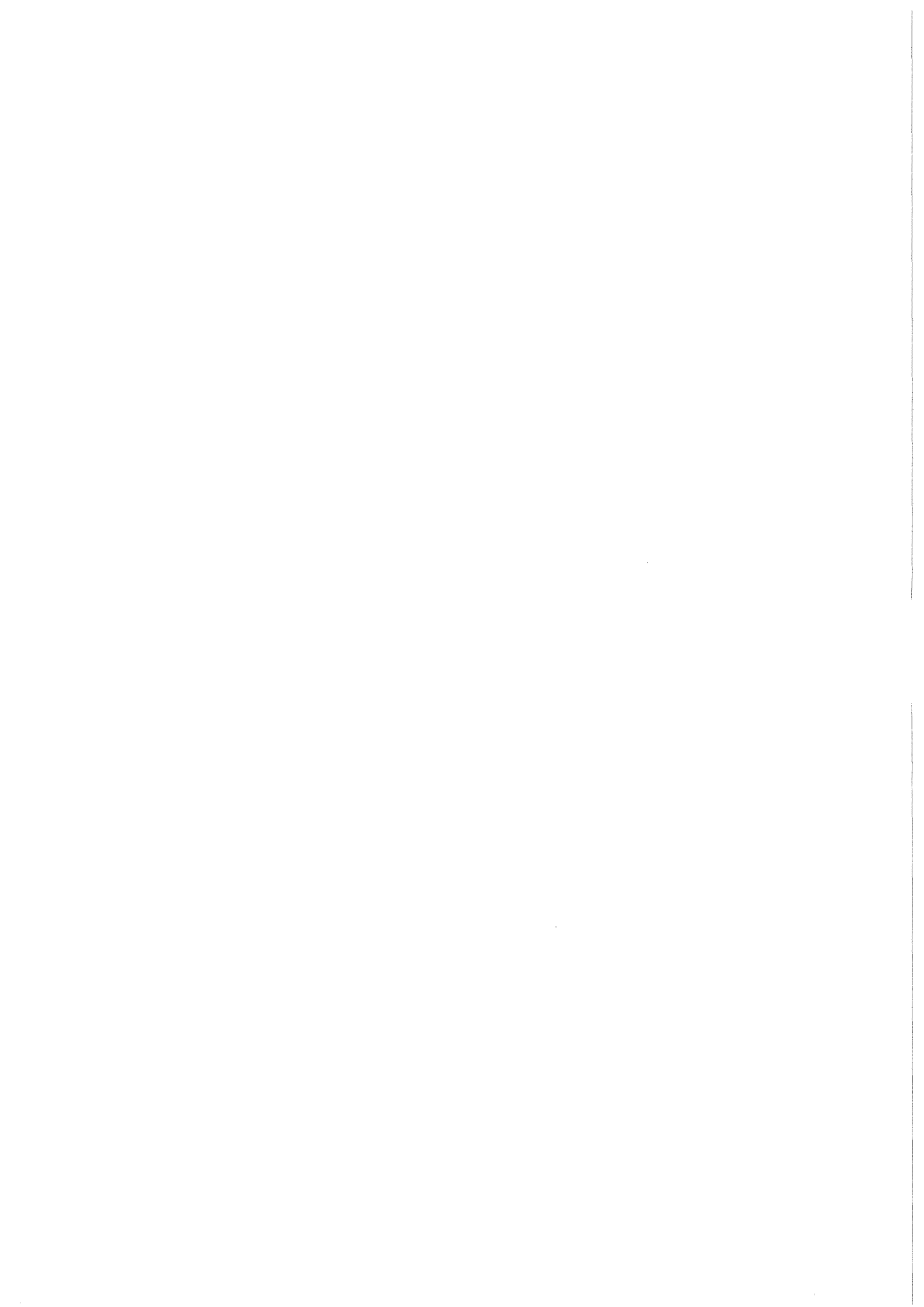


KfK 4380
Februar 1988

**Histomorphologische und
-morphometrische
Untersuchungen von
frühen Knochenschäden nach
Inkorporation optimal
kanzerogener Dosen von
²³⁹Plutonium an männlichen
Ratten verschiedenen Alters**

A. O. Gamer
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

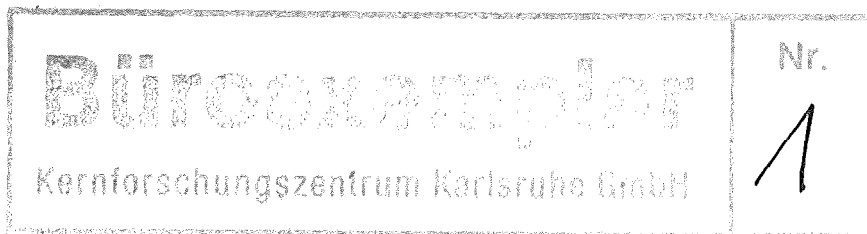
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4380

Histomorphologische und -morphometrische Untersuchungen
von frühen Knochenschäden
nach Inkorporation optimal kanzerogener Dosen von
239-Plutonium
an männlichen Ratten verschiedenen Alters

Armin O. Gamer

vom Fachbereich Tiermedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
genehmigte Dissertation



Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung:

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit frühen Knochenschäden nach Inkorporation kanzerogener Dosen von 239-Plutonium. Es konnte gezeigt werden, daß unterschiedliches Alter der Versuchstiere bei gleicher applizierter Menge des Nuklides pro Körpergewichtseinheit zur unterschiedlichen Strahlenbelastung des Skelettes führt. Dies schlägt sich deutlich in der Ausprägung histologischer Knochenschäden nieder, deren Spektrum von schweren morphologischen Defekten an Knochenmark und Trabekelstruktur über histologisch sichtbare Osteoporosen zu nur histomorphometrisch erfaßbaren Veränderungen des Knochenstoffwechsels führen. Die Abhängigkeit der Mikroverteilung im Knochen sowie das Dekorporationsverhalten des Strahlers vom Knochenwachstum der Tiere wird dargestellt und die Folgen für das Knochengewebe aufgezeigt.

Histomorphological and Histomorphometrical Investigations of Early Bone Damage Following Incorporation of Optimal Carcinogenic Doses of 239-Plutonium in Male Rats of Different Age

There is early damage to bone at small carcinogenic amounts of the nuclide, including heavy defects of bone structure and bone marrow osteoporotic features of trabecular bone and only histomorphometrically detectable changes in bone metabolism. The dependance of radiation dose to skeleton and the spacial distribution of the nuclide on age and growth of the experimental animals is demonstrated and correlated to the histological findings. It is also shown that growth and metabolism parameters of bone influence the decorporation performace of the chelating agent Zn-DTPA.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Plutonium, Herkunft und Verwendung	3
1.2 Abriß des biologischen Verhaltens von Plutonium in Mensch und Säugetier	4
1.3 Plutonium und Knochen	5
1.3.1 Verteilung im Körper	5
1.3.2 Übersicht zur Histologie des Strahlen- schadens im Knochen in Abhängigkeit von der inkorporierten Aktivitätsmenge	6
 2. Material und Methoden	
2.1 Versuchstiere	13
2.2 Sektion und Entnahme von Gewebeproben	13
2.3 Bestimmung der Plutoniumaktivität in den Knochen	14
2.4 Untersuchung des Blutes	15
2.5 Histologische Bearbeitung unentkalkter Knochen	15
2.5.1 Einbettung in Spurr's Low Viscosity Epoxy Resin	16
2.5.2 Einbettung in Methylmethacrylat	17
2.5.3 Vorbereitung und Schneiden der Kunst- stoffblöckchen	18
2.5.4 Färbung der histologischen Präparate	19
2.6 Autoradiographie	20
2.6.1 Autoradiographie mit Kunststoffolie	20
2.6.2 Autoradiographie mit "stripping film"	20
2.7 Histomorphometrische Methoden	21
2.7.1 Apparative Ausstattung	21
2.7.2 Messungen an Fluoreszenzpräparaten	22
2.7.2.1 Messung der Wachstumsrate des distalen Femur	23
2.7.2.2 Bestimmung der Knochenmineralisationsrate	23
2.7.2.3 Knochenmorphometrie und Stoffwechsel- schätzung	24

2.7.3	Messungen an Epiphysenfugen	27
2.7.3.1	Messung der Knorpelfugenbreite am distalen Femur	27
2.7.3.2	Bestimmung der Höhe von Blasenknorpel- zellen	28
2.7.4	Messung des Abstandes des Aktivitäts- sowie des Knochenquerbandes in der Metaphyse des distalen Femur	28
2.7.5	Zellzählung in der Metaphyse des distalen Femur	29
2.8	Versuchsbeschreibungen	30
2.8.1	Radionuklide und Fluoreszenzfarbstoffe	30
2.8.2	Versuche mit jugendlichen Ratten	31
2.8.3	Versuche mit jung-erwachsenen Ratten	32
2.9	Statistik und Darstellung der Ergebnisse	32
3.	Ergebnisse	
3.1	Nuklidverteilung	34
3.1.1	Nuklidretention in Leber und Nieren	34
3.1.2	Nuklidretention und Strahlenbelastung von Femur und drittem Lendenwirbelkörper	34
3.1.2.1	Nuklidretention	34
3.1.2.2	Nuklidkonzentration	35
3.1.2.3	Strahlenbelastung von Femur und drittem Lendenwirbel	36
3.2	Körpergewichtsentwicklung	37
3.3	Ergebnisse der Blutuntersuchung	38
3.3.1	Zahl der Erythrozyten	38
3.3.2	Zahl der Leukozyten	38
3.3.3	Aktivität der Alkalischen Phosphatase	39
3.4	Histologie ausgewählter Knochenproben	40
3.4.1	Femur distalis	40
3.4.1.1	Makro- und Mikroverteilung von Plutonium	40
3.4.1.2	Histologisch faßbare Veränderungen	42
3.4.1.3	Knochenwachstum und Knorpelfuge	46
3.4.1.4	Zellpopulation der Metaphyse	48
3.4.1.5	Histomorphometrie der distalen Femur- epiphyse	49

3.4.2	Untersuchungen an Wirbelkörpern	50
3.4.2.1	Nuklidverteilung und histologisch faßbare Veränderungen	50
3.4.2.2	Histomorphometrie des Wirbelkörpers	53
4.	Diskussion der Ergebnisse	
4.1	Retention, Nuklidverteilung und Strahlen- belastung des Knochens durch Plutonium	55
4.2	Bewertung der klinischen Parameter	59
4.3	Histopathologie und Histomorphometrie (Wachstum und Knochenstoffwechsel) von Femur und Wirbelkörper	63
4.3.1	Bewertung der qualitativen Befunde	63
4.3.2	Bewertung der quantitativen Befunde	67
4.3.2.1	Zur Genauigkeit der Methodik	67
4.3.2.2	Parameter des Längenwachstums	68
4.3.2.3	Merkmale des Knochenstoffwechsels	70
4.3.2.4	Zellzählung in der Metaphyse	73
5.	Zusammenfassung/Summary	74
6.	Tabellen und Abbildungen	78
7.	Methodischer Anhang	134
8.	Schrifttum	148

1. Einleitung

Wie in allen übrigen Geweben eines Lebewesens kann ionisierende Strahlung auch beim Knochengewebe die Veränderung seines biologischen Verhaltens bewirken.

Der Grad dieser Veränderung, die sich in der Mehrzahl der Fälle als negativ erweist, hängt vor allem von der Menge der Strahlung, der Strahlendosis ab. Ob die Strahlung von außen oder von innen, z.B. über im Gewebe selbst abgelagerte radioaktive Stoffe, auf das Gewebe einwirkt, spielt nur insofern eine Rolle, als dadurch der Ort der Hauptstrahlenbelastung charakterisiert wird.

Die Morphologie des Strahlenschadens am Knochen ist qualitativ sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch weitgehend bekannt, und eine umfassende Literaturübersicht wird von Gössner, Luz, Heuck (Gös85) gegeben. Die pathologischen Abläufe gleichen sich bei externer und interner Bestrahlung und sind in ihrem Ausmaß und ihrer zeitlichen Dimension von der applizierten Strahlendosis abhängig.

Man unterscheidet zwischen dem Frühschaden, der sich innerhalb kurzer Zeit (Tage und Wochen) nach der Bestrahlung entwickelt und den Spätfolgen einer Strahlenentwicklung. Die Spätwirkung von ionisierender Strahlung auf den Knochen besteht hauptsächlich in der Induktion von Knochengeschwülsten verschiedener geweblicher Provenienz, wobei die Tumorzinzidenz (Häufigkeit des eintretenden Schadens) von der Strahlendosis abhängt (stochastische Strahlenwirkung), die wesentlich niedriger sein kann als zur Induktion offensichtlicher morphologischer Frühschäden notwendig. Andererseits werden auch nichtstochastische Effekte im Bereich der Dosen, die zur Krebsentstehung führen, diskutiert. Weiterhin ist die Qualität der Strahlung von Bedeutung sowie möglicherweise eine genetische Disposition (Gös85).

Für die Entwicklung und den Verlauf des Frühschadens am Knochen ist die Feststellung wesentlich, in welchem physiologischen Zustand sich das Gewebe befindet, insbesondere, ob das Knochenwachstum beendet ist und der Knochen in die Phase des Erhaltungsstoffwechsels eingetreten ist oder nicht. Bei

wachsenden Knochen ist zu beachten ob es sich um den Mechanismus der enchondralen Ossifikation handelt, wie er beispielhaft in den langen Röhrenknochen abläuft, oder ob eine desmale Ossifikation stattfindet, wie in den Deckknochen des Schädels.

Der Ablauf pathologischer Erscheinungen am wachsenden Röhrenknochen schließt vor allem Wachstumsknorpel und Metaphyse ein. Die durch Strahlenschäden betroffenen Zellpopulationen sind Knorpelzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Mesenchymzellen, insbesondere Kapillarendothelien und Osteoprogenitorzellen. Durch die enge räumliche und physiologische Bindung an den Knochen trägt auch das blutbildende Organ, das Knochenmark, einen Schaden davon. Dieser hängt, insbesondere bei im Knochen abgelagerten Nukliden, von der Reichweite der Strahlung und vom Ort der Energieabsorption ab. Weiterhin sei hier auf die Beziehung zwischen Makrophagen des Knochenmarks und Osteoklasten hingewiesen, deren Einzelheiten sich noch weitgehend unserer Kenntnis entziehen (Owe80, Vau81).

Wird im wachsenden Knochen also der Wachstumsvorgang selbst und die Knochenformung (growth & modeling) gestört, so ist es im ausgewachsenen Knochen der Umbau (remodeling), in den eingegriffen wird, wobei die Population der Knorpelzellen vernachlässigbar wird (Fro83).

Durch die wesentlich höhere Proliferationsaktivität der Zellen und einen wesentlich höheren Zellgehalt des Gewebes ist im wachsenden Knochen mit sich stärker ausdrückenden Frühschäden zu rechnen. Zu bedenken ist jedoch, daß bei inkorporierten Nukliden eine höhere Knochenumbaurate die Zeit, in der Zellen exponiert sind (population at risk), verkürzt und somit der wachsende Knochen möglicherweise geringer belastet ist, als der nichtwachsende, dies vor allem im Hinblick auf die Tumorzinzidenz (Jee72).

Nach diesen allgemeinen Erläuterungen soll nun auf das spezielle Problem der inkorporierten und sich im Knochen ablagernden Radionuklide eingegangen werden. Neben Art und Energie der Strahlung, diese Faktoren bestimmen die Reichweite und Energiedeposition der Teilchen oder Quanten im Gewebe, ist vor allem der Verteilungsmodus der Nuklide in der

Knochensubstanz, insbesondere bei Strahlern kurzer Reichweite von Bedeutung. Hierbei unterscheidet man grob zwischen zwei Ablagerungsverhalten:

Volumensuchende Elemente wie zum Beispiel Nuklide des Alphastrahlers Radium oder des Betastrahlers Strontium verteilen sich relativ gleichmäßig im mineralisierten Anteil der Knochensubstanz, während sich oberflächensuchende Nuklide, zum Beispiel viele Elemente der Aktinidenreihe, hauptsächlich an innere oder äußere Knochenoberflächen anlagern.

Die volumensuchenden Radionuklide sind durch ein ähnliches chemisches Verhalten wie Kalzium gekennzeichnet, zu dessen Substitution im mineralisierten Anteil der Knochensubstanz sie befähigt sind, während sich die Aktiniden mit Glykoproteiden der organischen Matrix, die nur an der Knochenoberfläche zu Tage treten, assoziieren (Vau73a).

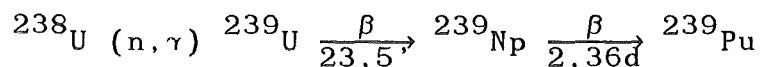
Die weiteren Ausführungen sollen sich nun mit dem Verhalten und den Auswirkungen von Plutonium im Organismus befassen.

1.1 Plutonium, Herkunft und Verwendung

Plutonium besitzt die Ordnungszahl 94 im Periodensystem der Elemente. Es ist ein künstliches Element und gehört zu den Transuranen in der Aktinidenreihe, die in den 40er Jahren dieses Jahrhunderts bei kernphysikalischen Experimenten im Labor entdeckt wurden. Seine wichtigsten Isotope ^{239}Pu und ^{238}Pu sind Alphastrahler mit Halbwertszeiten von $2,4 \times 10^4$ bzw. 86,4 Jahren (See81). Aufgrund dieser, in erdgeschichtlichen Maßstäben kurzen Halbwertszeiten, gab es vor seiner künstlichen Erzeugung kein Plutonium auf der mit Leben erfüllten Erde.

^{238}Pu Plutonium kommt in langlebigen Batterien zum Einsatz (Sta73). ^{239}Pu Plutonium ist neben ^{235}U Uran ein spaltbares Nuklid, welches bei der Gewinnung von Kernenergie oder als Bestandteil von Kernwaffen Bedeutung hat. Es wird in Kernkraftwerken als Nebenprodukt der Energiegewinnung auf

folgendem Weg gebildet:



Weltweit werden auf diese Weise jährlich etwa 25 Tonnen Plutonium erzeugt (Hen82).

Der technische Umgang mit diesem Element, sei es bei der Lagerung radioaktiver Abfälle aus Kernkraftwerken oder bei der Wiederaufbereitung abgebrannten Kernbrennstoffes, wird bis auf Weiteres unerlässlich sein.

1.2 Abriß des biologischen Verhaltens von Plutonium in Mensch und Säugetier (Übersicht bei Bai74 und ICRP48)

Neben seiner chemischen Toxizität als Schwermetall, geht von Plutonium die weitaus größere Gefahr der radioaktiven Strahlung aus. Da es sich um einen reinen Alphastrahler handelt, entfaltet das Nuklid auch hierbei, wegen der geringen Reichweite der Alphateilchen erst bei Aufnahme in den Körper seine schädlichen Wirkungen.

Die Inkorporation von Plutonium ist in der Regel über drei Wege möglich: Ingestion, Inhalation und direkte Inkorporation, zum Beispiel durch kontaminierte Wunden.

Die gastro-intestinale Absorption von Plutonium ist gering (ICRP48, Su185).

Nach Inhalation hauptsächlich plutoniumhaltiger Stäube, kann es, je nach Löslichkeitsverhalten der Verbindung, zu Translokationen aus der Lunge in andere Körperkompartimente kommen (Mül85).

Die größte Gefährdung für den Gesamtorganismus geht jedoch von der direkten Inkorporation über Verletzungen aus (Vau73), wobei die Verbreitung des Nuklides vom Ort seiner ersten Ablagerung hinein in den Körper zusätzlich stark von seiner physikalisch-chemischen Beschaffenheit und teilweise auch vom Alter des kontaminierten Organismus abhängt (Tay73, Sik76).

Die Zielorgane von Plutonium sind Leber und Skelett. Im Falle gut löslicher Verbindungen lagert sich der größte Teil der inkorporierten Aktivität im Knochen ab; bilden sich polymere, kolloidale Komplexe, so ist die Leber der Ort der größten Akkumulation (Vau73, Mah74, Son83).

Nach der initialen Deposition in diesen Organen kommt es im zeitlichen Verlauf zur Umverteilung und Ausscheidung des Nuklids in Urin und Faeces, wobei ein beträchtlicher Teil des im Skelett befindlichen Plutoniums mit langer biologischer Halbwertszeit im Knochen verweilt (Tay83, Son84).

1.3 Plutonium und Knochen

1.3.1 Verteilung im Skelett

Plutonium lagert sich im Skelett in verschiedenen Knochen zu unterschiedlichen Anteilen ab (Cra76). Knochen mit aktivem Stoffwechsel sind mit mehr Radioaktivität belastet als solche mit geringerer Umsatzrate (Wro80, Pol84). So finden sich auch bei wachsenden Organismen im allgemeinen höhere Retentionen im Skelett als bei erwachsenen, und hierbei sind vor allem Wachstumszonen die Orte größter Ablagerung (Lit. bei Bru84). Die Mikroverteilung des Nuklides erfolgt initial ungleichmäßig auf den Knochenoberflächen mit deutlicher Bevorzugung ihrer endostalen Anteile (Vau73a). Nach dieser ersten Ablagerung erfolgt, abhängig vom Stoffwechsel des Knochens, eine Umverteilung. Diese wird hauptsächlich durch Prozesse der Knochenapposition und -resorption bewerkstelligt (Jee72, Pri83).

Ein solches Verhalten des Strahlers führt zu großen Schwierigkeiten bei der Abschätzung der Strahlenbelastung einzelner Knochen, von Knochenteilen oder gar der Mikrodosisverteilung in der Knochenzellpopulation (Pol81, Pol84a). Gerade letzteres spielt aber eine wichtige Rolle in der Pathogenese früher oder protrahierter Strahlenschäden des Skeletts.

1.3.2. Histologie des Strahlenschadens im Knochen in Abhängigkeit zur inkorporierten Aktivitätsmenge

Im Folgenden möchte ich einen Überblick zum bisherigen Kenntnisstand des frühen Strahlenschadens in Abhängigkeit von der inkorporierten Menge verschiedener Aktiniden geben:

Heller (Hel48) beschreibt schon sehr früh den Strahlenschaden des Knochens sowohl nach externer Bestrahlung als auch nach Inkorporation von Radionukliden.

²³⁹Plutonium wird wachsenden männlichen Spraque-Dawley Ratten unbekanntes Alters in folgenden Aktivitäten i.v. gespritzt (umgerechnet auf MBq/kgKG):

4,6; 3,7; 2,2; 1,1; 0,55 und 0,3MBq/kgKG
(125; 100; 60; 30; 15 und 8 μ Ci/kgKG)

Da die obigen Dosen fast immer nur einem Tier verabreicht wurden, sind die abgeleiteten Daten heterogen und statistisch nur ungenügend gesichert. Trotzdem lassen sich folgende Aussagen mit Sicherheit treffen:

Bei Inkorporation einer Aktivität von über 1,1MBq/kgKG (30 μ Ci/kgKG) wird der Knochen sehr stark geschädigt und zeigt wenig Tendenz, diese Schäden wieder zu beheben. Bei Inkorporation von Aktivitäten unter 1,1MBq/kgKG (30 μ Ci/kgKG), also 555kBq/kg und 296kBq/kg, sind die Veränderungen etwas geringer, aber immer noch deutlich histologisch nachweisbar, und der Knochen sucht den eingetretenen Schaden zu reparieren.

Der Ablauf der Ereignisse bei Verabreichung von 1,1MBq/kgKG (30 μ Ci/kgKG) stellt sich wie folgt dar:

Bis zum 16.Tag p.incorp. kommt es zum Sistieren des Längenwachstums. Die Zellpopulation der Osteoblasten wird in der Metaphyse stark beeinträchtigt. Es kommt zur Kontinuitätsunterbrechung zwischen Fugenknorpel und Knochen ("severance"). In der primären Spongiosa bilden die verbleibenden osteoblastischen Zellen atypischen Knochen, während in der sekundären Spongiosa keine Osteoblasten mehr gesehen werden und auch die Osteozyten abgetötet sind. In der primären Spongiosa kommt es zur Einsprossung transverser Gefäße.

Bis zum 64. Tag p. incorpor. wird das Längenwachstum wieder aufgenommen und die Metaphyse stellt sich im histologischen Bild in fünf Abschnitte gegliedert dar:

- 1 regenerierte Epiphysenfuge mit intakter Trabekulierung und zahlreichen Osteoblasten
- 2 Zone spongiösen Knochens mit aktivem Knochenmark
- 3 typischer oder atypischer Reparaturknochen ohne Knorpel, gelatinöses Knochenmark enthaltend
- 4 toter Knochen und verkalkter Knorpel, gelatinöses und fibröses Mark
- 5 aktives Knochenmark

Jee (Jee 62) beschreibt nach intravenöser Injektion von: 104; 33; 11; 3,3kBq/kgKg (2,8; 0,9; 0,3; 0,09 μ Ci/kgKG) ^{239}Pu den Gewebeschaden des Knochens bei zu verschiedenen Zeitpunkten gestorbenen Beagle-Hunden.

Während bei höheren Aktivitäten (104; 33kBq/kgKG) atypischer Knochen, peritrabekuläre Fibrose, bizarre Trabekelstruktur, Tod von Osteozyten und abnorme Resorption in den veränderten Bereichen zu beobachten ist, beschränken sich die histologischen Veränderungen bei der niedrigsten Dosis auf kaum erkennbare Abweichungen in der Osteozytenpopulation und der Resorptionsaktivität. Es wird auf die Beziehung dieser Schäden zur Entwicklung von Knochengeschwülsten eingegangen.

Clarke (Cla62) vergleicht die Strahlenschäden am Knochen verschieden alter Miniatur-Schweine nach Inkorporation von ^{90}Sr , ^{226}Ra bzw. ^{239}Pu . Plutonium erweist sich hierbei als den Knochen am meisten schädigendes Agens, gleich ob 6 Wochen, 6 Monate oder 1 Jahr alte Tiere behandelt werden.

Pro Altersgruppe werden 3 Tiere mit 48kBq/kgKG (1,3 μ Ci/kgKG) Plutonium intravenös gespritzt. Zu jeder der drei Altersgruppen gesellt sich ein inaktives Kontrolltier. 18 Monate nach Inkorporation werden die ersten Tiere untersucht. Für die histologischen Untersuchungen wird der proximale Teil einer siebten Rippe herangezogen.

Bei jungen Tieren kommt es zur Desorganisation der Knochenbildung durch Beeinflussung vorhandener Epiphysenfugen.

Nekrosen in den trabekulären und kompakten Knochenanteilen sind in allen Altersgruppen ausgeprägt. Es fällt jedoch auf, daß Plutonium vermehrt Fibrosen von Knochen, Knochenmark und Gefäßen hervorruft. Das Knochenmark wird im Vergleich zu den anderen Radionukliden durch Plutonium am heftigsten geschädigt.

Jee (Jee72) betont in seinem umfassenden Beitrag über Plutonium im Knochen, daß nichttumoröse Veränderungen bei inkorporierten Aktivitäten von 0,6kBq/kgKG (0,0157 μ Ci/kgKG) in Lendenwirbeln von Beagle-Hunden nur mit quantitativer Methodik zu erfassen sind. Sie äußern sich in einer gesteigerten Anzahl leerer Osteozyten-Lakunen und in einer Abnahme der Zahl kleiner Blutgefäße. Der Tod der Osteozyten kann, so schließt der Autor, direkt durch Strahlenwirkung oder aber durch eine Ischämie bestimmter Knochenbezirke bedingt sein. Die Tumorinzidenz beträgt bei dieser Aktivität 33%.

Pömsl (Pöm74) erfaßt die zeitliche Entwicklung der Knochenzellpopulation nach Inkorporation von ^{224}Ra und ^{227}Th in Tibia und Lendenwirbeln der Maus quantitativ. Osteoblasten und Mesenchymzellen (Osteoprogenitoren) erweisen sich als am stärksten strahlenempfindlich.

Nach 185kBq/kgKG (5 μ Ci/kgKG) ^{227}Th sind Osteoblasten und Mesenchymzellen nur geringfügig vermindert, jedoch in Lendenwirbeln stärker als in der Tibia. Auffällige histologische Veränderungen werden bei dieser Aktivität nicht gefunden.

Durch 1,85MBq/kgKG (50 μ Ci/kgKG) ^{227}Th werden die Zellen des osteogenen Gewebes fast vollständig abgetötet. In der folgenden Reparationsphase entstehen größere Bereiche atypischen Knochens in der Tibiametaphyse, die im weiteren Verlauf des Wachstums durch neugebildeten Knochen vom Epiphysenknorpel abgeschoben werden.

Die zahlenmäßige Veränderung von Osteoklasten, Endothelzellen und Osteozyten erweist sich bei allen Aktivitäten als nicht bedeutend.

Mahlum und Sikov (Mah74) untersuchen den Einfluß des Alters und der physikochemischen Form von ^{239}Pu auf das Skelett von Ratten. Es werden Neugeborenen (-24h), Ratten im Absatzalter (21d) und 4 Monate alten Ratten Aktivitäten von 222kBq bis 3,3MBq/kgKG (6-90 μCi) polymerer bzw. monomerer Plutoniumlösungen intravenös verabreicht.

Der Beobachtungszeitraum beträgt 9 Monate nach Inkorporation (1,7,30,90,279 Tage).

Veränderungen im makroskopischen Bereich, z.B. pathologische Frakturen und deren abnormale Heilung, werden vor allem bei Ratten beobachtet, die im Absatzalter gespritzt wurden. Auch histologisch erkennbare Alterationen (Exostosen, Nekrosen, Veränderungen des Epiphysenknorpels) treten bei dieser Altersgruppe am häufigsten auf. An zweiter Stelle stehen die erwachsenen Ratten, und am wenigsten sind die Neugeborenen betroffen.

Der Einfluß polymerer Lösungen auf den Knochen ist geringer als der monomerer Zubereitungen.

Morphologische Abweichungen:

Adulte Tiere:

Bei Dosen ab 1,1MBq/kgKG (30 $\mu\text{Ci}/\text{kgKG}$) und höher erscheinen schon nach 7 Tagen Veränderungen an Knochenmark, Knochen und Epiphysenknorpel, die bis zum 90. Tag p.incorp. zunehmen. Nach 9 Monaten sind Andeutungen einer Reparatur des Schadens am Knochenmark und Knochen zu erkennen.

Absatzalter:

Es wird nach einem Monat eine gesteigerte Brüchigkeit der Knochen deutlich. Abnormale Heilung und Kallusbildung wird beobachtet. Frühe Knochenveränderungen treten bei Dosen ab 1,1MBq/kgKG (30 $\mu\text{Ci}/\text{kgKG}$) schon nach 7 Tagen auf. Unter 1,1MBq/kgKG (30 $\mu\text{Ci}/\text{kgKG}$) sind am 30. Tag p.incorp. nur geringe Schäden zu erkennen. Dasselbe gilt für den Zeitpunkt von 90 Tagen p.incorp.. Nach 9 Monaten werden Nekrosen, Blutungen und fibroblastische Proliferationen in Teilen des Knochenmarks festgestellt.

Neugeborene:

In dieser Altersgruppe gibt es kaum histologisch sichtbare Schäden.

Polig (Pol76) führt eine quantitative Bestimmung der Trabekelstruktur nach Inkorporation von 1,1MBq/kgKG (30 μ Ci/kgKG) ²⁴¹Am bei 8 Wochen alten weiblichen Ratten durch. Zur Untersuchung wird der distale Teil des Femur herangezogen. Gleichzeitig wird der Effekt einer Dekorporationstherapie mitverfolgt.

Es zeigt sich, daß das Oberflächen/Volumen-Verhältnis (S/V-ratio) sich verkleinert und mit ihm die Komplexität der Trabekelstruktur abnimmt. Es werden Knochenüberbleibsel in die Metaphyse geschoben, die sich in Autoradiographien mit einem Band gesteigerter Aktivität zur Deckung bringen lassen. Der Autor schließt auf eine stark verringerte Knochenresorption in der Metaphyse.

Behandlung mit einem Chelatbildner vermindert die Veränderungen.

Moskalev et al. (Mos79) berichten vom biologischen Verhalten von ²³⁷Neptunium in wachsenden Ratten. In diesem Zusammenhang geht er auch auf verschiedene durch dieses Nuklid bewirkte Veränderungen an Knochen und Knochenmark ein.

Nach einer Einzeldosis von 185kBq/kgKG (5 μ Ci/kgKG) i.v. finden sich schon wenige Tage p.incorp. erste Schäden. Unterhalb der Knorpelfuge verschwinden die Osteoblasten. Es tritt eine wesentlich verstärkte Knochenresorption auf, die sich in der Verkalkung von Nierentubuli niederschlägt. Im Beobachtungszeitraum von 3 Tagen bis 12 Monaten kommt es zum Stillstand und zur Wiederaufnahme des Knochenan- und umbaus, wobei vorzugsweise resorptive Prozesse stattfinden. Die mikroskopische Knochenstruktur ist stark gestört. Es kommt zur falschen Orientierung von Trabekeln und zu mosaikartigem Aussehen der Knochensubstanz. Um die Knochenbälkchen ist das Knochenmark aplastisch und bindegewebig ersetzt.

Im Laufe des Wachstums bildet sich ein "Aktivitätsband" (waistband of activity), bestehend aus "totem Knochen" (Hel48). Nach Auffassung Moskalevs wird aber hier weiterhin versucht die Schäden reparativ anzugehen.

Im kompakten Knochen führt die verstärkte Resorptions-tätigkeit zu porotischen Erscheinungen und eröffnet die

Möglichkeit von Spontanfrakturen.

Am Ende des Beobachtungszeitraumes ist die enchondrale Ossifikation immer noch stark unterdrückt. Auch gibt es auffällige Veränderungen an Blutgefäßen bis hin zur Obliteration.

Das sehr frühe Auftreten von Knochenschäden bei dieser Dosierung führt Moskalev auf die chemische Toxizität von ^{237}Np zurück, das wegen seiner geringen spezifischen Aktivität in wägbaren Mengen appliziert werden muß.

Werden 185 bzw. 74kBq/kgKG (5 bzw. $2\mu\text{Ci/kgKG}$) Np-237 intratracheal verabreicht, kommt es erst später zum Auftreten oben aufgeführter Veränderungen, und die Schädigung nimmt einen milderen Verlauf. Eine atypische Knochenbildung überwiegt hierbei leicht die Resorption. Es treten osteoblastische Inseln auf, die nach Meinung des Autors als Präkanzerosen anzusehen sind.

Die bisher beschriebenen Veränderungen treten in verschiedenen Graden auch bei chronischer Gabe des Nuklides auf:

111 und 56kBq/kgKG (3.0 und $1.52\mu\text{Ci/kgKG}$) sowie 22 und 11kBq/kgKG (0.6 und $0.3\mu\text{Ci/kgKG}$) i.p. täglich führen trotz erheblicher Verkürzung der Lebenszeit zu entsprechenden Veränderungen.

5,6 und 0,2kBq/kgKG (0.15 und $0.006\mu\text{Ci/kgKG}$) täglich bedingen das Auftreten einer Vielzahl von Neubildungen vor allem aber von Osteosarkomen

Priest et al. (Pri83) beschreiben den Verteilungsmodus von ^{241}Am im Skelett der Ratte. Die angewandten, intravenös injizierten Aktivitäten betragen 1,9 und 10kBq/Ratte (0.05 und $0.27\mu\text{Ci/Ratte}$). Das entspricht, nimmt man als mittleres Gewicht einer 50 Tage alten Ratte 150g an, 12 bzw. 67kBq/kgKG (0.33 bzw. $1.8\mu\text{Ci/kg}$). Von Schädigungen des Knochengewebes wird nichts berichtet.

Obige Daten wurden in der Regel mit sehr hohen Aktivitätsdosen verschiedener Aktiniden bei verschiedenen Tierarten gewonnen. (Tab. 1), die krankhaften Veränderungen weisen aber

ein erstaunliches Maß an Ähnlichkeit auf, wobei die funktionellen Aspekte ihrer Entstehung kontrovers diskutiert werden.

Auf dieser Basis ist es nun Ziel dieser Arbeit im Bereich niedriger aber optimal kanzerogener Dosen:

- mit geeigneten histologischen Methoden frühe Knochenveränderungen nach Inkorporation von Plutonium nachzuweisen,
- den zeitlichen und räumlichen Ablauf der pathologischen Prozesse am Knochen zu beschreiben und wenn möglich
- die Bedeutung solcher frühen Veränderungen für die Pathogenese späterer Knochenkrebsentwicklung zu bewerten.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten von der Wiga Versuchstierzucht, Sulzfeld bezogen. Die Haltung erfolgte in Käfigen mit maximal 5 Tieren in einem zwangsbelüfteten Stall (Unterdruck um 40 mbar), bei einer Raumtemperatur von etwa 22°C und 50 bis 55% relativer Luftfeuchte. Von 7⁰⁰ bis 19⁰⁰ war, zusätzlich zum durch Fenster einfallenden Tageslicht, die aus Leuchtstoffröhren bestehende Raumbelichtung eingeschaltet. Die Futter- bzw. Trinkwasserversorgung bestand aus einer Standarddiät (Altromin^R), sowie Leitungswasser ad libitum. Die Tiere gelangten nach einwöchiger Gewöhnungszeit in den Versuch. Nach der Nuklidgabe wurden die Käfige mit Einmalinneneinsätzen und -fußrosten bestückt und die Tiere, in der Zeit der größten Ausscheidung, für etwa 4 Wochen, in zwei im Tierraum befindlichen Klimaschränken untergebracht, danach in im Raum installierten Käfiggestellen. Das Gewicht der Versuchstiere wurde in der Regel wöchentlich bestimmt und Gewichtskurven erstellt. (Weitere Einzelheiten siehe 2.8 Versuchsbeschreibungen)

2.2 Sektion und Entnahme von Gewebeproben

Zur Sektion wurden die Ratten mit Äther betäubt und durch Eröffnung von Bauchaorta und V. cava caud. entblutet. Das Blut wurde in heparinisierten Zentrifugenröhrchen aufgefangen und ungerinnbar gemacht. Aus den entbluteten Tieren wurden die Organe der Bauch- und Brusthöhle entfernt, danach wurde der Restkörper in zwei Ebenen geröntgt. Femora, Tibiae, Humeri und 3. bis 5. Lendenwirbel wurden herausgelöst und weitgehend von der anhaftenden Muskulatur gesäubert. Nach Messung verschiedener Längen- und Breitenparameter (Län87) wurden die Röhrenknochen der linken Körperhälfte und die Lendenwirbel 4 und 5 in neutralem, phosphatgepuffertem 8% Formalin fixiert. Die Zeit zwischen Tötung des Tieres und Fixation der Knochen

betrug höchstens 90 Minuten. Die Knochen der rechten Körperhälfte und der 3. Lendenwirbel wurden zur Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse (Län87) sowie zur Aktivitätsmessung herangezogen.

2.3 Bestimmung der Plutoniumaktivität im Skelett

Die Bestimmung der in den Knochen befindlichen Aktivität wurde mit dem Femur der rechten Seite sowie dem dritten Lendenwirbel durchgeführt. Der Femur wurde hierfür in Schaftmitte mit einer kleinen Metallsäge geteilt. Distaler Femur, proximaler Femur und Wirbel wurden jeweils separat in Kunststoff-Szintillationsfläschchen mit einer Mischung aus Perchlorsäure und Wasserstoffperoxid im Wärmeschrank bei 60°C aufgelöst. Nach Abkühlung wurden die Fläschchen mit Insta-Gel^R befüllt und in einem Packard Szintillationszähler gemessen (Sei72). Die Berechnung der Retentionsdaten erfolgte unter Berücksichtigung von Standards der Injektionslösung, so daß sich die relativen Aktivitätsmaße:

$$\% \text{ der injizierten Dosis} = \frac{\text{Aktivitätsmenge im Organ}}{\text{injiz. Gesamtaktivität}}$$

sowie

$$\text{Aktivitätskonzentration} = \frac{\% \text{ der injizierten Dosis}}{\text{Knochenfrischmasse}}$$

ableiten ließen.

Aus der Nuklidkonzentration wurde die Dosisleistung im Knochen zur Zeit der Sektion mit der Formel:

$$D' = 51,2 \times \bar{E} \times A_0 \quad (\text{cGy/d})$$

berechnet, wobei \bar{E} die mittlere Energie der Alphateilchen in MeV und A_0 die absolute Konzentration des Nuklides in $\mu\text{Ci/g}$ Knochenmasse ist (Hug74).

Die kumulative Strahlendosis über den Versuchszeitraum wurde als innerer Treppenkörper der Dosisleistungskurve geschätzt, wobei die Hälfte der Rechteckflächen, die sich als Differenz zum äußeren Treppenkörper ergaben, hinzuaddiert wurden.

$$\text{Kumulative Dosis} = \sum_1^n D'_n \times t_n + \sum_1^n \frac{(D'_{n-1} - D'_n) \times t_n}{2}$$

2.4 Untersuchung des Blutes

Der Zellgehalt der durch Heparin ungerinnbar gemachten Blutproben wurde unmittelbar nach der Entnahme mit einem Coulter Counter Modell FN bestimmt. Weiterhin wurde ein Blutausrich zur Erstellung eines Differentialblutbildes angefertigt. Schließlich wurde durch Zentrifugation über 10 Minuten bei 2000 U/min Plasma gewonnen, welches zur photometrischen Bestimmung des Gehaltes an alkalischer Phosphatase vorgesehen war. Diese wurde mit dem kinetischen Test "Monotest^R Alkalische Phosphatase" der Firma Boehringer Mannheim am Tag nach der Sektion durchgeführt, da die Aufbewahrung des gewonnenen Plasmas bei 4°C im Kühlschrank eine Abnahme der Enzymaktivität verhinderte.

2.5 Histologische Bearbeitung unentkalkter Knochen

Um die Möglichkeiten der lichtmikroskopischen Untersuchung, die in der Regel an entkalktem, paraffineingebettetem Knochengewebe durchgeführt wird, mit den Methoden der Vitalmarkierung des Knochens mit Fluorochromen, sowie dem autoradiographischen Nachweis der Nuklidverteilung in Einklang zu bringen, wurde beschlossen, den steinigen Weg der Bearbeitung unentkalkten, in Kunststoff eingebetteten Knochens zu beschreiten.

