den Vorteil, daß die Absorption der begleitenden CDC-Konjugate so gering wie möglich gehalten wird. Wir haben deshalb die Eichkurven für TDC und GDC durch Ablesen genau 5 Min. nach Zugabe des Eisessigs bei 690 m μ ermittelt (s. Abb. 3). Die damit festgelegten Beziehungen zwischen eingesetzter Konzentration und entsprechendem Extinktionswert sind bei sorgfältigem Arbeiten, wobei besonders die Zeitabhängigkeit des Reaktionsablaufs zu beachten ist, einwandfrei reproduzierbar.

Diskussion

Die Schwierigkeiten, die einer quantitativen Bestimmung der konjugierten DHC, die chromatographisch nur ungenügend zu trennen sind, entgegenstehen, lassen sich überwinden, wenn für die Bestimmung der einzelnen Konjugate spezifische Nachweisreaktionen eingesetzt werden. Da beide Gruppen

von Gallensäuren (TDC und TCDC bzw. GDC und GCDC) jeweils gleichzeitig zur Bestimmung kommen, sei der Spezifitätsbegriff so eingengt, daß die Nachweisreaktion der einen Gallensäure durch ein Mitreagieren der anderen nicht gestört wird. Wie oben ausgeführt, können die DC-Konjugate mittels Salicylaldehyd-Schwefelsäure-Eisessig-Reaktion in Gegenwart der entsprechenden CDC-Konjugate quantitativ ermittelt werden, da deren Absorption minimal gehalten werden kann und bei Vorliegen gleicher Konzentrationen unter Beachtung des von uns benützten Vorgehens 8% nicht übersteigt. Die quantitative Bestimmung der CDC-Konjugate kann in Gegenwart der DC-Konjugate mittels der Äthylacetat-Schwefelsäure-Eisessigsäureanhydrid-Reaktion vorgenommen werden, wobei die geringe Absorption der konjugierten DC zu vernachlässigen ist. Damit besteht eine Möglichkeit, zwei gleichzeitig vorliegende Gallensäuren durch Anwendung zweier spezifischer Nachweisreaktionen einzeln quantitativ zu bestimmen.

Mortalität sensibilisierter Kaninchen nach Röntgenbestrahlungen*

Von A. D'ADDABBO, U. FEINE und E. KALLEE

Aus der Medizinischen Klinik (ehem. Direktor: Prof. H. BENNHOLD) und dem Medizinischen Strahleninstitut (Direktor: Prof. R. BAUER) der Universität Tübingen
(Z. Naturforschg. 19 b, 483—487 [1964]; eingegangen am 11. Januar 1964)

Herrn Professor Bock zum 60. Geburtstag

Whole body irradiation with lethal or sublethal X-ray doses caused more frequent and earlier deaths in hyperimmune rabbits than in non-sensitized controls.

Anläßlich einer Untersuchung über den Schwund von ^{131}J -Insulin hatten wir einen zufälligen Nebentbefund erhoben¹: Kaninchen, die mit artfremden Serumproteinen hyperimmunisiert waren, starben nach einmaligen Röntgen-Ganzkörperbestrahlungen viel rascher an der Strahlenkrankheit als die nicht-sensibilisierten Kontrolltiere. Die Anzahl der damals verwendeten Kaninchen war allerdings nicht groß gewesen; außerdem war allen diesen Tieren vor der Bestrahlung wiederholt Insulin injiziert und des öfteren Blut entnommen worden. Daher versuchten wir die Bestrahlungsexperimente an umfangreicheren, nicht mit Insulin vorbehandelten Kollektiven zu reproduzieren. Zusätzlich prüften wir bei einem Teil

der sensibilisierten Kaninchen und der Kontrollen den Einfluß von Prednisolon auf die Überlebensdauer und auf das Blutbild nach letalen und subletalen Röntgendosen. Damit sollte festgestellt werden, ob die verkürzte Lebenszeit durch eine bei der langandauernden Immunisierung entstandene Erschöpfung der Nebennierenrinde bedingt ist.

