat in den Reticulumzellen der perisinuösen Maschenmäntel und Lymphfollikel sowie in den Sinuswandzellen gefunden (STUTTE, 1965).

*Alkalische Phosphatase* wird in der Rattenmilz in wechselnder Aktivität in den Zellelementen der roten und weißen Pulpa gefunden, ohne daß eine nähere Differenzierung der Zellen möglich ist. Es besteht eine deutliche Aktivität besonders um die Follikel, außerdem in den Capillarwänden der roten und weißen Pulpa und in den Wänden der Zentralarterien (GÖSSNER, 1958) sowie in den Lymphocyten (PASQUALINO u. BOURNE, 1960; ACKERMAN, BELLIOS, KNOUFF u. FRAJOLA, 1954). In der Menschenmilz ist das Capillarendothel stark positiv (DORFMAN, 1961), in der Mäusemilz die Endothelzellen der Zentral- und Pulpaarterien sowie ringförmig um die weiße Pulpa angeordnete mesenchymale Zellen und Lymphocyten (SMITH et al., 1958).

*Saure Phosphatase* wird in der Rattenmilz in den Zellen der roten Pulpa, vereinzelt innerhalb der Follikel sowie in ringförmig angeordneten Zellen an der Grenze zwischen Follikelperipherie und Zentrum (GÖSSNER, 1958) und in Makrophagen gefunden (STRAUS, 1964).

#### *Bestrahlte Milz*

*Unspezifische Esterasen.* In Gewebsschnitten der Mäusemilz trat nach 400 R Ganzkörperbestrahlung mit einer Co<sup>60</sup>-Quelle von 2 Std bis 2 Tage nach Bestrahlung eine Verbreiterung der esterasepositiven Ränder der weißen Pulpa ein, hervorgerufen teils durch einen Anstieg der Zahl esterasepositiver Reticulumzellen, teils durch Abnahme des Volumens der weißen Pulpa. Außerdem färbten sich die Esterase-positiven Zellen stärker an. Eine graduelle Verdünnung dieser Ränder begann nach 3 Tagen. Die Flächen reaktiver Zellen in der roten Pulpa nahmen während der Degenerationsphase an Farbe ab. Die Wiederherstellung

war am 9. Tag durch zahlreichere und tiefer gefärbte Regionen gekennzeichnet (SMITH et al., 1958).

*Alkalische Phosphatase.* In Gewebsschnitten der Rattenmilz wurde nach 600 R Röntgenganzkörperbestrahlung ein Anstieg der alkalischen Phosphatase nach 6 Std in Form positiver perifollikulärer Halos beobachtet, der nach 2 Tagen besonders deutlich war. Am 7. Tag nach Bestrahlung war die Reaktion normal oder unternormal (PASQUALINO u. BOURNE, 1960). Ebenfalls in Gewebsschnitten der Rattenmilz wurde nach 600 R Röntgenganzkörperbestrahlung ein initialer Aktivitätsabfall der alkalischen Phosphatase bis 2 Std nach Bestrahlung in den Lymphocyten und Reticulumzellen, gefolgt von einem Anstieg auf übernormale Werte zwischen der 12. Std und dem 4. Tag nach Bestrahlung gefunden. Der Anstieg der alkalischen Phosphatase in den Gewebsschnitten der Milz war sowohl auf ein relatives Anwachsen der Zahl von Phosphatase-positiven Zellen in der roten Pulpa als auch auf eine Zunahme der cytochemischen Reaktion der Einzelzellen zurückzuführen (ACKERMAN et al., 1954). In Gewebsschnitten der Mäusemilz ergab sich nach 400 R Ganzkörperbestrahlung mit einer  $\text{Co}^{60}$ -Quelle ein Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase in den Randzellen der weißen Pulpa am 1. und 2. Tag nach Bestrahlung. Die ATPase war in den Zellen der roten Pulpa am 1. und 2. Tag erhöht, am 3. Tag waren weniger reaktive Zellen feststellbar (SMITH et al., 1958).