Es wurden zwei Methoden auf ihre Eignung für histologische Belange geprüft. Dies war einerseits die Einbettung in Spurr's Low Viscosity Epoxy Resin und andererseits die Einbettung in Methyl-Methacrylat.

2.5.1 Einbettung in Spurr's Low Viscosity Epoxy Resin (Resin)

Diese Art der Einbettung wurde am Institut von einer englischen Arbeitsgruppe übernommen und als Routinemethode eingeführt (Xip74, Wat81). Solchermaßen eingebettete Knochenproben werden mittels eines Rotations-Sägemikrotomes Leitz 1600 zu etwa 100 μm dicken Schnitten verarbeitet, welche zur Autoradiographie sowie zur Erfassung der Knochenstruktur dienen.

Der Einbettungsprozeß verläuft wie folgt:

- Fixierung der in der Schaftmitte quergeteilten langen Knochen bzw. der ungeteilten Lendenwirbel 4 und 5 in Schaffer'scher Lösung oder neutralem gepuffertem Formalin für 2-3 Tage.
- Danach Aufbewahrung in 50% Aceton bis zum Beginn der Einbettung.
- Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe und Infiltration im aufsteigenden Aceton-Resin-Gemisch bis 100% Resin.
- Evakuierung der Proben in der letzten Portion des Infiltrationsgemisches bei 15 Torr im Exsikkator.
- Ausbettung in Silikon-Kautschuk-Formen und Aushärtung über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank.

Die Zusammensetzung des Kunstharzes, sowie der zeitliche Ablauf von Entwässerung und Infiltration ist dem Methodischen Anhang zu entnehmen.

Zunächst wurde begonnen, mit auf diese Weise eingebetteten Knochenproben, histologische Schnitte anzufertigen. Es zeigte sich jedoch, daß durch die Einbettung eine mangelnde Gewebserhaltung im Bereich der Knochenoberflächen und des Knochenmarkes, sowie mangelnde Färbbarkeit der Präparate resultierte. Trotz verschiedener Modifikationen der Verarbeitung, zum Beispiel Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe oder unterschiedliche Medien zur Deplastifizierung, konnte keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden (Yen68, Ima68, Sno72, Hog82, Far84). Daraufhin wurde beschlossen, zum Zwecke histologischer Untersuchungen in weiteren Versuchen eine Einbettung in Methyl-Methacrylat einzuführen.

2.5.2 Einbettung in Methyl-Methacrylat (MMA)

Eine weithin angewandte Methode zur histologischen Untersuchung von Hartgeweben stellt die Einbettung in Methyl-Methacrylat dar. Zunächst eingeführt und intensiv erprobt zur Untersuchung von Beckenkammbiopsien (Bur66, Bur66a), wurde sie alsbald mit Modifikationen zur Histologie von Knochen und Knochenmark verschiedenster Spezies herangezogen (Lit. bei Sav83, Sche84, Hut84). Kummermehr (Kum73) beschreibt ausführlich die bis heute noch nicht vollständig ausgeräumten Probleme dieser Methodik. Für die Einbettung distaler Femora, proximaler Tibiae und ganzer Lendenwirbel von Ratten wurde folgender Ablauf ausgearbeitet:

- Nach Fixierung der Knochen in neutralem phosphatgepuffertem Formalin 8% (s.v.) folgte die Entwässerung in aufsteigender Methanolreihe bis 100% Methanol, sodann Wechsel in 100% Ethanol.
- Mehrmaliger Wechsel des absoluten Ethanol zur vollständigen Entwässerung, sowie Entfettung in Xylol.
- Infiltration in fünf Portionen MMA Einbettungsgemisch, wobei die beiden letzten Infiltrationschritte im Exsikkator bei einem Unterdruck von 15 Torr mit Sicapent^R als Trockenmittel durchgeführt wurden.
- Verschließen der Probengefäße mit Kunststoffdeckeln, Anstoßen der Polymerisation 50 Minuten bei 50^oC im Wasserbad, Auspolymerisation über Nacht bei 34^oC im Wasserbad.

In der Regel gelangten zwanzig Proben zur Einbettung. Schloß sich der Entwässerung nicht unmittelbar eine Einbettung an, so wurden die Proben in absolutem Ethanol aufbewahrt. Die Entwässerungs-, Entfettungs- und ersten drei Infiltrationsstufen wurden in Kunststoff-Szintillationsfläschchen mit Schraubverschluß durchgeführt. Die Imprägnation und Polymerisation der beiden Endportionen erfolgte in Glas-Medikamentenfläschchen mit Kunststoff-Schnappdeckel. Femur und Tibia wurden vor der Polymerisation mit ihren kaudalen

Flächen zum Fläschchenboden ausgerichtet. Die vierten und fünften Lendenwirbel wurden in eine Seitenlage gebracht.

Für zwanzig Proben setzte sich das MMA-Einbettungsgemisch wie folgt zusammen:

800 ml MMA (Merck 800590) entstabilisiert + 25,6 g Benzoylperoxid (Merck 801641) getrocknet + 200 ml Plastoid N (Röhm & Haas 7/1468).

Die Entstabilisierung des Methacrylats wurde durch einen Säulenlauf (Durchm. 45mm, Höhe 150mm) über basisches Aluminiumoxid (Alumina Woelm^R B, Akt. I) bewerkstelligt. Die Säulenfüllung wurde nach Durchlauf von 800 ml MMA erneuert. Der Weichmacher Plastoid N wurde erst nach Auflösung des über Nacht getrockneten Benzoylperoxid zugefügt.

Nachdem die Blöckchen sich verfestigt hatten, wurden sie durch Zerschlagen der Gläschen gewonnen. Der zeitliche Ablauf der Einbettung ist dem Methodischen Anhang zu entnehmen.

2.5.3 Vorbereitung und Schneiden der Kunststoffblöckchen

Die Rohbearbeitung der eingebetteten Knochen erfolgte zur Einstellung der gewünschten Schnittebene, cranio-caudal bei Femur und Tibia beziehungsweise lateral bei den Wirbeln, durch Anfeilen der Blöckchen. Mittels eines Leitz 1600 Innenloch-Sägemikrotoms wurden vom so vorbereiteten Material etwa 100 μm dicke Schnitte abgenommen, bis die Medianebene des Knochens erreicht war.

Zur weiteren Bearbeitung gelangten die gesägten Blöckchen, nach Aufkleben auf Kunststoff-Trägerklötzchen, in ein motorgetriebenes Jung Polycut Groß- und Hartschnittmikrotom. Dieses war mit Hartschnittmesserhalter und Hartschnittmessern (Facettenwinkel 40°) bestückt. Die Schnitte wurden unter Benetzung der Blöckchen und Messer mit 30% Ethanol bei einem Freiwinkel von 5° mit einer Schnittgeschwindigkeit von ca. 1mm/s abgenommen. Für die Histologie wurden in der Regel sechs aufeinanderfolgende 3 μm dicke Schnitte, für die Fluoreszenzmikroskopie zwei 5 μm dicke Schnitte gewonnen, welche

mit einer feinen Pinzette direkt auf gelatine-beschichtete Objektträger (s. Methodischer Anhang) transferiert und mit 96% Ethanol überschichtet wurden. Nach mehrminütigem Weichen und Streckung der Schnitte mit einem Marderhaarpinsel, wurden dieselben mit befeuchteten Zigarettenpapierchen bedeckt, welche mit einer Moosgummiwalze angepreßt wurden. Die Befestigung der Schnitte wurde durch Trocknung der zwischen Teflonscheiben gestapelten Objektträger unter Druck (Bleiklotz) bei 40°C im Wärmeschrank erreicht.

2.5.4 Färbung der histologischen Präparate

Die Präparate zur Fluoreszenzmikroskopie wurden ohne weitere Behandlung nach dem Trocknen mit Eukitt^R unter Deckgläser eingeschlossen.

Zur histologischen Färbung mußte der Kunststoff aus den dazu bestimmten Schnitten entfernt werden. Dies erfolgte durch zwei zwanzigminütige Aufenthalte in Benzol bei Zimmertemperatur, beziehungsweise durch Einstellen der Schnitte in Xylol bei 40°C im Brutschrank über Nacht. Nach ausgiebigem Spülen in zwei Portionen von absolutem Methanol, gelangten die Präparate über eine absteigende Methanolreihe in destilliertes Wasser.

Für histologische und zytologische Fragestellungen wurde je ein Schnitt nach Giemsa, beziehungsweise mit der Trichromfärbung nach Ladewig gefärbt. Des weiteren wurde die Eisenfärbung mit Berlinerblau, sowie zur Bewertung der Knochenstruktur eine Alizarinrotfärbung vorgenommen. Der Ablauf der angewandten Färbemethoden ist dem Methodischen Anhang zu entnehmen (Rom68, Scha84, Schu85).

2.6 Autoradiographie

Zur Darstellung der Nuklidverteilung im Knochen wurden zwei Wege beschritten. Einen Überblick über die Lokalisation der Radioaktivität in verschiedenen Knochenteilen ließ sich durch Autoradiographie mit Kunststoffdetektoren erzielen. Mit der stripping-film Technik, einer photoautoradiographischen Methode, konnten der Aktivitätsverteilung histologische Strukturen zugeordnet werden.

2.6.1 Autoradiographie mit Kunststoffolie

Das Prinzip dieser Art von Autoradiographie besteht in der Sichtbarmachung von Strukturveränderungen, die in bestimmten Materialien durch ionisierende Strahlung hervorgerufen werden. Makrofol-Kernspurdetektoren wurden mit der Oberfläche der mit dem Mikrotom geschnittenen Blöckchen in engen Kontakt gebracht und für 16 Stunden der aus dem Präparat dringenden Strahlung ausgesetzt. Mittels eines elektro-chemischen Ätzverfahrens (Urb84), konnten dann die Spuren der Radioaktivität als kleine Punkte auf der Folie sichtbar gemacht und anhand der mit Alizarinrot gefärbten Schnitte der Knochenstruktur zugeordnet werden.

2.6.2 Histoautoradiographie mit stripping-film

Hierbei handelt es sich um eine photochemische Reaktion sensibilisierten Halogensilbers mit ionisierender Strahlung. Die Sensibilisierung der Emulsion richtet sich nach der Art der Strahlen. Zur Autoradiographie von Alphastrahlern wird in der Regel AR10 stripping-film der Firma Kodak herangezogen. Ausgewählte Schnitte wurden entacryliert und mit AR10 stripping-film beschichtet. Nach einer Expositionszeit von 2 - 6 Wochen im Kühlschrank wurden die Autoradiographien nach Herstellerangaben entwickelt und mit Mayer's Hämalaun sowie teilweise mit alkoholischem Eosin gefärbt (Fis71).

2.7 Histomorphometrische Methoden

In die Histologie und Histopathologie des Knochengewebes fanden schon früh Methoden zur quantitativen Erfassung der Knochenstruktur und, durch Einführung geeigneter Vitalmarkierungen, auch zur Bestimmung des Knochenumsatzes Eingang (Lit. bei Rev83, Rec83, Jee84). Grundsätzlich gibt es drei Ansätze zur morphometrischen Bestimmung stereologischer Knochenparameter; dies sind:

1. Punkt und Schnittpunktzählverfahren mit Okulargittern (Sche69, Mer70)
2. semiautomatische Morphometrie mittels meist rechnergestützten Digitalisierereinrichtungen (Dun80, Man81, Mal82, Cle85) und
3. vollautomatische Verfahren zur Erfassung der Knochenstruktur (Pol81, Son80, Gre81).

In dieser Arbeit fand die semiautomatische Morphometrie, teilweise in Kombination mit der Verwendung von Okulargittern, Anwendung.

2.7.1 Apparative Ausstattung

Zentrales Gerät bei der halbautomatischen Morphometrie ist die Digitalisierereinrichtung. Mit ihrer Hilfe lassen sich Streckenlängen und Flächen jeder Gestalt durch Nachzeichnen oder Umfahren messen. Der bei uns angewandte Digitalisierer MOP digiplan 1 (Kontron, München) entstammt der ersten Generation dieser Geräte und besteht aus drei Teilen: dem Digitalisiertablett, dem Cursor oder Auswertstift und der Zentraleinheit, der die Steuerung vorgenannter Bestandteile obliegt. Er arbeitet nach dem Magnetostruktions-Prinzip. Ein im Digitalisiertablett befindliches Netzwerk aus vormagnetisierten Stahldrähten wird mit magnetostruktiven Impulsen durchsendet, die von einem Empfänger im Cursor oder Auswertstift aufgenommen werden. In der Steuereinheit werden dann über eine Kurzzeitmessung bei bekannter Laufgeschwindigkeit der Impulse die Koordinaten der abgefahrenen Meßpunkte fest-

gestellt (Auflösung 0,1mm) und weiter in Strecken und Flächenmaße umgerechnet (Kon79).

Um eine vielseitige Anwendung des Digitalisierers zu gewährleisten, wurde von uns ein Arbeitsplatz konzipiert, der verschiedene Möglichkeiten seines Einsatzes in sich vereint (Pol 85, Abb. 1). Die Anordnung erlaubt einerseits seine Benutzung an einem Orthoplan-Mikroskop (Leitz, Wetzlar) mit Zeicheneinrichtung, wobei ein Bild des Cursors mit Leuchtdiode auf dem Digitalisiertablett über das mikroskopische Bild projiziert wird. Andererseits kann mittels eines Projektionsmikroskopes über zwei Umlenkspiegel ein mikroskopisches Bild auf das mit weißem Papier belegte Tablett projiziert werden. Hierbei bedient man sich zur Auswertung verschiedener Strukturen am besten des Auswertstiftes. Die Auswertung von Zeichnungen und fotografischen Reproduktionen kann an diesem Arbeitsplatz ebenso unbehindert durchgeführt werden.

Zur weiteren Verarbeitung der von ihm gelieferten Datenfülle ist der Digitalisierer direkt an einen Dec PDP11/34 Mini-computer adaptiert. Insbesondere die Einführung von Maßstabfaktoren, sowie die Berechnung gewünschter Parameter lassen sich, neben der Datenerfassung, durch den Rechner mittels Fortran77 Programmen bewerkstelligen (Beispiel im Methodischen Anhang)

Detaillierte Ausführungen zu den morphometrisch bestimmten Größen geben die nächsten Abschnitte.

2.7.2 Messungen an Fluoreszenzpräparaten

Diese Messungen wurden mit einem Leitz Orthoplan-Mikroskop mit Ploemopak Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung, 100 Watt Gleichstrom Quecksilberhöchstdrucklampe und Zeicheneinrichtung durchgeführt. Die beste Fluoreszenzausbeute wurde mit den Leitz Fluoreszenzfilterblöckchen I2 und H2 erzielt. Bei Anwendung des Blöckchens I2 erhält man eine selektive Grünfluoreszenz des in die Knochensubstanz eingebauten Calcein, das Filterblöckchen H2 erzeugt zusätzlich eine leichte Nebenfluoreszenz des Knochenmarkes.

2.7.2.1 Messung der Wachstumsrate des distalen Femur

Die Bestimmung der Wachstumsrate an der Epiphysenfuge des distalen Femur wurde, wegen der besseren Fluoreszenzausbeute bei geringer Vergrößerung, an angeschnittenen Blöckchen durchgeführt. Als geeignet wurden die Objektive Pl2.5 und PlApo4 sowie die Okulare GW6.3x und GW10x eingesetzt. Der Maßstabfaktor für die Messung mit dem Digitalisierer wurde jeweils durch Eichung anhand eines Objektträgermikrometers ermittelt.

Durch die zweifache Fluoreszenzmarkierung der Tiere in zeitlich definiertem Abstand (s. Methodischer Anhang) entstanden unterhalb der Knorpelfuge zwei fluoreszierende Bänder (Abb. 2). In manchen Fällen waren diese Bänder zweigeteilt, so daß der Eindruck einer vierfachen Markierung entstand. Der Abstand der Bänder (im Falle einer Zweiteilung der fugennahen Teilbänder) wurde an mindestens zehn äquidistanten Punkten als kürzeste Strecke gemessen (Abb. 2). Mindestens zwei solche an verschiedenen Tagen durchgeführte Messungen eines Präparates wurden zu einem gemeinsamen Mittelwert zusammengefaßt und als geschätzte Wachstumsrate angenommen. Die Wachstumsrate in μm pro Tag wurde durch Anwendung der entsprechenden Maßstabfaktoren und Markierungsintervalle berechnet.

2.7.2.2 Bestimmung der Knochenmineralisationsrate

Wird an einem Knochenbälkchen kontinuierlich während des gesamten Markierungszeitraumes Knochensubstanz angebaut und mineralisiert, so entsteht an dieser Stelle bei jeder Gabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der sich bei der Mineralisation einlagert, eine Fluoreszenzlinie. In dieser Arbeit wurde die Methode der zweimaligen Farbstoffgabe in zeitlichem Abstand angewandt. Ist obige Bedingung erfüllt, ergibt sich eine Doppelmarkierung.

Der Abstand dieser beiden Linien entspricht somit der Mineralisationsrate und wurde mit dem Objektiv Fluoreszenz 10x Oel

und dem Okular GW10x an 5 μm dicken ungefärbten Schnitten ohne Oelimmersion in verschiedenen Knochenteilen ermittelt. An mehreren doppelt markierten Stellen wurde in äquidistanten Abständen jeweils die kürzeste Entfernung (Senkrechte zur Tangente der Oberfläche) der beiden Linien bestimmt, wobei pro Präparat mindestens 30 Meßwerte ermittelt wurden (Kra82, Kra85). Die Schätzung der Mineralisationsrate (MR) erfolgte in gleicher Weise wie die der Wachstumsrate des distalen Femur (s. 2.7.2.1). Die erhaltenen Werte in μm pro Tag wurden zur Bestimmung der Knochenbildungsrate (s. Abschn. 2.7.2.3) in mm pro Jahr umgerechnet (Faktor $(365/1000) \times 0,74$) (Kim82).

2.7.2.3 Knochenmorphometrie und Stoffwechselschätzung

Zur Charakterisierung bestimmter Veränderungen der Struktur und Zusammensetzung des Knochengewebes bediente man sich zunächst der statischen Morphometrie, d.h. der Beschreibung des Zustandes einer Knochenprobe zur Zeit ihrer Entnahme.

Drei durch Methoden der statischen Morphometrie beschreibbare Parameter fanden Eingang in diese Arbeit:

1. das Verhältnis der mit Knochen belegten Fläche zur gesamten ausgemessenen Fläche des Präparates, welches proportional dem Verhältnis des Knochengewebsvolumens zum gesamten Knochenvolumen ist und deshalb Volumendichte (V) genannt wird

$$V\% = \text{mit Knochen bedeckte Fläche} / \text{gesamte ausgemessene Fläche} \quad (\text{mm}^2 / \text{mm}^2 \text{ oder } \% = (\text{mm}^2 / \text{mm}^2) \times 100)$$

2. das Verhältnis des Umfanges der Knochenstruktur zu der ausgemessenen Gesamtfläche (innere Oberfläche)

$$O_i = \text{Umfang der Trabekel} / \text{ausgemessene Gesamtfläche} \quad (\text{mm} / \text{mm}^2)$$

3. das Verhältnis des Umfanges der Knochenstruktur zu ihrer Fläche, welches Veränderungen in der Geometrie der Trabekelstruktur anzeigt

$$O_{sp} = \text{Umfang der Trabekel} / \text{mit Knochen bedeckte Fläche} \quad (\text{mm} / \text{mm}^2).$$

Letzterer Parameter kann durch Multiplikation mit stereologischen Korrekturfaktoren in das Oberflächen-Volumen-Verhältnis (S/V ratio) umgerechnet werden. Diese Faktoren hängen von der Dicke der ausgewerteten Schnitte ab (Par83) und werden von verschiedenen Autoren unterschiedlich bewertet (Fro81). In der Regel wird eine Multiplikation mit $4/\pi$ vorgeschlagen. Aufgrund der anhaltenden Diskussion wird in dieser Arbeit von der Verwendung eines stereologischen Korrekturfaktors abgesehen.

Die Möglichkeit der Einführung eines Zeitfaktors durch die Fluoreszenzmarkierung des Knochengewebes führte zur dynamischen Histomorphometrie und Schätzung des Knochenstoffwechsels, insbesondere des Knochenanbaues. In dieser Arbeit wurden, neben der Messung des Umfangs und der Fläche der spongiösen Knochenstruktur, auch deren verschieden fluoreszenzmarkierte Anteile bestimmt (s.u.). Aus den Rohdaten der statischen und dynamischen Größen ließen sich dann unter Einbeziehung des Wertes der Mineralisationsrate folgende weiteren Parameter berechnen:

DO% = Anteil des doppelmarkierten Umfangs/Gesamtumfang
des Knochens

SI% = Anteil des einzelmarkierten Umfangs/Gesamtumfang
des Knochens

DI% = Anteil des unbestimmt markierten Umfangs/Gesamtumfang
des Knochens

KL% = Anteil markierter Resorptionslakunen/Gesamtumfang des
Knochens.

Die Knochenbildungsrate (KBR) nach Kimmel (Kim82) wurde als Schätzwert des Knochenstoffwechsels berechnet:

$$KBR = \left[\frac{DO\% \times DI\%}{DO\% + SI\%} + \frac{SI\% \times DI\%}{DO\% + SI\%} + DO\% + \frac{SI\%}{2} \right] \times MR \times O_{sp} .$$

Die Bestimmung der oben beschriebenen Parameter erfolgte in definierten Bereichen von Femurepiphyse und dritten oder vierten Lendenwirbelkörpern. Sie wurden an ungefärbten 5 μm dicken Mikrotomschnitten durchgeführt, wobei zur Untersuchung von Knochenfläche und -umfang im Durchlicht-Hellfeld gearbeitet wurde. Es wurde ein "Scanning"-Verfahren angewandt, bei dem mit Hilfe eines Kreuztisches und eines Leitz Universal-Zähllokulares (Best. Nr. 2519312) Reihen von Meßfeldern über die Knochenschnitte gelegt werden konnten. Die Fläche des Meßfeldes wurde mittels eines Objektträgermikrometers ermittelt und betrug bei der Verwendung des Objektivs Fluoreszenz10x Oel 0,165 mm^2 .

In der distalen Femurepiphyse wurden zwei Reihen solcher Meßfelder quer zur Längsachse des Knochens über den beiden höchsten Punkten der sinusförmigen, sich distal an die Knorpelfuge anschließenden Knochenplatte ausgewertet, wobei die die Epiphyse umschließende kompakte Knochenschicht nicht berücksichtigt, sondern nur der mit trabekulärem Knochen gefüllte Innenraum vermessen wurde (Abb. 3).

Der Wirbelkörper wurde anhand von zwei bzw. drei solcher Meßfeldreihen, parallel zum Wirbelkanal, von Metaphyse zu Metaphyse charakterisiert, wobei der kleine, knorpelfugennahe Bereich der primären Spongiosa aufgrund der komplexen Struktur seiner Markierung ausgeklammert wurde (Abb. 3).

Die mittlere ausgewertete Fläche pro Präparat betrug für die distale Femurepiphyse 3,94 mm^2 , für den Wirbelkörper des dritten Lendenwirbels mit zwei Meßfeldreihen 5,05 mm^2 und beim vierten Lendenwirbelkörper mit drei Meßfeldreihen 6,76 mm^2 .

Die bildanalytische Auswertung der einzelnen Meßfelder folgte einem durch das Rechnerprogramm bestimmten Duktus. In jedem Feld wurden, in der Reihenfolge ihrer Bestimmung, durch Nachzeichnen oder Umfahren der Knochenstruktur folgende Basisdaten erhoben:

- gesamter Umfang der Knochenstruktur im Feld
- Umfang mit Doppelmarkierung
- Umfang mit Einzelmarkierung
- Umfang mit unbestimmter Markierung
- Umfang mit markierten Resorptionslakunen
- Gesamtfläche des Knochenanteils im Meßfeld

Aus diesen grundsätzlichen Merkmalen berechnete das Programm, nach Beendigung der Messung, die vorne aufgeführten Parameter.

2.7.3 Messungen an Epiphysenfugen

Die Messungen an der Epiphysenknorpelfuge wurden in ähnlicher Weise wie die Schätzung der Wachstumsrate, durch Streckenmessung mit dem Digitalisierer bewerkstelligt. Eichung und Berechnung der Maßstabfaktoren für die entsprechenden Vergrößerungen wurden mit einem Objektträgermikrometer vorgenommen.

2.7.3.1 Bestimmung der Knorpelfugenbreite am distalen Femur

Das Längenwachstum des Femur geht bei der Ratte zum größten Teil aus der distalen Epiphysenfuge hervor. Weitere Knorpelfugen von geringerer Bedeutung befinden sich in Trochanter major und im Femurkopf. Struktur und Dicke der Fugen sind maßgebend für ihre Funktion beim Wachstum des Knochens. Einflüsse von in Meta- und Epiphyse abgelagerten Radionukliden können sich hierin bemerkbar machen. Messungen der Dicke der Knorpelfuge wurden an mit Giemsa-Lösung gefärbten Schnitten durchgeführt. Die Knorpelgrundsubstanz stellt sich mit dieser Färbung kontrastreich metachromatisch dunkel-violett dar.

Zunächst wurde mit einem Projektionsmikroskop gearbeitet, dessen Strahlengang über zwei Umlenkspiegel auf das Tablett des Digitalisierers gebracht wurde. Die notwendigerweise hohe Lichtleistung dieser Einrichtung zog die Präparate jedoch

stark in Mitleidenschaft. Deshalb wurde dazu übergegangen, die Untersuchungen am Orthoplan-Mikroskop mit Zeicheneinrichtung fortzusetzen. Eine geeignete Vergrößerung ergab die Kombination des Objektivs PlanApo4x mit dem Okular GW10x.

Es wurden über die gesamte Länge der Fuge etwa 25 Messungen durchgeführt, indem in äquidistanten Abständen die kürzesten Strecken von der Keimschicht der Fuge bishin zum Rand des Blasenknorpels ermittelt wurden (Abb. 2). Aus diesen Werten wurde ein arithmetischer Mittelwert gebildet, dessen Standardfehler in der Regel unter 5% lag. Aus mindestens zwei solcher, an verschiedenen Tagen bestimmter Mittelwerte, wurde wiederum ein gemeinsamer Mittelwert als Schätzwert der Fugendicke gebildet, dessen mittlere Standardabweichung nur um 3% betrug.

2.7.3.2 Messung der Höhe von Blasenknorpelzellen

Als weiterer Parameter der enchondralen Knochenbildung wurde die Höhe von 25 endständigen intakten Zellen des hypertrophischen Blasenknorpels gemessen (Uen85). Hierbei kam das Objektiv PlanApo40x mit dem Okular GW10x zum Einsatz. Die Knorpelzellproduktionsrate konnte mittels der fluoreszenzmikroskopisch bestimmten Wachstumsrate berechnet werden:

Knorpelzellproduktionsrate = Wachstumsrate/Knorpelzellhöhe

2.7.4 Messungen des Abstandes des Aktivitäts- sowie des Knochenquerbandes in der Metaphyse des distalen Femur

Die Bestimmung der Abstände von Aktivitäts- und Knochenquerband von der Epiphyse wurden an exponierten Autoradiographiefolien und an mit Alizarinrot gefärbten Knochenschnitten, mit dem Objektiv Plan1x und dem Okular GW6,5x durchgeführt. Die Methodik folgte den Prinzipien, die schon für die Knorpelfugenbreite- bzw. die Längenwachstumsmessungen beschrieben wurden. Es wurde der Abstand der distalen Begrenzung des

heißen Bandes zur deutlichen Markierungslinie in der Epiphyse und der unteren Begrenzung des Knochenbandes zum Grenzbereich Knorpelfuge-Epiphysenplatte bestimmt.

2.7.5 Zellzählung in der Metaphyse des distalen Femur

Effekte ionisierender Strahlung variieren von Gewebe zu Gewebe und von Zellart zu Zellart. Deshalb können Veränderungen der Zahl verschiedener Zellarten innerhalb eines Gewebes Aufschluß über die Strahlensensibilität dieser Zellarten und über die Reaktionslage des Gewebes geben (Pöm74, Kim80).

In der schaftwärtigen Metaphyse des distalen Femur wurde eine Reihe von Meßfeldern quer zur Längsachse des Knochens nach verschiedenen Knochenzellarten ausgewertet (Abb. 4). Die Entfernung der Meßfeldreihe zur tiefsten Stelle der Epiphysenfuge betrug 1.56 mm und wurde mit Hilfe des Meßokulars eingestellt. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit dem Objektiv PlanApo25x und dem Okular GW10x. Folgende Zellarten wurden in nach Giemsa gefärbten Schnitten differenziert und gezählt:

Osteozyten sind in mineralisierte Knochensubstanz oder Osteoid eingebettete Zellen. Ihr histologisches Aussehen ändert sich vom jugendlichen osteoblastenähnlichen Osteozyten mit großem aufgelockertem Kern, viel Zytoplasma und noch deutlichem Golgiapparat hin zur älteren Zelle mit dichter Kernstruktur und schmalem Zytoplasmasaum, von dem Fortsätze in die Knochenkanälchen (Canaliculi) ausstrahlen.

Osteoblasten sind an der Knochenoberfläche liegende Zellen mit ovalem hellem Kern, der häufig ein deutliches Kernkörperchen enthält, und einem großen violettem Zytoplasmaleib mit gut sichtbarem aufgehelltem Golgikomplex. Bei nachlassender Syntheseleistung verlieren sie ihre kubische Form und liegen nur noch flach auf der Knochenoberfläche. In der Regel bilden sie in wachsenden Knochenbereichen epithelähnliche Verbände.

Osteoklasten sind Riesenzellen mit in der Regel mehreren, teilweise gelappten Kernen und hellem, häufig vakuolisiertem

Zytoplasma. Sie liegen in Resorptionslakunen an der Knochenoberfläche. Auch wenn nur ein Kern im Schnitt sichtbar wird, ist durch Größe und Lage der Zelle für den geübten Betrachter eine Differenzierung möglich.

Mesenchymzellen sind Vorläufer der osteoblastischen Linie (osteoprogenitor cells, Vau81), deren Gestalt, ein dominierender längsovaler Kern in einem schmalen, oft spindelförmigen Zytoplasmasaum, sehr der von Endothel- oder Stromazellen ähnelt, welche als ihre Vorfahren angesehen werden. Sie sind in der primären Spongiosa häufig zwischen einsprossenden Kapillaren und mit Osteoblasten bedeckten Trabekeln angeordnet. Im älteren Knochen finden sie sich im Anschluß an die direkt der Oberfläche aufliegenden Knochenzellen oder in unmittelbarer Nähe der Knochenoberfläche selbst (lining cells).

Die Zählung dieser Zellart rechnet auch Kapillarendothelien, die in engem Kontakt zum Knochen lagen, mit hinzu.

Bei der Auswertung der Knochenzellpopulation war weiterhin zu berücksichtigen, daß nicht die gesamte Knochenoberfläche mit sichtbaren Knochenzellen bedeckt ist. Insbesondere bei älteren Tieren scheinen häufig auch Zellen des Knochenmarkes an die Knochenoberfläche zu grenzen.

2.8 Versuchsbeschreibungen

2.8.1 Radionuklide und Fluoreszenzfarbstoffe

Das eingesetzte Nuklid ^{239}Pu wurde von der Firma Amersham, Großbritannien als Nitrat bezogen. Die Herstellung der Stamm- und Injektionslösungen führte Herr Prof. V. Volf durch. Die Tiere erhielten ^{239}Pu Plutonium-Zitrat in einprozentiger Natriumzitratlösung intramuskulär appliziert. Die Injektionen wurden den Ratten unter Äthernarkose in die Oberschenkelmuskulatur verabreicht. Die Menge des Injektums variierte zwischen 0,1 und 0,22 ml. Die Zitratlösung des Nuklids wurde am Tag vor dem Injektionstermin hergestellt und kurz vor der Verabreichung durch einen Millipore Filter mit der Porengröße

0,025 μm filtriert, um kolloidale Nuklidaggregationen in der Lösung auszuschließen.

Zur Vitalmarkierung des Knochens wurde Calcein (Fluka, Best. Nr. 21030) in der Dosierung von 25 mg pro kg Körpergewicht (KG) angewandt. Die Herstellung der subkutan unter die Rückenhaut verabreichten 1,5 und 3 prozentigen Injektionslösungen für die jugendlichen bzw. jung-erwachsenen Tiere, sowie die zeitliche Abfolge der Markierung sind dem Methodischen Anhang zu entnehmen (Son80, Rah80, Jee85). In den Versuchen mit jung-erwachsenen Ratten wurde teilweise eine Behandlung mit Oxytetracyclin (Terramycin^R, Pfizer) durchgeführt um eine mehrfarbige Markierung zu erhalten. Dazu wurden 30 mg/kgKG des Präparates subkutan gespritzt.

2.8.2 Versuche mit jugendlichen Ratten

Sechzig junge Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 117 Gramm wurden in vier Gruppen verteilt. Zwanzig Tiere erhielten eine Aktivität von 111kBq ($3\mu\text{Ci}$)/kgKG ^{239}Pu -Zitrat verabreicht. Sechzehn Tieren wurde in wöchentlichen Abständen dreimal 37kBq ($1\mu\text{Ci}$)/kgKG des Nuklides injiziert. Davon wurden vier Tiere ab der vierten Woche nach Beginn der Injektionen mit 10^{-3} molarer Zn-DTPA Lösung als Trinkwasserersatz behandelt. Die restlichen Tiere wurden als unbehandelte inaktive Kontrollen gehalten.

Sektionen der 1 x 111kBq Gruppe und der inaktiven Kontrolltiere wurden 1, 2, 4, 8 und 16 Wochen nach der Injektion durchgeführt. Aus der dreimal mit 37kBq behandelten Gruppe ohne Dekorporationstherapie wurden Tiere 4, 8, und 16 Wochen nach der ersten Injektion getötet. Die Ratten der Therapiegruppe wurden sechzehn Wochen nach der ersten Injektion sezziert (s. Schaubilder Abb. 4a).

Allen Tieren wurde zweimal im zeitlichen Abstand kurz vor der Sektion 25mg/kgKG einer 1,5 prozentigen Calceinlösung subkutan verabreicht. Die Zeitpunkte der Markierung sind aus dem Methodischen Anhang zu entnehmen.

2.8.3 Versuche mit jung-erwachsenen Ratten

Sechzig jung-erwachsene Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 330 Gramm wurden in fünf Gruppen verteilt. Sechzehn dieser Tiere erhielten eine einmalige Injektion von 111kBq (3 μ Ci)/kgKG ²³⁹Pu-zitrat.

Sechzehn Tieren wurde in wöchentlichem Abstand dreimal 37kBq (1 μ Ci)/kgKG des Nuklids verabreicht. Vier dieser Tiere wurden als separate Gruppe einer Dekorporationstherapie mit 10⁻³ molarer Lösung von Zn-DTPA als Trinkwasserersatz unterzogen. Zwölf Tiere wurden mit einer Einzelgabe von 222kBq (6 μ Ci)/kgKG behandelt und die restlichen Tiere dienten als inaktive Kontrollen (Kontrolle 1). Zwei, vier, acht und sechzehn Wochen nach Radionuklidgabe wurden Tiergruppen seziiert (s. Schema Abb. 4a).

In diesem Versuch wurde zur Vitalmarkierung des Knochens zunächst 25 mg/kgKG Calcein in 3 prozentiger Lösung und als zweiter Marker, mit Ausnahme des letzten Zeitpunkts, kurz vor der Sektion Terramycin^R 30 mg/kgKG verabfolgt (Methodischer Anhang).

Vierundzwanzig weitere jung-erwachsene Ratten wurden in zwei Gruppen verteilt, wovon zwölf Tiere eine einmalige intramuskuläre Gabe von 37kBq (1 μ Ci)/kgKg ²³⁹Plutonium-Zitrat erhielten und zwölf Tiere als inaktive Kontrollen unbehandelt blieben (Kontrolle2). Sektionen erfolgten hierbei 2, 4 und 8 Wochen post injectionem.

Auch diese Tiere wurden einer zweimaligen Fluoreszenzmarkierung aber ausschließlich mit 25 mg/kgKG Calcein in drei-prozentiger Lösung unterzogen (Methodischer Anhang).

2.9 Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Als grundsätzliches statistisches Verfahren wurde die Berechnung arithmetischer Mittelwerte und deren Standardabweichung

(SD) bzw. Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angewandt. Zur Prüfung statistischer Unterschiede wurde der zweiseitige t-Test herangezogen (Sac68). Die Berechnung linearer Regressionen erfolgte mit einem dafür vorhandenen Computerprogramm.

In graphischen Darstellungen wurde aus Gründen der besseren Übersicht in der Regel auf die Einbringung von Fehlerbalken verzichtet, da die entsprechenden Daten aus zugehörigen Tabellen entnommen werden können.

Die Abbildungen der Knochenstruktur und der makroskopischen Autoradiographie wurden durch direkte photographische Vergrößerung von mit Alizarinrot gefärbten Schnitten bzw. der Autoradiographiefolien erzeugt. Es werden stets, auch bei den histologischen Aufnahmen, die Endvergrößerungen angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Nuklidverteilung

Skelett und Leber sind die beiden Zielorgane von ^{239}Pu -Plutonium, so daß hinsichtlich der Nuklidverteilung diesen beiden Organen die Hauptaufmerksamkeit geschenkt wurde. Dabei dienten die Leberretentionswerte vor allem dazu, Aussagen über die Löslichkeit des Nuklides beziehungsweise die Stabilität der Lösung zu machen, während das eigentliche Interesse der Verteilung im Knochen galt.

3.1.1 Retention in Leber und Nieren

Die Nuklidgehalte von Leber und Nieren sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Aktivität in der Leber nahm in allen Versuchen rasch ab, so daß sich nach 112 Tagen nur noch weniger als 2% der injizierten Dosis in ihr befanden. Die Nieren enthielten über den Versuchszeitraum zwischen 0,5 und 0,3% der gespritzten Nuklidmenge.

Diese Werte verdeutlichen die optimale Löslichkeit des Plutonium-Zitrat-Komplexes aus dem intramuskulären Depot, sowie seine gute Stabilität im physiologischen Milieu ohne Neigung zur Kolloidbildung.

3.1.2 Nuklidretention und Strahlenbelastung von Femur und drittem Lendenwirbelkörper

3.1.2.1 Nuklidretention

Im rechten Femur bzw. dritten Lendenwirbel (3.LW) fanden sich im zeitlichen Verlauf 3,5 bis 2,1 bzw. 1,3 bis 0,6 Prozent der injizierten ^{239}Pu -Dosis (Abb. 5 und Tab. 3). Im Femur waren zwei Drittel der Aktivität in seiner distalen Hälfte lokalisiert. Bei den jung-erwachsenen Tieren war die Retention aller Dosisgruppen in beiden Knochen über den gesamten

Versuchszeitraum im Mittel um 20% höher als bei den jungen Tieren. Eine Ausnahme bildeten die 3 x 37kBq Dosisgruppen am 28. Tag nach der Inkorporation, hier entsprachen sich die Retentionswerte.

Es ergaben sich zwischen den beiden Versuchen mit älteren Tieren keine Retentionsunterschiede in den einzelnen Dosisgruppen. Im Vergleich der mit 3 x 37kBq/kg gegen die mit einer Einzeldosis behandelten Tiere der gleichen Altersstufe war die Retention in den Wirbeln der mehrfach injizierten Tiere bei den jugendlichen initial, bei den älteren über den Versuchszeitraum hinweg höher (Tab. 2).

Durch eine zwei Wochen nach der letzten Injektion begonnene Dekorporationstherapie mit oraler Gabe von Zn-DTPA Lösung konnte bei den mit 3 x 37kBq belasteten jungen Tieren eine Verringerung der Retention im Femur auf 71,3%, im 3.LW sogar auf 61,8% der nichtbehandelten Gruppen erreicht werden. Die Abnahme des Nuklidgehaltes im Femur einer in Dosis und Therapie vergleichbaren Gruppe jung-erwachsener Tiere auf 78,8% der zugehörigen unbehandelten Ratten war noch vergleichbar mit der von jugendlichen Tieren. Im 3.LW sank die Retention jedoch nur auf 92,3% (Tab. 7).

3.1.2.2 Nuklidkonzentration

Die Nuklidkonzentration geht als maßgeblicher Faktor bei der Berechnung der Strahlenbelastung ein (s. Abschn. 3.1.2.3). Trotz der höheren Retentionswerte der jung-erwachsenen Ratten war die Konzentration des ²³⁹Plutonium im Femur der jüngeren Tiere zu den frühen Sektionszeitpunkten wesentlich höher, glich sich aber im zeitlichen Verlauf durch eine schnellere Abnahme derjenigen der älteren Tiere an (Abb. 5).

In den dritten Lendenwirbeln divergierten die initial ähnlichen Werte der Nuklidkonzentration gegen Ende des Versuchszeitraums stark (Abb. 5).

Die beiden Versuche mit jung-erwachsenen Tieren waren hinsichtlich der Konzentration des Strahlers in beiden vorgeannten Knochen identisch (Tab. 4).

Die Wirkung der Dekorporationstherapie mit Zn-DTPA läßt sich Tabelle 7 entnehmen. Bei den jungen Tieren nahm die Konzentration im Vergleich zur Retention etwas weniger, bei den älteren Tieren etwas stärker ab.

Oben beschriebenes Verhalten dieses Parameters ist eng mit der Gewichtsentwicklung der unterschiedlichen Knochen verknüpft (Län87).

3.1.2.3 Strahlenbelastung von Femur und drittem Lendenwirbel

Die Werte der Dosisleistung in den verschiedenen Knochen und Dosisgruppen, zu den einzelnen Sektionszeitpunkten lassen sich Tabelle 5 entnehmen. Trotz der Verabreichung gleicher Aktivitätsdosen pro kg Körpergewicht war die Dosisleistung bei den mit $1 \times 111\text{kBq/kg}$ behandelten älteren Tieren im Mittel um das 2,5 bis 3fache (Femur bzw. Wirbel) höher als bei den vergleichbaren Gruppen der jüngeren, während die Dosisleistungskurve der mit $1 \times 37\text{kBq/kg}$ behandelten jugendlichen Tiere derjenigen der $1 \times 111\text{kBq/kg}$ Gruppe jugendlicher nahekam (Abb. 6). Ähnliches gilt für die mehrfach injizierten Tiergruppen. Aus diesem Grund war die kumulative Strahlendosis der mit gleicher Aktivität pro Körpergewicht behandelten älteren Tiere um ein Mehrfaches höher als bei den jungen, bzw. glichen sich die kumulativen Dosen der $1 \times 111\text{kBq}$ jugendlichen und der $1 \times 37\text{kBq}$ jugendlichen erwachsenen.