Methoden

1. Hyperimmunisierung

Etwa einjährige, ♀ und ♂, 3...4 kg schwere Kaninchen erhielten 14 Tage lang zweimal wöchentlich je 0,5 ml Humanserum i.v. injiziert und weitere 2 Wochen

* Durchgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Clinica Medica, Policlinico (Direktor: Prof. V. CHINI), Università di Bari/Italien.

¹ A. D'ADDABBO u. E. KALLEE, Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 8th Colloquium, Bruges 1960, p. 255, Elsevier Publ., Amsterdam 1961.

lang ansteigende Mengen bis zu 1,0 ml pro Injektion. Drei Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren erstmals Blut abgenommen und mit jeweils 0,2 ml Kaninchen Serum und 0,1 ml des 1 : 10 verdünnten Antigens die Stärke der Präzipitinreaktion an Hand der auftretenden Trübung (+), Flockung (++) oder Gerierung (+++) der Ansätze geschätzt.

2. Prednisolon

Von den 22 sensibilisierten Kaninchen erhielten 11 sechs Tage vor der Bestrahlung jeden zweiten Tag und unmittelbar nach der Bestrahlung jeweils 2 mg Prednisolon (Deltacortril®-intramuscular-veterinary, Pfizer, New York) appliziert. Das gleiche geschah mit 10 von 21 Kontrollen.

3. Bestrahlung

Am neunten Tage nach der letzten Antigen-Injektion wurden je ein sensibilisiertes Kaninchen und ein nicht-sensibilisiertes Kontrolltier gleichzeitig in zwei übereinandergestellten Holzkästen mittels eines Siemens-Stabilipan-Bestrahlungsgerätes bei 220 kV, 16 mA und 0,5 mm Cu bestrahlt. Der Abstand betrug 80 Zentimeter. Die Ganzkörperbestrahlung erfolgte von zwei Seiten; die Dosis von jeweils 500 oder 700 r wurde auf die Mittelebene der Tiere berechnet. Das Bestrahlungsfeld wurde so groß gewählt, daß die gesamten Tiere im Strahlenkegel lagen, wodurch sich eine weitgehend homogene Ganzkörperdosis erzielen ließ.

4. Blutstatus

Am Tage vor der Bestrahlung wurde aus der Ohrvene jedes Kaninchens Blut für die Erythrozyten- und Leukozytenzählung sowie für die Ausstriche entnommen. Die Erythrozyten- und Leukozytenzahlen dieser Ausgangswerte sind in den Abbildungen gleich 100% gesetzt. Die Frequenz der Blutentnahmen ist aus den Abbildungen ersichtlich.

Ergebnisse

1. Überlebensdauer

In prinzipieller Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen starben die gegen Humanseren sensibilisierten Kaninchen innerhalb der ersten 14 Tage nach der einzeitigen Röntgenbestrahlung zu einem siebenmal höheren Prozentsatz als die nicht-sensibilisierten Kontrollen (Tab. 1 und Abb. 1). Die Überlebensrate der Kontrollen nach mehr als 1 Monat nach der Bestrahlung war nicht eindeutig erhöht (Tab. 1). Zwischen der Menge der produzierten humoralen Antikörper und der Sterblichkeit ließ sich kein Zusammenhang finden. Prednisolon verlängerte die Überlebenszeit nicht, es schien die Mortalität der Kontrollen eher zu erhöhen, doch ist die Differenz statistisch nicht signifikant. Wegen der unterschiedlichen Vorbehandlung der Versuchstiere zusammen mit einer etwas andersartigen Bestrahlungstechnik sind die Versuchsreihen des Jahres 1960¹ nicht gut mit den jetzigen zu vergleichen. Damals waren von den hyperimmunisierten Kaninchen 100% binnen zwei Tagen gestorben, von den nichtsensibilisierten Kontrollen 58% innerhalb von 10 Tagen, und 42% der Kontrollen hatten länger als 4 Wochen gelebt. Dennoch starben in beiden Versuchsanordnungen die sensibilisierten Tiere viel früher und zu einem wesentlich größeren Anteil als die Kontrollkaninchen.