*Saure Phosphatase.* In Gewebsschnitten der Rattenmilz war nach einer Strahlendosis, die einer LD 50/30 entsprach, eine Zunahme der sauren Phosphatase von der 6.—12. Std nach Bestrahlung infolge einer starken Proliferation von Reticulumzellen bzw. Makrophagen mit einem auffallend starken Gehalt an saurer Phosphatase feststellbar (RUMMEL u. GÖSSNER, 1965). Ebenfalls in Gewebsschnitten der Rattenmilz wurde nach 600 R Röntgenganzkörperbestrahlung nach 6 Std ein Anstieg der sauren Phosphataseaktivität gefunden, der bis zum 7. Tag anhielt und dann auf Kontrollwerte abfiel (PASQUALINO u. BOURNE, 1960).

Die verschiedenen Untersuchungen zeigen:

1. Nach Bestrahlung wird histochemisch in Gewebsschnitten der Ratten- und Mäusemilz für unspezifische Esterasen, saure und alkalische Phosphatase eine Aktivitätszunahme beobachtet, deren Maximum am 2. Tag nach Bestrahlung auftritt.

2. Am 3.—4. Tag fällt die Aktivität ab.

3. Zwischen 4.—9. Tag ergeben sich mit Ausnahme der sauren Phosphatase, die am 7. Tag noch erhöht ist, normale oder unternormale Werte.

Eine Schwierigkeit im Vergleich dieser histochemischen Befunde mit den auf die Einzelzellen übertragenen biochemischen Werten liegt darin, daß beim Gewebsschnitt zwei Möglichkeiten einer Enzymaktivitätszunahme gegeben sind:

1. Die Zahl der enzympositiven Zellen je Flächeneinheit steigt an. Diese Möglichkeit wird in der Ratten- und Mäusemilz nach Bestrahlung beobachtet. Durch den weitgehenden Wegfall der Lymphocyten tritt im histochemischen Gewebsschnitt ab der 2.—6. Std nach Bestrahlung eine Verdichtung überlebender Zellen ein, die enzympositiver sind als die untergegangenen Lymphocyten. Eine absolute Erhöhung der Zahl enzympositiver Zellen/Milz durch Zellteilung oder Einwanderung aus anderen Körperregionen dürfte dabei nach Ganzkörperbestrahlung infolge einer weitgehenden Mitosehemmung (MURRAY,

1948) und dem Betroffensein des gesamten Organismus kaum von Bedeutung sein. Ein Zusammenrücken von Zellen, die esteraseaktiver sind als die untergegangenen Lymphocyten, wurde auch durch Übertragung der biochemischen Befunde auf die Einzelheiten gefunden und steht in Übereinstimmung mit den histochemischen Ergebnissen.

2. Die Enzymaktivität in der Einzelzelle nimmt nach Bestrahlung zu. Eine derartige Zunahme wird in den überlebenden enzymaktiven Zellen der Ratten- und Mäusemilz (PASQUALINO u. BOURNE, 1960; SMITH et al., 1958; ACKERMAN et al., 1954) für die unspezifischen Esterasen, die saure und alkalische Phosphatase gefunden. Sie ist in Tabelle 5 der Zellesterasekonzentration (Abb. 8) gegenübergestellt, die durch Übertragung der biochemischen Befunde auf die Einzelzellen abgeleitet wurde:

Tabelle 5. *Esteraseaktivität der Milzzellen nach Bestrahlung*

		Histochemisch (unspez. Esterasen, saure, alk. Phosph.)	Eigene Versuche (unspez. Esterasen)
12 Std	ACKERMAN et al. (1954) RUMMEL u. GÖSSNER (1965)	Zunahme Zunahme	—
1. Tag	ACKERMAN et al. (1954) SMITH et al. (1958) PASQUALINO u. BOURNE (1960)	Zunahme Zunahme Zunahme	Zunahme
2. Tag	ACKERMAN et al. (1954) SMITH et al. (1958) PASQUALINO u. BOURNE (1960)	Zunahme Zunahme Zunahme	Zunahme
3. Tag	ACKERMAN et al. (1954) SMITH et al. (1958)	Zunahme Abnahme	Zunahme
4. Tag	ACKERMAN et al. (1954)	Zunahme	Abnahme
7. Tag	PASQUALINO u. BOURNE (1960)	Normal- Unternormal	Unternormal
9. Tag	SMITH et al. (1958)	Normal	Unternormal

Demnach besteht eine weitgehende Übereinstimmung der histochemisch in den Einzelzellen der Ratten- und Mäusemilz nach Bestrahlung gefundenen Veränderungen der unspezifischen Esterasen, der sauren und alkalischen Phosphatase mit der durch die Übertragung biochemischer Befunde auf die Einzelzelle abgeleiteten Zellesterasekonzentration. Die Übereinstimmung mit der Zellesterasekonzentration und nicht mit dem Zellesterasegehalt ist verständlich, da sich mikroskopisch nicht der Zellesterasegehalt, sondern die Zellesterasekonzentration in einer stärkeren Anfärbung der Zelle auswirkt.