So betragen die kumulativen Strahlendosen im Femur am Ende des Versuchszeitraumes in der $1 \times 111\text{kBq}$ Gruppe der jungen Tiere bzw. der $1 \times 37\text{kBq}$ Gruppe der älteren Tiere um 3 Gy, in der $1 \times 111\text{kBq}$ Gruppe der älteren Tiere um 7 Gy sowie bei der $1 \times 222\text{kBq}$ Gruppe der älteren sogar um 15 Gy.

Die Unterschiede in der durchschnittlichen Strahlenbelastung von Femur und drittem Lendenwirbel waren gering (Tab. 6).

3.2 Körpergewichtsentwicklung

Obwohl im Versuch mit jungen Ratten die Zuordnung der Tiere zu den verschiedenen Experimentalgruppen durch zufällige Auswahl vorgenommen wurde, waren die Mittelwerte des Körpergewichtes verschiedener Gruppen zu Beginn des Versuches unterschiedlich. Das Ausgangsgewicht der mit $1 \times 111 \text{ kBq}$ ($3 \mu\text{Ci}$) /kgKg behandelten Tiere lag signifikant niedriger als bei den anderen Tiergruppen. Das mittlere Gewicht aller Tiere zu Beginn dieses Versuches war $117 \pm 7 \text{ g}$, wobei die oben genannte Gruppe nur $112 \pm 6 \text{ g}$ erreichte, während die Tiere der inaktiven Kontrollgruppe $119 \pm 7 \text{ g}$ wogen. Mit fortschreitender Gewichtszunahme vergrößerte sich die Standardabweichung auf bis zu 10% des mittleren Gewichtes, so daß die anfänglich statistische Signifikanz der Gewichtsunterschiede nicht mehr nachweisbar war.

In den Versuchen mit jung-erwachsenen Ratten beliefen sich die mittleren Ausgangsgewichte der Tiere auf $328 \pm 10 \text{ g}$ beziehungsweise $332 \pm 10 \text{ g}$ und die Unterschiede zwischen den einzelnen aktiven und inaktiven Experimentalgruppen waren gering.

Die jung-erwachsenen Tiere zeigten keine Beeinflussung ihrer Gewichtszunahme durch die Behandlung mit ^{239}Pu .

Im Versuch mit den jugendlichen Tieren waren die Mittelwerte des Körpergewichtes der mit $1 \times 111 \text{ kBq}$ ($3 \mu\text{Ci}$) /kg Kg behandelten Tiere immer geringer, diejenigen der mit $3 \times 37 \text{ kBq}$ ($1 \mu\text{Ci}$) /kg Kg behandelten Tiere immer höher als bei den inaktiven Kontrolltieren. Die übrigen Gruppen lagen um die Werte der Kontrollen.

Anhand der Gewichtskurven der Kontrolltiere aller drei Versuche, die eine erstaunliche Kongruenz aufwiesen, ließ sich der Altersunterschied der jungen zu den jung-erwachsenen Ratten auf etwa 4 Wochen schätzen. Bei Versuchsbeginn betrug das Alter der jungen Ratten nach Angaben des Zulieferers um fünf Wochen und somit das der älteren Tiere um neun Wochen (s. Abb. 7 ; Sektionsgewichte s. Tabellen 8 und 9).

3.3 Blutuntersuchung

Neben der allgemeinen Beobachtung der Tiere und der Körpergewichtsentwicklung wurden als weitere Parameter des klinischen Gesundheitszustandes die Zahl der roten und weißen Blutzellen sowie als Indikator des Knochenzustandes das Enzym Alkalische Phosphatase im Blutplasma bestimmt.

3.3.1 Zahl der Erythrozyten

Die Altersentwicklung der Erythrozytenzahl von Kontrolltieren aus verschiedenen Versuchen ist in Abb. 8 dargestellt. Die mittels automatischer Zählung gewonnenen Daten schwanken zwischen $5,3$ und $2,8 \times 10^6$ roten Blutzellen/ μl .

Bei den jugendlichen Tieren ließ sich 4 Wochen nach Inkorporation von ^{239}Pu ein leichtes Absinken der Erythrozytenzahl beobachten. Zu späteren Zeitpunkten glichen sich die Werte wieder denjenigen der Kontrolltiere an. Am letzten Sektionszeitpunkt war eine signifikante Erhöhung der Erythrozytenzahl der mit Zn-DTPA behandelten Tiere festzustellen (Tab. 8).

Bei den älteren Tieren fanden sich signifikante Verringerungen der Zahl der roten Blutzellen nach 2 Wochen in der mit $1 \times 111 \text{ kBq}$ ($3 \mu\text{Ci}$) und nach 4 Wochen in der mit $1 \times 222 \text{ kBq}$ ($6 \mu\text{Ci}$) behandelten Gruppe, die zu späteren Zeitpunkten wieder verschwunden waren. Diese Tendenz deutete sich auch bei den $1 \times 37 \text{ kBq}$ ($1 \mu\text{Ci}$) behandelten Tieren an. Korrespondierend zu den verminderten Erythrozytenzahlen war auch die Hämoglobinkonzentration der älteren Tiere mit Belastungen von 111 kBq/kg und mehr vermindert (Tab. 9).

3.3.2 Zahl der Leukozyten

Die zeitliche Variation der Leukozytenzahl bei den Kontrolltieren ist aus Abb. 8 ersichtlich. Im Alter von 9 Wochen fand sich ein ausgeprägtes Maximum der weißen Blutzellen, deren

Zahl dann wieder sukzessive abnahm.

Bei den jugendlichen Tieren war 2 und 4 Wochen nach Inkorporation eine deutliche Verminderung der Leukozyten feststellbar, die bei den mit $1 \times 111 \text{ kBq/kgKG}$ behandelten Tieren statistische Signifikanz aufwies (Tab. 8).

Bei den jung-erwachsenen Tieren waren die Werte der weißen Blutzellen selbst in den mit $1 \times 37 \text{ kBq}$ behandelten Gruppen nach 2, 4 und 8 Wochen gegenüber den Kontrolltieren stark vermindert. Nach 16 Wochen wies nur noch die mit $1 \times 222 \text{ kBq}$ belastete Gruppe einen deutlichen Unterschied auf. Die statistische Bewertung der Daten läßt sich aus Tabelle 9 entnehmen.

3.3.3 Alkalische Phosphatase

Neben ihrer Bedeutung bei Leberfunktionsstörungen, sind Änderungen des Blutplasmaspiegels des Enzymes Alkalische Phosphatase für Aussagen über Funktion und Aktivität von osteoplastischen Prozessen geeignet.

Die drastische altersabhängige Abnahme der Enzymaktivität bei den Kontrolltieren verschiedener Versuche von Werten über 600 U/l auf unter 130 U/l ist in Abb. 8 dargestellt.

Durch die Behandlung mit verschiedenen Mengen ^{239}Pu ergaben sich keine gravierenden Veränderungen der Aktivitätswerte. Bei den jugendlichen Tieren war die Enzymaktivität am Ende des Versuchszeitraumes in der $1 \times 111 \text{ kBq}$ Gruppe im Vergleich mit den inaktiven Kontrolltieren erhöht. Ein ähnlicher Trend ließ sich teilweise auch nach 8 beziehungsweise 16 Wochen Versuchsdauer bei den mit 111 oder mehr kBq/kgKG behandelten älteren Tieren feststellen. Durch die große Streuung der Individualwerte waren jedoch geringfügige Änderungen der Enzymaktivität durch statistische Methoden nicht zu verifizieren.

3.4 Histologie ausgewählter Knochenproben

Um eventuelle Gewebsschäden durch die Einwirkung der abgelagerten Aktivität festzustellen und mittels autoradiographischer Methoden die Grob- und Feinverteilung des Nuklides zu eruieren, wurden der distale Teil des Femur und der 4. und 5. Lendenwirbel histologisch weiterverarbeitet. Da vom rechten Femur und vom 3. Lendenwirbel die Retentionswerte bestimmt wurden, war somit die Möglichkeit gegeben histologische Veränderungen direkt mit der abgelagerten Aktivitätsmenge zu korrelieren.

3.4.1 Femur distalis

3.4.1.1 Makro- und Mikroverteilung von ^{239}Pu Plutonium

Die mittels Autoradiographie auf Kunststoffolie entschleierte Grobverteilung des Nuklides zeigte vor allem den immensen Einfluß des Längenwachstums auf den Wandel der Ablagerung im Knochen. Während die Nuklidverteilung in der Epiphyse sowohl der jugendlichen als auch der jung-erwachsenen Tiere makroskopisch keine Veränderung erfuhr, verdichtete sich in der initial homogen markierten Metaphyse bei den jugendlichen Tieren bereits zwei Wochen nach der Injektion, bei den älteren zwei Wochen später, ein Band erhöhter Aktivität über der relativ wenig belasteten Region neugebildeten metaphysären Knochens. Die Wachstumsfuge und somit die Epiphyse entfernte sich zunehmend von diesem "Heißen Band" (Abb. 9).

Bei den Gruppen mit mehrfacher Verabreichung des Nuklids war dieser Vorgang weniger ausgeprägt oder zeitlich verschoben. Hier fand sich vier Wochen nach Beginn der Behandlung beziehungsweise zwei Wochen nach der letzten Injektion noch eine homogene Verteilung in der Metaphyse. Bei den jugendlichen Tieren kam es zu keiner deutlichen Ausbildung eines Aktivitätsbandes. Im Gegensatz dazu fand sich ein solches nach acht bzw. sechzehn Wochen bei den jung-erwachsenen (Abb. 10).

Die Abstände des Bandes zur Epiphyse sind in Tabelle 10 auf-

gelistet. Bei den jugendlichen Tieren lag es am Ende des Versuchszeitraumes etwa 10,8 mm, bei den jung-erwachsenen nur 4,7 mm proximal der Epiphysenplatte. Bei den mehrfach behandelten Gruppen war diese Distanz immer geringer als bei mit vergleichbaren Einzeldosen behandelten Tieren, wobei in den jung-erwachsenen die verabreichte Aktivitätsmenge keinen deutlichen Einfluß auf den Abstand des "Heißen Bandes" ausübte.

Der Effekt der protrahierten Spättherapie mit 10^{-3} molarer Zn-DTPA Lösung als Trinkwasser auf die Nuklidverteilung war nur bei den jugendlichen Tieren deutlich sichtbar. Hier stellte man eine Verminderung der Aktivität in der Metaphyse fest, die auch bei den älteren Tieren angedeutet war. Weder die Verteilung in der Epiphyse, noch das heiße Band bei den jung-erwachsenen Ratten zeigten große Veränderungen durch die Dekorporation (Abb. 11).

Mikroautoradiographische Untersuchungen histologischer Schnitte mit der "stripping film" Methode ließen die Feinverteilung des Nuklides in Knochen und Knochenmark erkennen.

In der Epiphyse spiegelte sich das Bild des stetigen Knochenan- und -abbaus auch im Ablagerungsverhalten von ^{239}Pu wider. Stellen des Anbaus waren charakterisiert durch die fortschreitende Begrabung "Heißer Linien" in die Knochensubstanz, während in osteoklastischen Bereichen oder Stellen mit unbestimmten Funktionszustand das Nuklid eher an der Knochenoberfläche lag (Abb. 12). Die Geschwindigkeit, mit welcher an Stellen der Knochenbildung das Nuklid in der Knochensubstanz begraben wurde, war bei jugendlichen deutlich größer als bei jung-erwachsenen Ratten (Abb. 13).

Die Mikroverteilung in der Metaphyse war vom Längenwachstum des Knochens beherrscht. In der neugebildeten primären und später daraus entstehenden sekundären Spongiosa war insbesondere bei den jungen Tieren relativ wenig Aktivität auffindbar. Diese konzentrierte sich auf die bei der Injektion vorhandene und durch das Wachstum nach proximal gewanderte Knochensubstanz und deren Umgebung (s.u.), um dort als

"Heißes Band" zu persistieren. Die in der distalen Metaphyse vorzufindende große osteoklastische Aktivität ließ die Spuren des Nuklides hauptsächlich an der Knochenoberfläche erscheinen (Abb. 14).

Das Auftreten von Radioaktivität im Knochenmark konnte in zwei Formen gesehen werden. Der Hauptteil war an Aktivitätssterne gebunden, die häufig in der Nähe von Knochenoberflächen aber auch frei im Mark liegend gefunden wurden. Ein kleinerer Teil verteilte sich als einzelne Kernspuren im gesamten Knochenmark.

Den sternförmigen Aktivitätskonzentrationen lagen in der Regel amorphe Gebilde zugrunde, die sich mittels Eisennachweis blau anfärben ließen und deshalb im Weiteren als Hämosideringranula angesprochen werden sollen (s. auch Abschn. 3.4.1.2). Bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop wiesen sie eine rötliche Fluoreszenz auf. Ihre Größe und Zahl nahm mit steigender inkorporierter Aktivität in den hochbelasteten Gebieten der untersuchten Knochen- und Knochenmarkteile zu. Solche mit Aktivität beladenen Hämosideringranula waren im Bereich der Metaphyse auch im periostalen Bindegewebe linienförmig eingelagert (Abb. 15).

3.4.1.2 Histologisch faßbare Veränderungen

Die Ergebnisse, die in diesem Kapitel beschrieben werden, beruhen auf einer Zusammenfassung von Erkenntnissen, die mittels dreier methodischer Komponenten gewonnen wurden:

- 1) Erfassung der Knochenstruktur durch Alizarinrotfärbung
- 2) lichtmikroskopische Histologie und Zytologie
- 3) Vitalmarkierung des Knochens

In den Abbildungen 16 und 17 ist der zeitliche Verlauf der Veränderung der Knochenstruktur dargestellt. Anhand der Kontrollgruppen ließ sich erkennen, daß in der Altersgruppe zwischen 6 und 25 Wochen qualitativ kein gravierender Wandel der Trabekulierung in Epi- und Metaphyse stattfand (s. Abschn.: 3.4.1.5). Bei den jugendlichen Tieren war

deutlich die Verminderung der Knorpelfugenbreite mit zunehmendem Alter zu sehen (s. Abschn.: 3.4.1.3).

Nach Inkorporation verschiedener Mengen ^{239}Pu ergaben sich Abweichungen in der Knochenstruktur, die je nach Nuklidmenge und Verabreichungsmodus, Ablagerungsort im Knochen und Alter der Tiere verschieden waren.

Bei den jugendlichen Tieren aller Dosisgruppen fiel als deutlichstes Merkmal eine Verminderung der epiphysealen Trabekelmasse auf, die, vier Wochen p. incorp. beginnend, gegen Ende des Versuchszeitraumes deutlich persistierte (s. Abschn.: 3.4.1.5). Auch in der Metaphyse ließ sich diese Tendenz erkennen, wobei hier zu frühen Zeitpunkten (1. und 2. Woche p. incorp.) ihr schaftwärtiger Teil im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger Knochenbälkchen zu besitzen schien (Abb. 16).

Anders verhielt es sich bei den jung-erwachsenen Ratten, bei welchen, selbst nach Verabreichung der niedrigsten Nuklidmenge von 37kBq/kg, grobe Knochenstrukturveränderungen in der Metaphyse dominierten. Bei obiger Dosis war bis zum letzten Sektionszeitpunkt dieses Versuches, 8 Wochen nach der Injektion, in der Epiphyse noch keine Osteoporose sichtbar. Diese stellte sich aber nach Verabreichung von 111kBq/kg oder mehr in ähnlicher Weise wie bei den jugendlichen Ratten ein.

In der Metaphyse bildete sich in allen Dosisgruppen ein Knochenband aus miteinander verschmolzenen oder stark verplumpten Trabekeln quer zur Schaftrichtung, von welchem sich Knorpelfuge und Epiphyse im Verlauf des Wachstums entfernten und darunter eine neue metaphysäre Struktur entstehen ließen. Diese neugebildete Metaphyse unterlag bei den höher belasteten Tieren einer Rarefikation, so daß sich in diesen Gruppen 16 Wochen nach Inkorporation ein allgemeiner osteoporotischer Zustand manifestiert hatte (Abb.: 17). Die schaftwärtig von der Knochenbrücke befindlichen Trabekel fielen frühzeitig einer weitgehenden Resorption anheim. Das Ausmaß und Aussehen dieser metaphysären Veränderungen war von der verabreichten Dosis und vom Verabreichungsmodus abhängig. Abbildung 18 zeigt die Zunahme der Schadwirkung auf den Knochen von 37, 111, und 222kBq/kg Einzeldosen vier Wochen nach der Injek-

tion. Weiterhin lassen sich in Abb. 17 die großflächigeren Zerstörungen der Metaphyse nach dreimaliger Gabe von 37kBq/kg erkennen, wobei zum 4 Wochen späteren Sektionszeitpunkt sich diese Läsionen auch zu einem persistierenden Knochenband reduziert hatten. Hierbei fiel auf, daß der Abstand des Knochenbandes zur Epiphysenplatte bei dieser Gruppe zu jedem Zeitpunkt wesentlich geringer war als bei den mit Einzeldosen behandelten Gruppen (s.Tab. 10).

Die histologische Untersuchung zeigte bei den jugendlichen Tieren nach Inkorporation der verschiedenen Plutoniumdosen nur leichte Abweichungen im Vergleich zu den inaktiven Kontrolltieren. Diese betrafen das Knochengewebe der schaftwärtigen Metaphyse, wo eine Woche nach der Verabreichung eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten sichtbar wurde (Abb. 19), und das Knochenmark. Der Versuch erstere Beobachtung zu objektivieren ist Gegenstand des Abschnitts 3.4.1.4. Die Veränderung des Knochenmarkes beruhte auf einer frühzeitigeren Erhöhung seines Fettzellgehaltes insbesondere in der Epiphyse (Abb. 20). Weder die Knochenzellpopulation der Epiphyse noch die der Metaphyse wies qualitativ von der Norm der Kontrolltiere abweichende Erscheinungen auf.

Ein völlig anderes Bild fand sich bei den jung-erwachsenen Tieren. Schon makroskopisch waren die schweren Schäden an Knochen und Knochenmark, selbst bei der niedrigsten verabreichten Dosis, im Schnitt sichtbar (Abb. 21). Über dem sich bildenden Knochenband in Richtung auf das Schaftmark waren bei den mit 111kBq/kg oder mehr behandelten Tieren die Trabekel mit einer zellreichen Bindegewebsschicht bedeckt, wobei der Knochenoberfläche immer noch die physiologischen Funktionszellen anhafteten (Abb. 22). Das Ausmaß und die Persistenz dieser peritrabekulären Fibrose waren dosisabhängig. So blieben in der mit 222kBq/kg höchstbelasteten Gruppe am Ende des Versuchszeitraumes oberhalb des Knochenbandes noch solche Veränderungen zurück, während bei den mit 111kBq behandelten Tieren die Fibrose nach 4 Wochen deutlich vermindert und zum Ende des Versuchszeitraumes verschwunden war. Bei protrahierter Gabe dieser Nuklidmenge schienen die Veränderungen

etwas ausgeprägter zu sein und länger zu bestehen. Im Versuch mit der geringsten Dosis von 37kBq trat trotz der Bildung des metaphysären Querbandes keine peritrabekuläre Fibrose auf. An den Knochenbälkchen der Epiphyse gab es bei den höheren Dosierungen eine Veränderung der Zellpopulation hin zu länglichen spindelförmigen Zellen ohne daß eine deutliche Fibrosierung bestand.

Das Knochenmark der Epiphyse fiel dosisabhängig einer sukzessiven Atrophie und Verfettung anheim, wobei die gelenknahen Bereiche bevorzugt betroffen waren. In der Metaphyse dominierte zu den frühen Zeitpunkten nach Injektion eine Hyperämie der Marksinus und eine deutliche Abnahme des Zellgehaltes. Mit der Bildung des Knochenbandes fand eine Verfettung des darüberliegenden Markes statt. Unterhalb des Querbandes zur Knorpelfuge hin wurde die sich neubildende Metaphyse von aktivem Knochenmark wiederbesiedelt. In den verfetteten Bereichen verblieben einzelne Zellnester der erythropoietischen Linie mit dunklen dichten Kernen, seltener waren Foci histio- oder granulocytyären Ursprungs zu sehen. Hier fanden sich auch, häufig in Trabekelnähe oder oberhalb des Knochenbandes, die vorne schon erwähnten Hämosideringranula, die teilweise beachtliche Größen von mehreren Zelldurchmessern erreichten. Das Knochenmark des Schaftes war, uneindrückt von den Abläufen in Epi- und Metaphyse, zellreich und aktiv.

Näheren Aufschluß über die Bildung des Knochenbandes ergab die Vitalmarkierung des Knochens mit Fluoreszenzmarkern. In der nach Nuklidverabreichung neugebildeten, gering belasteten metaphysären Spongiosa war eine deutliche Tendenz zur Aktivierung der Knochenbildung (hellere Fluoreszenz) und zur Quervernetzung der Trabekel untereinander festzustellen (Abb. 23). An der schaftwärtigen Seite dieser in Knochenquerrichtung aufeinandertreffenden Knochenbälkchen dominierten osteoklastische Prozesse. Die Metaphysenteile proximal dieser Zone wiesen bei den mit 37kBq behandelten Tieren qualitativ eine normale Markierungsstruktur auf, während bei den höher belasteten Gruppen ein Schwund von vor allem Doppelmarkierung zu sehen war. Trotz der teilweise dicken peritrabekulären

Fibroseschicht waren jedoch genügend Anzeichen von Knochenstoffwechsel vorhanden. Im Lauf der Zeit wurde dieser Bereich der Metaphyse resorbiert (deutlich sichtbar am Vorhandensein zahlreicher Resorptionslakunen), beziehungsweise im Verlauf der Verengung des Schaftes in die Kompakta integriert. Zum Ende der Versuche überwog bei den mit 222kBq bzw. 3x37kBq behandelten Tieren am Knochenband und in der neugebildeten Metaphyse die Aktivität der Osteoklasten, während bei den anderen Aktivitätsgruppen, insbesondere bei den mit Zn-DTPA behandelten Tieren, letztere eine reguläre Fluoreszenzmarkierung aufwies.

In den Epiphysen der mit 111kBq und mehr belasteten jugerwachsenen Tieren war eine Verringerung der Fluoreszenz zu beobachten. Die jugendlichen Tiere zeigten weder in der Epi- noch in der Metaphyse qualitativ eine Änderung der Ablagerung des Fluoreszenzfarbstoffes.

3.4.1.3 Knochenwachstum und Knorpelfuge

Um den Einfluß des abgelagerten ^{239}Pu auf das Knochenwachstum zu bewerten und physiologische Daten der Wachstumsrate des Femur in verschiedenen Altersstufen zu gewinnen, wurde das Längenwachstum der distalen Metaphyse mittels Fluoreszenzmarkierungstechnik bestimmt, sowie verschiedene quantitative Untersuchungen an der Knorpelfuge durchgeführt.

Die Längenwachstumsraten des distalen Femur verschiedener aktiver und nichtaktiver Tiergruppen sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Eine Zusammenstellung der Werte von Kontrolltieren verschiedenen Alters aus verschiedenen Versuchen zeigt Tabelle 15.

Bei den jugendlichen Tieren fand man keine Beeinflussung der Längenwachstumsrate nach Inkorporation von Plutonium. Erst am Ende des Versuchszeitraumes machte sich ein etwas stärkerer Rückgang dieses Parameters bei den mit Radioaktivität behandelten Tieren bemerkbar. Die älteren Tiere zeigten in der höchstbelasteten Gruppe eine nicht statistisch nachweisbare,

aber über den gesamten Versuchszeitraum anhaltende Verringerung der Wachstumsrate. Ähnliches gilt für die mit $1 \times 111 \text{ kBq/kg}$ behandelte Gruppe, wobei sich hier das Längenwachstum zum Ende des Versuches wieder dem der Kontrolltiere anglich. Bei mit $3 \times 37 \text{ kBq/kg}$ behandelten Ratten setzte diese Verminderung der Wachstumsrate später ein und persistierte noch zum letzten Sektionszeitpunkt. Die niedrigst belasteten Tiere deuteten nur zum Zeitpunkt 14 Tage nach Inkorporation eine geringe Verringerung der Wachstumsrate an.

Die Dicke der Knorpelfuge zeigte weder bei den jugendlichen noch bei den jung-erwachsenen Ratten eine Beeinflussung durch die innere Bestrahlung mit ^{239}Pu . Ein leichter, nicht signifikanter Unterschied bestand zwischen den beiden Kontrollgruppen der jung-erwachsenen Tiere, vor allem zum ersten Sektionszeitpunkt 14 Tage nach Beginn des Versuches (Tab. 12). Ebenso wies die Höhe der hypertrophischen Knorpelzellen am unteren Rand der Epiphysenfuge nach Plutoniumgabe keine Veränderungen auf (Tab. 13).

Die aus der Längenwachstumsrate und der Knorpelzellhöhe berechnete Knorpelzellproduktionsrate zeigte bei den jugendlichen und den mit der niedrigsten Dosis belasteten älteren Tieren keine Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollgruppen, während sich bei den mit $1 \times 111 \text{ kBq/kg}$ behandelten Gruppen der älteren ein solcher abzeichnete (Tab. 14).

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Altersentwicklung vorgenannter Parameter bei inaktiven Kontrolltieren aus verschiedenen Gruppen zusammengestellt. Die Logarithmen der Meßwerte (mehrere Meßwerte zu einem Zeitpunkt gemittelt) waren mit Korrelationskoeffizienten von $r > -0,967$ im Bereich zwischen 6 und 17 Wochen mit dem Alter der Tiere linear korreliert. Das bedeutet, daß in diesem Zeitraum die Abnahme der verschiedenen Parameter einer einfachen Exponentialfunktion folgte. Dadurch ließen sich die Halbwertszeiten für Längenwachstumsrate und Knorpelfugenbreite auf $4,7 \pm 0,5$ bzw. $8,0 \pm 0,8$ Wochen berechnen. Weiterhin konnte für die Abnahme beider Größen auf $1 \mu\text{m/d}$ bzw. $1 \mu\text{m}$, d.h. auf vernachlässigbare Werte, ein Zeitraum von 43 bzw. 75 Wochen bestimmt werden, wobei bei älteren Tieren sich die Kurven jedoch mit zuneh-

mender Lebenszeit abzuflachen schienen, so daß das Ende des Wachstums und der Schluß der Knorpelfuge möglicherweise zu noch späterer Zeit liegt.

Untereinander waren die Parameter mit hohen Koeffizienten linear korreliert, zum Beispiel Längenwachstumsrate mit Knorpelfugenbreite $r=0,990$; Längenwachstumsrate mit Knorpelzellhöhe $r=0,962$; Knorpelzellhöhe mit Knorpelzellproduktionsrate $r=0,991$.

3.4.1.4 Zellpopulation in der schaftwärtigen Metaphyse jugendlicher Ratten

Der in Abschnitt 3.4.1.2 beschriebene, qualitativ wahrnehmbare Anstieg der Osteoklastenzahl im Bereich der schaftwärtigen Metaphyse bei mit ^{239}Pu behandelten jugendlichen Tieren war Anlaß, in dieser Region (etwa 1,56mm von der tiefsten Stelle der Knorpelfuge) eine Differenzierung und Zählung der Knochenzellen vorzunehmen.

Die Ergebnisse der Zählung sind in Tabelle 16 zusammengefaßt. Um die Werte auf Schwankungen im Knochenanteil der ausgewerteten Fläche zu korrigieren wurden die in Tabelle 17 aufgezeichneten Zellzahlen berechnet.

Die Osteozytenzahlen lagen im ausgemessenen Bereich der Metaphyse über den gesamten Versuchszeitraum in beiden Tiergruppen um 125 Zellen/mm² ausgewerteter Fläche. Vergleicht man jedoch die auf den Knochenanteil der gemessenen Fläche korrigierten Werte, so waren diejenigen der mit Plutonium behandelten Tiere immer leicht niedriger als bei den Kontrolltieren.

Die Anzahl der Osteoblasten schien initial, vor allem 7 Tage nach Verabreichung des Nuklides, niedriger als bei den Kontrolltieren. Auch die korrigierten Werte deuteten auf eine solche Entwicklung hin. Gegen Ende des Versuchszeitraumes verschwanden diese Unterschiede. Insgesamt war die Zahl der Osteoblasten über den Beobachtungszeitraum rückläufig, mit einer starken Abnahme zwischen 4. und 8. Woche nach Verabreichung des Nuklides.

Die Zahl der Osteoklasten hingegen war 7 Tage nach Inkorporation bei den aktiven Tieren höher als bei den Kontrolltieren. Dieser Unterschied verschwand jedoch schon eine Woche später. Über den Versuchszeitraum war bei den Kontrolltieren eine konstante Klastenpopulation um 9 Zellen/mm² Knochenoberfläche vorhanden.

Die Anzahl der Kerne pro Osteoklast dient als Merkmal der Stoffwechselaktivität dieser Zellart und zeigte zu Beginn der Beobachtung bei den radioaktiven Tieren eine leichte Erhöhung, die sich später wieder den Werten der Kontrolltiere angleich.

Die Zahl der Mesenchymzellen war bei den behandelten Tieren zum ersten Sektionszeitpunkt leicht verringert. Nach Korrektur auf die Knochenoberfläche war der Unterschied weniger deutlich. Insgesamt ließ sich im zeitlichen Verlauf und ausgewerteten Bereich der Metaphyse eine Zunahme dieser Zellart pro Einheit der Knochenoberfläche feststellen.

Der Flächen-(Volumen-)Anteil der Knochensubstanz schwankte über die Versuchsdauer um einen Mittelwert von 23%, während die spezifische Oberfläche im Laufe der Zeit sukzessive abnahm.

3.4.1.5 Histomorphometrie der Femurepiphyse

Um die vorne qualitativ beschriebenen Veränderungen in den Femurepiphyse nach Inkorporation von ²³⁹Plutonium (Abschn. 3.4.1.2) quantitativ zu fassen und um möglicherweise die Mechanismen ihrer Entstehung zu erfahren, wurden histomorphometrische Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten jugendlichen Tieren durchgeführt. Eine komprimierte Zusammenfassung der gewonnenen Daten ist in Tabelle 18 dargestellt.

Bei den mit ²³⁹Plutonium behandelten Tieren war 28 Tage nach Injektion eine deutliche Verringerung des spongiösen Knochenanteils (V%) in den ausgewerteten Bereichen der Epiphysen feststellbar. Auch fand sich ab diesem Zeitpunkt eine Verminderung der inneren Oberfläche (Oi) in den aktiven Tiergruppen. Die spezifische Oberfläche (Osp) zeigte wechselnde

Befunde, ohne große Unterschiede zwischen behandelten und nichtbehandelten Tieren.

Der Anteil des doppelt fluoreszenzmarkierten Knochenumfangs (DO%) war acht Wochen nach der Injektion bei den aktiven Tieren doppelt so groß wie bei den inaktiven, zeigte aber zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten keine Unterschiede.

Im Gegensatz dazu ergab die Messung des Anteils der mit markierten Resorptionslakunen versehenen Oberfläche (KL%) jederzeit eine teilweise statistisch signifikante Erhöhung bei den mit Plutonium behandelten Tieren.

Letztgesagtes gilt auch für die Mineralisationsrate (MR).

Die Knochenbildungsrate (KBR), die von Mineralisationsrate, fluoreszenzmarkiertem Knochenumfang und spezifischer Oberfläche abhängt (s. Abschn. Material u. Methoden), sinkt bei den Kontrolltieren im Zeitraum 2 bis 16 Wochen nach Injektion von etwa 1200%/Jahr auf 160%/Jahr. Dies bedeutet, daß die Stoffwechselaktivität in der Femurepiphyse bei männlichen Ratten von der 7. bis zur 21. Lebenswoche um etwa eine Größenordnung abnimmt. Bei den radioaktiven Tieren ist die Knochenbildungsrate über den gesamten Beobachtungszeitraum stets leicht höher als bei den zugehörigen Kontrolltieren.

3.4.2 Untersuchungen an Wirbelkörpern

3.4.2.1 Nuklidverteilung und histologisch faßbare Veränderungen

Beispiele für die Makroverteilung von ^{239}Pu zeigt Abbildung 24. Das Verhalten der Nuklidverteilung folgte bei Ratten beider Altersgruppen, gleich welche Dosis oder welcher Verabreichungsmodus gewählt wurde, dem gleichen Ablauf: eine zunächst homogene Verteilung kurz nach Verabreichung des Nuklides, veränderte sich dahingehend, daß in bestimmten Bereichen des Knochens, die weitgehend mit älteren metaphysären Anteilen der Knochenstruktur übereinstimmten, heiße Zonen entstanden. Diese heißen Zonen nahmen teilweise, wie in der Metaphyse des Femur bandförmige Gestalt an. Korrespondierend

zur später noch zu beschreibenden Veränderung der Knochenstruktur, entstanden im Zentrum des Wirbelkörpers größere Flächen (bzw. Räume) mit nur geringer Aktivitätsansammlung. Die mikroautoradiographischen Präparate zeigten ein gleichartiges Verhalten des Nuklids wie in den Femora.

Im Wirbelkörper fand im Laufe des Versuches sowohl bei den jugendlichen in den mit insgesamt 111kBq/kg belasteten Gruppen, als auch bei den jung-erwachsenen Ratten in allen Dosisgruppen, ein ausgeprägter Schwund der Trabekelmasse statt (Abbildungen 25 und 26). Bei den jung-erwachsenen Tieren konnte in den mit dieser Dosis oder mehr belasteten Gruppen auch die Tendenz zur Bildung von Knochenbändern in den beiden Metaphysen gesehen werden. Eine Dekorporationstherapie mit 10^{-3} molarer Zn-DTPA Lösung konnte trotz Reduktion des Nuklidgehaltes weder bei jugendlichen noch bei älteren Tieren diese Veränderung wesentlich beeinflussen (Abb. 27).

In den korrespondierenden histologischen Bildern fanden sich bei den jugendlichen radioaktiven Ratten keine Störungen in der Knochenzellpopulation. Die von Knochensubstanz entblößten Teile im Zentrum des Wirbelkörpers beherbergten aktives Knochenmark. Insgesamt war im Mark bei den mit Plutonium behandelten Tieren ein etwas größerer Fettzellgehalt feststellbar.

Im Gegensatz dazu, ergaben sich schon bei der niedrigst belasteten Gruppe der älteren Tiere pathologische Zustände von Knochen und Knochenmark in bandförmigen Zonen der beiden Metaphysen des Wirbelkörpers. Bei den zur oben genannten Gruppe zählenden Tieren (1x37kBq/kg) gestaltete sich der Ablauf der Ereignisse wie folgt:

Zwei Wochen nach der Injektion des Nuklides dominierten in den beiden Metaphysen hyperämische Marksinus anstelle des bei den Kontrolltieren zellreichen Knochenmarkes. Die Knochenzellpopulation war zu diesem Zeitpunkt vom Geschehen noch unberührt.

Vier Wochen nach Inkorporation war in den betroffenen, sich Richtung Knochenmitte verschiebenden Bereichen, eine ödematöse Verquellung des zurückgebliebenen Knochenmarkstroma und, bei abnehmender Sinusfüllung, die Zubildung von Fettzellen festzustellen. Die knorpelfugennahen Bereiche begannen sich wieder mit zellreichem Knochenmark zu füllen. In der Zellpopulation der Knochenoberfläche fand sich eine starke Zunahme spindelförmiger Zellen, die in einschichtiger Lage der Knochenoberfläche anhafteten.

Acht Wochen nach Behandlung hatten sich die nun vollständig verfetteten bandförmigen Bezirke etwa 0,7 mm von der Epiphysenfuge entfernt. Zwischen den Schadenszonen und der Knorpelfuge waren die Metaphysen mit intaktem Knochenmark wiederbesiedelt. Die Knochenoberfläche in den geschädigten Bereichen war weiterhin zum größten Teil nur mit spindelförmigen Zellen bedeckt.

Die oben beschriebenen Veränderungen zeigten sich in verstärktem Maße und auch im zeitlichen Ablauf früher einsetzend bei den höher belasteten Tiergruppen. So trat mit $1 \times 111 \text{ kBq}$ verabreichter Dosis nach 2 Wochen schon das Stadium der Ödematisierung des Knochenmarkstroma auf und die Verfettung des Markes war nach 4 Wochen schon stark fortgeschritten. Auch hatten die geschädigten Bezirke eine größere räumliche Ausdehnung, und die Reaktivierung des Knochenmarkes in der neugebildeten Metaphyse dauerte länger. Sehr auffällig war das aktive Knochenmark im osteoporotischen Zentrum des Wirbelkörpers (Abb. 28). Weiterhin traten zu den späten Untersuchungszeitpunkten (8 und 16 Wochen nach Injektion) an den hochbelasteten Trabekeln Fibrosen auf, wobei in der mit $3 \times 37 \text{ kBq/kg}$ belasteten Gruppe ein größerer Anteil zu finden war. Für die Hämosiderose der geschädigten Bereiche gilt das bei den Femora Geschriebene.

3.4.2.2 Histomorphometrie des Wirbelkörpers

Zur morphometrischen Untersuchung wurden Schnitte von 4. Lendenwirbelkörpern herangezogen. Aus einem Versuch mit ^{238}Pu (Län87) standen 3. Lendenwirbel zur Verfügung, die ebenfalls ausgewertet werden konnten. Die untersuchten Dosisgruppen waren $1 \times 111 \text{ kBq}$ beider Nuklide bei den jugendlichen Tieren und $1 \times 37 \text{ kBq } ^{239}\text{Pu}$ bei den jung-erwachsenen.

Die statische Morphometrie verdeutlichte die schon qualitativ festgestellten osteoporotischen Prozesse im Wirbelkörper. So war sowohl bei den jugendlichen, als auch noch ausgeprägter bei den jung-erwachsenen Tieren, in den mit Plutonium behandelten Gruppen bereits 28 Tage nach Inkorporation der Flächenanteil (Volumenanteil) des Knochens vermindert. Dies blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes unverändert. Parallel hierzu nahm auch die innere Oberfläche (O_i) in den Knochen der aktiven Tiere ab, so daß die spezifische Oberfläche keine großen Unterschiede aufwies (Tabellen 19 bis 21).

Die dynamischen Parameter ergaben ein ähnliches Stoffwechselverhalten des Wirbelkörpers wie der Femurepiphyse.

Bei den jugendlichen Tieren fand sich ein starker Unterschied im Anteil des doppelmarkierten Umfangs (DO) nur 8 Wochen nach Inkorporation von ^{239}Pu . Ebenso war bei den radioaktiven jung-erwachsenen Tieren trotz niedrigerer Plutonium-Dosis zu diesem Zeitpunkt dieser Parameter im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht, während sich im 3. Lendenwirbelkörper von mit ^{238}Pu behandelten jugendlichen Ratten kein solcher Unterschied feststellen ließ.

Der Oberflächenanteil markierter Resorptionslakunen (KL) war in allen untersuchten Tiergruppen bei den mit Plutonium kontaminierten Tieren stets höher als bei den inaktiven Kontrollen.

Gleiches gilt für die Mineralisationsrate (MR), wobei in den 3. Lendenwirbelkörpern aus dem Versuch mit ^{238}Pu sich ein Unterschied nur andeutete.

Das Verhalten der Knochenbildungsrate (KBR) war, aufgrund ihrer Abhängigkeit vom fluoreszenzmarkierten Anteil des Knochens und von der Mineralisationsrate, ähnlich dem dieser beiden Parameter, d.h. sie war bei aktiven Tieren teilweise höher, nie jedoch verringert im Vergleich zu den Kontrolltieren.

In Tabelle 22 ist nochmals das Verhalten der morphometrischen Parameter von Kontrolltieren im zeitlichen Verlauf dargestellt.

Während in der Femurepiphyse die Knochenmasse über den Beobachtungszeitraum zunahm, blieb sie im Wirbelkörper gleich.

Innere und spezifische Oberfläche (O_i , O_{sp}) waren in der Femurepiphyse deutlich geringer als im Wirbelkörper. Während in der Epiphyse erstere leicht zu- und letztere leicht abnahm, blieben die Werte beider Parameter im Wirbel recht konstant.

Bei der mit Doppelmarkierungen versehenen Knochenoberfläche (DO) und dem Anteil der markierten Resorptionslakunen (KL) ließ sich mit zunehmendem Alter eine rückläufige Tendenz erkennen, wobei wechselnde Unterschiede zwischen Femurepiphyse und Wirbelkörper auftraten.

Die Mineralisationsrate (MR) erwies sich als bei beiden untersuchten Knochenteilen vergleichbar und verringerte sich im Laufe der Versuchsdauer.

Letzteres galt auch für die Knochenbildungsrate (KBR), die jedoch in der Femurepiphyse schneller abnahm als im Wirbelkörper.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Retention, Nuklidverteilung und Strahlenbelastung des Knochens durch Plutonium

Die Zielorgane von Plutonium sind, wie die aller anderen Aktiniden, Skelett und Leber (Dur60). In Abhängigkeit von der physiko-chemischen Form des Nuklids ändert sich die Verteilung zwischen diesen beiden kritischen Ablagerungsorten. So finden sich lösliche Verbindungen vor allem im Knochen, während kolloidale Formen sich hauptsächlich in Leber, Knochenmark und anderen Organen des RES (MPS) anreichern (Mah74, Dur75, Sik76). Neben der chemischen Verbindung ist auch die Art ihrer Verabreichung ein wesentlicher Faktor für das Verteilungsverhalten. Wird zum Beispiel Plutonium-Nitrat intravenös verabreicht, ergibt sich das Ablagerungsverhalten einer gut löslichen Verbindung, während nach intramuskulärer Injektion eine hohe Retention an der Injektionsstelle erfolgt, wobei sich durch hydrolytische Prozesse Kolloide bilden (Vol 74, Har78). Plutonium-Zitrat hingegen wird, wie diese Arbeit zeigt, schnell und restlos von der Injektionsstelle in der Muskulatur resorbiert und zeigt eine Verteilung wie nach i.v. Injektion (Sei74).