2. Blutstatus

a) Rotes Blutbild

Schon kurz nach der Totalbestrahlung trat bei allen Tiergruppen eine Anämie leichten bis mittel-

Abb. 1. Mortalität hyperimmunisierter, bestrahlter Kaninchen. Diejenigen sensibilisierten Kaninchen, welche den ersten Monat nicht überlebten, starben zwischen dem 1. und 14. Tage nach der Bestrahlung mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 8,04 Tagen. Nur eines der zehn mit 700 r bestrahlten hyperimmunisierten Tiere lebte länger als einen Monat, während von den zwölf 500-r-Kaninchen fünf überlebten. Sechs nichtsensibilisierte Kontrolltiere starben erst zwischen dem 4. und 24. (Durchschnitt 15,0) Tage nach der Bestrahlung; davon waren vier mit 700 r bestrahlt gewesen, zwei mit 500 r. Von den 15 Kontrollen, die einen Monat überlebten, waren sechs mit 700 r und neun mit 500 r bestrahlt. Da eine kurzfristige Prednisolonbehandlung bei jeweils der Hälfte jeder Tiergruppe statistisch erfolglos blieb, ist diese Vorbehandlung im Säulendiagramm nicht berücksichtigt.

		Mortalität innerhalb 14 Tagen nach der Bestrahlung				
	Beobach- tungszahl (n)	gestorben (n) = [%]	zulässige Zu- fallsdifferenz ⁵ $P_0 - P_u$ [%]	beobachtete Differenz $P_1 - P_2$ [%]	$\frac{P_1 - P_2}{P_0 - P_u}$	Beurteilung
Hyper- immunisierte	22	15 = 68,2	46	58,6	1,27	signifikant
Kontrollen	21	2 = 9,6				
Überlebensrate nach mehr als 1 Monat						
		Überlebende				
Hyper- immunisierte	22	7 = 32,8	47	39,7	0,85	nicht signifikant
Kontrollen	21	15 = 71,5				

Tab. 1. Mortalität und Überlebensrate hyperimmunisierter Kaninchen. Die in dieser Zusammenstellung fehlenden 4 Kontrollkaninchen waren zwischen dem 17. und 24. Tag gestorben (vgl. Abb. 1).

Abb. 2. Verlauf der Bestrahlungsanämie bei hyperimmunisierten Kaninchen und nichtsensibilisierten Kontrolltieren. Die Anzahl der Erythrozyten pro μl Blut am Tage vor der Bestrahlung ist jeweils gleich 100% gesetzt. Die erforderlichen t -Werte beziehen sich auf $p=0,002$.

Abb. 3. Bestrahlungs-Leukopenie bei hyperimmunisierten und bei nichtsensibilisierten Kaninchen. Die Anzahl der Leukozyten pro μl Blut am Tage vor der Bestrahlung ist jeweils gleich 100% gesetzt. Die erforderlichen t -Werte beziehen sich auf $p=0,002$. Ähnlich wie in Abb. 2 ist die Differenz zwischen den beiden Tiergruppen gegen Ende der Beobachtungszeit nur scheinbar, da vorwiegend die sensibilisierten Tiere in der leukopenischen Phase gestorben waren.

Abb. 4. Verlauf der Bestrahlungs-Lymphopenie bei hyperimmunisierten und nichtsensibilisierten Kaninchen. Die Werte geben den prozentualen Anteil der Lymphozyten im Differential-Blutbild an. Die neutrophilen segmentkernigen Zellen verhielten sich komplementär zur Lymphozytenkurve. Bei diesen, wie auch bei den übrigen Zellformen, war kein Unterschied zwischen den sensibilisierten Tieren und den Kontrollen festzustellen.

schweren Grades auf, die wochenlang anhielt (Abb. 2). Obwohl die Kontrolltiere die Bestrahlung viel länger überlebten als die sensibilisierten Kaninchen, fiel die Anzahl der Erythrozyten bei den Kontrollen scheinbar stärker ab. Die gefundenen Unterschiede sind jedoch statistisch nur knapp signifikant, wahrscheinlich weil die hyperimmunisierten Tiere vorzugsweise in der anämischen Phase gestorben waren. Bei 5 sensibilisierten Kaninchen, welche die Bestrahlung vier Wochen lang überlebten, war der Ausgangswert nach dieser Zeit wieder erreicht.