### Literatur

- ACKERMAN, A., N. C. BELLIOS, R. A. KNOUFF, and W. J. FRAJOLA: Cytochemical changes in lymph nodes and spleens of rats after total body X-radiation. *Blood* **9**, 795—803 (1954).  
 AMMON, R., u. W. DIRSCHERL: Die Esterasen. In: *Fermente, Hormone, Vitamine*, Bd. I. S. 99—113. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

- ANDERSEN, N. G., and J. G. GREEN: The soluble phase of the cell. In: D. B. ROODYN, *Enzyme cytology*, p. 475—509. New York and London: Academic Press 1967.
- ANDREW, W.: Age changes in the vascular architecture and cell content in the spleens of 100 Wistar-Institute rats, including comparisons with human material. *Amer. J. Anat.* **79**, 1—74 (1946).
- ARVY, L.: Autres estérasas carboxyliques spléniques. In: L. ARVY, *Splénologie*, p. 74—76. Paris: Gauthier-Villars 1965.
- BACQ, Z. M., u. P. ALEXANDER: Pathologische Physiologie der Strahlenkrankheit und ihre Bedeutung. In: *Grundlagen der Strahlenbiologie*, S. 286—295. Stuttgart: Georg Thieme 1958.
- BLOOM, W.: *Histopathology of irradiation from external and internal sources*. New York and Toronto: McGraw-Hill Book Co. 1948.
- BULL, H. B.: Adsorption of water vapor by proteins. *J. Amer. chem. Soc.* **66**, 1499—1507 (1944).
- COHRS, P., u. L. CL. SCHULZ: Die Milz. In: P. COHRS, R. JAFFÉ u. H. MEESEN, *Pathologie der Laboratoriumstiere*, Bd. I. I. Normale Anatomie, S. 330—338; II. Weiße Ratte, S. 343—345. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- COTTIER, H.: Histopathologie der Wirkung ionisierender Strahlen auf höhere Organismen (Tier und Mensch). In: A. ZUPPINGER, *Handbuch der medizinischen Radiologie*, Bd. II/2, S. 35—272. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966a.
- Die Milz. In: A. ZUPPINGER, *Handbuch der medizinischen Radiologie*, Bd. II/2, S. 96—100. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966b.
- DORFMAN, R. F.: Nature of the sinus lining cells of the spleen. *Nature (Lond.)* **190**, 1021—1022 (1961).
- ERNST, H.: Strahlenbedingte Frühveränderungen an Zellkernproteinen. *Z. Naturforsch.* **17b**, 300—305 (1962).
- GEIGY: Statistik. In: GEIGY, *Wissenschaftliche Tabellen*, 6. Aufl., S. 146—171. 1962.
- GÖSSNER, W.: Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Azofarbstoffen. *Histochemie* **1**, 48—96 (1958).
- HEINEKE, H.: Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf Tiere. *Münch. med. Wschr.* **1903b**, 2090—2092.
- HERRATH, E. v.: Die funktionellen Typen der Säugermilz. In: *Bau und Funktion der normalen Milz*, S. 80—85. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1958.
- HOFFMANN-OSTENHOFF, O.: Carbonsäureesterasen. In: *Enzymologie*, S. 171—176. Wien: Springer 1954.
- HUGGINS, C., and S. H. MOULTON: Esterases of testis and other tissues. *J. exp. Med.* **88**, 169—179 (1948).
- JAFFE, H. H., and M. ORCHIN: Light absorption and its measurement in theory and application of ultraviolet spectroscopy, p. 1—15. New York and London: John Wiley & Sons 1962.
- KINDRED, I. E.: A quantitative study of the hemopoietic organs of young adult albino rats. *Amer. J. Anat.* **71**, 207—243 (1942).
- LÖFFLER, H.: Vergleichende histochemische Untersuchungen an Säugermilzen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **44**, 351—355 (1960).
- MITCHELL, J. S.: Some aspects of radiation on the metabolism of tissues and tumors. In: A. ZUPPINGER, *Handbuch der medizinischen Radiologie*, Bd. II/1, S. 355—486. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- MURRAY, R. G.: The spleen. In: W. BLOOM, *Histopathology of irradiation from external and internal sources*, p. 243—347. New York and Toronto: McGraw-Hill Book Co. 1948.
- PAPE, R., u. N. JELLINEK: Die Milz als Indikator verschiedener biologischer Röntgenwirkungen. *Radiol. Austriaca* **1**, 59—76 (1948).
- — Wichtige Unterschiede in den Organbefunden bei Allgemein- und Lokalbestrahlung, sowie über besondere Wirkungen kleiner Strahlendosen. Die Milz als Indikator verschiedener Strahlenwirkungen. Teil II. *Radiol. Austriaca* **3**, 43—62 (1950).
- , u. A. PIRINGER-KUCHINKA: Über die Wiederherstellung des lymphoretikulären Gewebes nach Strahlenschäden (Nach Untersuchungen am Follikelapparat der Rattenmilz). *Strahlentherapie* **101**, 523—535 (1956).