Bei der Ratte vermindert sich, im Gegensatz zu anderen Tierarten, der Anteil des in der Leber befindlichen Plutoniums rasch, wobei einerseits die Ausscheidung über die Galle (Tay61), andererseits eine Wiederabgabe ins Blut mit anschließender Ablagerung im Knochengewebe erfolgt. In der Literatur finden sich nun bei verschiedenen Autoren trotz Verabreichung löslicher Verbindungen hohe initiale Leberretentionen (Tay61, Bal67, Mah74, Cra76), die im Laufe der Zeit abnehmen und zu einer Erhöhung der Retention im Knochen führen. Andererseits berichten teilweise die gleichen Arbeiten (Bal67, Mah74, Son83) wesentlich niedrigere anfängliche Retentionen und damit auch weniger ausgeprägte Umverteilung ins Skelett. Auch die eigenen Versuche mit intramuskulär verabreichtem Plutonium-Zitrat gehören letzter Kategorie an. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß der Plutonium-

Zitrat-Komplex eine Stabilität aufweist, die die Hydrolyse im Gewebsumilieu verhindert und die Injektion von Plutonium-Zitrat in die Muskulatur eine vergleichbare Nuklidverteilung hervorbringt wie die i.v. Injektion anderer löslicher Verbindungen.

Beim Vergleich der Femur-Retentionswerte der eigenen Versuche mit Literaturdaten vorn genannter Autoren zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung. Eine Ausnahme bildet die Retention bei den jugendlichen Tieren, die wider Erwarten niedrigere Werte aufwies als bei den jung-erwachsenen. Dieses Faktum wird auch in der Literatur widersprüchlich diskutiert. So fand Hollins (Hol75) bei etwa 15 Wochen alten weiblichen Ratten höhere Retentionen als bei 5 wöchigen, während nach den Befunden anderer Autoren (Mah74, Wir85 für Np) bei jüngeren Tieren eine größere Ablagerung zu erwarten ist. Eine aus vorliegender Arbeit abzuleitende Erklärung für die verstärkte Ansammlung von Plutonium bei älteren Tieren fände sich in den zur Zeit der Inkorporation vorhandenen Unterschieden in der Knochenmasse und insbesondere der inneren Knochenoberfläche, die nach vorliegenden Ergebnissen ihr Maximum erst um die 9. Lebenswoche erreichen (Tab. 22).

Leider besteht in der Literatur häufig ein Defizit an genaueren Alters- bzw. ersatzweise Körpergewichtsangaben der eingesetzten Versuchstiere. Auf die Problematik der Knochenreife, sowie deren Kopplung an Alter und Körpergewicht der Tiere wird an anderer Stelle eingegangen.

Die Nuklidkonzentration in den untersuchten Knochen war erwartungsgemäß bei den erwachsenen Tieren, aufgrund der höheren Knochenmasse (Län87) initial niedriger als bei den Jungtieren. Bis zum Ende des Versuchszeitraumes hatten sich jedoch, bedingt durch das starke Wachstum letztgenannter Tiergruppe, die Konzentrationswerte ausgeglichen bzw. waren die Werte der jugendlichen Ratten sogar niedriger als bei den jung-erwachsenen. Diesen Effekt haben auch Mahlum et al (Mah74) beim Vergleich von Ratten im Absatzalter zu jung-erwachsenen Ratten in noch krasserer Weise festgestellt. Dies bedeutet aber, daß die Dosisverteilung im Knochen, selbst

ohne Berücksichtigung der Feinverteilung des Nuklides, schon allein durch das Alter des Tieres unterschiedlich ist. So belastet die Inkorporation von Plutonium den Knochen jugendlicher Tiere zu frühen Zeitpunkten wesentlich stärker als bei erwachsenen, bzw. umgekehrt formuliert wird bei erwachsenen Tieren zu späteren Zeitpunkten nach Inkorporation noch ein wesentlich größerer Beitrag zur Dosis geleistet als bei jugendlichen.

Bei der Berechnung der Dosisleistung und der kumulativen Dosen für die untersuchten Knochen fand sich nun bei gleicher Aktivitätszufuhr pro Körpergewicht eine sehr unterschiedliche Strahlenbelastung bei jugendlichen im Vergleich zu den älteren Tieren. So war die kumulative Dosis bei den letzteren nach Verabreichung von $1 \times 111 \text{ kBq}$ am Ende des Versuchszeitraumes im Femur um den Faktor 2,3, im Wirbel gar um den Faktor 2,7 höher als bei den jugendlichen, während die kumulativen Dosen bei älteren Tieren 56 Tage nach Injektion von $1 \times 37 \text{ kBq/kg}$ nur leicht geringer waren (Faktor 0,7) als bei mit dreifacher Dosis behandelten Jungtieren. Diese großen Unterschiede begründen sich darin, daß in die Berechnung der Dosisleistung die tatsächlich injizierte Aktivitätsmenge pro Tier einfließen muß. Diese betrug bei den jugendlichen Tieren um 13 kBq/Tier , bei den älteren jedoch 33 bzw. in der niedrig belasteten Gruppe ebenfalls 13 kBq/Tier . Die Differenz der Verhältnisse der pro Tier injizierten Dosen bzw. der kumulativen Dosen begründet sich durch die Unterschiede in der Retention zwischen jugendlichen und jung-erwachsenen. So läßt sich aus den Ergebnissen also ableiten, daß bei Ratten über einem Alter von fünf Wochen für eine grob vergleichbare mittlere Dosisbelastung des Skeletts nicht die injizierte Aktivitätsdosis pro Körpergewicht, sondern die injizierte Aktivität pro Tier ausschlaggebend ist. Um weiteren Aufschluß über den für die Makro-Dosimetrie so wichtigen Parameter des Knochengewichtes im Verhältnis zum Körpergewicht zu erhalten, insbesondere auch in Hinsicht auf den ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus des letzteren bei der Ratte, wären noch weitere Untersuchungen vorteilhaft. Von Sontag (Son84a) wurden für über ein Jahr alte Ratten beiderlei Geschlechtes

solche Daten erhoben, wobei sich zeigte, daß das Skelettgewicht bei weiblichen Tieren geringer ist als bei männlichen und sich in diesem Alter keine großen Änderungen mehr ergeben. Längle (Län87) stellte bei jugendlichen männlichen Tieren eine linear-ansteigende Abhängigkeit vom Körpergewicht fest. Da es sich bei dieser Abhängigkeit jedoch nicht um eine Ursprungsgerade mit der Steigung eins handelt, kommt es zur Diskrepanz zwischen Körper- und Knochengewicht, welche sich schließlich auf solche Weise in den dosimetrischen Daten niederschlägt. Deshalb sollte eine Dosierung von Nukliden der Aktinidenreihe, insbesondere wenn es um die Vergleichbarkeit strahlentoxikologischer Ergebnisse geht, möglichst nach Skelettgewicht bzw. dem Gewicht eines zum Skelett korrelierten Knochens vorgenommen werden.

Neben dieser groben Abschätzung der Strahlenbelastung einzelner Knochen, ist die makro- und mikroskopische Verteilung des Strahlers für dosimetrische und pathogenetische Betrachtungen von immenser Wichtigkeit. Aus den ermittelten makro- und mikroautoradiographischen Befunden geht eindeutig der große Einfluß des metaphysären Längenwachstums auf die Verteilung des Nuklides hervor (s.auch Wir85). Metaphysen sind bei wachsenden Tieren in allen Teilen des enchondralen Skelettes vorhanden (Bal83), sodaß die diese Strukturen betreffenden Prozesse an den hier untersuchten Beispielen Femur und Wirbelkörper für andere Knochen ebenso zutreffen. In nicht-metaphysären Bereichen wie zum Beispiel den Epiphysen der langen Knochen oder dem Zentrum des Wirbelkörpers, sowie nach Abschluß des Längenwachstums spielt für das mikroskopische Verhalten des Nuklids im Knochen nur noch die Intensität des Knochenstoffwechsels eine Rolle. Dieses Verhalten führte in früherer Zeit sogar zur Anwendung von Plutonium als Stoffwechselmarker (Arn57, Arn62).

Zusammenfassend kann aus den im Abschnitt Ergebnisse beschriebenen Daten gefolgert werden, daß

- durch schnelles Längenwachstum die Aktivität in neugebildeten Teilen der Metaphyse sich stark vermindert und große Teile davon bandförmig an der Stelle der ersten Ablagerung verbleiben.

- durch Knochenresorption Aktivität ins Knochenmark transferiert wird.
- durch hohen Stoffwechsel bei jüngeren Tieren mittels Begrabung oder Resorption die Aktivität schneller von der Knochenoberfläche entfernt wird als bei älteren.

Gleiches gilt auch für andere Elemente der Aktinidenreihe wie Americium (Pri83) oder Neptunium (Wir85). Dieses Verhalten bedingt die Unterschiede in der Reaktion des Gewebes und führt zur Notwendigkeit einer Dosimetrie auf zellulärer Ebene (Pol86).

Weiterhin lassen sich aus obigen Ausführungen auch die Ergebnisse der Dekorporationstherapie (Lit. bei Vol78) erläutern, welche vor allem dort am wirksamsten ist, wo ein hoher Knochenumsatz, insbesondere große Resorptionsaktivität herrscht. Wird das Nuklid durch diese Vorgänge in einer Weise freigesetzt, daß der Chelatbildner es komplexieren kann, so wird eine Redeposition verhindert. Typische Beispiele für solche Knochenbereiche sind die Metaphysen. Dort werden große Mengen des Nuklids abgelagert, aber im Verlauf des Wachstums auch wieder freigesetzt und somit der Chelattherapie zugänglich. Je langsamer das Wachstum fortschreitet, um so mäßiger ist der Erfolg der Therapie. In Knochenteilen, die keine Metaphyse besitzen, ist der Einfluß der Chelattherapie noch weniger deutlich (Abb. 11, Tab.7). Auch scheint die Einlagerung von freigesetzter Aktivität in die pathologischen Hämosiderinablagerungen mit der Dekorporationstherapie in Wettbewerb zu treten, jedenfalls scheint sich hämosideringebundene Aktivität kaum mehr mobilisieren zu lassen (Abb. 11 jung-erwachsene Tiere mit bandförmiger Aktivitätskonzentration).

4.2 Bewertung der klinischen Parameter

Ein wichtiger Punkt bei der Beurteilung des klinischen Allgemeinzustandes von Versuchstieren ist die Körpergewichtsentwicklung. Verschiedenste mindernde Einflüsse auf das Wohlbefinden des Tieres verursachen eine Stagnation der Zunahme bzw. eine Abnahme des Körpergewichts. Hierbei ist zu

berücksichtigen, daß um vergleichbare Werte zu erhalten, die Haltungsbedingungen der Tiere sich entsprechen müssen. So überschritt die Gewichtszunahme bei an unserem Institut gehaltenen männlichen Ratten die vom Züchter gelieferten Daten. Da die durchgeführten Versuche mit Kontrollgruppen ausgestattet waren, konnte ein direkter Vergleich zwischen diesen und den behandelten Tiergruppen erstellt werden. Die Gewichtszunahme zeigte sich hierbei weitgehend unbeeinflusst von der Nuklidapplikation. Die in der jugendlichen Gruppe aufgetretene Verminderung der Körpermasse in der mit $1 \times 111 \text{ kBq/kg}$ behandelten Tiergruppe war schon zu Beginn des Versuches aufgrund der noch hohen Tierzahl signifikant angelegt. Diese Tatsache zeigt die Bedeutung einer statistischen "Homogenisierung" des Körpergewichtes einzelner Tiergruppen zu Versuchsbeginn.

Bei der als weiterer Gesichtspunkt durchgeführten Blutuntersuchung sollte, neben ihrer Bedeutung für den klinischen Allgemeinzustand, auch die periphere Wirkung der Nuklidablagerung auf das im Knochen liegende Blutbildungsorgan erfaßt werden.

Zunächst unterziehen wir die ermittelten Werte der Kontrollgruppen einer kritischen Betrachtung (Abb. 8). Die Zahl der roten Blutzellen lag durchweg niedriger als die in der Literatur (Rin79, San81) zu findenden Werte. Dagegen ist die Diskrepanz zwischen den Angaben des Versuchstierlieferanten (Cha84) und den eigenen Ergebnissen wesentlich geringer.

Der Anstieg der Leukozytenzahl der Kontrolltiere zwischen 7. und 11. Lebenswoche mit anschließendem Rückgang auf sehr niedrige Werte ist in der oben aufgeführten Literatur ebenfalls so nicht beschrieben, allenfalls läßt sich bei Sanderson (San81) eine gewisse Ähnlichkeit im zeitlichen Verlauf dieses Parameters finden. Eine mögliche Erklärung für diesen Anstieg der weißen Blutzellen ist die Durchseuchung der angelieferten Tiere im fremden Milieu des nur mit einfacher Barriere ausgestatteten Tierstalls. Dazu hätten sich jedoch die aus verschiedenen Versuchen ermittelten Verlaufskurven auf eine Weise überlagert, daß sich vorliegende Kurve

ergab. Es ist also durchaus denkbar, daß es sich hierbei doch um eine reine Altersabhängigkeit der Leukozytenzahl handelt.

Die Differenzen der Blutzellzahlen in Hinblick auf Daten aus der Literatur können vielfältige Ursachen haben. So ergeben sich Unterschiede nicht nur aus dem methodischen Ansatz zur Bestimmung der Werte sondern auch durch viele andere Faktoren wie Tierstamm, Fütterung, Geschlecht, Gesundheitszustand und so fort (Rin79). Innerhalb eines Labors sind mit gleicher Methodik bestimmte Werte jedoch miteinander vergleichbar. Dies soll im folgenden Absatz nun geschehen.

In der Zahl der roten Blutzellen deutete sich 14 und 28 Tage nach Injektion bei den jung-erwachsenen Tieren eine leichte Verminderung an, wobei zu diesem Zeitpunkt auch die Hämoglobinkonzentration des Blutes vermindert war. Diese Abnahme der Zahl peripher zirkulierender Erythrozyten läßt sich möglicherweise mit der initial starken Hyperämie in Teilen des Knochenmarks und der Blutversackung in die erweiterten Marksinus erklären (s.auch Abschn. 4.3).

Einen weitaus stärkeren Effekt übte die innere Bestrahlung durch Plutonium auf die Leukozytenzahl aus. Ungeachtet der Ursache des vorne beschriebenen Verlaufes war sowohl bei den jugendlichen, als auch bei den jung-erwachsenen aktiven Tieren dieser Gipfel der Zellzahl nicht vorhanden. Zum letzten Zeitpunkt der Untersuchung, 16 Wochen nach Inkorporation, hatte sich jedoch die Zahl der Leukozyten von aktiven und Kontrolltieren wieder einander angeglichen. Eine Ausnahme stellten die mit 222kBq/kg höchstbelasteten Tiere dar, bei welchen sie weiterhin sehr niedrig blieb. Die Auswertung vereinzelter Differentialblutbilder ergab keinen deutlichen Unterschied der belasteten zu den Kontrollgruppen. Da jüngere Ratten ein weißes Blutbild mit einem Lymphozytenanteil von um 80% besitzen, muß die Verminderung der Leukozytenzahl vor allem auf diese Zellart zurückzuführen sein und scheint zudem unabhängig vom Ausmaß der Knochenmarkschädigung, da bei den jugendlichen Tieren dieser Effekt auch ohne ausgeprägte Veränderung am Knochenmark besteht. Dougherty (Dou69) beobachtete ähnliche Ereignisse bei Beagle-Hunden nach Inkorporation alpha-

strahlender Nuklide, wobei er die Veränderung der Lymphozytenzahl mit, durch die innere Bestrahlung hervorgerufener, stressbedingter Kortikoidsekretion zu erklären suchte. Möglicherweise gibt es auch Regulationsmechanismen durch Veränderung der im Knochenmark anwesenden Lymphozyten (um 3% bei der Ratte nach San81), falls diese wieder in periphere lymphatische Organe gelangen. Erst bei weitgehender Zerstörung des Knochenmarks (Gruppe 222kBq/kg) scheint ein anhaltender Effekt auf die Leukopoiese zu bestehen.

Die Plasmaaktivität der Alkalischen Phosphatase hängt in starkem Maße von der osteoplastischen Aktivität im Knochengewebe ab (Rin79, Boe81). Die in dieser Arbeit ermittelten Werte weisen eine relativ starke individuelle Streuung auf, wobei sie jedoch weitgehend mit den Literaturdaten übereinstimmen. Es hat sich gezeigt, daß die Aktivität des Enzymes mit hohem Regressionskoeffizienten ($r=0,988$) linear mit der Längenwachstumsrate korreliert ist, und daß die innere Bestrahlung durch die verabreichten Nukliddosen keinen Einfluß auf seinen Plasmaspiegel ausübt. Der Hauptanteil des Enzyms entstammt in der Zeit des Knochenwachstums somit den großen metaphysären Knochenbereichen, und die hier verabreichten Nuklidmengen stören die Aktivität der Osteoblasten in diesen Strukturen nur wenig. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den im Abschnitt 4.3 noch zu erläuternden Befunden über die Veränderungen von Histologie und Stoffwechsel.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der klinische Zustand der Tiere nach Inkorporation von bis zu 222kBq/kg Körpergewicht über den Beobachtungszeitraum von 16 Wochen nach Injektion keine wesentlichen negativen Einflüsse offenbarte.

4.3 Histologie und Histomorphometrie (Wachstum und Knochenstoffwechsel) von Femur und Wirbelkörper

4.3.1 Bewertung der qualitativen Befunde

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- 1) im Hinblick auf die pathogenetischen Abläufe am Knochen, sind in den untersuchten Altersgruppen vor allem Wachstums- und Stoffwechselfvorgänge von größter Bedeutung, da diese die makroskopische und mikroskopische Nuklid- und Dosisverteilung bestimmen.
- 2) in Abhängigkeit von der injizierten Dosis und von oben erwähnten Größen manifestieren sich teilweise strukturelle, teilweise primär funktionelle Gewebeschäden. Letztere führen mit der Zeit zu Veränderungen der Knochenstruktur ohne erkennbare histologische Störungen zu hinterlassen.
- 3) die Form der Gewebeschäden an Knochen und Knochenmark läßt sich als für die Späteffekte der Nuklidablagerung, die Krebsentstehung, förderlich interpretieren.

Dies bedeutet im Einzelnen, daß histomorphologische Schäden an Knochen und Knochenmark durch die verabreichten Aktivitätsdosen nur bei der Altersgruppe der jung-erwachsenen Ratten deutlich hervortraten. Sie bestanden den Knochen betreffend, in groben Strukturveränderungen vor allem im Bereich der Femurmetaphyse, teilweise auch in den Metaphysen der Lendenwirbelkörper. Das Knochenmark war in Teilen aplastisch und stark verfettet und in den hochbelasteten Knochenteilen bildeten sich peritrabekuläre Fibrosen. Die geschädigten Bereiche deckten sich mit den Zonen größter Nuklidablagerung. Aufgrund der kaum beeinträchtigten Längenwachstumsparameter veränderte sich das Schadensbild im Laufe der Zeit durch Verschiebung der Schadenszonen. Somit ergab sich im Beobachtungszeitraum ein ähnlicher Ablauf der Veränderungen wie bei mehrfach höheren, schon in der Einleitung beschriebenen Aktivitäten (Hel48, Pöm74, Pol76, Mos79),

jedoch ohne schwerwiegende Beeinträchtigung der Knorpelfuge und des Längenwachstums.

Die Bildung des Knochenquerbandes erfolgte, wie die Vitalmarkierung deutlich zeigte, an der Grenze der sich nach der Kontamination neu bildenden Metaphyse zum älteren, stark belasteten Teil. Durch verstärkten Knochenanbau in Querrichtung zur Längsachse des Knochens ergab sich eine Vernetzung dort entstehender sekundärer Knochenbälkchen. Die stark belasteten Teile der Metaphyse wurden rasch resorbiert und auch an dem Knochenband, von dem sich Knorpelfuge und Epiphyse immer weiter entfernten, herrschte rege Osteoklastenaktivität, welche jedoch bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes keine Auflösung des Bandes bewirken konnte. Diese Befunde stehen im Einklang mit Beobachtungen von Moskalev (Mos79), welcher nach Neptuniumgabe ähnliche Abläufe fand, widerspricht jedoch Feststellungen von Heller und Polig (Hel48, Pol76), welche die Knochenquerbänder als toten Knochen bezeichneten bzw. die Querbandbildung einer mangelnden Resorptionstätigkeit zuschrieben. Die beiden letztgenannten Autoren beobachteten diese Veränderungen aber nach weit höheren Aktivitätsdosen und hatten auch nicht die Möglichkeit Vitalmarkierungsmethoden anzuwenden. Knochennekrosen und leere Osteozytenlakunen wie sie in der Literatur teilweise beschrieben werden (Jee72) fanden sich nicht, die Zusammensetzung der Knochenzellpopulation an der Oberfläche veränderte sich jedoch bis hin zu den beschriebenen peritrabekulären Fibrosen.

Neben diesen explicit histopathologischen Veränderungen, stellte sich auch eine deutliche Verminderung der Trabekelmasse, d.h. eine Osteoporose ein, welche sehr deutlich auch bei den Tiergruppen in Erscheinung trat, die keine ins Auge fallenden Gewebsschäden aufwiesen, also insbesondere auch bei den jugendlichen Tieren. Sie war vor allem in der Femurepiphyse und im Lendenwirbelkörper nachweisbar. Diese Befunde werden Gegenstand des morphometrischen Abschnitts der Diskussion sein.

Die Schäden am Knochenmark stimmen mit den in der Literatur bei teilweise weit höheren Dosen beschriebenen weitgehend

überein. Es manifestierte sich zu frühen Zeitpunkten, abhängig von der Dosis, eine "Entzündung" durch die Strahlenwirkung, gekennzeichnet von starker Hyperämie der Sinus und Verquellung des mesenchymalen Stromas, die später in den betroffenen Bezirken in eine Aplasie der blutbildenden Zellen mit Substitution durch Fettzellen übergeht. Die Strahlensensibilität scheint dabei in folgender Weise abzunehmen: leukopoietische Zellen > erythropoietische Zellen > Mesenchymzellen (Stroma), da in der zeitlichen Abfolge zunächst noch erythropoietische Inseln persistieren. Das Knochenmarkstroma bleibt selbst in stark belasteten Bereichen bestehen und bildet im Verlauf des Wachstums die Grundlage der Neubesiedlung der jungen Metaphyse mit blutbildenden Zellen. Aus Untersuchungen von Schoeters und van den Heuvel (Scho85, Heu85) geht hervor, daß die Proliferationsaktivitäten von Mesenchymzellen (CFUs) und leukopoietischen Zellen (CFUc) sich durch innere Bestrahlung mit ^{241}Am in Abhängigkeit von der Mikroverteilung der Dosis und der Knochenstruktur der Entnahmestelle vermindern, bzw. daß Stromazellen nach Strahlenexposition die Proliferation und Differenzierung der weißen Zelllinien nicht mehr vollständig unterstützen. Somit sind die Knochenmarksschäden wahrscheinlich nicht ausschließlich auf direkte Strahlenwirkung, sondern auch auf Veränderungen der Regulationsmechanismen der Knochenmarksproliferation zurückzuführen. Die Veränderung der Blutzellzahlen, insbesondere der weißen Blutkörperchen, gründen sich somit möglicherweise ebenfalls auf funktionelle Störungen der Knochenmarksregulation, da sie sowohl bei morphologisch weitgehend intaktem (bei jugendlichen Tieren) als auch bei zum großen Teil zerstörtem Mark (jung-erwachsene Tiere) nachzuweisen ist. In der mit 222kBq am höchsten belasteten Gruppe der jung-erwachsenen scheint das Knochenmark weitergehend geschädigt zu sein, da sich die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut hier bis zum Ende des Versuchszeitraumes nicht erholt hat.

Die komplexen räumlichen und physiologischen Wechselwirkungen von Knochengewebe und Knochenmark wurden jüngst von Vaughan (Vau81) in einer Übersicht dargestellt und sind weiterhin

Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Während die mononukleäre Abstammung der Zellen des Knorpel- und Knochenabbaus noch sehr kontrovers diskutiert wird (Hor85, Zal85), scheint gesichert, daß die Zellen der Knochenbildung mesenchymalen Ursprungs sind, d.h. dem Knochenmarksstroma entspringen. Dies bestärkt den Autor in der Ansicht, daß die peritrabekulären Fibrosen an den hochbelasteten Trabekeln zumindest teilweise vom Knochenmarkstroma mitgetragen werden.

Die auffallend starke Hämosiderose in den veränderten Knochenmarksbereichen mit teilweise sehr großen Granula, welche auch mit Aktivität beladen waren, wurde auch bei Beno im Mark mit Plutonium behandelte Kaninchen gefunden (Ben68). Er versuchte nachzuweisen, daß der Grad der Hämosiderose von der Stärke der inneren Bestrahlung abhängt. In der Einlagerung von Aktivität in das Hämosiderin zeigt sich weiterhin nochmals der enge physiologische Zusammenhang zwischen Knochen und Knochenmark in Hinsicht auf die Knochenresorption und den Abtransport resorbierten Materials über mononukleäre Zellen (Pri80). Diese sind auch maßgeblich an der Entstehung von Hämosiderin beim Abbau der durch die Strahlung geschädigten erythropoietischen Zellen beteiligt. Zusätzlich wird die große Affinität von Plutonium zu eisenbindenden Proteinen deutlich.

Für die Tumorinduktion ist meiner Meinung nach die vor allem bei den jung-erwachsenen Tieren ausgeprägte, qualitativ festzustellende Änderung der Population der Knochenoberflächenzellen in Richtung Mesenchymzellvermehrung bis hin zur peritrabekulären Fibrose von großer Bedeutung. Ein solches Verhalten bewirkt die vermehrte Strahlenexposition pluripotente Zellmaterials, mit der Möglichkeit der Transformation proliferationsaktiver Populationen. Leider sind die Literaturdaten zur Strahlenkarzinogenese durch Plutonium und andere Aktiniden bei der Ratte spärlich, und es gestaltet sich vor allem recht schwierig auf dosimetrischem Niveau Vergleiche zu ziehen, selbst wenn man die Feinverteilung der Nuklide unberücksichtigt läßt.

Volf (Vol79) hat dies anhand von Literaturdaten (Sin76, Mah75) versucht, wobei im Hinblick auf vorliegende Arbeit

sich als wesentliche Punkte die um den Faktor 2 höhere absolute Tumorzinzidenz bei "erwachsenen" männlichen Ratten und die in dieser Gruppe um den Faktor 4 höhere Dosisleistung gegenüber jugendlichen Tieren, bei Verabreichung derselben Aktivitätsdosis pro kg Körpergewicht hervorheben lassen.

4.3.2 Bewertung der quantitativen Befunde

4.3.2.1 Zur Genauigkeit der Methodik

Am Beginn dieses Kapitels soll zunächst auf die Genauigkeit und Bedeutung der histomorphometrischen Methodik eingegangen werden. Der Zweck solcher Untersuchungen besteht einerseits darin, Eindrücke des Betrachters zu objektivieren (z.B. den Schwund der Trabekelmasse), andererseits nicht sofort auffällige Veränderungen sichtbar zu machen.

Zwei Punkte, die wesentlich zur Qualität der Ergebnisse beitragen, sind hierbei die Genauigkeit der Meßmethodik und die Subjektivität des Untersuchenden (Mal82, Com86). Der erste Punkt hängt weitgehend von der zur Verfügung stehenden gerätlichen Einrichtung ab und ist innerhalb eines Labors ohne große Bedeutung. Aus dem zweiten Punkt ergeben sich Differenzen zwischen einzelnen Messungen desselben Untersuchers (intra observer error) bzw. zwischen den Messungen verschiedener Untersucher des gleichen Labors (inter observer error). Die Größe dieser Abweichungen hängt zusätzlich von dem zu bestimmenden Merkmal ab.

In dieser Arbeit wurde der intra observer error durch Vergleich zweier Messungen der gleichen Präparate zu verschiedenen Zeitpunkten, der inter observer error durch Vergleich der Messungen gleicher Präparate durch den Autor und eine technische Assistentin bestimmt. Es zeigte sich, daß für die statischen Parameter wie Knochenumfang und -fläche beide Arten von Fehlern geringer waren (zwischen 5% und 15% mittlere Abweichung) als für die dynamischen, bei welchen vor allem der Umfang der markierten Resorptionslakunen hohe Fehler (bis $\pm 200\%$ inter observer error bei ungeübtem Betrachter) aufwies.

Trotzdem erwies sich die quantitative Methodik als fähig, insbesondere hinsichtlich der dynamischen Morphometrie, funktionelle Abläufe des Knochenstoffwechsels besser zu erfassen. Der Vergleich von Daten verschiedener Labors untereinander wird jedoch, bis zur Vereinheitlichung der morphometrischen Methodik und Parameter, immer schwierig bleiben.

4.3.2.2 Parameter des Längenwachstums

Das Längenwachstum des distalen Femur, der hier stellvertretend für die anderen Knochen steht, welche hauptsächlich aus Epiphysenfugen wachsen, wird durch vorliegende injizierte Aktivitätsdosen kaum beeinträchtigt. Statistisch nachweisbare Verminderungen der Wachstumsrate gibt es nur vereinzelt und initial bei den höher belasteten jung-erwachsenen Tieren.

Auch Pömsl (Pöm74) fand bei Verabreichung vergleichbarer Dosen $^{227}\text{Thorium}$ (185kBq/kg) an männliche Mäuse keine Wachstumsrückstände, wohl aber bei Behandlung von weiblichen Tieren. Längle hingegen (Län87) stellte bei den jugendlichen Tieren durch Längenmessung des gesamten Femur einen Wachstumsrückstand fest, der durch Berechnung des mittels der Fluoreszenzmethode bestimmten kumulativen Wachstums nicht zu verifizieren war. Es zeigte sich dabei weiterhin, daß das Längenwachstum des Femur nahezu vollständig aus der distalen Epiphysenfuge erfolgt.

Diese nur geringe Störung der Wachstumsrate ist für die Feinverteilung des Nuklides, für die Dosisverteilung und somit für die Schadensverteilung am Knochen und im Knochenmark der Metaphysen von vorne schon betonter eminenter Bedeutung. Ein Vergleich des kumulativen Längenwachstums mit den Abständen von Aktivitäts- und pathologischem Knochenband von der Epiphyse zeigt ein Zurückbleiben der beiden Gebilde am Ort ihrer anfänglichen Ablagerung bzw. Entstehung, wobei sich die Knorpelfuge samt Epiphyse durch das Wachstum davon entfernt (Tab.23). In diesem Zusammenhang fallen die geringen

Unterschiede zwischen Aktivitätsbandentfernung von der Epiphyse und kumulativem Wachstum auf, während das pathologische Knochenband wesentlich näher an der Knorpelfuge zu finden ist. Dies stützt die vorne gemachte Feststellung, daß das Knochenband sich außerhalb der stark belasteten Metaphysenteile erst eine gewisse Zeit nach der Inkorporation formiert. Aus diesem Grund findet sich in diesen Gebilden auch nur wenig Radioaktivität.

Wie das Längenwachstum, ist auch die Struktur, aus der es hervorgeht, die Epiphysenfuge, durch die Einlagerung des Nuklides nur wenig betroffen. Weder die Breite des Fugenknorpels, noch die Höhe der hypertrophischen Knorpelzellen oder die Knorpelzellproduktionsrate zeigen einschneidende Veränderungen.

Am Ende dieses Kapitels soll nun noch der Vergleich der bei den Kontrolltieren ermittelten Werte der behandelten Parameter mit Daten aus der Literatur stehen, da es von großer Bedeutung für alle den Knochen betreffenden Untersuchungen ist, zunächst die physiologischen Werte der Knochenentwicklung zu kennen. Leider fanden sich hierbei keine Angaben über den Femur von Ratten, da solche Untersuchungen vor allem an der Tibia vorgenommen wurden, so daß für diesen Knochen eine größere Anzahl von Publikationen vorliegen. In den Tabellen 24 und 25 wurden die Werte der Längenwachstumsrate und Knorpelfugenbreite der proximalen Tibia von verschiedenen Autoren für männliche und weibliche Ratten aufgelistet und den eigenen Ergebnissen gegenübergestellt. Es zeigt sich, daß die Knorpelfuge des distalen Femur etwas mächtiger angelegt ist, und daß seine Wachstumsrate derjenigen der proximalen Tibia weitgehend entspricht. Auch bei den Knorpelzellparametern findet sich solche Gemeinsamkeit (Uen85, Jee85, Fur86). Die große Schwierigkeit bei der Gegenüberstellung von Literaturdaten ist die häufig mangelhafte Angabe über das Alter, in älteren Arbeiten (Tap66) sogar über das Geschlecht der Tiere. Gerade dies ist jedoch bei jungen, schnellwachsenden Tieren, wie sie in der Regel zu Versuchszwecken herangezogen werden, von großer Bedeutung.

4.3.2.3 Merkmale des Knochenstoffwechsels

Für das Verständnis der Pathogenese von verschiedenen Knochenerkrankungen ist die quantitative Kenntnis des Knochenstoffwechsels von entscheidender Wichtigkeit. Am Menschen sind in jüngerer Zeit viele Daten der statischen und dynamischen Histomorphometrie mittels Fluoreszenzmarkierung mit Tetrazyklinen und Beckenkammbiopsie ermittelt worden (Lit. bei Fro81, Voi84). Dies führte im Hinblick auf den Gleichgewichtsstoffwechsel des erwachsenen Menschen zum Frost'schen Modell der Kopplung von Resorption und Knochenbildung in sogenannten basic multicellular units (BMU) als Stoffwechsellpakete über dem zellulären Niveau (Lit. bei Fro84).

Für Versuchstiere sind solche Daten in wesentlich geringerem Maße erhoben. Kimmel (Kim82) hat in einer umfangreichen Arbeit den Knochenumsatz in verschiedenen Bereichen des Skeletts von jung-erwachsenen Beagle-Hunden untersucht. Er stellte fest, daß das Skelett sich in Bereiche hohen und niedrigen Stoffwechsels einteilen läßt, und daß selbst in einem Knochen verschiedene Teile sich in ihrem Umsatz unterscheiden. Diese Veröffentlichung lieferte auch die Grundlagen der hier eingesetzten rechnerischen Stoffwechselschätzungen.

In bezug auf den Stoffwechsel der Spongiosa im Rattenskelett sind bisher nur wenige Untersuchungen an verschiedenen Knochen gemacht worden (Tra82, Bar84, Son85). Die beiden erstgenannten Autoren finden dabei auch Hinweise auf oben beschriebene Form des an BMUs gebundenen Knochenumbaus. Ein solches Verhalten konnte in den hier untersuchten Knochen nicht festgestellt werden, da es sich in dieser Arbeit um relativ junge Tiere mit noch starkem Zuwachs an Knochenmasse handelte. Auch Frost (Fro81) selbst bezweifelt das Vorhandensein von BMUs in kleinen Labortieren. Deren Knochen unterliegen lange Zeit der Knochenformung (modeling), insbesondere auch in den Altersstufen, in welchen sie zu Versuchen herangezogen werden. Dabei findet über große Perioden an bestimmten Stellen nur Knochenanbau, in anderen Bereichen -abbau statt (Par84). Aus den selbst gewonnenen Daten für Femur-

epiphyse und Lendenwirbelkörper der Kontrolltiere (Tab.22) geht hervor, daß

- 1) das Trabekelvolumen und die innere Oberfläche zwischen 7. und 9. Lebenswoche wesentlich ansteigen, ab der 9. Lebenswoche jedoch ziemlich stabil bleiben;
- 2) die spezifische Oberfläche stetig leicht abnimmt. Dies ist Ausdruck einer Zunahme der Breite der Knochenbälkchen mit zunehmendem Alter der Tiere (Pol84);
- 3) die Werte der Merkmale der dynamischen Morphometrie sich mit fortschreitendem Alter stetig verringern, wobei die Knochenbildungsrate einer einfachen ($r=-0,842$), die Mineralisationsrate einer Potenzfunktion ($r=-0,881$) folgt.

Im Vergleich der beiden Knochenteile zeigen sich nur größere Unterschiede der Oberflächen. Hier weist die Femurepiphyse geringere Werte auf.

In der Literatur finden sich für die oben aufgeführten Merkmale nur wenige vergleichbare Daten. Sonntag (Son85) beschreibt ebenfalls eine Abnahme der spezifischen Oberfläche bei Zunahme des Knochenvolumens in der Epiphyse, wobei die absoluten Werte jedoch die in dieser Arbeit gefundenen überschreiten. Auch das Verhalten der Knochenbildungsrate ist mit dem hier beschriebenen im Einklang. Für die Mineralisationsrate des trabekulären Knochens sind in Tabelle 26 die Ergebnisse verschiedener Autoren im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen zusammengefaßt.

Stellt man nun die Befunde der Kontrolltiere denjenigen der mit Plutonium behandelten gegenüber, ergibt sich folgendes Bild:

Es kommt weitgehend unabhängig von den hier angewandten Aktivitätsdosen zu einem Verlust trabekulären Knochens, d.h. zu einer Osteoporose, welche einhergeht mit einer Verminderung der inneren Oberfläche.

Da sich diese beiden Parameter gleichzeitig und gleichsinnig ändern, gibt es hinsichtlich der spezifische Oberfläche nur geringe Unterschiede zwischen aktiven und Kontrolltieren, d.h. die Feinheit der Trabekelstruktur bleibt erhalten und es

kommt nicht zur Verplumpung der Knochenbälkchen, wie andere Autoren es (für meist wesentlich höhere Aktivitätsdosen) fanden (Pol76, Pol84).

Dieses Verhalten der statischen Parameter läßt sich schlüssig aus den Veränderungen der dynamischen Merkmale herleiten. So zeigte sich, daß der Knochenanbau, vertreten durch die doppelt markierte Oberfläche (DO%), die Mineralisationsrate (MR) und die Knochenbildungsrate (KBR) bei den untersuchten aktiven Tieren eine leichte Steigerung erfährt, während die osteoklastische Aktivität sich wesentlich mehr erhöht. Insgesamt resultiert aus dieser allgemeinen Stoffwechselaktivierung also ein Netto-Knochensubstanzverlust der Spongiosa. Ob diese Steigerung des Knochenumsatzes durch Aktivierung der Zelleistung oder durch erhöhte Proliferationsaktivität geschieht ist unklar. Daß es sich hierbei um einen Strahlungseffekt handelt, dürfte unbestritten sein, da die verabreichte Masse des Nuklides (16 bzw. 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$) äußerst gering ist. Andere, nicht radioaktive Metalle wie Aluminium (Ver85a), Eisen (Ver85b) oder stabiles Strontium (Mar85) üben durch Einbau in die Knochensubstanz ebenfalls Effekte auf die Knochenbildung und Mineralisation aus, wobei wesentlich höhere Konzentrationen des Metalles notwendig sind um Veränderungen zu erzeugen und auch kein gemeinsames Reaktionsmuster des Gewebes mit den hier vorliegenden Ergebnissen erkennbar wird.

Insgesamt entsteht der Eindruck, daß das Knochengewebe versucht, durch die Aktivierung des Stoffwechsels und die Mechanismen der Begrabung und der Resorption den Strahler von seinen kritischen Zellpopulationen zu entfernen. Wo ihm dies nicht schnell genug gelingt, bilden sich morphologische Schäden aus, welche eher das Gegenteil bewirken. Weiterhin führt dieses Verhalten zu einer stärkeren Belastung des Knochenmarkes, in dem das mobilisierte Nuklid kumuliert.

Ob die Regulation dieser Vorgänge lokal oder systemisch geschieht bedarf weiterer Aufklärung. Es wäre vorstellbar, daß strahlenbedingte entzündliche Effekte am Knochenmark durch Freisetzung von Mediatoren den Knochenstoffwechsel auf beide Arten beeinflussen. So fand Minne (Min84) bei auch nicht mit

dem Skelett assoziierten Entzündungen einen Knochenschwund. Um diese Unklarheiten auszuräumen, müssen weitere detaillierte Studien, insbesondere der hormonellen Situation und der Zellkinetik des Knochengewebes nach Nuklidinkorporation in Angriff genommen werden.

4.3.2.3 Zellzählung in der Metaphyse

Die Bestimmung der Knochenzellpopulation im distalen Bereich der Metaphyse konnte die qualitativ gewonnenen Eindrücke einer initialen Erhöhung der Osteoklastenzahl nur unterstützen aber nicht statistisch sichern. Es zeigte sich auch, daß zu frühen Zeitpunkten nach der Inkorporation die Osteoblasten- und Mesenchymzellzahlen der untersuchten Region leicht abnahmen. Dies bedeutet, daß letztgenannte Zellgruppen eine größere Strahlensensibilität aufweisen als die Klasten, die eher invers reagieren. Die Aktivierung des Knochenabbaus deutet auch hier darauf hin, daß das Gewebe versucht durch Verstärkung eines physiologischen Vorganges (Abbau des Knochens der distalen Metaphyse) die Radioaktivität zu dekorporieren.

Weiterhin war eine altersabhängige Abnahme der Osteoblastenzahl gekoppelt mit der Zunahme mesenchymaler Zellen festzustellen. Dies steht im Einklang mit der sukzessiven Verringerung von Knochenwachstum und -stoffwechsel, wie sie durch die Vitalmarkierung nachgewiesen werden konnte.

5. Zusammenfassung

Durch den verbreiteten Einsatz von Kernkraftwerken zur Deckung unseres Energiebedarfes entsteht neben anderen strahlenden Restprodukten auch das Element ^{239}Pu Plutonium, welches, nach weiterer Aufbereitung, für verschiedene Zwecke technologisch genutzt werden kann. Die Inkorporation dieses alphastrahlenden Nuklids stellt ein großes gesundheitliches Risiko dar. Insbesondere bestehen die Spätfolgen der Aufnahme kleiner Mengen in der Entwicklung von strahlenbedingten Geschwülsten, vor allem von Osteosarkomen. Diese Arbeit beschreibt die noch wenig untersuchten frühen Knochenveränderungen nach Verabreichung solch kleiner, optimal kanzerogener Plutoniummengen bei Ratten in Abhängigkeit von der aufgenommenen Aktivität und dem Alter der Tiere bei Inkorporation.