b) Weißes Blutbild

Bei allen bestrahlten Kaninchen sank die Leukozytenzahl, nach dem typischen vorübergehenden Anstieg, auf $1/5 \dots 1/6$ des Ausgangswertes ab (Abb. 3). Die Leukopenie besserte sich vom 16. Tage an. Prednisolon hatte, an der Leukozytenzahl gemessen, keine statistisch signifikante Schutzwirkung aufzuweisen. Auch die Differenz der Leukozytenzahl zwischen Immunisierten und Kontrollen war nicht signifikant.

Der Leukozytensturz ging hauptsächlich zu Lasten der Lymphozyten (Abb. 4). Im Differentialblutbild stieg dafür die relative Anzahl der neutrophilen segmentkernigen, insbesondere der hypersegmentierten Leukozyten an. Vor allem bei den bestrahlten sensibilisierten Tieren war wohl der prozentuale Anteil der neutrophilen Segmentkernigen unter dem Einfluß von Prednisolon zeitweilig höher als bei den bestrahlten, nichtvorbehandelten Kontrollen. Jedoch reichte die Anzahl der überlebenden, sensibilisierten Kaninchen für einen echten statistischen Vergleich nicht aus.

Während die Kontrollen den Lymphozytensturz größtenteils überlebten, starben die meisten immunisierten Kaninchen in dieser Phase der Strahlenkrankheit. Die Sensibilisierung übte aber keinen statistisch sicherbaren Einfluß auf das Verhältnis zwischen Lymphozyten und Segmentkernigen nach der Bestrahlung aus.

Diskussion

Ein starker, langdauernder immunologischer Reiz kann die Überlebensaussichten von Kaninchen nach letalen oder subletalen Röntgenbestrahlungen erheblich verschlechtern. Die Mortalität der hyperimmunisierten und anschließend bestrahlten Kaninchen dieser Versuchsreihe war jedoch nicht von der Stärke der Präzipitinreaktion in vitro vor der Bestrahlung abhängig. Für die tödliche Strahlenwirkung scheint es also unwesentlich zu sein, ob größere Mengen humoraler Antikörper gebildet werden.

Nach DIXON und MCCONAHEY kann eine Ganzkörperbestrahlung bei Kaninchen, die gegen bestimmte Proteine einmalig sensibilisiert waren, die Ausschüttung von humoralen Antikörpern beschleunigen und den Antikörper-Titer maximal in die Höhe treiben². Somit könnte auch bei unseren hyperimmunisierten Kaninchen eine überschießende Immunreaktion nach der Bestrahlung für die innerhalb der ersten zwei Wochen erhöhte Mortalität mitverantwortlich gewesen sein.

Eine langdauernde Sensibilisierung kann als „Stress“ aufgefaßt werden. Da die Röntgenbestrahlung einen zusätzlichen „Stress“ auslöst, ließen die verkürzten Überlebenszeiten der hyperimmunisierten Tiere an eine Erschöpfung der Nebennierenrinde denken. In diesem Falle wäre durch eine Corticoid-Medikation eine Verbesserung der Überlebensrate

² F. J. DIXON u. P. J. MCCONAHEY, J. exp. Medicine **117**, 833 [1963].

zu erwarten gewesen. Wie aber bereits bekannt ist, verbessert Cortison die Überlebensrate nach Ganzkörperbestrahlungen nicht, es kann sogar schädlich wirken³. Auch Prednisolon verlängerte weder die Überlebenszeit unserer sensibilisierten Kaninchen noch die der Kontrollen. Dennoch ist damit eine Beteiligung der Nebennierenrinde am besonders schweren Verlauf der Strahlenkrankheit nach einer immunologischen Vorschädigung nicht völlig auszuschließen.