- PASQUALINO, A., and G. H. BOURNE: Histochemical effects of X-radiation. *Acta anat. (Basel)* **42**, 1—11 (1960).
- PEARSE, A. G. E.: The chemistry of fixation. The principles of hydrolytic enzyme histochemistry. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, carboxylic esterases. In: *Histochemistry, theoretical and applied*, p. 53—74 and p. 363—490. London: J. A. Churchill 1961 a.
- The principles of hydrolytic enzyme histochemistry. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, carboxylic esterases. In: *Histochemistry, theoretical and applied*, p. 456—490. London: J. A. Churchill 1961 b.
- PETERSEN, D. F., F. W. FITCH, and K. P. DUBOIS: Biochemical changes in spleens of rats after localized X-irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* **88**, 394—397 (1955).
- POHLE, E. A., u. C. H. BUNTING: Histologische Untersuchungen an der Rattenmilz nach abgestuften Röntgenstrahlendosen. *Strahlentherapie* **57**, 121—131 (1936).
- RUMMEL, W., u. W. GÖSSNER: Einfluß einer Ganzkörperbestrahlung LD 50/30 auf die Enzymmuster der Milz bei verschiedenen Spezies. EUR 3270. d. EURATOM-Ges. für Strahlenforschung, München, Neuherberg Jahresbericht 1965, S. 30—33.
- SCHERER, E.: Cytologische und karyometrische Untersuchungen zur Strahlenwirkung auf Leber und Milz bei Anwendung von Total- und Teilbestrahlung. *Strahlentherapie* **100**, 211—224 (1956).
- Cytoplasma und Mitochondrien. In: E. SCHERER, H. ST. STENDER, *Strahlenpathologie der Zelle*, S. 47—68. Stuttgart: Georg Thieme 1963.
- , u. H. ST. STENDER: *Strahlenpathologie der Zelle*. Stuttgart: Georg Thieme 1963.
- SCOTT, I.: Introduction. In: *Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products*, p. 1—14. Oxford: Pergamon Press 1964.
- SMITH, C., T. J. WHARTON, and A. M. GERHARDT: Studies on the thymus of the mammal. XI. Histochemical studies of thymus, spleen and lymphnode in normal and irradiated mice. *Anat. Rec.* **131**, 369—387 (1958).
- STRAUS, W.: Factors affecting the state of injected horseradish peroxidase in animal tissues and procedures for the study of phagosomes and phago-lysosomes. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 470—480 (1964).
- STUTTE, H. J.: Zur fermentchemischen Differenzierung retikulo-endothelialer Milzzellen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **49**, 280—283 (1965).
- TAYLOR, J. F.: Methods of determining proteins. In: H. NEURATH, K. BAILEY, *The proteins*, vol. IA, p. 14—18. New York: Academic Press 1953.
- VALET, G.: Esteraseaktivität und Proteingehalt der Milz von ganzkörperbestrahlten Ratten unter Berücksichtigung funktionsmorphologischer Gesichtspunkte. Diss. München 1968.

Dr. G. VALET

Dr. H.-J. GROSS

Prof. Dr. G. RUHENSTROTH-BAUER

Max-Planck-Institut für Biochemie

8 München 15, Goethestraße 31