Zu diesem Zweck wurden geeignete histologische Methoden der Bearbeitung des unentkalkten Knochengewebes, sowie für Färbung und Autoradiographie der Knochenschnitte eingeführt bzw. adaptiert. Das Knochenwachstum und der Knochenstoffwechsel wurde mittels Vitalmarkierung mit Calcein sichtbar gemacht. Für die histomorphometrische Quantifizierung der Knochenstruktur und des Knochenumsatzes wurde ein halbautomatisches System mit Digitalisierer und Minicomputer samt Programmen realisiert.

In Hinsicht auf die Nuklidretention und Dosimetrie zeigte sich, daß die älteren Tiere mehr Plutonium im Skelett zurückhielten, sich die Nuklidkonzentrationen analog der Zunahme der Knochenmasse in beiden Altersgruppen unterschiedlich verhielten, daß jedoch letztlich die älteren Tiere trotz übereinstimmender injizierter Aktivität pro Gewichtseinheit im Vergleich zu den jugendlichen Tieren eine fast dreifache Strahlenbelastung hinnehmen mußten. Auch konnten autoradiographisch deutliche Unterschiede der räumlichen Nuklidverteilung zwischen den beiden untersuchten Altersgruppen nachgewiesen werden.

Qualitativ faßbare histopathologische Befunde am distalen Femur und Lendenwirbelkörper reichten von osteoporotischen Veränderungen der Spongiosa bis hin zu schweren Störungen der Knochenstruktur im Bereich der Femurmetaphyse, peritrabekulären Fibrosierungen sowie Aplasie und Hämosiderose des Knochenmarks, wie sie bei Nuklidosen dieser Größenordnung bisher nicht beschrieben wurden. Sie waren deutlich von der Strahlendosis im Knochen und vom Alter der Versuchstiere, das den Verteilungsmodus des Nuklides bestimmte, abhängig.

Der Entstehungsmechanismus der Knochenstrukturveränderungen konnte durch Einsatz von Vitalmarkierungsmethoden geklärt werden. Die statische und dynamische Morphometrie zeigte keine wesentliche Beeinflussung des Längenwachstums und der Epiphysenfugen des Knochens durch die verabreichten Aktivitätsmengen. Die Entstehung des Knochensubstanzverlustes konnte einer Steigerung der Knochenresorption bei unverminderter, eher leicht erhöhter Knochenbildung zugeordnet werden. Die quantitativen Untersuchungen der Zellpopulation der distalen Femurmetaphyse deuten in die gleiche Richtung.

Durch die innere Bestrahlung ergibt sich also eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität des Knochens bzw. verändert sich seine Zellpopulation und diejenige des Knochenmarkes in Richtung auf die Vermehrung mesenchymaler Zellen. Beide Faktoren vergrößern die zur Bestrahlung verfügbare sensitive und transformierbare Population wenig differenzierter Zellen. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung bei diesen optimal kanzerogenen Dosen.

Summary

The broad application of nuclear power to supply electric energy brings up many problems concerning radioactive wastes. ^{239}Pu Plutonium is one of these by-products of nuclear industry which may be used in technical amounts after reprocessing in special facilities. Contamination with this α -emitter represents a considerable risk. Incorporation of the nuclide especially in low doses causes bone tumour development as a late effect.

This work describes the poorly investigated early bone changes in rats after injection of such low, optimal carcinogenic amounts of ^{239}Pu (37 - 111kBq/kg) and their dependence on the age of the animals at time of incorporation.

Convenient histological methods for embedding, cutting and staining undecalcified bone as well as autoradiographic processing have been developed or adapted. Bone growth and metabolism have been visualized by vital staining with Calcein fluorescent dye. Histomorphometric quantification of bone structure and modeling was done by means of a semi-automated system with digitizer and minicomputer.

The experiments revealed that the retention of the nuclide was higher in elder animals and that there was a difference in behaviour of nuclide concentration according to the faster or slower increase of bone mass in young or young-adult animals and in different bones. Lately the skeleton of elder animals received an about three times higher radiation dose compared to that of the younger ones at the same amount of nuclide per bodymass. Big differences in the distribution of the nuclide could be detected between the two age groups autoradiographically.

Histopathological findings in the distal half of the femur and in lumbar vertebrae comprised osteoporotic changes of spongy bone, heavily disturbed metaphyseal structures as well as peritrabecular fibrosis of bone and aplasia and hemoside-

rosis of bone marrow. There was a marked dependence of the above features on age and distribution of the nuclide.

Static and dynamic histomorphometry elucidated the mechanisms of induction of changes in bone structure and metabolism. There was no obvious alteration of growth in length and in width of epiphyseal plates, but there was a rise in osteoclastic activity combined with a stable or slightly increased bone formation rate in trabecular bone which resulted in osteoporosis. Quantitative parameters of bone cell population in the distal metaphysis of the femur pointed in the same direction.

Thus, the incorporation of these small amounts of plutonium causes an increase in metabolic activity of bone and a change of cell population of bone and bone marrow towards an increase of mesenchymal cells.

Both factors are augmenting the sensitive and transformable pool of poorly differentiated cells at radiation risk which increases the probability of malignant transformation at these optimal carcinogenic dose levels

6. Tabellen und Abbildungen

Tab. 1:
 Dosisbereiche und Nuklide, die zu histologisch erkennbaren Fröhschäden am
 (wachsenden) Knochen führen

Autor	Spezies	Nuklid	Dosis	Grad
Heller '48	Ratte	^{239}Pu	4,6MBq/kg	sehr stark
			3,7MBq/kg	LD-50/30d
			2,2MBq/kg	sehr stark
			1,1MBq/kg	sehr stark
			555 kBq/kg	stark
			296 kBq/kg	stark
Jee '62	Hund	^{239}Pu	104 kBq/kg	mittelgradig
			4,5kBq/kg	schwach
Clarke '62	Schwein	^{239}Pu	48 kBq/kg	stark
Jee '72	Hund	^{239}Pu	0,6kBq/kg	sehr schwach
Pömsl '74	Maus	^{227}Th	1850 kBq/kg	stark
			185 kBq/kg	schwach
Mahlum und Sikov '74 '76	Ratte	^{239}Pu	> 3,3MBq/kg	LD-50/30d
			3,0MBq/kg -	
			222 kBq/kg	
Polig '76	Ratte	^{241}Am	1,1MBq/kg	stark
Moskalev '79	Ratte	^{237}Np	185 kBq/kg iv	stark
			185 kBq/kg itr	mittelgradig
			74 kBq/kg itr	mittelgradig
			111 kBq/kg -	
			0,2kBq/kg tgl.	stark
Priest '83	Ratte	^{241}Am	10 kBq/Ratte	kein Schaden
			1,9kBq/Ratte	kein Schaden

iv = intravenös; itr = intratracheal; tgl. = täglich

Tab. 2: Nuklidretention in Leber und Nieren von jugendlichen und jung-erwachsenen männlichen Ratten nach Inkorporation verschiedener Mengen ^{239}Pu

Tage nach Injektion		7	14	28	56	112	
jugendliche	1x111kBq/kg	8,03±0,76	4,60±0,17	2,86±0,16	1,67±0,26	1,99±0,44	a) Leber
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			2,06±0,34	1,42±0,10	1,59±0,11	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		3,53±0,69	1,95±0,12	1,59±0,17	1,38±0,11	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		4,78±0,64	2,02±0,23	1,53±0,12		
jugendliche	3x 37kBq/kg			4,85±0,62	2,18±0,67	1,39±0,23	
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			2,56±0,34	1,51±0,25	1,68±0,26	
jugendliche	1x111kBq/kg	0,58±0,08	0,53±0,02	0,25±0,002	0,31±0,03	0,30±0,002	b) Nieren
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			0,32±0,03	0,22±0,01	0,26±0,01	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		0,54±0,02	0,38±0,01	0,23±0,02	0,26±0,02	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		0,88±0,05	0,60±0,03	0,41±0,01		
jugendliche	3x 37kBq/kg			0,38±0,03	0,35±0,02	0,32±0,03	
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			0,51±0,04	0,29±0,04	0,30±0,02	

% der injizierten Dosis; Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes von 3 Tieren pro Zeitpunkt und Gruppe

a) von ca 3g Leber auf Gesamtleber extrapoliert; b) Wert einer Niere x2

Tab. 3: Retention von ^{239}Pu in Femur und drittem Lendenwirbel junger und jung-erwachsener männlicher Ratten

Tage nach Injektion		7	14	28	56	112	
jugendliche	1x111kBq/kg	2,74±0,07	2,54±0,11	2,58±0,22	2,56±0,08	2,14±0,10	Femur
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			2,97±0,11	2,74±0,18	2,53±0,17	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		3,45±0,10	3,11±0,06	2,80±0,08	2,57±0,10	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		3,25±0,07	3,31±0,06	2,90±0,05		
jugendliche	1x111kBq/kg	0,79±0,02	0,74±0,01	0,74±0,05	0,69±0,03	0,62±0,05	Wirbel
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			1,06±0,05	0,93±0,06	1,06±0,05	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		1,28±0,02	1,09±0,03	0,93±0,04	0,94±0,02	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		1,25±0,04	1,05±0,03	1,03±0,02		
jugendliche	3x 37kBq/kg			3,19±0,04	2,47±0,11	2,26±0,09	Femur
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			3,18±0,11	2,86±0,08	2,78±0,12	
jugendliche	3x 37kBq/kg			1,03±0,05	0,77±0,04	0,68±0,01	Wirbel
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			1,26±0,01	1,18±0,11	1,04±0,02	

% der injizierten Dosis; arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes von 3 Tieren pro Zeitpunkt und Gruppe

Tab. 4: Nuklidkonzentration in Femur und drittem Lendenwirbel jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten nach Inkorporation verschiedener Mengen ^{239}Pu

Tage nach Injektion		7	14	28	56	112	
jugendliche	1x111kBq/kg	5,08±0,27	4,16±0,21	3,21±0,29	2,53±0,12	1,88±0,13	Femur
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			2,79±0,07	2,53±0,10	1,93±0,14	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		3,24±0,06	2,79±0,07	2,39±0,12	2,07±0,16	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		3,08±0,09	2,70±0,16	2,16±0,06		
jugendliche	1x111kBq/kg	5,82±0,04	3,65±0,21	2,86±0,14	1,90±0,06	1,36±0,19	Wirbel
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			2,85±0,26	2,90±0,09	2,09±0,02	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		3,41±0,09	2,57±0,23	2,43±0,17	2,20±0,23	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		2,76±0,22	2,23±0,11	2,21±0,10		
jugendliche	3x 37kBq/kg			3,63±0,07	2,12±0,12	1,82±0,07	Femur
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			2,99±0,13	2,63±0,23	2,23±0,10	
jugendliche	3x 37kBq/kg			3,21±0,03	1,87±0,09	1,49±0,11	Wirbel
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			3,44±0,02	3,25±0,29	2,39±0,12	

% der injizierten Dosis/ Gramm Knochenfrischmasse; arithmetischer Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes von 3 Tieren pro Zeitpunkt und Gruppe

Tab. 5: Dosisleistung in Femur und drittem Lendenwirbel jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten nach Inkorporation verschiedener Mengen ^{239}Pu

Tage nach Injektion		7	14	28	56	112	
jugendliche	1x111kBq/kg	4,83	3,95	3,05	2,40	1,79	Femur
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			14,22	12,89	9,84	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		8,13	7,00	5,99	5,19	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		2,81	2,47	1,99		
jugendliche	1x111kBq/kg	5,53	3,47	2,72	1,81	1,29	Wirbel
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			14,52	14,78	10,65	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		8,55	6,45	6,10	5,52	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		2,52	2,04	2,01		
jugendliche	3x 37kBq/kg			2,97	1,74	1,49	Femur
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			7,74	6,81	5,77	
jugendliche	3x 37kBq/kg			2,63	1,53	1,22	Wirbel
jung-erwachsene	3x 37kBq/kg			8,90	8,41	6,18	

Berechnet in cGy/d (rad/d) aus den Mittelwerten der Nuklidkonzentration (s. Abschnitt 2.3)

Tab. 6: Kumulative Strahlendosen in Femur und drittem Lendenwirbel jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten nach Inkorporation verschiedener Mengen ^{239}Pu

Tage nach Injektion		7	14	28	56	112	
Tiergruppen							Knochen
jugendliche	1x111kBq/kg	33,8	64,6	113,6	189,9	307,2	Femur
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			398,2	759,1	1310,1	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		113,8	219,7	401,5	714,5	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		39,3	76,3	138,7		
jugendliche	1x111kBq/kg	38,7	70,2	113,5	177,0	263,8	Wirbel
jung-erwachsene	1x222kBq/kg			406,6	820,4	1416,8	
jung-erwachsene	1x111kBq/kg		119,7	224,7	400,4	717,5	
jung-erwachsene	1x 37kBq/kg		35,3	67,2	123,9		

Werte in cGy (rad); Berechnung siehe Abschnitt 2.3

Tab. 7: Wirkung der Dekorporationstherapie mit Zn-DTPA im Trinkwasser auf Retention und Nuklidkonzentration von ^{239}Pu in Femur und drittem Lendenwirbel junger und jung-erwachsener männlicher Ratten.

	Retention	Konzentration	
jugendliche	71,3	74,7	Femur
jung-erwachsene	78,8	73,5	
jugendliche	61,8	63,7	Wirbel
jung-erwachsene	92,3	82,4	

inkorporierte Aktivitätsmenge $3 \times 37 \text{ kBq} (3 \times 1 \mu\text{Ci}) / \text{kg KG}$;

% der unbehandelten Kontrolltiere

Tab. 8: Verschiedene klinische Parameter jugendlicher männlicher Ratten
nach Inkorporation von ^{239}Pu

Inkorp. Strahlenmg.	d nach Inj.	Erythrozyten $\times 10^6/\mu\text{l}$	Leukozyten $\times 10^3/\mu\text{l}$	Alkalische Phosphatase U/l	Körpergewicht g
1x111kBq/kg Kontrolle	7	3; 4,27 \pm 0,54	3; 5,64 \pm 2,50	3; 598,9 \pm 151,1	3; 180,3 \pm 15,2
		3; 4,22 \pm 0,49	3; 4,97 \pm 0,44	3; 611,0 \pm 168,9	3; 191,7 \pm 11,6
1x111kBq/kg Kontrolle	14	3; 4,96 \pm 1,04	3; 3,98 \pm 0,28 *	3; 517,7 \pm 54,8	3; 222,3 \pm 9,1
		2; 4,81 \pm 0,72	2; 8,43 \pm 1,29	2; 523,2 \pm 144,7	2; 231,5 \pm 9,2
1x111kBq/kg 3x 37kBq/kg Kontrolle	28	3; 3,82 \pm 0,29	3; 6,24 \pm 0,51 *	3; 397,5 \pm 46,6	3; 315,0 \pm 16,0
		3; 4,07 \pm 0,18	3; 6,97 \pm 1,74	3; 441,0 \pm 60,7	3; 346,3 \pm 2,9
		2; 5,27 \pm 1,66	2; 10,91 \pm 2,54	2; 399,1 \pm 12,2	2; 313,0 \pm 21,2
1x111kBq/kg 3x 37kBq/kg Kontrolle	56	3; 4,12 \pm 0,01	3; 5,23 \pm 1,33	3; 188,0 \pm 51,6	3; 392,3 \pm 35,6
		3; 4,74 \pm 0,28	3; 5,37 \pm 0,89	3; 152,1 \pm 46,8	3; 413,3 \pm 18,5
		3; 4,28 \pm 0,83	3; 6,96 \pm 0,38	3; 188,3 \pm 11,6	3; 395,7 \pm 61,0
1x111kBq/kg 3x 37kBq/kg Therapie Kontrolle	112	3; 4,50 \pm 0,55	3; 4,49 \pm 0,70	3; 184,7 \pm 27,6 *	3; 457,3 \pm 45,6
		3; 4,12 \pm 0,24	3; 4,49 \pm 0,70	3; 135,1 \pm 11,0	3; 533,0 \pm 39,2
		3; 5,06 \pm 0,28 *	3; 3,20 \pm 1,42	3; 149,8 \pm 15,7	3; 502,0 \pm 62,6
		4; 3,77 \pm 0,73	4; 3,65 \pm 1,80	4; 139,9 \pm 13,6	4; 501,3 \pm 57,5

Mittelwerte \pm SD; Zahlen vor dem Semikolon entsprechen dem Stichprobenumfang
* statistische Signifikanz $p < 0,05$; Therapie = 3x37kBq mit Zn-DTPA im Trinkwasser

Tab. 9: Verschiedene klinische Parameter jung-erwachsener männlicher Ratten
nach Inkorporation von ^{239}Pu

Inkorp. Strahlenmg.	d nach Inj.	Anz. Tiere	Erythrozyten $\times 10^6/\mu\text{l}$	Leukozyten $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hämoglobin konz. g/dl	Alkalische Phosphatase U/l	Körpergewicht g
1x 37kBq/kg	14	4	4,35 ± 0,39	4,99 ± 1,78*	17,2 ± 1,9	193,9 ± 118,1 (a)	366,3 ± 7,8
1x111kBq/kg		3	3,66 ± 0,47*	4,01 ± 0,29*	13,1 ± 0,1*		386,0 ± 25,2
Kontr. I		3	4,59 ± 0,28	7,21 ± 0,33	15,0 ± 0,5		387,7 ± 31,6
Kontr. II		4	4,78 ± 0,39	8,24 ± 1,03	18,1 ± 1,4		372,0 ± 31,0
1x 37kBq/kg	28	4	4,44 ± 0,33	4,56 ± 0,71*	15,7 ± 1,0	184,0 ± 60,7	437,5 ± 14,1
1x111kBq/kg		3	4,11 ± 0,01	3,37 ± 1,06*	14,3 ± 1,1	186,1 ± 21,8	427,0 ± 36,6
1x222kBq/kg		2	3,61 ± 0,29*	1,91 ± 0,93	12,7 ± 0,3*	250,7 ± 28,9	395,5 ± 13,4
3x 37kBq/kg		3	4,18 ± 0,16	2,10 ± 0,37*	13,8 ± 0,2*	172,7 ± 71,6	424,0 ± 30,5
Kontr. I		3	4,81 ± 0,46	8,01 ± 2,53	15,3 ± 0,4	212,5 ± 49,5	417,0 ± 38,1
Kontr. II		4	5,31 ± 0,66	8,44 ± 2,32	16,5 ± 1,9	178,6 ± 52,9	420,3 ± 33,4
1x111kBq/kg	56	3	4,20 ± 0,47	2,43 ± 1,29	13,7 ± 0,4	173,6 ± 33,1	485,7 ± 33,9
1x222kBq/kg		3	3,68 ± 0,26	1,59 ± 0,80*	13,6 ± 0,6	214,2 ± 71,7	489,0 ± 67,6
3x 37kBq/kg		3	3,95 ± 0,07	3,48 ± 1,16	12,8 ± 1,3	121,9 ± 21,4	463,7 ± 57,8
Kontr. I		3	3,70 ± 0,35	6,59 ± 2,84	14,7 ± 0,8	132,1 ± 24,7	450,3 ± 31,3
1x111kBq/kg	112	3	2,49 ± 0,33	4,97 ± 1,93	12,8 ± 0,5	145,2 ± 46,7	527,0 ± 70,8
1x222kBq/kg		3	3,20 ± 0,21	1,80 ± 0,43	12,8 ± 0,2	163,6 ± 22,9	499,7 ± 12,5
3x 37kBq/kg		3	3,03 ± 0,16	3,32 ± 1,73	13,3 ± 0,3	184,7 ± 58,7	527,3 ± 18,8
Therapie		3	2,78 ± 0,41	2,86 ± 0,85	12,5 ± 0,5	128,7 ± 33,3	562,0 ± 7,9
Kontr. I		3	2,85 ± 0,31	3,79 ± 1,71	13,5 ± 0,9	125,9 ± 30,5	562,3 ± 16,6

Mittelwerte ± SD; (a) nur 3 Tiere ausgewertet; * statistische Signifikanz $p < 0,05$, getestet wurde die 1x37kBq-Gruppe gegen Kontrolle II, die restlichen Gruppen gegen Kontrolle I

Tab. 10: Abstände des metaphysären Aktivitätsbandes und des Knochenbandes von der Epiphysenplatte bei jugendlichen und jung-erwachsenen männlichen Ratten (mm)

Tage nach Injektion	14	28	56	112
Aktivitätsband jugdl.				
3x 37kBq/kg		2,5±()	7,3±()	
1x111kBq/kg	2,8±0,6	6,5±0,4	9,6±0,2	10,8±1,2
Aktivitätsband erw.				
3x 37kBq/kg		1,2±0,1	2,5±0,1	4,0±0,2
1x 37kBq/kg	1,3±0,1	2,2±0,4	3,0±0,4	
1x111kBq/kg	1,5±0,3	2,4±0,1	3,7±0,3	4,7±0,8
1x222kBq/kg		2,2±0,1	3,4±1,6	4,8±0,1
Knochenband erw.				
3x 37kBq/kg		0,8±0,3	1,4±0,1	2,7±0,1
1x 37kBq/kg	0,7±0,1	1,4±0,3	2,2±0,3	
1x111kBq/kg	1,0±0,3	1,6±0,1	2,4±0,1	4,3±0,6
1x222kBq/kg		1,4±0,1	2,5±1,3	4,1±0,5

Mittelwerte ± S.D. zweier Tiere; () nur 1 Wert pro Gruppe

Tab. 11: Längenwachstum des distalen Femur jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten mit und ohne innere Bestrahlung durch ^{239}Pu (µm/d)

Tage nach Injektion	7	14	28	56	112
jugendliche Ratten					
1x111kBq/kg	290,0±()	250,5±3,5	177,5±26,2	62,3±7,2 ^a	19,2±0,3
Kontrollen	304,1±8,6	272,0±5,7	143,5±14,8	61,6±3,1 ^a	30,8±4,2
jung-erwachsene Ratten					
3x 37kBq/kg			62,4± 5,0	27,0± 1,0	14,1±0,1 [*]
1x222kBq/kg			41,4±12,7	29,9±13,6	10,5±5,1
1x111kBq/kg		79,1±16,4	44,8± 5,2 [*]	25,6± 3,3	19,7±1,3
1x 37kBq/kg ^b		76,0±10,9	78,3± 6,1	35,3± 1,6	
Kontrolle 1		110,4± 9,5	68,7± 1,5	34,5± 2,8	18,9±0,1
Kontrolle 2 ^b		86,5±16,5	69,6± 2,7	36,8± 1,8	

Mittelwerte ± SD zweier Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe; () Wert von nur einem Tier

^a 3 Tiere pro Gruppe; ^b separater Versuch mit jung-erwachsenen Tieren

* Signifikanz im t-Test $p < 0,05$

Tab. 12: Breite der Epiphysenfuge des distalen Femur jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten mit und ohne innere Bestrahlung durch ^{239}Pu Plutonium (μm)

Tage nach Injektion	7	14	28	56	112
jugendliche Ratten					
1x111kBq/kg	488,9±20,0	426,1±38,9	331,3±21,0	218,1±17,4 ^a	162,5± 9,4
Kontrollen	448,2±46,3	434,9±33,9	331,3±35,5	209,3±13,1 ^a	164,5±15,8
jung-erwachsene Ratten					
3x 37kBq/kg			247,0±40,9	181,7±12,7	143,1±10,8
1x222kBq/kg			219,1±25,7	157,0±31,9	142,7± 2,4
1x111kBq/kg		226,6±19,9	227,9± 3,0	184,3± 6,1	142,2± 0,6
1x 37kBq/kg ^b		212,5± 3,9	207,2±24,3	172,2± 0,8	
Kontrolle 1		303,4±28,8	237,7±16,3	192,1± 5,7	156,3± 7,3
Kontrolle 2 ^b		215,5± 8,3	206,0±38,0	175,6±31,8	

Mittelwerte ± SD zweier Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe; ^a 3 Tiere pro Gruppe;

^b separater Versuch mit jung-erwachsenen Tieren

Tab. 13: Höhe der hypertrophischen Knorpelzellen der Epiphysenfuge jugendlicher und jung-
 erwachsener männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation verschiedener Mengen
²³⁹Plutoniums (µm)

Tage nach Injektion	7	14	28	56	112
jugendliche Ratten					
1x111kBq/kg	29,3±0,4	28,6±3,2	22,7±1,8	17,6±0,5	13,6±0,8
Kontrollen	28,9±2,5	27,2±1,2	22,3±1,5	18,3±1,0	13,5±0,3
jung-erwachsene Ratten					
1x111kBq/kg		17,0±0,1	16,8±0,1	12,2±0,8	9,7±0,6
1x 37kBq/kg ^a		16,8±0,1	15,9±0,6	12,4±0,8	
Kontrolle 1		18,2±0,8	16,5±1,8	13,3±1,3	10,4±1,2
Kontrolle 2 ^a		17,8±0,3	13,6±1,2	12,7±0,9	

Mittelwerte ± SD zweier Tiere pro Gruppe; ^a separater Versuch mit jung-erwachsenen Tieren

Tab. 14: Knorpelzellproduktionsrate jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation von ^{239}Pu (Zellen/d)

Tage nach Injektion	7	14	28	56	112
jugendliche Ratten ^a					
1x111kBq/kg	9,9	8,8	7,8	3,5	1,4
Kontrollen	10,5	10,0	6,4	3,4	2,3
jung-erwachsene Ratten					
1x111kBq/kg		4,7±1,0	2,8±0,3	2,6±0,1	2,0±0,1
1x 37kBq/kg ^b		4,9±0,5	4,8±0,5	2,9±0,3	
Kontrolle 1		6,1±0,3	4,2±0,6	2,1±0,4	1,8±0,2
Kontrolle 2 ^b		4,5±0,9	5,1±0,7	2,9±0,2	

Mittelwerte ± SD zweier Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe; ^a berechnet aus den Mittelwerten für Längenwachstumsrate und Knorpelzellhöhe; ^b separater Versuch mit jung-erwachsenen Tieren

Tab. 15: Zusammenfassung der Werte von Knorpelfugenbreite, Längenwachstumsrate, Knorpelzellhöhe und Knorpelzellproduktionsrate des distalen Femur von Kontrolltieren unter der Annahme einer Altersdifferenz von 4 Wochen

Alter in Wochen	6	7	9	11	13	17	21	25
Knorpelfuge (μm)	448,2	434,9	331,3	303,4 215,5	209,3 237,7 206,0	192,1 175,6	164,5	156,3
Längenwachstums- rate ($\mu\text{m}/\text{d}$)	304,1	272,0	143,5	110,4 86,5	61,6 68,7 69,6	34,5 36,8	30,8	18,9
Höhe der hyper- trophischen (μm) Knorpelzellen	28,9	27,2	22,3	18,2 17,8	18,3 16,5 13,6	13,3 12,7	13,5	10,4
Knorpelzell- produktionsrate (Zellen/d)	10,5	10,0	6,4	6,1 4,5	3,4 4,2 5,1	2,1 2,9	2,3	1,8

Werte von jugendlichen Ratten: 6., 7., 9., 13., 21. Woche

Werte von Jung-erwachsenen : 11., 13., 17., 25. Woche

Tab. 16: Auswertung der Zellpopulation der distalen Femurmetaphyse (sekundäre Spongiosa) jugendlicher männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation von Plutonium (Zellen/mm² ausgewertete Fläche)

Tage nach Injektion		7	14	28	56		
Osteozyten (OZ)	1x111kBq/kg	100,1±38,7	155,5±21,5	150,7±51,5	75,5±17,7	Mittelwerte ± SD zweier Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe	
	Kontrolle	116,0±24,5	148,8±7,0	129,1±31,7	116,2±20,8		
Osteoblasten (OB)	1x111kBq/kg	123,6±24,4	187,1±20,4	160,3±72,2	45,2±9,2		
	Kontrolle	189,5±61,3	213,1±85,2	145,2±66,4	63,7±28,0		
Mesenchymzellen (MZ)	1x111kBq/kg	50,5±11,5	86,0±24,9	71,9±1,2	50,6±20,1		
	Kontrolle	72,2±7,7	92,1±3,3	71,1±13,2	65,0±1,3		
Osteoklasten (OK)	1x111kBq/kg	88,6±15,6	53,6±12,0	52,0±2,8	29,8±8,7		
	Kontrolle	63,9±8,0	59,2±15,5	58,4±22,7	35,0±3,4		
Kerne/Klast	1x111kBq/kg	2,36±0,28	2,14±0,20	2,14±0,27	2,48±1,03		
	Kontrolle	2,07±0,28	2,52±0,29	2,08±0,14	1,95±0,11		
V %	1x111kBq/kg	20,9±0,9	27,8±1,9	27,4±6,9	15,6±1,1		V % und Osp s. Abschn. 2.7.2
	Kontrolle	20,6±3,4	24,4±2,6	23,1±7,7	23,9±1,5		
Osp	1x111kBq/kg	25,1±0,9	24,4±0,8	21,5±1,8	22,1±5,3		
	Kontrolle	30,5±1,1	27,7±2,7	23,7±3,4	18,8±0,9		

Tab. 17: Knochenzellzahlen korrigiert nach Volumenanteil und spezifischer Oberfläche

Tage nach Injektion		7	14	28	56
OZ/V	1x111kBq/kg	474,9	558,9	543,8	481,1
	Kontrolle	562,5	611,3	567,5	485,4
OB/Osp	1x111kBq/kg	23,5	27,6	26,5	13,0
	Kontrolle	30,8	32,3	25,9	14,0
OK/Osp	1x111kBq/kg	16,4	8,0	9,1	8,8
	Kontrolle	10,3	8,7	10,6	7,8
MZ/Osp	1x111kBq/kg	9,6	12,6	12,6	14,9
	Kontrolle	11,6	13,7	14,2	14,5

Abkürzungen siehe Tab. 16

Tab. 18: Statische und dynamische Morphometrie der distalen Femurepiphyse junger männlicher Ratten

Zeit nach Injektion	14d		28d		56d ^a		112d		Pu prot.
	Pu	Kontr.	Pu	Kontr.	Pu	Kontr.	Pu	Kontr.	
V %	17,7±0,3	18,4±2,1	17,5±1,6	29,1±11,5	21,5±1,4	30,9±9,6	22,9±6,6	36,2±0,3	19,8±0,6*
Oi mm/mm ²	2,89±0,07	3,38±0,33	2,65±0,01	4,13±1,49	2,70±0,22	4,57±1,26	3,03±0,96	4,92±0,50	2,78±0,15*
Osp mm/mm ²	16,4±0,2	18,5±0,2	15,2±1,4	14,3±0,5	12,6±0,7	14,9±1,5	13,2±0,4	13,6±1,0	14,1±1,2
DO %	38,3±12,2	37,3±5,1	50,6±4,2	46,1±11,0	30,6±4,6*	13,5±5,6	16,0±6,5	18,4±5,1	17,5±0,7
KL %	14,7±3,3	8,1±5,2	13,3±2,3	6,7±2,8	8,7±1,2*	2,6±1,2	7,7±0,6*	5,1±0,1	7,4±4,5
MR mm/a	1,33±0,04*	1,04±0,01	0,98±0,08	0,76±0,01	0,66±0,04*	0,50±0,01	0,52±0,04	0,41±0,01	0,41±0,04
KBR %/a	1400±9	1244±144	941±151	720±122	362±55*	206±48	189±48	160±36	158±6

Mittelwerte ± SD von 2 Tieren; ^a 3 Tiere pro Gruppe

* statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05 oder besser) zu den Kontrolltieren

Pu: Tiere mit 1x111kBq/kg Körpergewicht behandelt; Pu prot.: Tiere mit 3x37kBq/kg behandelt

Erklärung der Abkürzungen der Parameter siehe Abschnitte 2.7.2.3, 3.4.1.5 und 3.4.2.2

Tab. 19: Statische und dynamische Morphometrie des 4.Lendenwirbelkörpers jugendlicher männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation von ^{239}Pu

Tage nach Injektion	28		56		112		
	1x111kBq	Kontr	1x111kBq	Kontr.	1x111kBq	Kontr.	3x37kBq
V %	21,9±3,8	29,3±5,4	19,0±9,1	32,2±6,1	15,1±0,3	32,6±6,3	17,0±3,4
Oi mm/mm ²	4,45±0,83	6,88±0,22	3,72±1,0	6,83±0,87	3,31±0,01*	6,45±0,92	3,47±0,13*
Osp mm/mm ²	20,3±0,2	24,0±3,9	20,6±4,5	21,3±1,3	21,9±0,4	19,8±1,0	20,8±3,4
DO %	33,2±5,2	29,1±7,5	23,9±1,3*	7,0±2,6	13,0±3,3	13,2±2,1	13,8±1,5
KL %	9,9±0,9	6,4±2,2	8,5±5,2	4,5±1,1	8,7±2,3	4,3±0,8	7,3±0,1*
MR mm/a	1,12±0,17	0,68±0,04	0,63±0,06	0,45±0,02	0,57±0,08	0,45±0,06	0,54±0,01
KBR %/a	1127±151	826±188	495±145	247±29	315±89	264±4	238±5

Mittelwerte ± SD von 2 Tieren pro Zeitpunkt und Gruppe

* statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ oder besser) zu den Kontrolltieren

Erklärung der Abkürzungen der Parameter siehe Abschnitte 2.7.2.3, 3.4.1.5 und 3.4.2.2

Tab. 20: Statische und dynamische Morphometrie des 3. Lendenwirbelkörpers jugendlicher männlicher Ratten 8 Wochen nach Inkorporation von ^{238}Pu

Parameter	V %	Oi mm/mm ²	Osp mm/mm ²	DO %	KL %	MR mm/a	BFR %/a
1x111kBq/kg	18,8±2,5*	4,48±0,02*	24,2±2,8	14,8±4,2	10,5±2,5	0,57±0,04	359±136
Kontrolle	29,8±3,8	7,01±0,43	23,8±3,8	15,3±7,4	7,9±1,8	0,51±0,08	378±140

Kontrolltiere n=5; Aktive Tiere n=3; * Signifikanz im t-Test, $p < 0,05$

Erklärung der Abkürzungen der Parameter siehe Abschnitte 2.7.2.3, 3.4.1.5 und 3.4.2.2

Tab. 21: Statische und dynamische Morphometrie des 4. Lendenwirbelkörpers jung-erwachsener männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation von ²³⁹Plutonium

Tage nach Injektion	14		28		56 ^a	
	1x37kBq	Kontr.	1x37kBq	Kontr.	1x37kBq	Kontr.
V %	26,9±7,2	27,5±3,4	18,8±2,4*	32,2±2,9	17,9±1,6*	28,6±5,1
Oi mm/mm ²	6,03±1,13	6,67±0,67	4,54±0,44*	6,82±0,48	3,83±0,15*	6,69±0,91
Osp mm/mm ²	22,7±1,9	24,3±0,2	24,2±0,7	21,2±0,4	21,5±1,6	23,6±1,3
DO %	11,9±0,7	17,2±5,0	16,1±9,5	14,8±5,4	24,4±4,8	11,4±6,8
KL %	8,0±0,1*	5,5±0,1	9,2±0,5*	4,2±0,4	9,5±1,4*	6,8±0,4
MR mm/a	0,59±0,02	0,46±0,09	0,73±0,07*	0,44±0,01	0,51±0,05*	0,33±0,01
KBR %/a	550±32	534±117	600±135	404±62	427±73*	239±54

Mittelwerte ± SD von 2 Tieren pro Zeitpunkt und Gruppe; ^a 3 Tiere pro Gruppe

* statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05 oder besser) zu den Kontrolltieren

Erklärung der Abkürzungen der Parameter siehe Abschnitte 2.7.2.3, 3.4.1.5 und 3.4.2.2

Tab. 22: Zusammenschau der Ergebnisse der statischen und dynamischen Histomorphometrie von Femur und Lendenwirbelkörper bei Kontrolltieren verschiedener Versuche unter der Annahme einer Altersdifferenz von 4 Wochen zwischen jugendlichen und jung-erwachsenen Tieren

Alter in Wochen		7	9	11	13	17	21
V %	W		29,3	27,5	32,2/32,2	28,6	32,6
	F	18,4	29,1		30,9		36,2
Oi mm/mm ²	W		6,88	6,67	6,83/6,82	6,69	6,45
	F	3,38	4,13		4,57		4,92
Osp mm/mm ²	W		24,0	24,3	21,3/21,2	23,6	19,8
	F	18,5	14,3		14,9		13,6
DO %	W		29,1	17,2	7,0/14,8	11,4	13,2
	F	37,3	46,1		13,5		18,4
KL %	W		6,4	5,5	4,5/4,2	6,8	4,3
	F	8,1	6,7		2,6		5,1
MR mm/a	W		0,68	0,59	0,45/0,44	0,33	0,45
	F	1,04	0,76		0,50		0,41
KBR %/a	W		826	534	247/404	239	265
	F	1244	720		206		160

Werte von jugendlichen Ratten: 9., 13., 21. Woche

Werte von jung-erwachsenen Ratten: 11., 13., 17. Woche

Erklärung der Abkürzungen der Parameter siehe Abschnitte 2.7.2.3, 3.4.1.5 und 3.4.2.2

Tab. 23: Vergleich von kumulativem Wachstum mit der Verschiebung von Knochen- und Aktivitätsband in der distalen Femurmetaphyse jugendlicher und jung- erwachsener männlicher Ratten (mm)

Tage nach Injektion	7	14	28	56	112
jugendl. 1x111kBq/kg					
Knochenwachstum	2,0	3,9	6,9	10,3	12,6
Aktivitätsband		2,8	6,5	9,6	10,8
jung-erw. 1x111kBq/kg					
Knochenwachstum		1,1	2,0	3,0	4,2
Aktivitätsband		1,5	2,4	3,7	4,7
Knochenband		1,0	1,6	2,4	4,3
jung-erw. 1x 37kBq/kg					
Knochenwachstum		1,1	2,2	3,8	
Aktivitätsband		1,3	2,2	3,0	
Knochenband		0,7	1,4	2,2	

Das kumulative Wachstum wurde mittels eines inneren Treppenkörpers analog zur kumulativen Dosis berechnet. Die Werte von Aktivitäts- und Knochenband sind Tab. 10 entnommen.

Tab. 24: Literaturdaten zum Längenwachstum der proximalen Tibia von Kontrollratten im Vergleich zu eigenen Daten des distalen Femur ($\mu\text{m}/\text{d}$)

Autor/Alter(Wochen)	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	17
weibliche Tiere													
Han72	356	331	265	229		146			68				
Ste82	386	326	246	196		131	96		74	56			23
Woo84			310						45				
Mil85				162			58						
männliche Tiere													
Han72	371	374	294	261		159			98		58		
Mil75					219		149						
Wro82					125								
Woo84			299						62				
Jee85								95					
Mil85				214			82						
Uen85				220								27	
Fur86			257										
Mittelwerte w.	371	329	274	196		139	77		62	56	49		23
Mittelwerte m.	371	374	283	231	172	159	115	95	80		58	27	
Eigene Werte			304	272		144		98		65			

Tab. 25: Literaturdaten zur Knorpelfugenbreite der proximalen Tibia von Kontrolltieren im Vergleich zu eigenen Daten des distalen Femur (μm)

Autor/Alter	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	17	21	25
weibliche Tiere													
Ste82	586	447	399	306		268	239		214	209	189		
Mil85				285			204						
Sve85				320									
männliche Tiere													
Sche73		505											
Mil75					448		331						
Mil83			372										
Wei84				530									
Jee85								148					
Mil85				370			247						
Uen85				262									
Fur86			330										
Mittelwerte w.	586	447	399	303		268	222		214	209	189		
Mittelwerte m.		505	351	387	448		289	148					
Eigene Werte			448	435		331		260		215	185	164	156

Tab. 26: Literaturdaten zur Mineralisationsrate der Spongiosa verschiedener Knochen im Vergleich zu eigenen Ergebnissen (mm/a)

Autor/Alter	4	6	7	8	11	12	13	17	21
weibliche Tiere									
Nog80				0,38					
Wro85								0,32	
Har86	0,49	0,41		0,49					
Mil86								0,46	
Wro86									0,30
männliche Tiere									
Tam78						0,32			
Tra82				0,67					
Cha83								0,30	
Bar84				0,23				0,17	
Wei84				1,15					
Mar85								0,36	
Eigene Werte									
			1,04	0,72	0,59		0,47	0,33	0,43

Die Umrechnung der meist in $\mu\text{m}/\text{d}$ vorliegenden Werte in mm/a erfolgte auf die im methodischen Teil beschriebene Weise.