Unsere Befunde lassen keinen Rückschluß auf die Verhältnisse bei niedrigerer Strahlendosierung oder bei Teilbestrahlungen⁴ zu. Da in der Strahlentherapie vorwiegend Teilbestrahlungen verabreicht

werden, sind die aus diesen Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf die Humanmedizin zu übertragen. Eine Verstärkung der Strahlenkrankheit mit einer erhöhten oder beschleunigten Letalität bei Kranken, die an chronischen Infekten oder anderen immunologischen Komplikationen leiden, ist unseres Wissens bisher nicht bekannt geworden. Dies erscheint aber nach den hier vorliegenden experimentellen Ergebnissen nun durchaus im Bereich des Möglichen zu liegen.

Frl. A. ERNST und Frau R. MÜLLER, geb. BRAUN, sowie Herrn Dr. G. FANFANI möchten wir für die ausdauernde und gewissenhafte Mitarbeit bestens danken.

³ Z. M. BACQ u. P. ALEXANDER, „Grundlagen der Strahlenbiologie“, Thieme-Verlag, Stuttgart 1958.

⁴ M. H. BROWN, Canad. med. Assoc. J. **87**, 1183 [1962].

⁵ S. KOLLER, „Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen“, S. 28, T. Steinkopff, Dresden u. Leipzig 1940.

Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen im Zusammenhang mit der Rickettsiose von *Melolontha* spp.*

Von ALOYSIUS KRIEG

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

(Z. Naturforschg. **19 b**, 487—490 [1964]; eingegangen am 10. Oktober 1963)

By immunofluorescent studies on the rickettsioses of *Melolontha* spp. it was demonstrated that the shell of the accompanying protein crystals is antigenically related to the normal surface antigen of rickettsiae. These findings are in agreement with recent results of HUGER who described on the base of light microscope studies the genesis of crystals within pleomorphic rickettsiae of the genus *Rickettsiella*.

Bei der Lorsch-Seuche des Maikäfers (*Melolontha* spp.) [Erreger: *Rickettsiella melolonthae* (Krieg) Philip] treten, ebenso wie bei der Rickettsiose des Japankäfers (*Popillia japonica* Newm.), im Verlauf der Krankheit sog. Begleitkristalle auf (DUTKY und GOODEN¹, KRIEG^{2,3}). Ähnliche Kristalle beobachtete auch MÜLLER-KÖGLER^{3a} in rickettsiösen Larven von *Tipula paludosa* Meig. [Erreger: *Rickettsiella tipulae* Müller-Kögler]. HUGER⁴ fand, daß die Begleitkristalle bei der *Tipula*-Rickettsiose innerhalb von kristallophoren Gebilden entstehen, die er auf Grund lichtmikroskopischer Untersuchungen als Albuminoid-Granula deutete. Solche Albuminoid-Gr-

nula sind in gesunden Fettkörperzellen zahlreich vorhanden, werden aber in *Rickettsiella*-infizierten Zellen allmählich abgebaut. EM-Untersuchungen von Ultradünnschnitten durch den Fettkörper rickettsiöser Maikäfer-Engerlinge zeigten, daß auch hier die Kristalle nicht anders entstehen dürften als bei *Tipula* (KRIEG)⁵.

Die Begleitkristalle von Rickettsiellen sind in Essigsäure und in Ammoniumhydroxyd löslich (KRIEG)³ und können deshalb entgegen der Auffassung von DUTKY⁶ nicht aus Calciumoxalat bestehen. Auch kann es sich bei ihnen nicht um Harnsäurekristalle handeln, da sie keine positive Murexid-Reaktion geben.

* IV. Mitteilung der in dieser Zeitschrift erschienenen Untersuchungen zur Pathologie der Rickettsiose von *Melolontha* spec.

¹ S. R. DUTKY u. E. L. GOODEN, J. Bacteriol. **63**, 743 [1952].

² A. KRIEG, Z. Naturforschg. **10 b**, 34 [1955].

³ A. KRIEG, Z. Naturforschg. **13 b**, 374 [1958].

^{3a} E. MÜLLER-KÖGLER, Naturwissenschaften **45**, 248 [1958].

⁴ A. HUGER, J. Insect Pathol. **1**, 60 [1959].

⁵ A. KRIEG, Z. Naturforschg. **15 b**, 31 [1960].

⁶ S. R. DUTKY, Adv. Appl. Microbiol. **1**, 175 [1959].