Abb. 1: Arbeitsplatz zur semiautomatischen Histomorphometrie

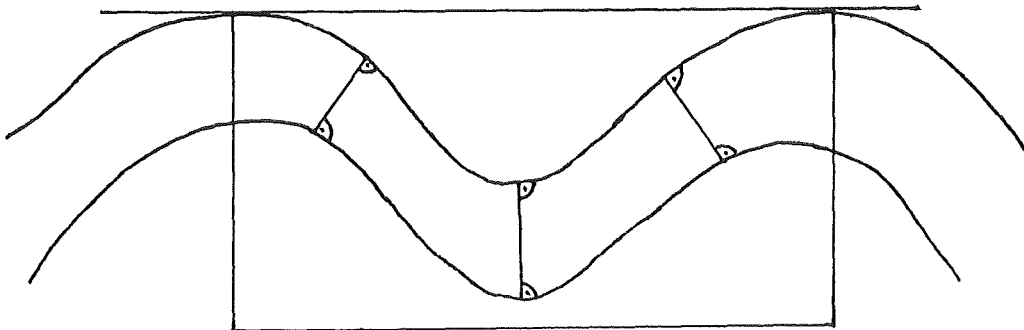
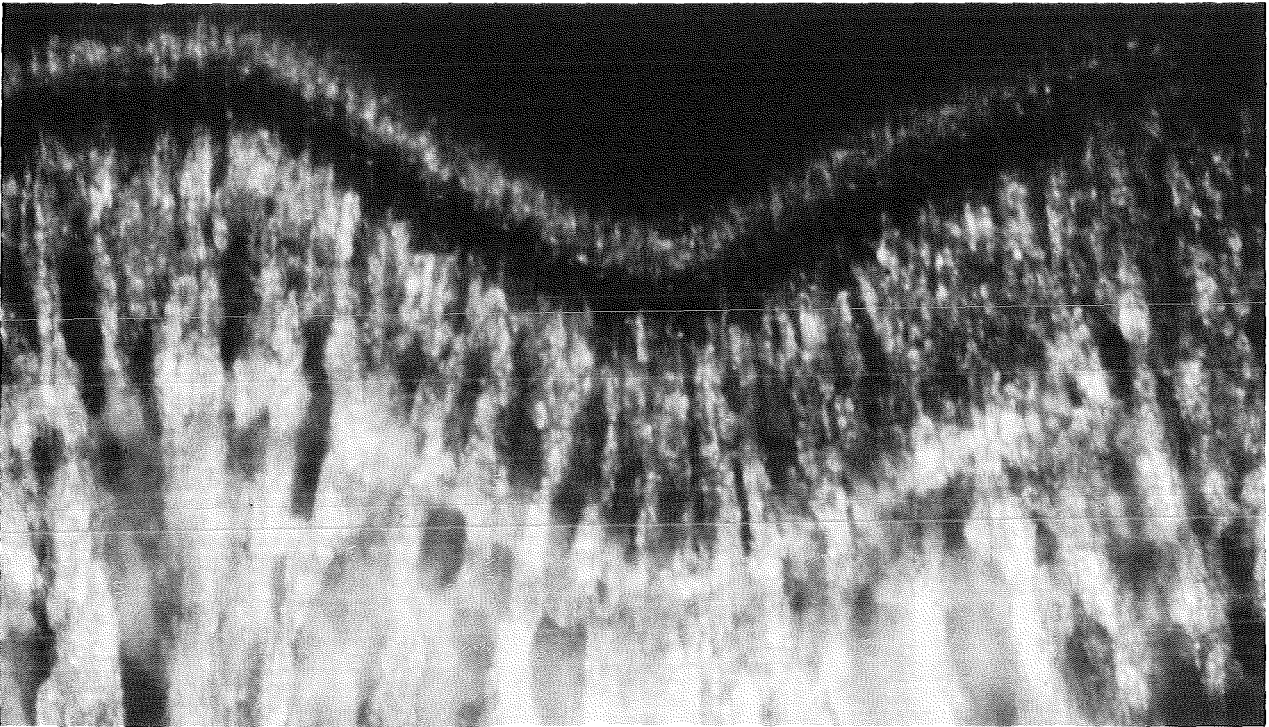


Abb. 2: Darstellung der Meßmethode zur Bestimmung des Längenwachstums mittels Fluoreszenzmarkierung. Die Breite der Knorpelfuge wurde in gleicher Weise bestimmt.

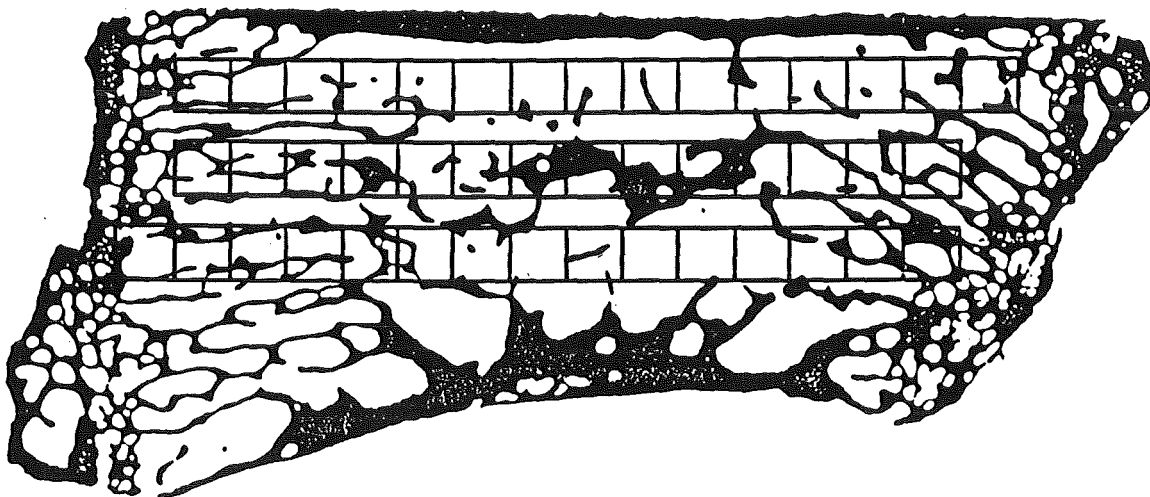
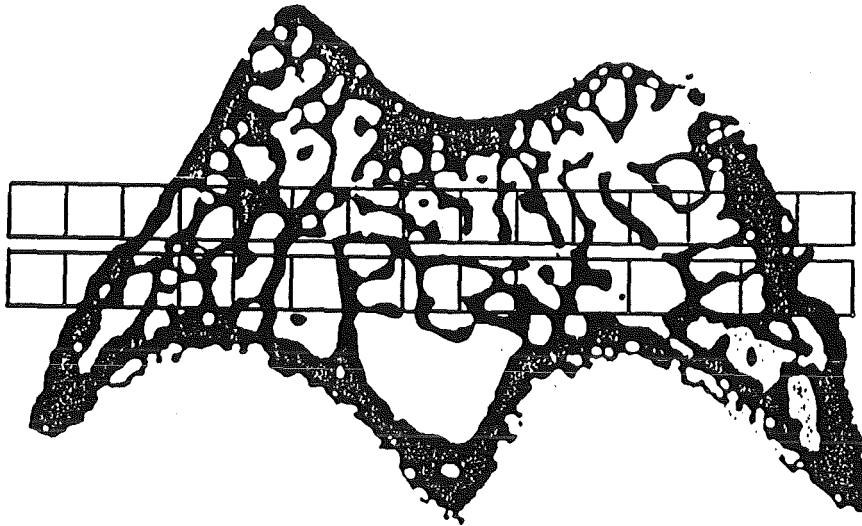
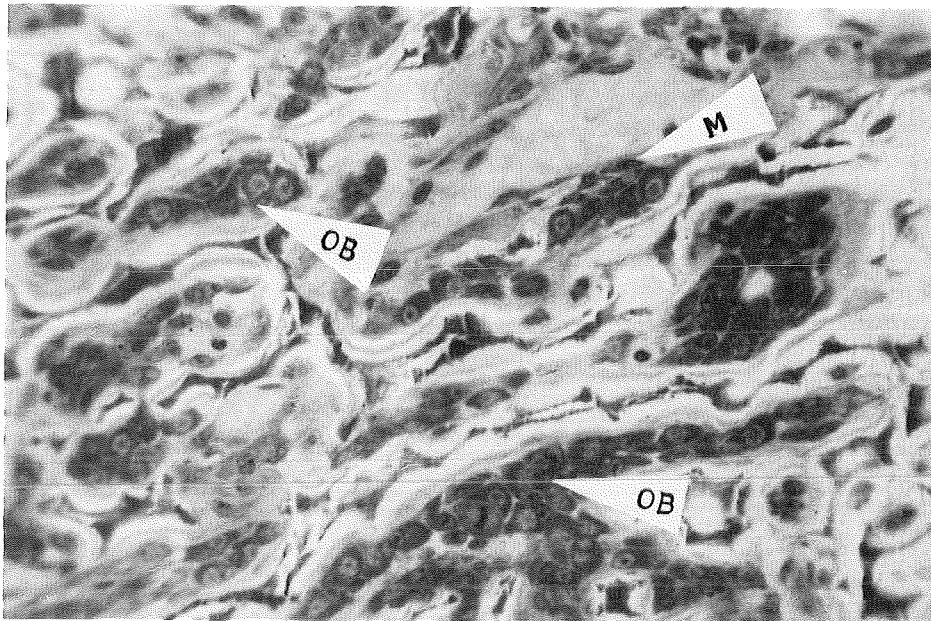
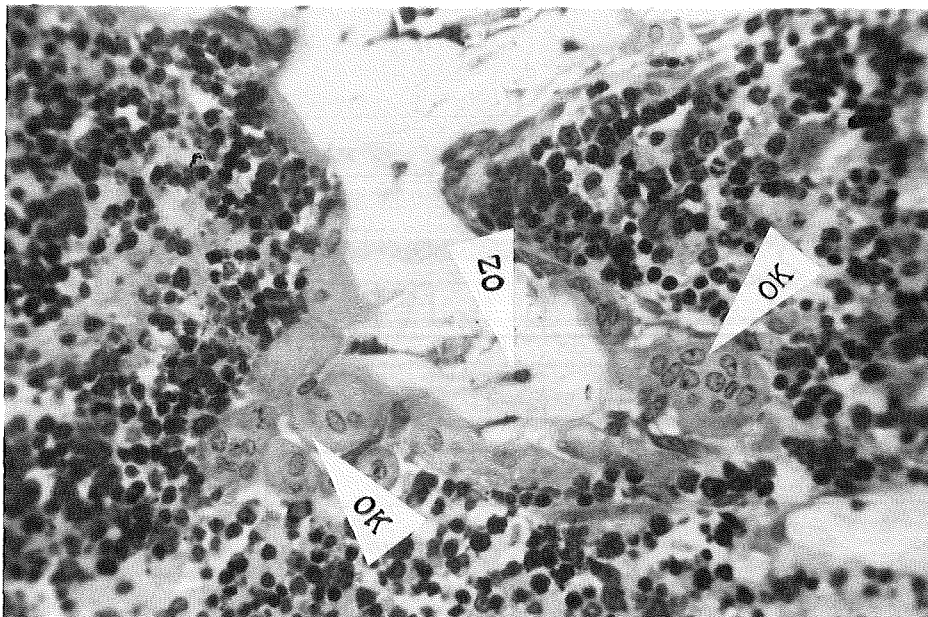


Abb. 3: Lage der Meßfeldreihen zur Bestimmung morphometrischer Parameter des spongiösen Knochens in distaler Femurepiphyse (oben) und Lendenwirbelkörper (unten). Die Meßfelder sind maßstabgerecht vergrößert (Vergrößerung 26x).



A



B

Abb. 4: Illustration der Knochenzellpopulation:

A: primäre Spongiosa mit Osteoblasten (OB) und Mesenchymzellen (M). Giemsa, 400x.

B: sekundäre Spongiosa mit Osteoklasten (OK) und Osteozyten (OZ). Giemsa, 400x.

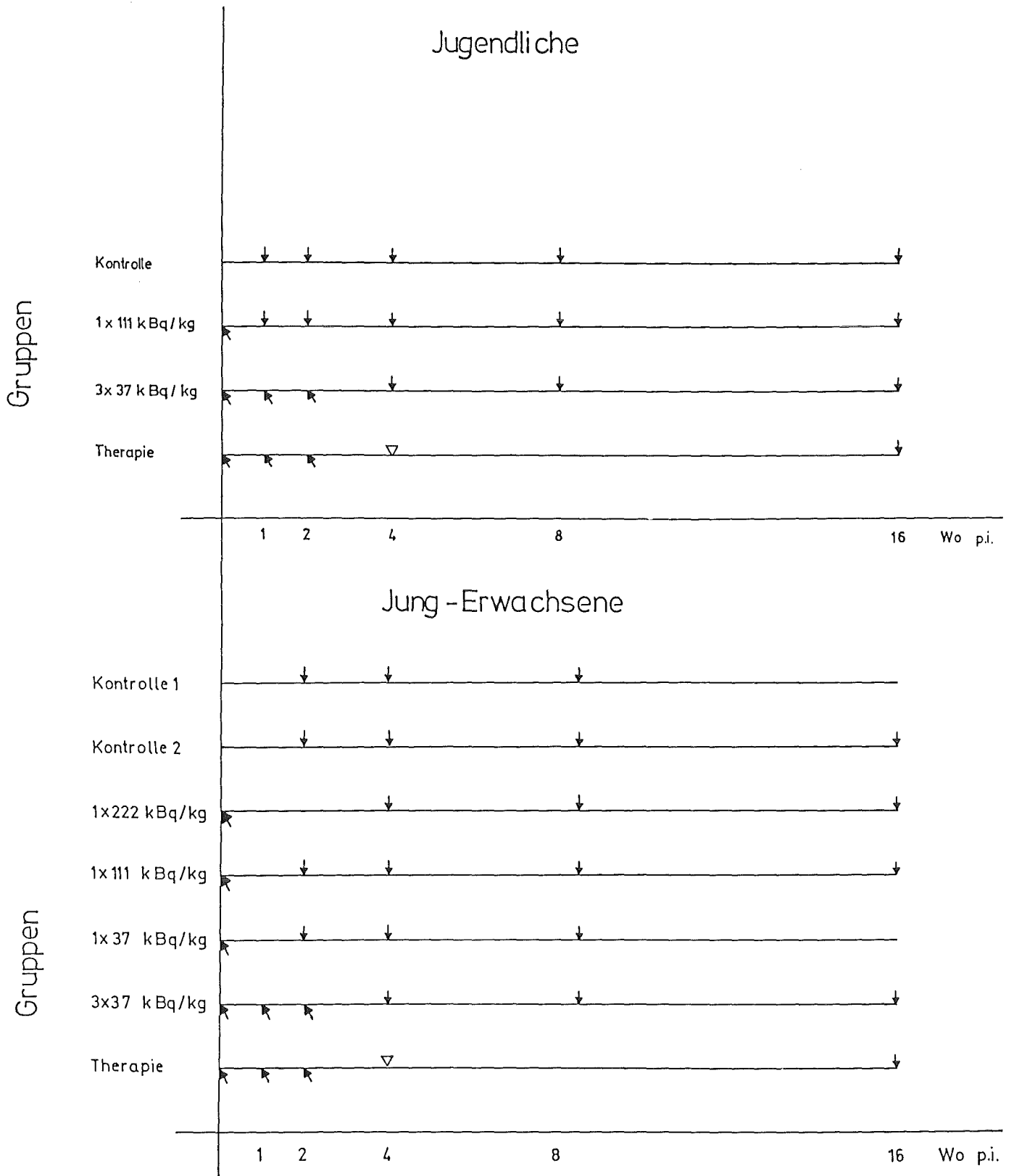


Abb. 4a: Schemata zum zeitlichen Ablauf der Versuche mit jugendlichen (oben) und jung- erwachsenen Ratten (unten). Einzelheiten zu den Gruppenbezeich- nungen s. Abschn. 2.8.

➤ Injektion; ↓ Sektion; ▽ Beginn der Therapie

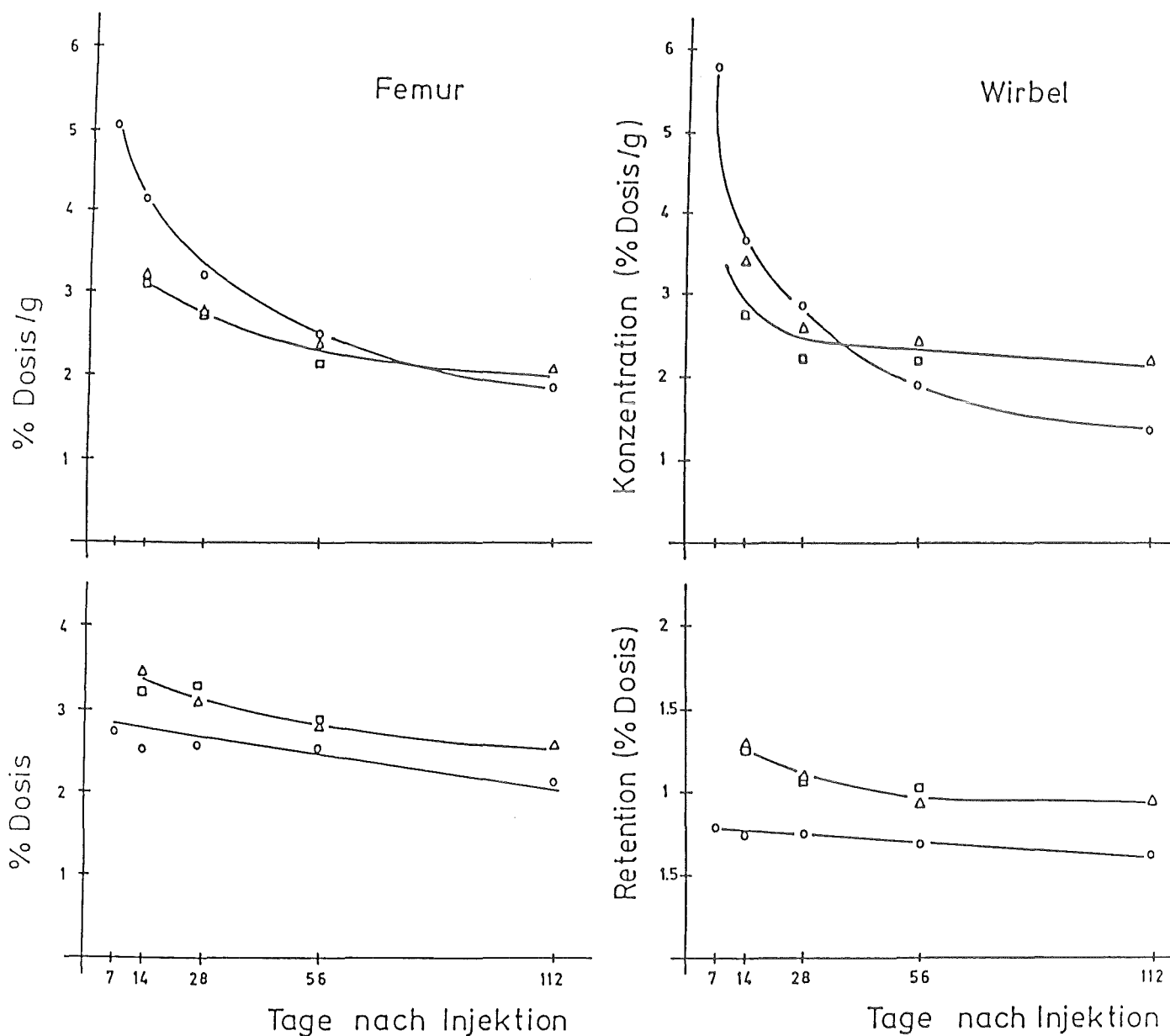


Abb. 5: Retention und Konzentration von ^{239}Pu in jugendlichen und jung-erwachsenen männlichen Ratten

○ Jugendliche 1x111kBq/kgKG

△ Jung-erwachsene 1x111kBq

□ Jung-erwachsene 1x37kBq

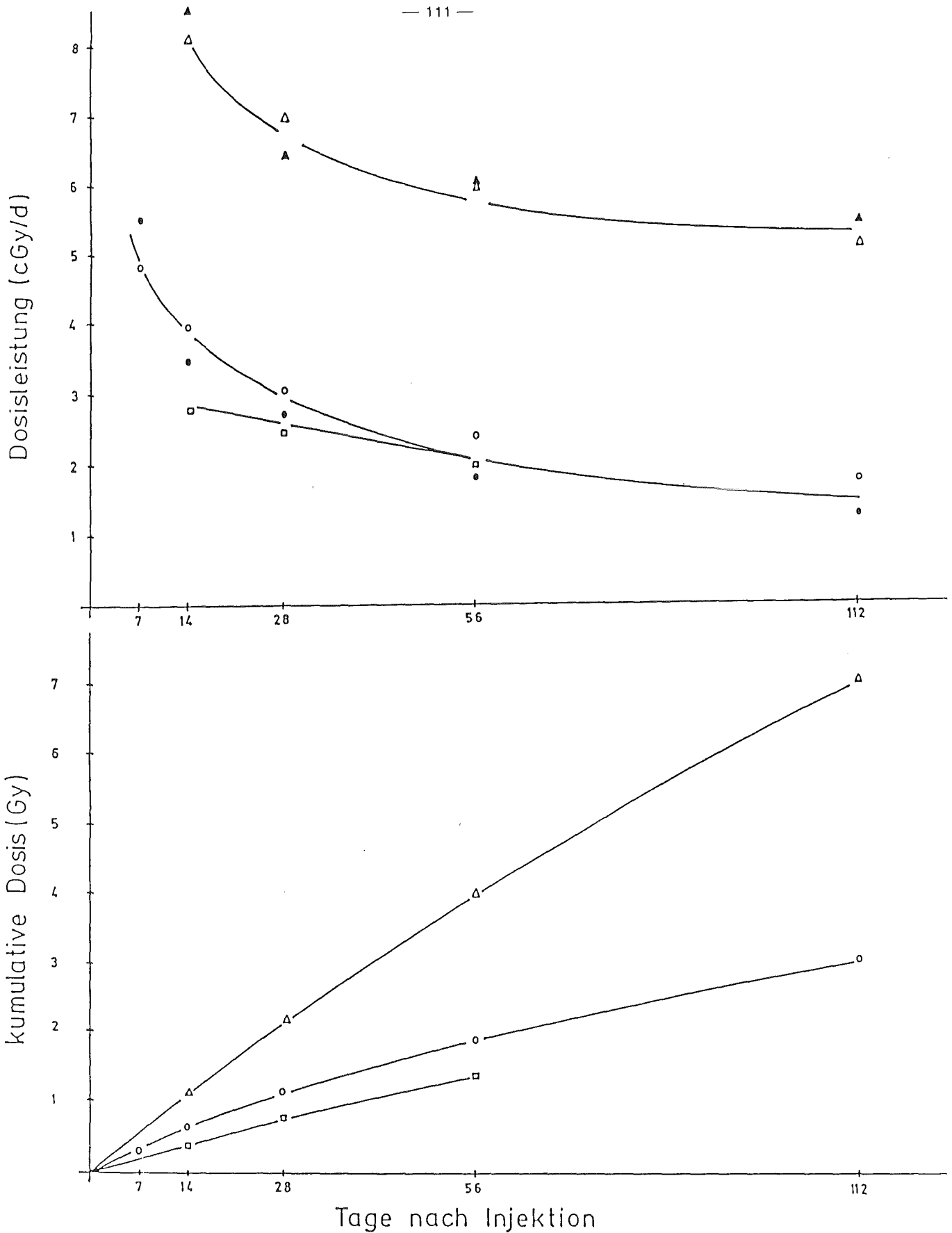
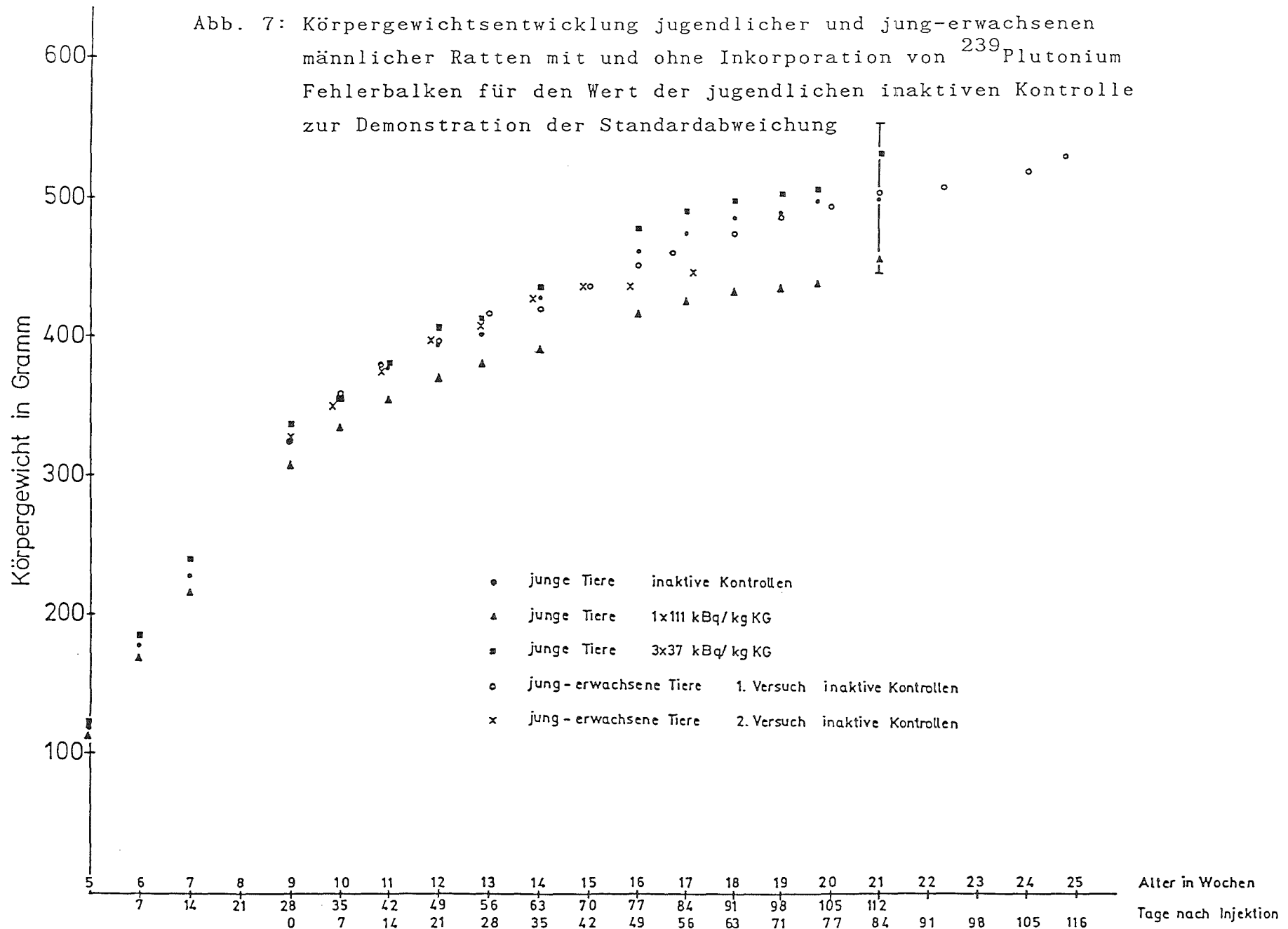


Abb. 6: Dosisleistung in Femur und Wirbel, sowie kumulative Dosis im Femur von jugendlichen und jung-erwachsenen Ratten nach Inkorporation von 37 bzw. 111kBq/kgKG ²³⁹Plutonium

Jugendliche 111kBq/kg	○ Femur	● Wirbel
Jung-erwachsene 111kBq/kg	△ Femur	▲ Wirbel
Jung-erwachsene 37kBq/kg	◻ Femur	

Abb. 7: Körpergewichtsentwicklung jugendlicher und jung-erwachsenen männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation von ^{239}Pu
 Fehlerbalken für den Wert der jugendlichen inaktiven Kontrolle zur Demonstration der Standardabweichung



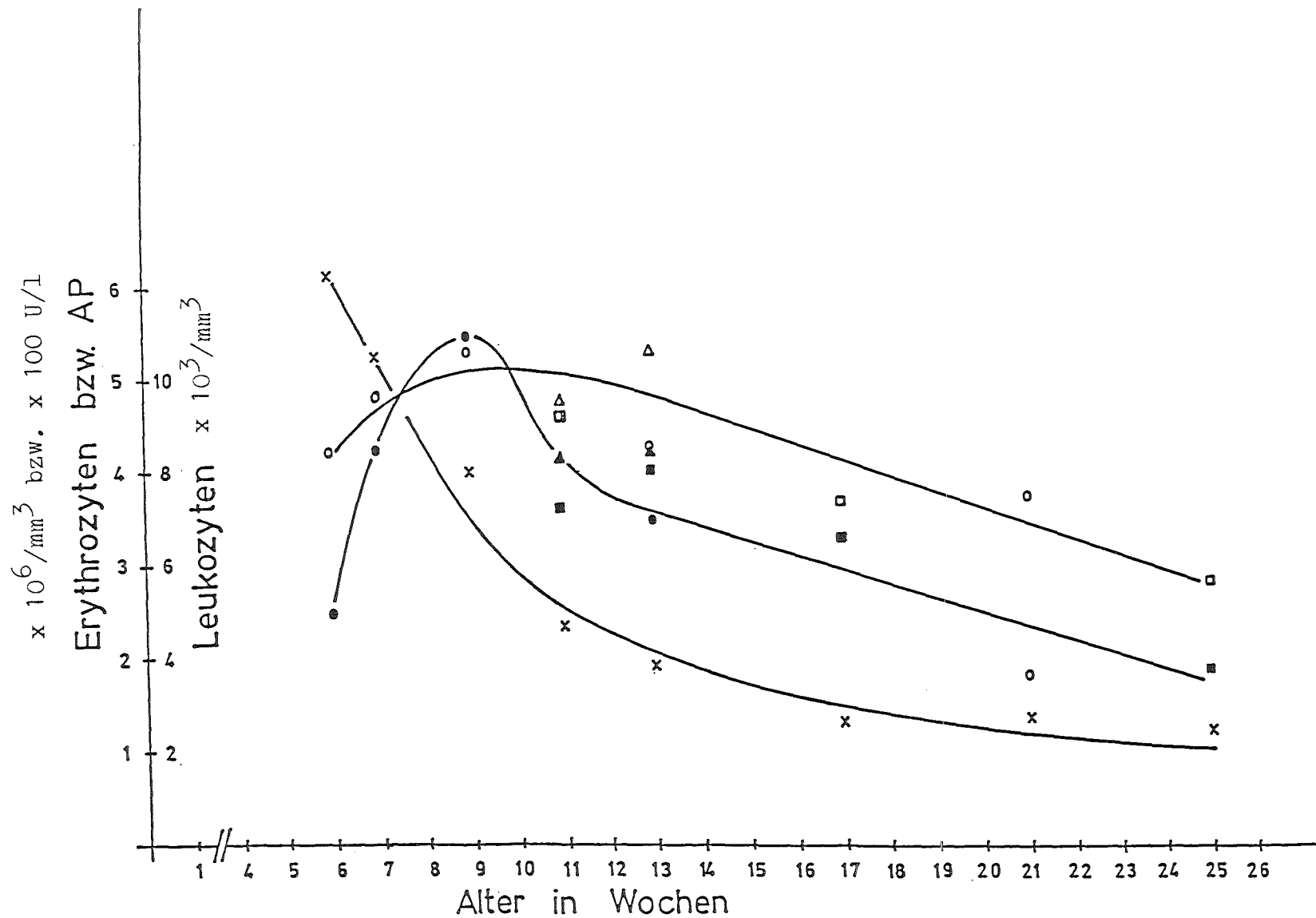


Abb. 8: Altersabhängigkeit der Erythro- und Leukozytenzahlen sowie der Alkalischen Phosphatase von Kontrolltieren aller Versuche

○□△Erythrozyten; ●■▲Leukozyten; × Alkalische Phosphatase

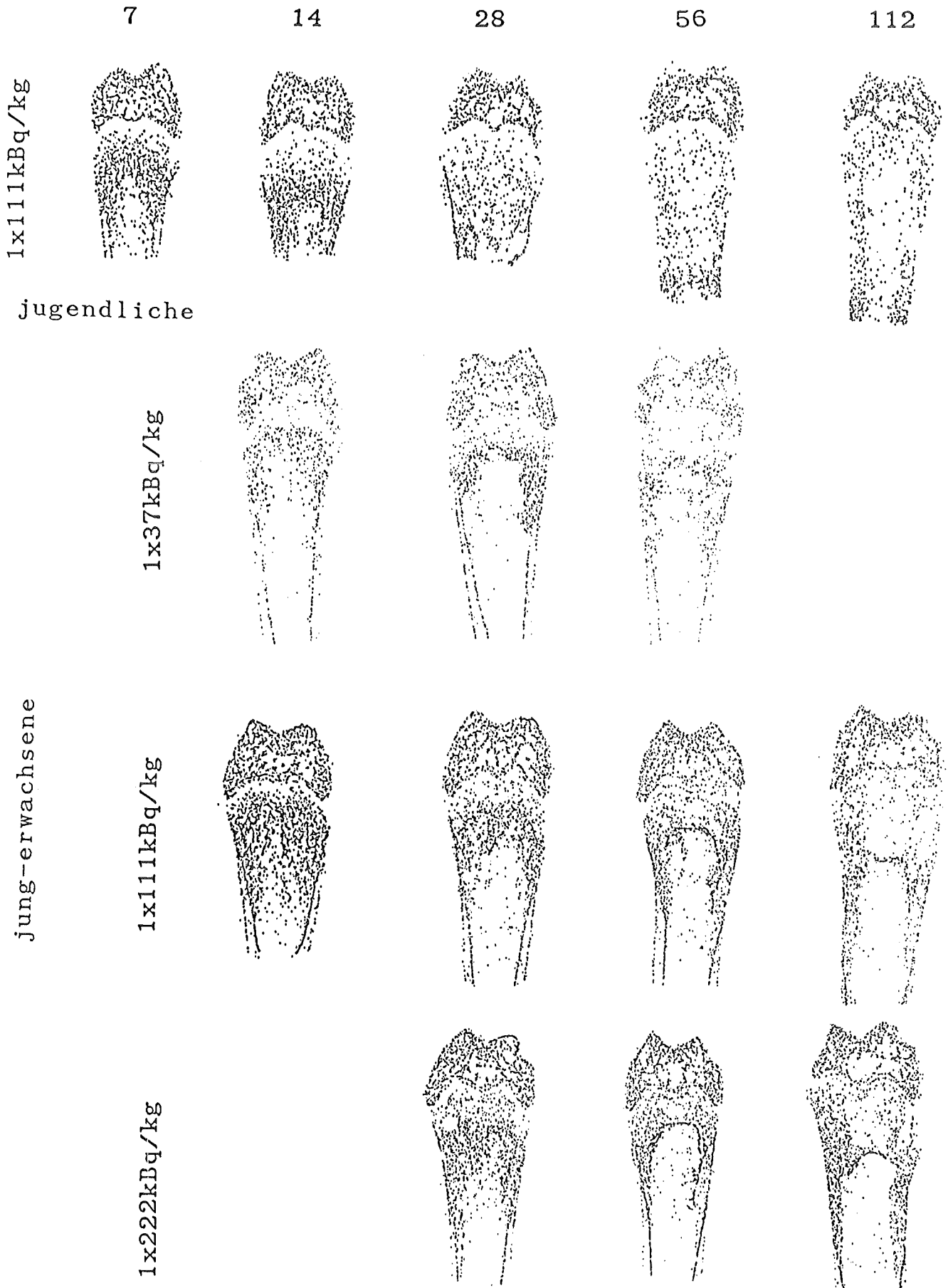


Abb. 9: Autoradiographische Darstellung der Grobverteilung verschiedener Einzeldosen von ^{239}Pu im distalen Femur jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten im zeitlichen Verlauf. Makrofol-Autoradiographie, 2,5x.

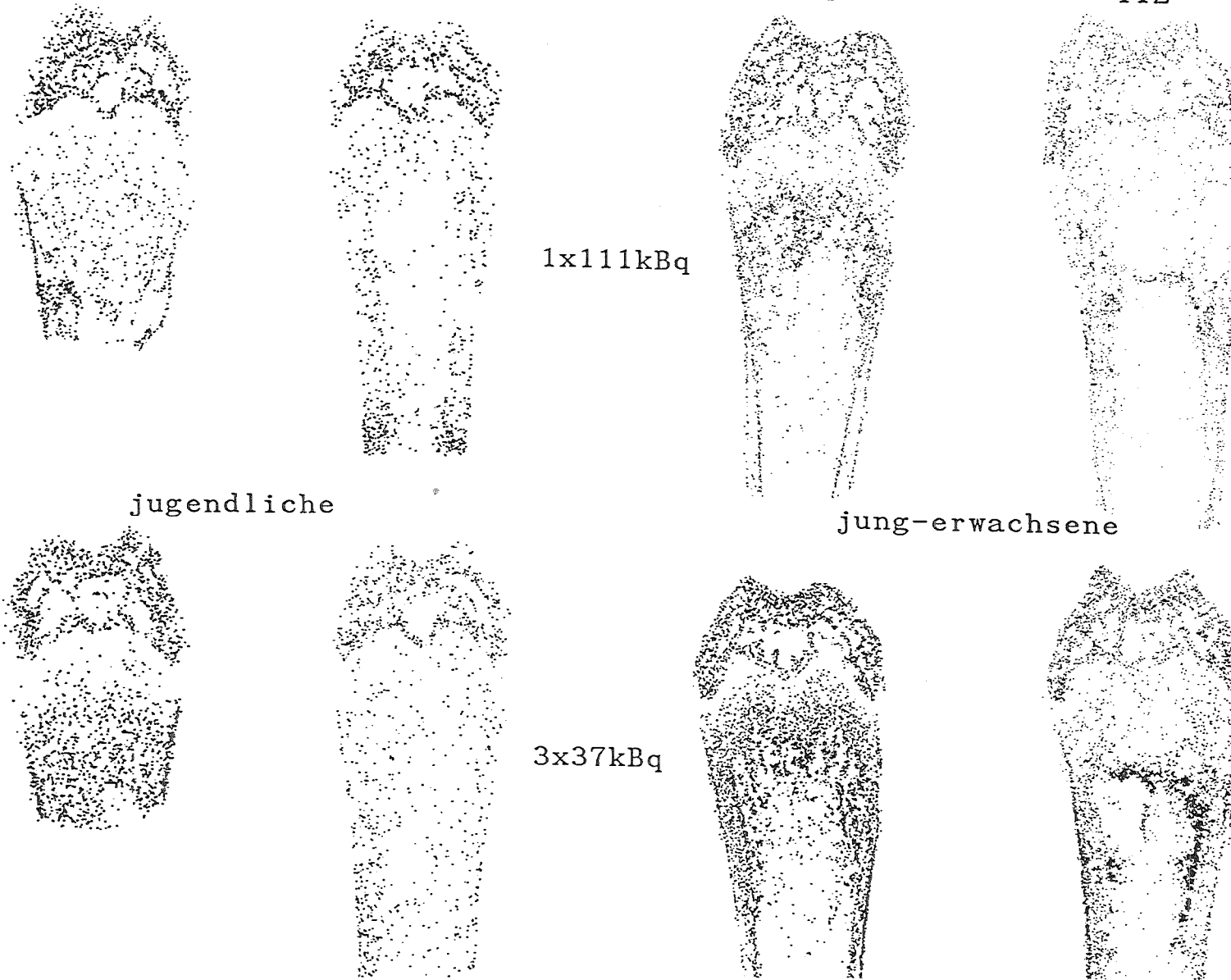


Abb. 10: Vergleichende Darstellung der makroskopischen Nuklidverteilung einer Einzeldosis von 111kBq/kg bzw. drei Injektionen von je 37kBq/kg Körpergewicht ^{239}Pu im distalen Femur jugendlicher und jung-erwachsener Ratten (Vergrößerung 4,5x).

jugendliche

jung-erwachsene

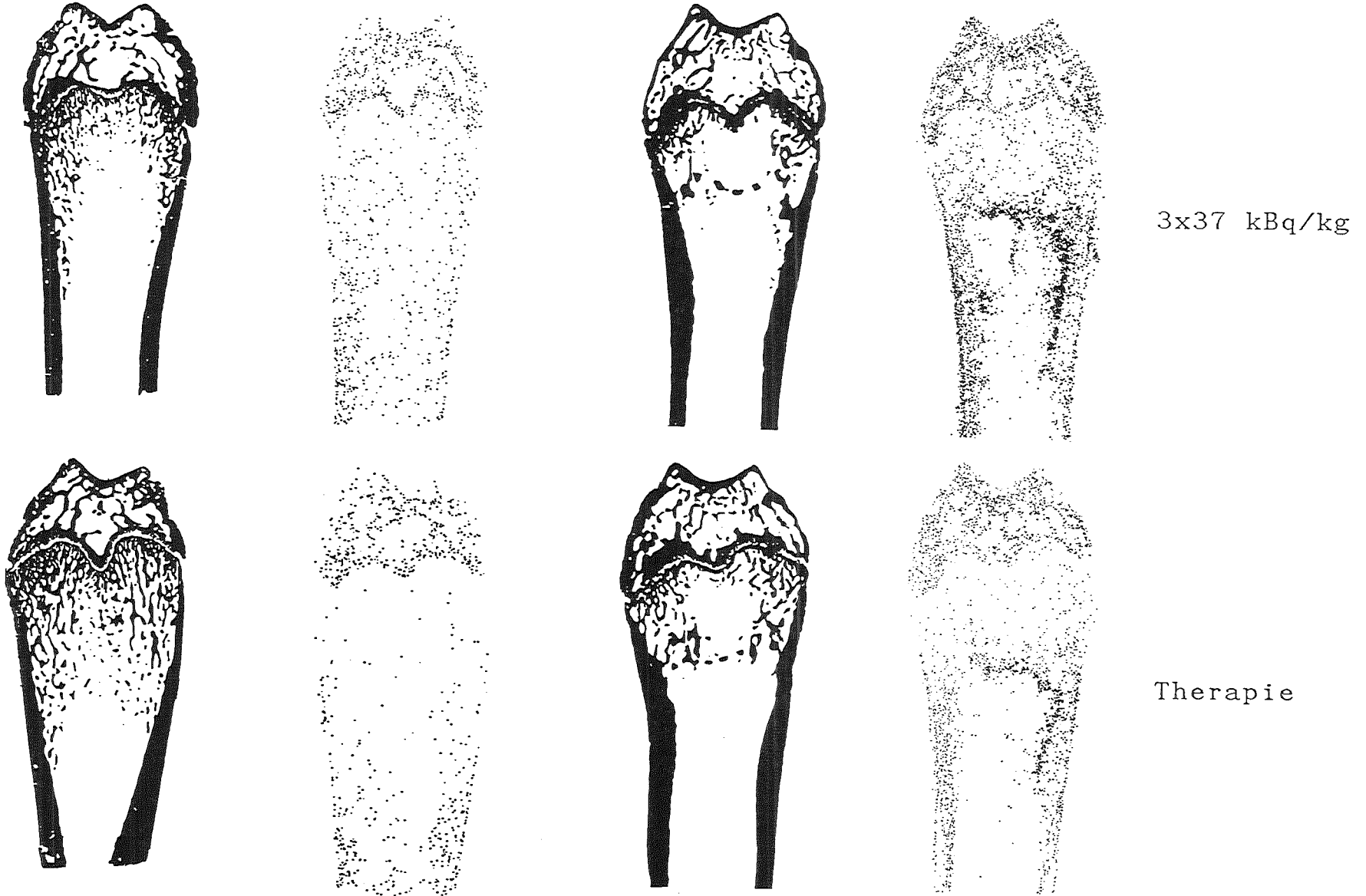
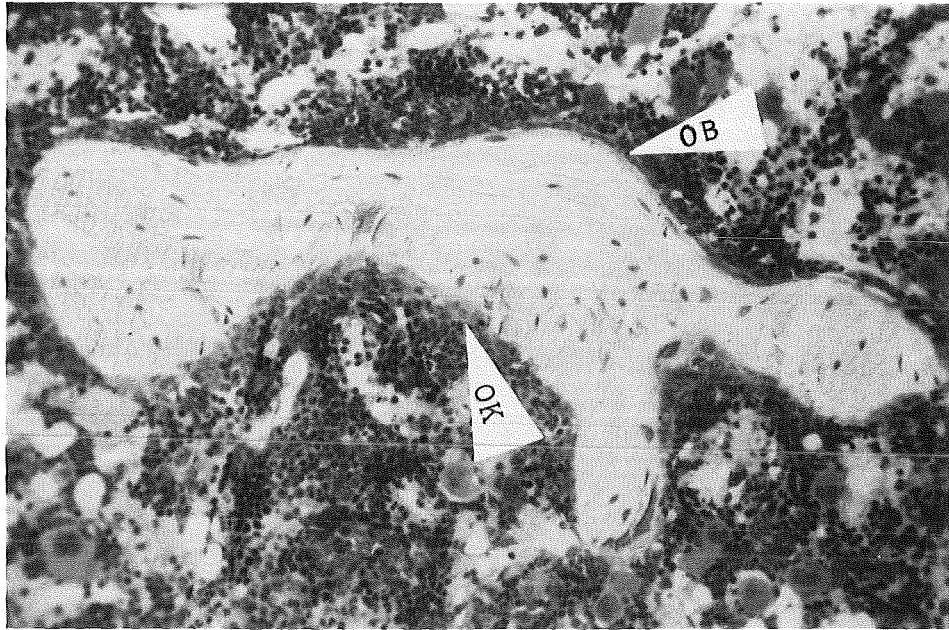
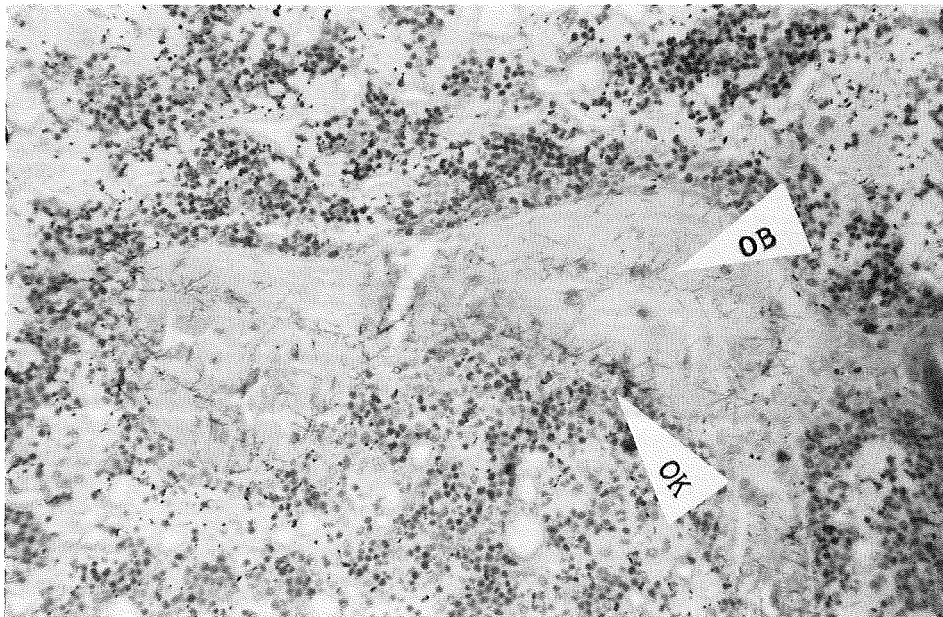


Abb. 11: Vergleichende Darstellung der Wirkung der Spättherapie mit 10^{-3} molarer Zn-DTPA Lösung auf jugendliche und jung-erwachsene männliche Ratten nach Inkorporation von $3 \times 37 \text{ kBq/kg } ^{239}\text{Pu}$ 112 Tage post incorporationem (Vergrößerung 4,5x).

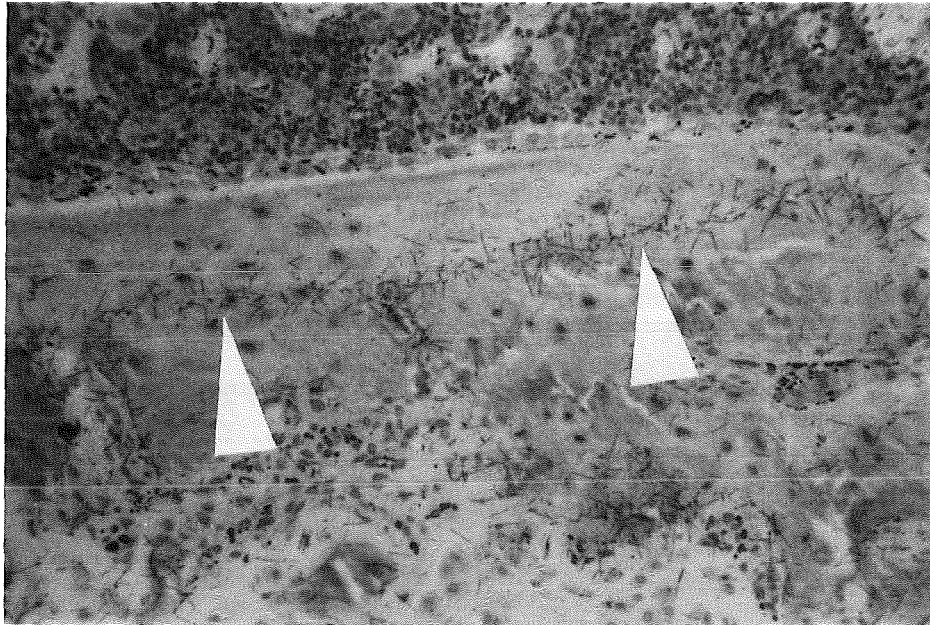


A

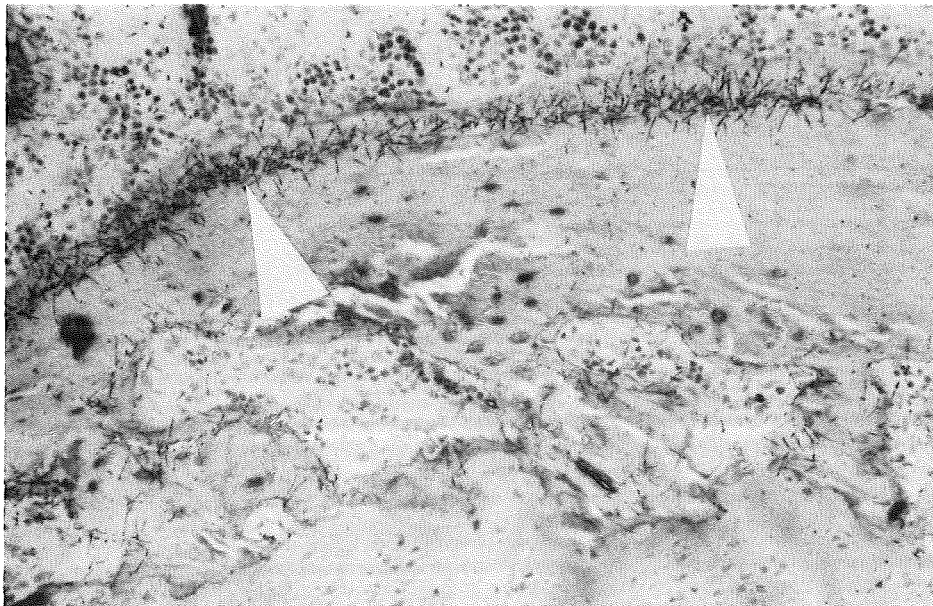


B

Abb. 12: Feinverteilung von ^{239}Pu an Trabekeln der Epiphyse in Bezug auf den Funktionszustand der Knochenoberfläche, 2 Wochen nach Inkorporation, bei einer jugendlichen Ratte (benachbarte Schnitte). A: Oberfläche mit Osteoblasten (OB) und Osteoklasten (OK), Giemsa, 200x. B: begrabene (OB) und oberflächlich liegende (OK) Radioaktivität, Histoautoradiographie, HE, 200x.



A

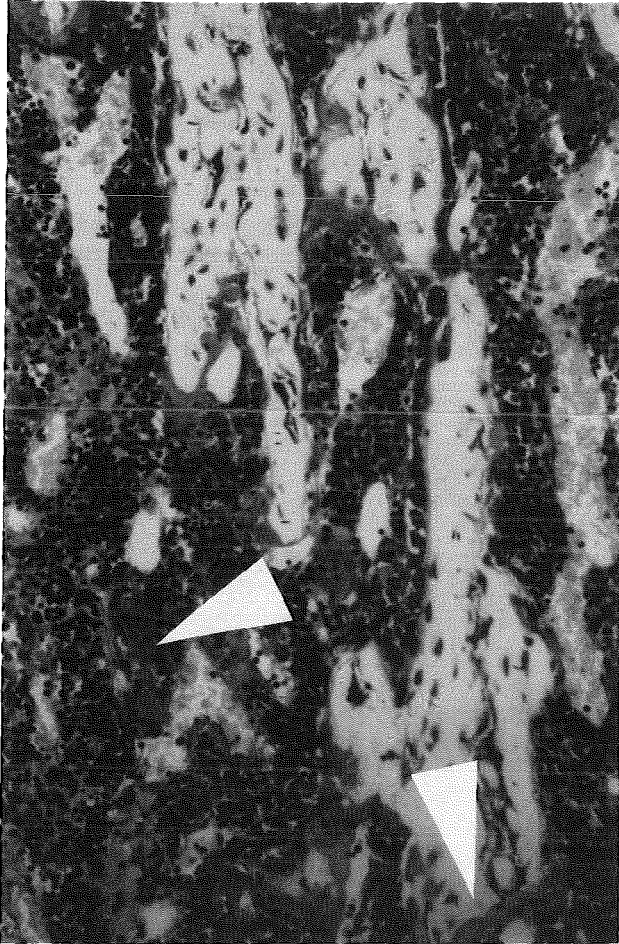


B

Abb. 13: Begrabung heißer Linien in der Epiphysenplatte 2 Wochen nach Inkorporation von $1 \times 111 \text{ kBq/kg } ^{239}\text{Pu}$ bei einer jugendlichen und einer jung-erwachsenen Ratte.

A: jugendliche Ratte, Histoautoradiographie, HE, 200x.

B: jung-erwachsene Ratte, Histoautoradiographie, HE, 200x.

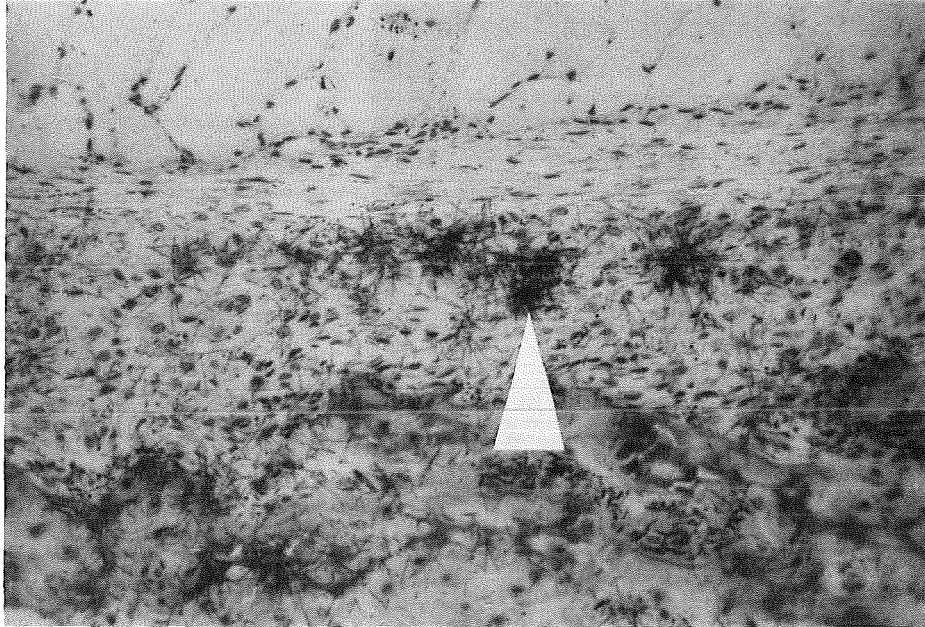


A

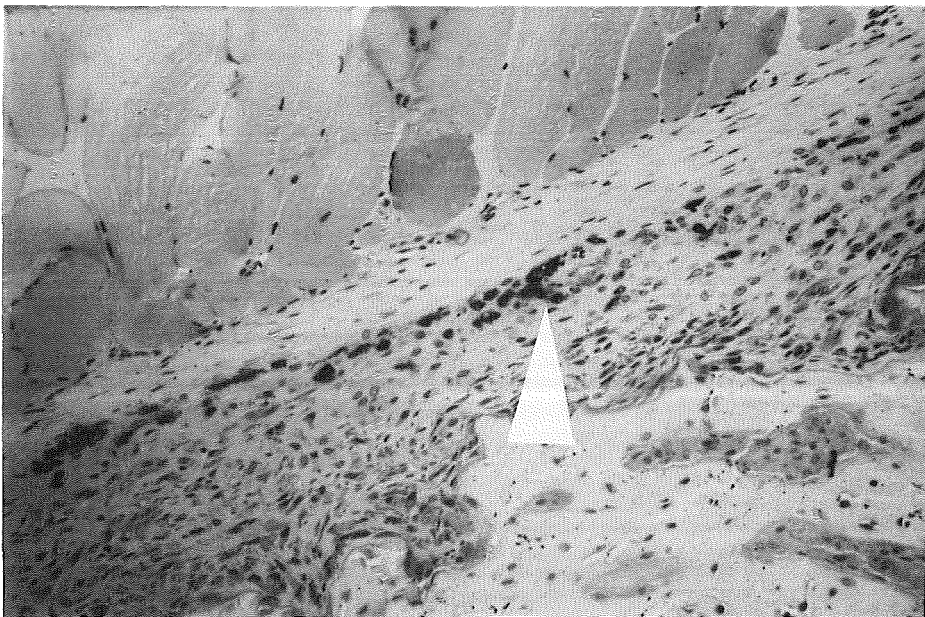


B

Abb. 14: Feinverteilung von ^{239}Pu an Trabekeln der Metaphyse in Bezug auf den Funktionszustand der Knochenoberfläche, 1 Woche nach Inkorporation. Aktivitätskonzentration auf mit Osteoklasten besetzten Oberflächen (benachbarte Schnitte).
A: Giemsa, 170x. B: Histoautoradiographie, HE, 170x.

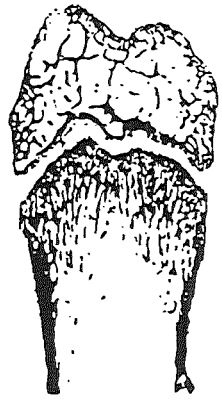


B

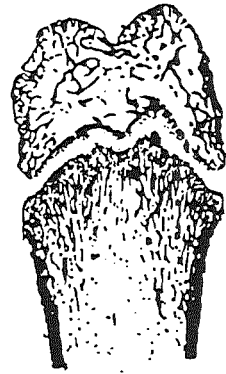


A

- . 15: Periostale Hämosiderinablagerungen mit Aktivitätskonzentration (Pfeile) bei einer jugendlichen Ratte eine Woche nach Inkorporation von 1×10^{11} kBq/kg ^{239}Pu Plutonium (benachbarte Schnitte).
A: Berliner Blau, 200x. B: Histoautoradiographie, HE, 200x.



Kontrolle



7



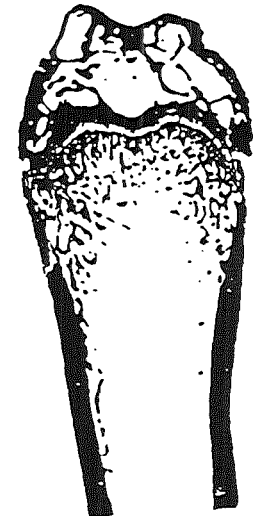
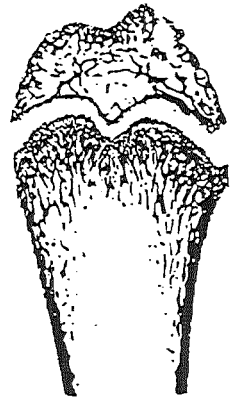
14



28



56



— 121 —

Tage nach
Injektion

1x111kBq/kgKG

Abb. 16: Knochenstrukturveränderungen im distalen Femur nach Inkorporation von 1x111kBq/kg ²³⁹Pu bei jugendlichen männlichen Ratten (Vergrößerung 4,5x).

Tage nach Injektion

14

28

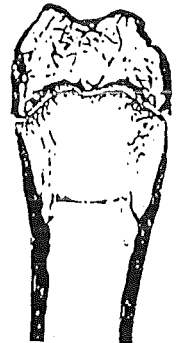
56

112

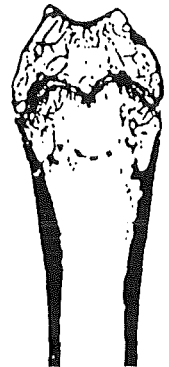
1x37kBq/kg



1x111kBq/kg



3x37kBq/kg



Kontrollen

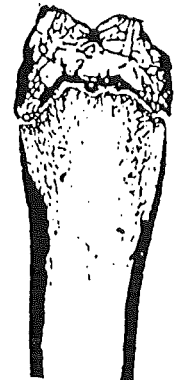


Abb. 17: Knochenstrukturveränderungen im distalen Femur nach Inkorporation verschiedener Mengen von ^{239}Pu bei jung-erwachsenen männlichen Ratten (Vergrößerung 2,5x).



1x37kBq/kg

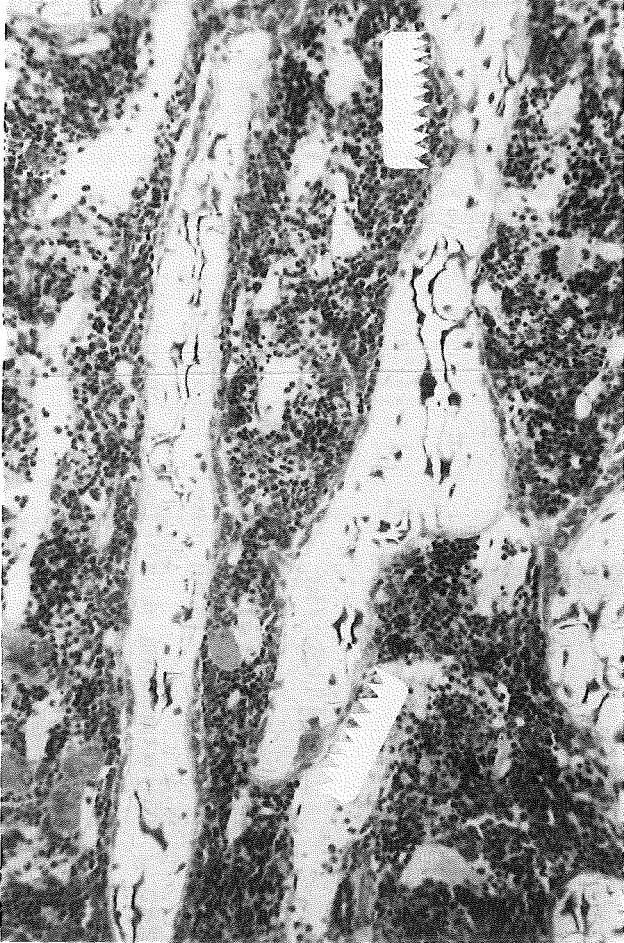


1x111kBq/kg



1x222kBq/kg

Abb. 18: Vergleich der Knochenstrukturveränderungen im distalen Femur jung-erwachsener männlicher Ratten nach Inkorporation verschiedener Mengen ^{239}Pu 4 Wochen p.incorp. (Vergrößerung 6,5x).



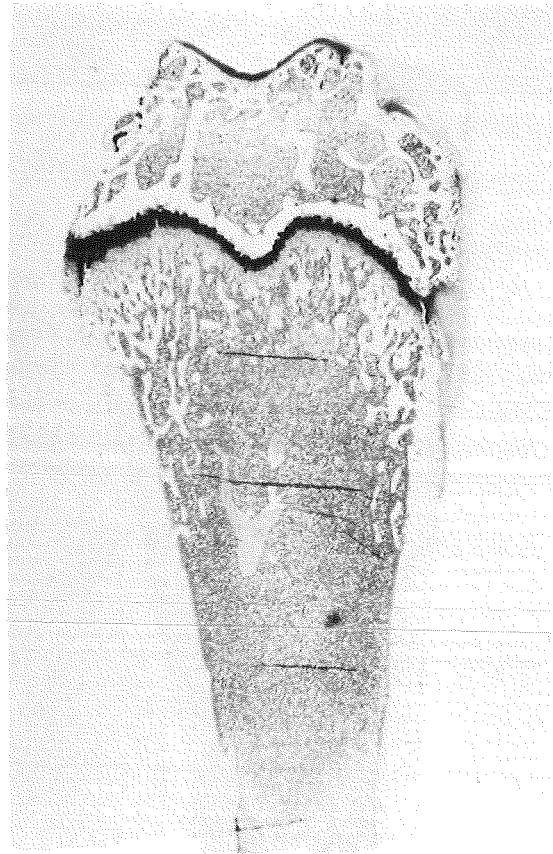
Kontrolle



1x111kBq/kg

Abb. 19: Schaftwärtige Metaphysen jugendlicher männlicher Ratten (sekundäre Spongiosa) mit und ohne Inkorporation von ²³⁹Plutonium; vermehrte Zahl von Osteoklasten bei den aktiven Tieren 1 Woche p. inj., Giemsa, 170x.

56 Tage p. inc.



112 Tage p. inc.

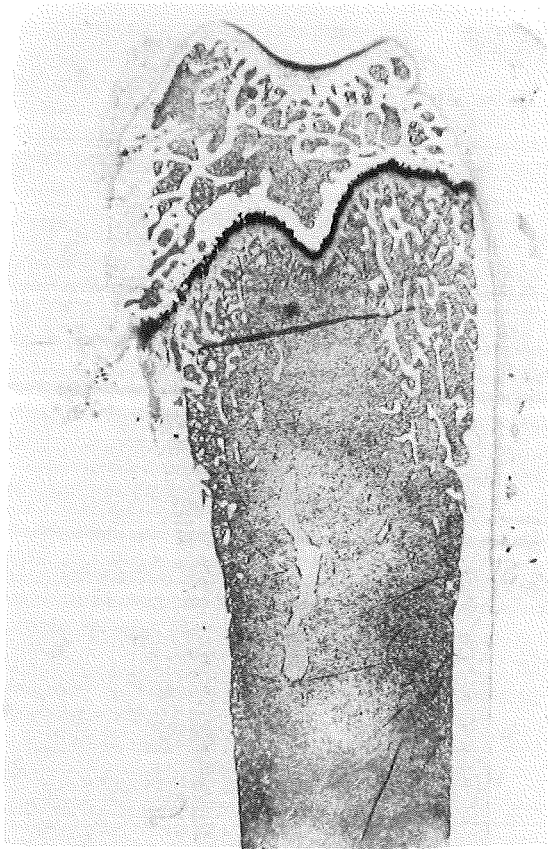
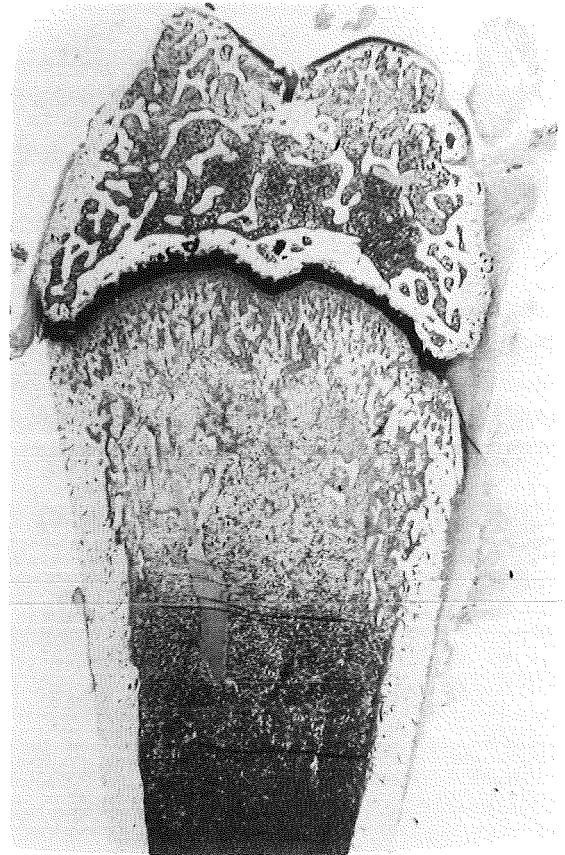


Abb. 20: Übersichten von histologischen Schnitten distaler Femora jugendlicher männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation von ^{239}Pu ; Knochenstrukturveränderungen und Verfettung des Knochenmarkes in der Epiphyse. Giemsa, 8x.

Kontrolle

1x111kBq/kg

14 Tage p. inc.



28 Tage p. inc.

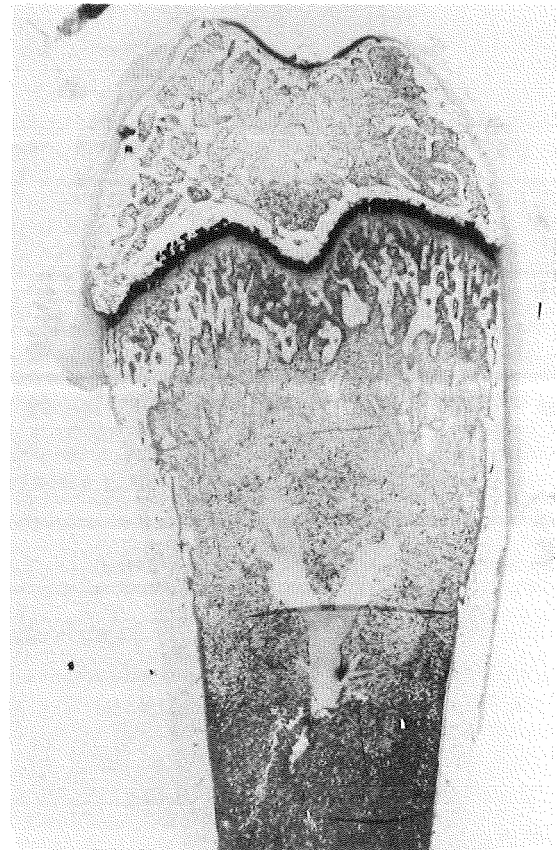
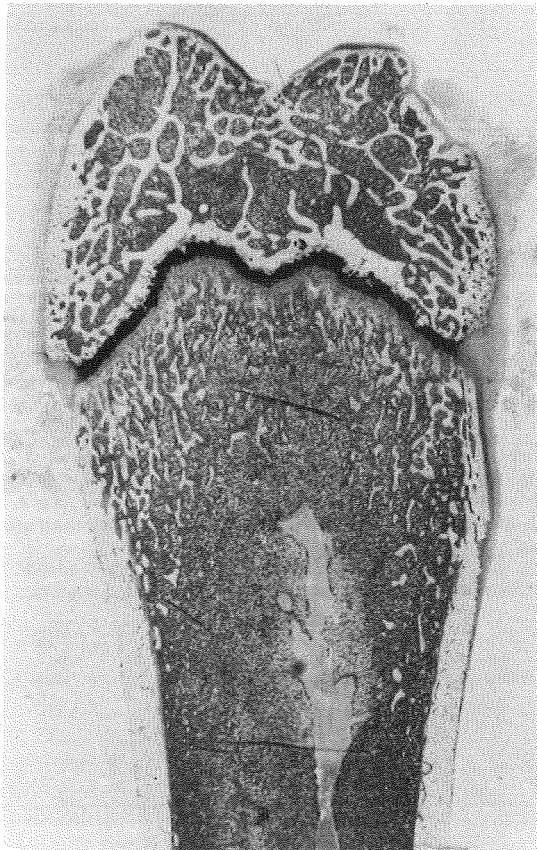
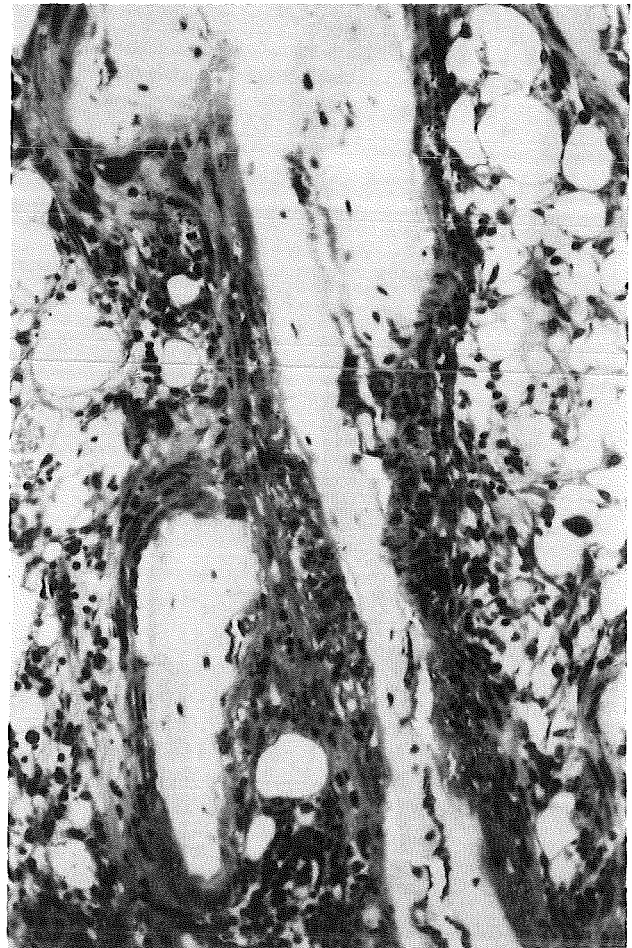


Abb. 21: Übersichten von histologischen Schnitten distaler Femora jung-
erwachsener männlicher Ratten mit und ohne Inkorporation von ^{239}Pu ;
Veränderungen an Knochen und Knochenmark der Epi- und Metaphyse. Giemsa, 8x.

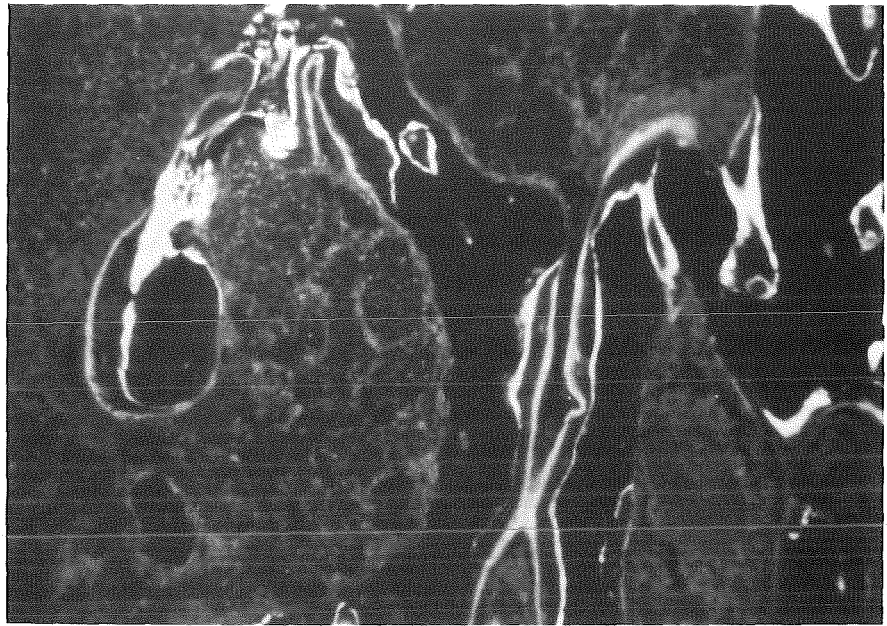


14 Tage p. inc.

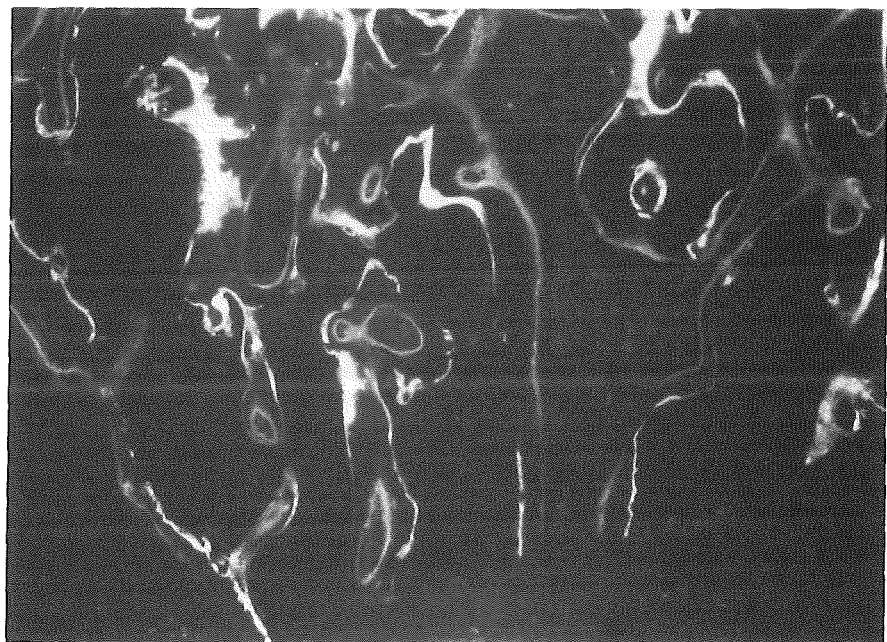
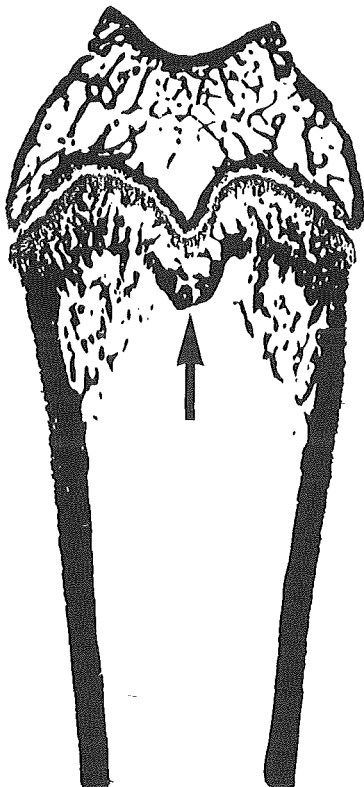


28 Tage p. inc.

Abb. 22: Peritrabekuläre Fibrosen in der distalen Femurmetaphyse von jung-erwachsenen männlichen Ratten nach Inkorporation von $1 \times 111 \text{ kBq/kg } ^{239}\text{Pu}$. Giemsa, 320x.



A



B

Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus dem Bereich des metaphysären Knochenbandes mit Zuordnung zur makroskopischen Knochenstruktur. Illustration der osteoplastischen Aktivität (14 Tage p. incorp.). A: jung-erw. Ratte, $1 \times 111 \text{ kBq/kg}$. B: jung-erw. Ratte, $1 \times 222 \text{ kBq/kg}$. Knochenstruktur 6,5x, Fluoreszenzpräparate 130x.

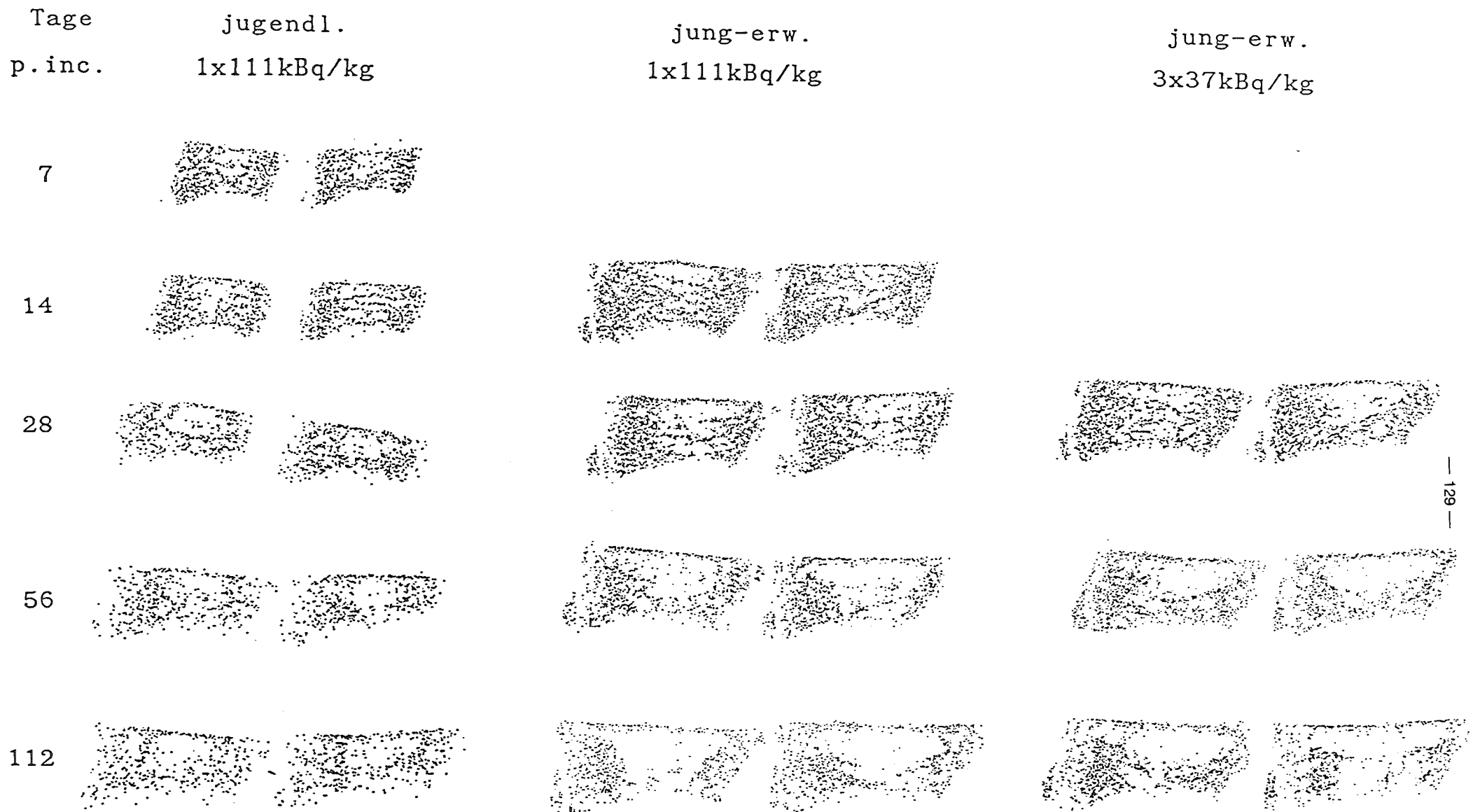


Abb. 24: Autoradiographische Darstellung der Grobverteilung verschiedener Dosen von ^{239}Pu im 4. und 5. Lendenwirbel jugendlicher und jung-erwachsener männlicher Ratten im zeitlichen Verlauf (Vergrößerung 4,5x).

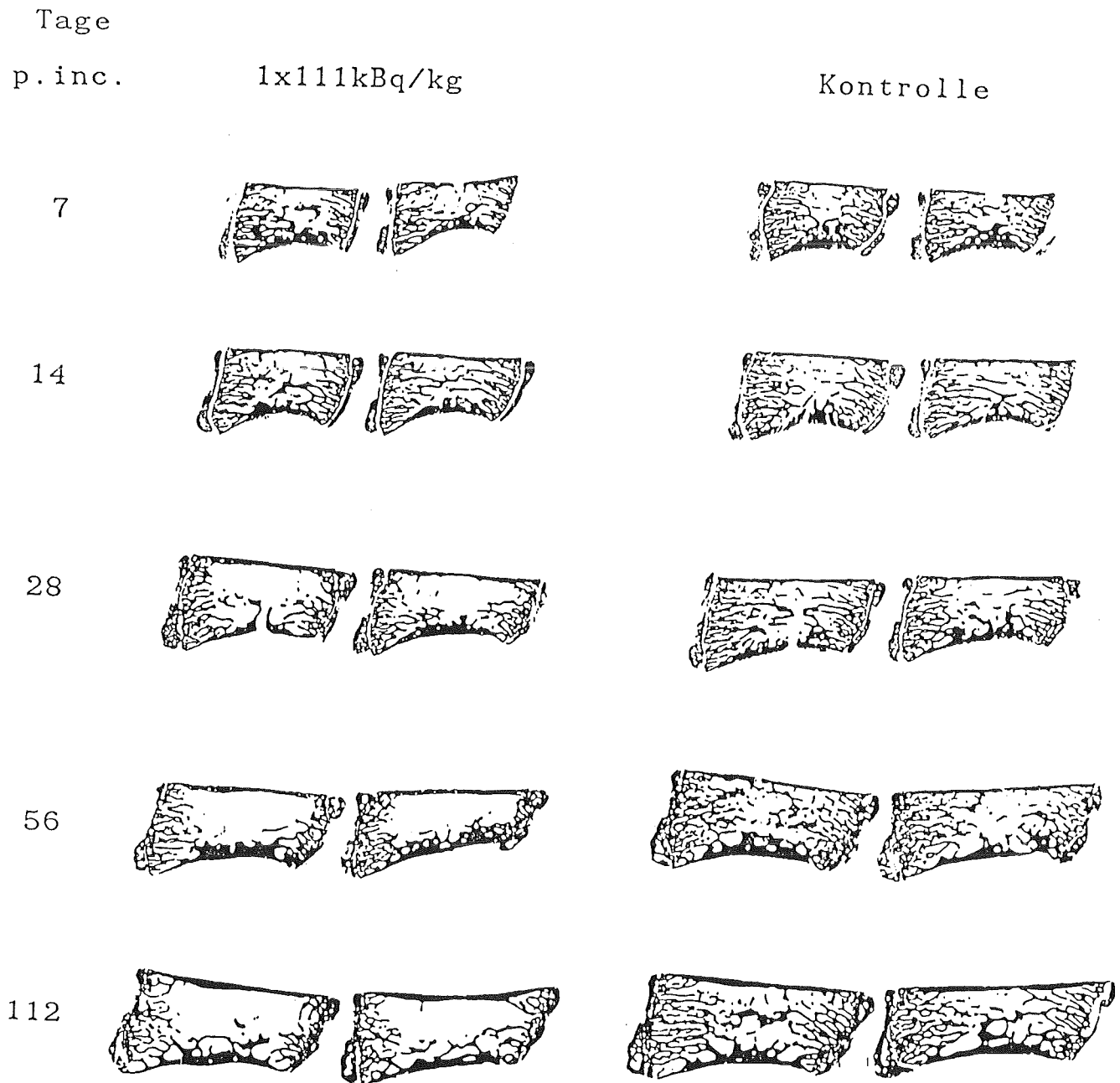


Abb. 25: Knochenstrukturveränderungen in 4. und 5. Lendenwirbeln jugendlicher männlicher Ratten nach Inkorporation von 1x111kBq/kg ²³⁹Plutonium (Vergrößerung 4,5x).

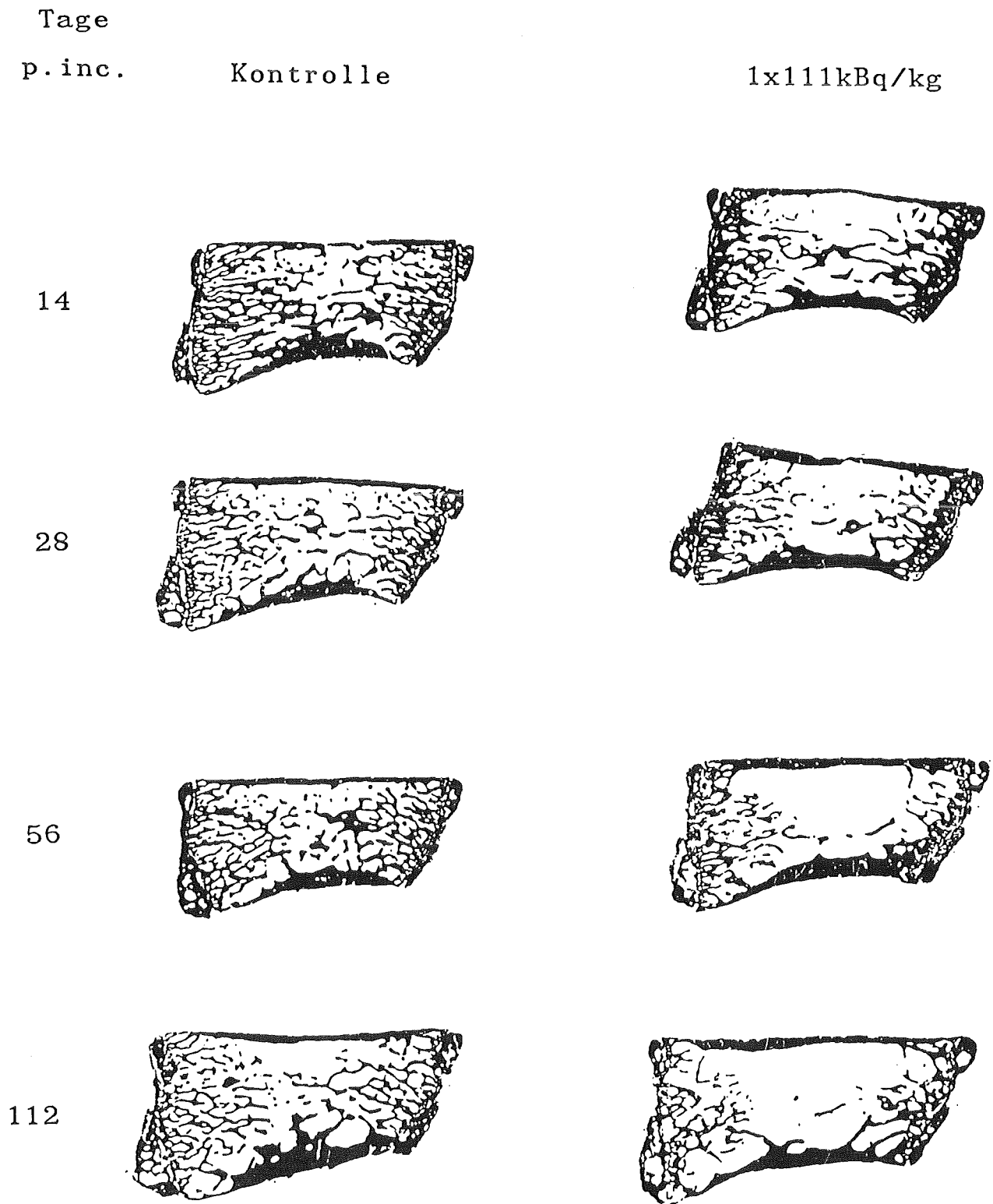


Abb. 26: Knochenstrukturveränderungen im 4. Lendenwirbel jung-erwachse-
ner männlicher Ratten nach Inkorporation von 1x111kBq/kg
²³⁹Plutonium (Vergrößerung 6,5x).

jung-erwachsene

jugendliche



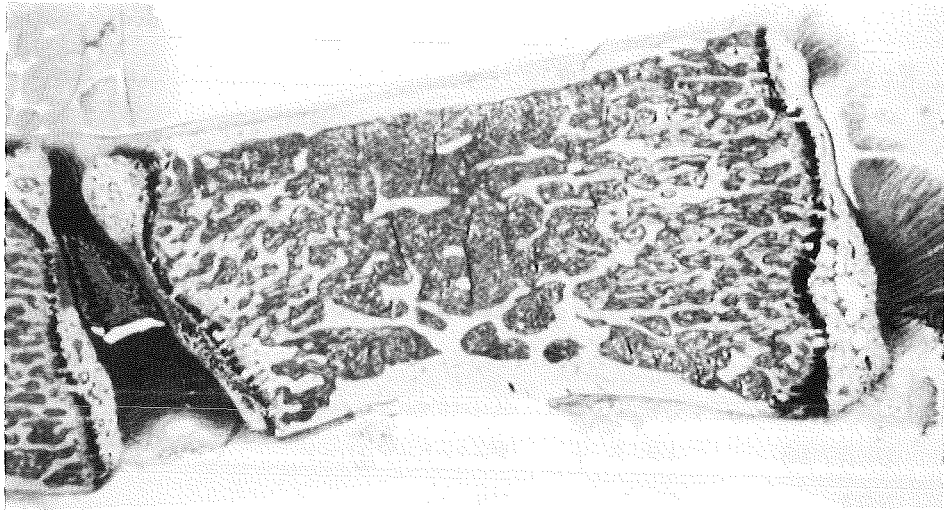
3x37kBq/kg



Therapiegruppe

Abb. 27: Vergleich der Knochenstruktur in 4. und 5. Lendenwirbel von jugendlichen und jung-erwachsenen männlichen Ratten 112 Tage nach Inkorporation von 3x37kBq/kg ²³⁹Pu mit und ohne Dekorporationstherapie durch Gabe von 10⁻³ molarer Zn-DTPA Lösung als Trinkwasser (Vergrößerung 6,5x).

Kontrolle



1x111kBq/kg



1x222kBq/kg

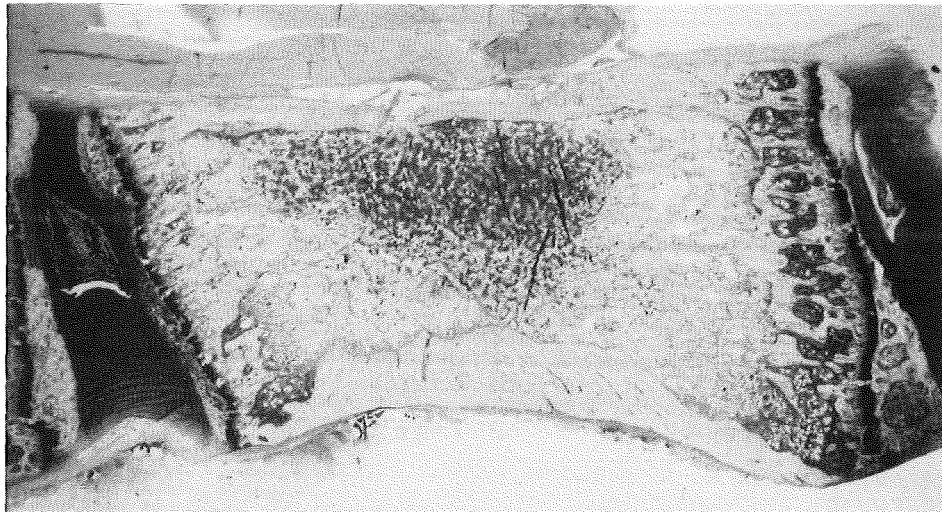


Abb. 28: Histopathologische Veränderungen an Knochen und Knochenmark in 4. Lendenwirbeln jung-erwachsener männlicher Ratten acht Wochen nach Inkorporation verschiedener Mengen von ²³⁹Plutonium. Giemsa, 15x.

7. Methodischer Anhang

Einbettungsschema für Spurr's Low Viscosity Epoxy Resin

Für das Einbettungsgemisch werden die Kunstharzkomponenten zu folgenden Anteilen benötigt:

ERL4206	25,0 g	Kunstharz
DER736	12,5 g	Weichmacher
NSA	65,0 g	Härter
S-1	0,75 g	Beschleuniger

Zulieferer:

Taab Laboratories Equipment Ltd.
40 Groveland Rd.
Reading, Berks.
England

Einbetttschema:

50% Aceton	2 Tage
75% Aceton	2 Tage
75% Aceton	3 Tage
100% Aceton	2 Tage
100% Aceton	2 Tage
100% Aceton	3 Tage
50% Resin/Aceton	2 Tage
75% Resin/Aceton	2 Tage
75% Resin/Aceton	3 Tage
100% Resin	2 Tage
100% Resin	2 Tage
100% Resin	3 Tage
100% Resin	2 Tage

in der letzten Infiltrationsstufe 4 Stunden im Vakuum, dann Ausbettung in Silikonkautschukformen.

Einbettungsschema für Methyl-Methacrylat

Entwässerung:

50% Methanol	8 Stunden
60% Methanol	16 Stunden
70% Methanol	8 Stunden
80% Methanol	16 Stunden
96% Methanol	8 Stunden
100% Methanol	16 Stunden
100% Ethanol	24 Stunden oder Aufbewahrung

Einbettung (Beginn Montag):

100% Ethanol	24 Stunden	
100% Ethanol	24 Stunden	
100% Ethanol	24 Stunden	
Xylol	24 Stunden	
Xylol	übers Wochenende	
MMA-Gemisch	24 Stunden	
MMA-Gemisch	24 Stunden	
MMA-Gemisch	24 Stunden	
MMA-Gemisch	8 Stunden	Gläschen
MMA-Gemisch	16 Stunden	Gläschen und Vakuum
Vakuum erneuern	1 Stunde	
Wasserbad 50°C	50 Minuten	
Wasserbad 34°C ⁺	über Nacht	

Gelatinieren von Objektträgern

Chemikalien:

Kaliumdichromat	Merck	4862
Schwefelsäure konz.p.a.	Merck	731
Gelatine gepulvert	Merck	4078
Kaliumchrom-III-sulfat	Fluka	60152

Lösungen:

Chrom-Schwefelsäure:

Kaliumdichromatlösung 10%	90 ml
Schwefelsäure konz.	10 ml

Gelatinelösung:

Gelatine, gepulvert	4 g
Aqua dest.	600 ml
Auflösen der Gelatine bei 60°C, Abkühlen der Lösung auf 50°C, Zusatz von	
Kaliumchrom III-sulfat-Lösung 4%	20 ml

Behandlung der Objektträger:

Objektträger 24 Stunden in Chrom-Schwefelsäure reinigen, mit warmem Leitungswasser spülen, kurz in Aqua dest. schwenken, gut abtropfen lassen, 5 Minuten in 50°C warme Gelatinelösung tauchen, gut ausschleudern und an staubarmem Ort trocknen und lagern.

Giensa-Färbung

Chemikalien:

di-Natriumhydrogenphosphat 1/15M	Merck	6587
Kaliumdihydrogenphosphat 1/15M	Merck	4875
Giensa-Lösung	Merck	9204

Phosphatpuffer:

pH 6,7:

di-Natriumhydrogenphosphat 1/15M	43,4 ml
Kaliumdihydrogenphosphat 1/15M	56,6 ml

pH 6,6:

di-Natriumhydrogenphosphat 1/15M	35,0 ml
Kaliumdihydrogenphosphat 1/15M	65,0 ml

Farblösungen:

Lösung 1:

Aqua dest.	49 ml
Phosphatpuffer pH 6,7	1 ml
Giemsa-Lösung	0,2ml

Lösung 2:

Aqua dest	49 ml
Phosphatpuffer pH 6,6	1 ml
Giemsa-Lösung	0,2ml

Färbeschema:

aus Aqua dest. in
Lösung 1 bei 50°C 50 Minuten
Lösung 2 bei 40°C 30 Minuten
in Aqua dest mit 3 Tropfen Eisessig pro 100 ml spülen
zwischen Filterblöckchen trocknen
mit Xylol benetzen und mit Eukitt eindecken

Trichromfärbung nach Ladewig

Chemikalien:

Hämatoxylin	Merck 4305
Eisen-III-chlorid	Merck 3943
Salzsäure 25%	
Phosphor-Wolfram-Säure	Merck 583
Methylblau	Merck 16316
Goldorange	Fluka 50840
Rubin S	Merck 7629

Farblösungen:

Weigerts Eisenhämatoxylin:

Lösung A:

Hämatoxylin	1 g
Ethanol	ad 100 ml

Lösung B:

Eisen-III-chlorid	1,16g
Salzsäure 25%	1 ml
Aqua dest.	98 ml

Gebrauchslösung:

Lösung A	25 ml
Lösung B	25 ml

immer frisch ansetzen

Ladewig-Lösung:

Methylblau	0,5 g
Goldorange	2 g
Aqua dest.	100 ml
Eisessig	8 ml

Lösung kochen und nach Erkalten filtrieren, Zusatz von
Rubin S 1 g

Lösung kochen und nach Erkalten filtrieren;
Herstellung mit Handschuhen unter einem Abzug;
Haltbarkeit der Lösung 4 Wochen.

Färbeschema:

Einstellen der Schnitte aus Wasser in	
Eisenhämatoxylin	über Nacht
fließend wässern	10 Minuten
Aqua dest.	spülen
Phosphor-Wolfram-Säure 25%	3 Minuten
Aqua dest.	spülen
Ladewig Lösung filtriert	35 Minuten
Aqua dest.	spülen
Methanol 96%	kurz differenzieren
Aqua dest.	spülen
zwischen Filterpapierblöcken trocknen;	
mit Xylol benetzen und mit Eukitt eindecken.	

Eisenfärbung mit Berlinerblau

Chemikalien:

Kaliumhexacyanoferrat-II p.a.	Merck 4984
Salzsäure 0,2N	

Kernechtrot	Merck	5189
Aluminiumsulfat	Merck	1100

Farblösungen:

Eisenlösung 1:

Kaliumhexacyanoferrat-II p.a.	2	g
Aqua dest.	100	ml

Eisenlösung 2:

Kaliumhexacyanoferrat-II p.a.	1	g
Aqua dest.	50	ml
Salzsäure 0,2N	50	ml

Kernechtrot-Lösung:

Kernechtrot	0,1	g
Aluminiumsulfat	5	g
Aqua dest.	ad 100	ml

aufkochen und nach Erkalten filtrieren

Färbeschema:

Schnitte aus Aqua dest. in	
Eisenlösung 1	5 Minuten
Eisenlösung 2	45 Minuten
Aqua dest.	spülen
Aqua dest.	spülen
Kernechtrot-Lösung bei 40°C	120 Minuten
Aqua dest.	spülen
zwischen Filterpapierblöcken trocknen;	
mit Xylol benetzen und mit Eukitt eindecken.	

Alizarinrot-Färbung

Chemikalien:

Alizarinrot S	Fluka	05600
Ammoniaklösung 25% p.a.	Merck	5432
Salzsäure rauchend p.a.	Merck	317

Farblösungen:

Alizarinrot-Lösung:

Alizarinrot S	1	g
Aqua dest.	90	ml
Ammoniaklösung 0,25%	10	ml
mit Ammoniaklösung auf pH 6.4 einstellen		
Salzsaurer Alkohol:		
Ethanol	1000	ml
Salzsäure rauchend	0,1	ml

Färbeschema:

nicht entacrylierte Schritte!

Alizarinrot-Lösung	3 Minuten
Aqua dest.	kurz spülen
Salzsaurer Alkohol	spülen
Ethanol absolut	spülen
lufttrocknen, mit Xylol benetzen und eindecken mit Eukitt.	

Calceinlösung 1,5%:

Calcein (Fluka 21030)	375	mg
NaHCO ₃ (Merck 6329)	500	mg
Aq. bidest.	ad 25	ml

Calceinlösung 3%:

Calcein	750	mg
NaHCO ₃	500	mg
Aq. bidest.	ad 25	ml

der pH-Wert beider Lösungen lag bei 7.

Tabelle des zeitlichen Ablaufs der Fluoreszenzmarkierung der jungen Ratten (oben) und jung-erwachsenen Ratten (mitte, unten).

Sektion d.p.i.	1. Farbstoffgabe d.p.i./Uhrzeit	2. Farbstoffgabe d.p.i./Uhrzeit	Intervall d
7	4 / 16 ⁰⁰	6 / 16 ⁰⁰	2
14	11 / 16 ⁰⁰	13 / 16 ⁰⁰	2
28	23 / 16 ⁰⁰	27 / 16 ⁰⁰	4
56	49 / 9 ⁰⁰	55 / 15 ⁰⁰	6,25
112	103 / 15 ⁰⁰	111 / 15 ⁰⁰	8
14	6 / 12 ⁰⁰	13 / 12 ⁰⁰ *	7
28	19 / 12 ⁰⁰	27 / 12 ⁰⁰ *	8
56	44 / 15 ⁰⁰	55 / 8 ⁰⁰ *	10,75
112	96 / 16 ⁰⁰	110 / 10 ⁰⁰	13,75
14	5 / 8 ⁰⁰	13 / 8 ⁰⁰	8
28	19 / 8 ⁰⁰	27 / 8 ⁰⁰	8
56	42 / 16 ⁰⁰	54 / 16 ⁰⁰	12

* Markierung mit Terramycin^R

```

C   PROGRAMM ZUR STRECKEN UND FLAECHENMESSUNG
C
    DIMENSION A(10),U(60),UDO(60),USI(60),UDI(60),UKI(60)
    *,F(60)
    DOUBLE PRECISION FI
C
C   BENUTZERANWEISUNGEN
C
    WRITE (5,4)
4   FORMAT (' MOP EINSCHALTEN')
    WRITE (5,9)
    WRITE (5,6)
6   FORMAT (' CLEAR SET SEND AREA LENGTH
    * ENTER')
    WRITE (5,9)
    WRITE (5,8)
8   FORMAT (' SETZE ALS ANZEIGE LENGTH')
    WRITE (5,9)
9   FORMAT ()
C
C   BENNENUNG DES PRAEPARATES
C
    WRITE (5,68)
68  FORMAT(' FILENAME (MAX. 8 ZEICHEN):',%)
    READ (5,64)FI
64  FORMAT (A8)
C
C   FLAECHE DES FELDDES UND MASSTABFAKTOR
C
    WRITE (5,9)
    WRITE (5,10)
10  FORMAT (' FLAECHE DES MESSFELDDES EINGEBEN
    *IN MM**2:',%)
    READ (5,11)FA1
    WRITE (5,110)
110 FORMAT (' MASSTABFAKTOR EINGEBEN:',%)
    READ (5,11)ANETZ
11  FORMAT (F10,6)
C
    ?
    WRITE (2,2)
2   FORMAT ()
C
C   BENUTZERANWEISUNGEN
C
    WRITE (5,32)FA1
    WRITE (5,12)
12  FORMAT (' DURCH DRUECKEN DER 0 KANN DER DER
    *MESSABLAUF GEAEENDERT WERDEN')
    WRITE (5,9)
C
    M=0
13  CONTINUE
    M=M+1
    WRITE (5,46)
46  FORMAT (' GESAMTUMFANG')
    WRITE (5,14)
14  FORMAT (5X,' BEGINN DER MESSUNG')
    CALL COUNT (M,A,U)
    WRITE (5,120)
120 FORMAT (' UMFANG MIT DOPPELMARKTIERUNG ')
    WRITE (5,14)
    CALL COUNT (M,A,UDO)
    WRITE (5,121)
121 FORMAT (' UMFANG MIT EINZELMARKTIERUNG')

```

```

WRITE (5,14)
CALL COUNT (M,A,USI)
WRITE (5,126)
126 FORMAT (' UNBESTIMMTE MARKIERUNG ')
CALL COUNT (M,A,UDI)
WRITE (5,122)
122 FORMAT (' UMFANG MIT KLASTEN ')
WRITE (5,14)
CALL COUNT (M,A,UKL)
WRITE (5,123)
123 FORMAT (' KNOCHENFLAECHE ')
WRITE (5,14)
CALL COUNTF (M,A,F)
WRITE (5,103)((U(J),J=1,M))
WRITE (5,103)((UDO(J),J=1,M))
WRITE (5,103)((USI(J),J=1,M))
WRITE (5,103)((UDI(J),J=1,M))
WRITE (5,103)((UKL(J),J=1,M))
WRITE (5,103)((F(J),J=1,M))
WRITE (5,198)M
IF (M,NE,10) GOTO 1000
WRITE (5,1001)
1001 FORMAT (' ABSPEICHERN ? ')
C
C LOOP EINGABE
C
1000 WRITE (5,101)
101 FORMAT(' NEUES FELD? JA(1) ODER NEIN(2):',#)
READ (5,102) LI1
102 FORMAT (I6)
IF(LI1,EQ,1)GOTO 13
C
C UNTERPROGRAMME ZUR BERECHNUNG
C
CALL ADD (M,U,US)
CALL ADD (M,UDO,UDOS)
CALL ADD (M,USI,USIS)
CALL ADD (M,UDI,UDIS)
CALL ADD (M,UKL,UKLS)
CALL ADD (M,F,FS)
C
C BERECHNUNG WEITERER PARAMETER
C
UDOSP=UDOS*100./US
USISF=USIS*100./US
UDISP=UDIS*100./US
UKLSF=UKLS*100./US
ULP=UDOSP+USISF+UDISP+UKLSF
FAKT=FLOAT(M)
FAS= FA1*FAKT
USS=US*ANETZ
UDOSS=UDOSP*ANETZ
USISS=USISF*ANETZ
UDISS=UDISP*ANETZ
UKLSS=UKLSF*ANETZ
FSS=FSS*((2*ANETZ)**2.)
USF=USS/FAS
UDOSF=UDOSS/FAS
USISF=USISS/FAS
UDISF=UDISS/FAS
UKLSF=UKLSS/FAS
FSF=FSS/FAS
USV=USS/FSS
UDOSV=UDOSS/FSS
USISV=USISS/FSS

```

UDISV=UDJSS/FSS
UKLSV=UKLSS/FSS

C
C
C
C

DRUCKANWEISUNGEN

```
OPEN (UNIT=3,FILE='MESS',STATUS='NEW')
WRITE (3,66)FI
66 FORMAT (1H0,AB)
WRITE (3,9)
WRITE (3,32)FA1
WRITE (3,9)
WRITE (3,34)ANETZ
WRITE (3,9)
32 FORMAT (' MESSFELDGROESSE IN MM*2:',F7.4)
34 FORMAT (' MASSTABFAKTOR :',F7.4)
WRITE (3,103)((U(J),J=1,M))
WRITE (3,103)((UDO(J),J=1,M))
WRITE (3,103)((USI(J),J=1,M))
WRITE (3,103)((UDI(J),J=1,M))
WRITE (3,103)((UKL(J),J=1,M))
WRITE (3,103)((F(J),J=1,M))
WRITE (3,9)
103 FORMAT (10F8.2)
WRITE (3,198)M
WRITE (3,9)
WRITE (3,199)FAS
WRITE (3,9)
WRITE (5,170) US,UDOS,USIS,UDIS,UKLS,FS
WRITE (3,170) US,UDOS,USIS,UDIS,UKLS,FS
WRITE (3,9)
170 FORMAT (6F12.2)
WRITE (3,206)UDOSP,USISP,UDISP,UKLSP,U1P
WRITE (3,9)
WRITE (3,207)
WRITE (3,9)
WRITE (5,200) USS,USF,USV
WRITE (3,200) USS,USF,USV
WRITE (3,9)
WRITE (5,201) UDOS,UDOSF,UDOSV
WRITE (3,201) UDOS,UDOSF,UDOSV
WRITE (3,9)
WRITE (5,202) USISS,USISF,USISV
WRITE (3,202) USISS,USISF,USISV
WRITE (3,9)
WRITE (5,203) UDISS,UDISF,UDISV
WRITE (3,203) UDISS,UDISF,UDISV
WRITE (3,9)
WRITE (5,204) UKLSS,UKLSF,UKLSV
WRITE (3,204) UKLSS,UKLSF,UKLSV
WRITE (3,9)
WRITE (5,205) FSS,FSF
WRITE (3,205) FSS,FSF
198 FORMAT (' ZAHL DER MESSFELDER:',I4)
199 FORMAT (' GEMESSENE GESAMTFLAECHE IN MM**2:',F7.4)
200 FORMAT (' SURFACE =',F10.4,' SURFACE/VOL.TOT =',
  *F10.4,' SURFACE/VOLBONE =',F10.4)
201 FORMAT (' SURF.DL =',F10.4,' SURF.DL/VOL.TOT =',
  *F10.4,' SURF.DL/VOLBONE =',F10.4)
202 FORMAT (' SURF.SL =',F10.4,' SURF.SL/VOL.TOT =',
  *F10.4,' SURF.SL/VOLBONE =',F10.4)
203 FORMAT (' SURF.IL =',F10.4,' SURF.IL/VOL.TOT =',
  *F10.4,' SURF.IL/VOLBONE =',F10.4)
204 FORMAT (' SURF.KL =',F10.4,' SURF.KL/VOL.TOT =',
  *F10.4,' SURF.KL/VOLBONE =',F10.4)
205 FORMAT (' VOLBONE =',F10.4,' VOLBONE/VOL.TOT =',
```



```

    *F10,4)
206 FORMAT (' DO % =',F7.2,2X, ' SI % =',F7.2,
    *2X,' DI % =',F7.2,2X,' KL % =',F7.2,2X,' GZ
    *=',F7.2)
207 FORMAT (24X,' MM/MM**2',19X,' MM/MM**2')
    CLOSE (UNIT=3,STATUS='KEEP')
    WRITE (5,1100)
1100 FORMAT (' WEITERE FELDER MESSEN ?',*)
    READ (5,1110) LI2
1110 FORMAT (I4)
    IF (LI2.EQ.1) GOTO 13
    STOP
    END

```

C
C
C

UNTERPROGRAMM ZUR ZAEHLUNG

```

1 SUBROUTINE COUNT (M,A,DOZ)
  DIMENSION A(1)
  DIMENSION DOZ(1)
  INTEGER*4 I,M
  U=0.
40 CONTINUE
  GOTO 47
46 WRITE (5,51)
51 FORMAT (' MOP AUSGESTIEGEN! LETZTE STRUKTUR
  * NOECHMALS MESSEN.',*)
47 CONTINUE
  READ (2,*,ERR=46)(A(I), I=1,5)
  IF (A(2).EQ.0..AND.A(4).EQ.0.) GOTO 38
  U=U+A(2)
  GOTO 40
38 CONTINUE
  WRITE (5,41)
41 FORMAT (' KORREKTUR ?')
  READ (2,*,ERR=46)(A(I), I=1,5)
  IF (A(2).EQ.0..AND.A(4).EQ.0.) THEN
    GOTO 50
  ELSE
    WRITE (5,42)
42 FORMAT (' SUBTRAKTION = 1')
    READ-(5,43) I
43 FORMAT (I4)
    IF (I.EQ.1) GOTO 44
    GOTO 40
44 WRITE (5,45)
45 FORMAT (' SUBTRAKTIONSMESSUNG')
    READ (2,*,ERR=46)(A(I), I=1,5)
    IF (A(2).EQ.0..AND.A(4).EQ.0.) GOTO 50
    U=U-A(2)
    GOTO 44
  ENDIF
50 CONTINUE
  DOZ(M)=U
  RETURN
  END

```

C
C
C

UNTERPROGRAMM ZUR FLAECHENMESSUNG

```

SUBROUTINE COUNTF (M,A,DOZ)
  DIMENSION A(1)
  DIMENSION DOZ(1)
  INTEGER*4 I,M
  U=0.
40 CONTINUE
  GOTO 47

```

```

46 WRITE (5,51)
51 FORMAT (' MOP AUSGESTIEGEN! LETZTE STRUKTUR
* NOCHMALS MESSEN.',#)
47 CONTINUE
  READ (2,*,ERR=46)(A(I), I=1,5)
  IF (A(2).EQ.0.,AND,A(4).EQ.0.) GOTO 38
  U=U+A(4)
  GOTO 40
38 CONTINUE
  WRITE (5,41)
41 FORMAT (' KORREKTUR ?')
  READ (2,*,ERR=46)(A(I), I=1,5)
  IF (A(2).EQ.0.,AND,A(4).EQ.0.) THEN
    GOTO 50
  ELSE
    WRITE (5,42)
42 FORMAT (' SUBTRAKTION = 1')
    READ (5,43) I
43 FORMAT (I4)
    IF (I.EQ.1) GOTO 44
    GOTO 40
44 WRITE (5,45)
45 FORMAT (' SUBTRAKTIONSMESSUNG')
    READ (2,*,ERR=46)(A(I), I=1,5)
    IF (A(2).EQ.0.,AND,A(4).EQ.0.) GOTO 50
    U=U-A(4)
    GOTO 44
  ENDIF
50 CONTINUE
  DOZ(M)=U
  RETURN
  END

C
C   UNTERPROGRAMM ZUR SUMMIERUNG DER FELDER
C
  SUBROUTINE ADD (M,DOZ,SUM)
  DIMENSION DOZ(1)
  SUM=0.
  DO 1 I=1,M
  SUM=SUM+DOZ(I)
1 CONTINUE
  RETURN
  END

C
C   UNTERPROGRAMM FUER STEREOLOGISCHE GROESSEN
C

```

200NEU

MESSFELDGROESSE IN MM*2: 0.1650

MASSTABFAKTOR : 0.0044

382.68	285.52	228.46	176.41	279.22	214.89	269.23	335.83	212.44	149.79
330.02	242.62	245.29	207.85	258.87	289.00	337.00	297.49	284.50	259.37
281.07									
0.00	42.50	21.14	31.92	63.34	27.03	23.70	31.09	0.00	0.00
10.97	0.00	24.64	0.00	19.35	28.18	0.00	0.00	0.00	53.05
0.00									
18.22	13.38	47.42	14.63	36.13	0.00	21.90	29.89	0.00	18.66
0.00	69.59	68.94	4.33	31.23	45.14	33.14	37.32	21.62	39.14
62.14									
0.00	19.10	26.77	25.82	45.32	42.77	39.59	22.19	85.26	73.18
10.11	0.00	13.13	32.09	14.15	30.56	49.87	69.65	34.43	33.28
0.00									
0.00	10.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.94	6.13	0.00
3.90	6.10	10.14	9.43	0.00	5.41	8.21	18.62	6.12	0.00
32.85									
1226.62	1043.25	839.15	940.97	653.04	627.88	1401.92	1337.48	681.23	941.22
928.47	540.93	777.37	575.41	641.36	589.85	1008.21	1179.03	804.29	930.00
1284.19									

ZAHL DER MESSFELDER: 21

GEMESSENE GESAMTFLAECHE IN MM**2: 3.4650

5567.53 376.91 612.81 667.27 121.78 18951.86

DO % = 6.77 SI % = 11.01 DI % = 11.99 KL % = 2.19 G% = 31.95

MM/MM**2

MM/MM**2

SURFACE =	24.3023	SURFACE/VOL.TOT =	7.0136	SURFACE/VOLBONE =	16.8255
SURF.DL =	1.6452	SURF.DL/VOL.TOT =	0.4748	SURF.DL/VOLBONE =	1.1391
SURF.SL =	2.6749	SURF.SL/VOL.TOT =	0.7720	SURF.SL/VOLBONE =	1.8520
SURF.IL =	2.9126	SURF.IL/VOL.TOT =	0.8406	SURF.IL/VOLBONE =	2.0165
SURF.KL =	0.5316	SURF.KL/VOL.TOT =	0.1534	SURF.KL/VOLBONE =	0.3680
VOL.BONE =	1.4444	VOL.BONE/VOL.TOT =	0.4168		

8. Schrifttum

- Bai74 Bair W.J. and Thompson R.C., "Plutonium: Biomedical Research", Science 183,715-722, 1974.
- Bal67 Ballou J.E. et al., "Comparative toxicity of ^{238}Pu Plutonium and ^{239}Pu Plutonium in the rat", Health Phys. 13, 1087-1092, 1967.
- Bal83 Balmain N. et al., "Metaphyseal pattern: uniqueness of this structure in growing bones originating from cartilaginous anlage. A microradiographic study", Calcif Tissue Int 35, 225-231, 1983.
- Bar84 Baron R. et al., "Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: Morphology, dynamic histomorphometry and changes during skeletal maturation", Anat.Rec. 208, 137-145, 1984.
- Ben68 Beno M., "A study of haemosiderin in the marrow of the femur of the normal young adult rabbit compared with that in rabbits four month after an intravenous injection of ^{239}Pu nitrate", Br.J.Haemat. 15,487-495, 1968.
- Boe81 Boehringer Mannheim GmbH, "Laboruntersuchungen für die Diagnose und Verlaufskontrolle in der Veterinärmedizin", Verfasser Schmidl M., 2.Auflage, 45-46 und 125-130, 1981.
- Bru84 Bruenger F.W. et al., "Radiation Dose Rates to the Proximal Humerus of Growing Beagles Injected with ^{239}Pu " Rad.Res. 97, 302-317, 1984.
- Bur66 Burkhardt R., "Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarkes. 1.Mitteilung", Blut 13(6), 337-357, 1966.
- Bur66a Burkhardt R., "Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarkes. 2. Mitteilung", Blut 14, 30-46, 1966.
- Cha83 Chan Y.L. et al., "Effect of aluminum on normal and uremic rats: Tissue distribution, vitamin D metabolites and quantitative bone histology", Calcif.Tissue Int. 35, 344-351, 1983.
- Cha84 Charles River Technical Bulletin, 3(2), 1984.
- Cla62 Clarke W.J., "Comparative histopathology of plutonium, radium and strontium in pig bone", Health Phys. 8, 621-627

1962.

- Cle85 Clermonts E.C.G.M. et al., "Software for bone histomorphometry by means of a digitizer", *Comp.Meth.Prog.Biomed.* 21, 185-194, 1985.
- Com86 Compston J.E. et al., "Inter-observer and intra-observer variation in bone histomorphometry", *Calcif. Tissue Int.* 38, 67-70, 1986.
- Cra76 Crawley F.E.H. et al., "A Comparison of ²³⁹Plutonium in Soft Tissues and Skeleton of Mice, Rats and Hamsters", *Health Phys.* 30, 491-493, 1976.
- Dou69 Dougherty J.H. et al., "Leukocyte depression in beagles injected with ²²⁶Ra or ²³⁹Pu", in "Delayed effects of bonesseeking radionuclides", Ed.: Mays C.W. et al., Univ. of Utah Press, 457-470, 1969.
- Dun80 Dunstan C.R. and Evans R.A., "Quantitative Bone Histology: A New Method", *Pathology* 12, 255-246, 1980.
- Dur60 Durbin P.W., "Metabolic characteristics within a chemical family", *Health Phys.* 2, 225-238, 1960.
- Dur75 Durbin P.W., "Plutonium in mammals: Influence of plutonium chemistry, route of administration, and physiological status of the animal on initial distribution and long term metabolism", *Health Phys.* 29, 495-510, 1975.
- Far84 Farnum C.E. et al., "Lectin-Binding Histochemistry of Non-Decalcified Growth Plate Cartilage: A Postembedding Method for Light Microscopy of Epon-embedded Tissue", *J.Histochem.Cytochem.* 32(6), 593-607, 1984.
- Fis71 Fischer H.A. und Werner G., "Die Autoradiographie mikroskopischer Objekte", in *Autoradiographie*, de Gruyter Verlag Berlin, 1971.
- Fro81 Frost H.M. et al., "Histomorphometric Changes in Trabecular Bone of Renal Failure Patients Treated with Calcifediol", *Metab. Bone Dis.Rel.Res.* 2, 285-295, 1981.
- Fro81a Frost H.M., "Appropriate and inappropriate animal models", *Orthop.Clin.North Am.* 12, 735-737, 1981.
- Fro83 Frost H.M., "The skeletal intermediary organization", *Metab.bone Dis. Rel. Res.* 4(5), 281-290, 1983.
- Fro84 Frost H.M., "The ADFR concept revisited", *Calcif. Tissue Int.* 36, 349-353, 1984.

- Fur86 Furuta Y. et al., "Effect of 16, 16-Dimethyl PGE 2 Methyl Ester on weanling rat skeleton: daily and systemic administration", *Anat.Rec.* 215, 305-316, 1986.
- Gös85 Gössner W., Luz A., Heuk F., "Stahlenempfindlichkeit von Organen und Geweben: Knochen" in *Handbuch der medizinischen Radiologie*, Bd.20 Teil I, Kapt.II, Abschn. 7.
- Gre81 Green D. et al., "Morphometric studies on mouse bone using a computer-based image-analysis system", *J.Microscopy* 122, 49-58, 1981.
- Gru76 Grube B.J. et al., "Cellular and extracellular distribution of plutonium in rat liver", in *The Health Effects of Plutonium and Radium*, 183-198, Ed.: Jee, W.S.S., J.W.Press, 1976.
- Han72 Hansson L.I. et al., "Rate of normal longitudinal bone growth in the rat", *Calcif.Tissue Int.* 10, 238-251, 1972.
- Har78 Harrison J.D., "Experimental studies of the translocation of plutonium from simulated wound sites in the rat", *Int.J.Radiat.Biol.* 33(5), 457-472, 1978.
- Har86 Harrison J.E. et al., "The relationship between bone apposition rate and vitamin D activity in phosphate deficient rats", *Metabolism* 35, 126-129, 1986.
- Hel48 Heller M., in "Histopathology of Irradiation" Ed.: Bloom W. *National Nuclear Energy Series IV-22I*, Chpt.5, 70-161, McCraw-Hill Book Company, 1948.
- Hen82 Henk H.-H., "Die zivilisatorisch bedingte Strahlenbelastung", 9.Auflage, Hamburgische Electricitäts-Werke AG.
- Heu85 van den Heuvel R. et al., "Functional damage to bone marrow fibroblasts after contamination with ²⁴¹Americium" in "Metals in bone", Ed.: Priest N.D., MTP Press Ltd, 63-70, 1985
- Hog82 Hogan D.L. et al., "Unconventional application of Standard Light and Electron Immunocytochemical Analysis to Aldehyde-fixed, Araldite-embedded Tissue", *J.Histochem. Cytochem.* 30(12), 1301-1306, 1982.
- Hol75 Hollins J.G. et al., "An analysis of the retention of plutonium by the tissues of the rat", *Rad. Res.* 61, 468-477 1975.
- Hor85 Horton M.A. et al., "On the origin of the osteoclast:

- The cell surface phenotype of rodent osteoclasts", *Calcif. Tissue Int.* 37, 46-50, 1985.
- Hug74 Hug O., "Medizinische Strahlenkunde", 19-20, Springer, Berlin, 1974.
- Hut84 Hutzschenreuter P. et al., "Embedding, Cutting and Grinding Methods to Produce Undecalcified Cortical Bone Sections Over the Whole Bone", *Acta Anat.* 118, 201-204, 1984.
- ICRP48 ICRP Publication 48, "The metabolism of plutonium and related elements", Vol. 16, No 2/3, 1986.
- Ima68 Imai Y. et al., "A Removing Method of the Resin from Epoxy-Embedded Sections for Light Microscopy", *J. Electron Microscopy* 17(1), 84-85, 1968.
- Jee62 Jee W.S.S. et al., "The skeletal toxicity of ^{239}Pu in adult beagles", *Health Phys.* 8, 599-607, 1962.
- Jee72 Jee W.S.S., "The distribution and toxicity of ^{239}Pu in bone", *Health Phys.* 22, 583-595, 1972.
- Jee84 Jee W.S.S. et al., "Image analysis of calcified tissues", in Dickson G.R. (Ed.), "Methods of Calcified Tissue Preparation", Chapt.22, 673-696, 1984.
- Jee85 Jee W.S.S. et al., "The Effects of Prostaglandin E2 in Growing Rats: Increased Metaphyseal Hard Tissue and Cortico-Endosteal Bone Formation", *Calcif. Tissue Int.* 37, 148-157, 1985.
- Kim80 Kimmel D.B. et al., "A Quantitative Histologic Analysis of the Growing Long Bone Metaphysis", *Calcif. Tissue Int.* 32, 113-122, 1980.
- Kim82 Kimmel D.B. et al., "A Quantitative Histologic Study of Bone Turnover in Young Adult Beagles", *Anat. Rec.* 203, 31-45, 1982.
- Kon79 Kontron Messgeräte GmbH, Breslauerstr. 2, 8057 Eching/München, MOP Quantitative Bildauswertung: Bedienungsanleitung, März 1979.
- Kra82 Kragstrup J. et al., "Estimation of the Three-Dimensional Wall Thickness of Completed Remodeling Sites in Iliac Trabecular Bone", *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 4, 113-119, 1982.
- Kra85 Kragstrup J., "Osteons in Trabecular Bone: Morphometric

- Study of Bone Formed by Remodeling", Thesis, Laegeforenings Forlag, Kobenhavn, 1985.
- Kum73 Kummermehr J., "Mikroradiographische Untersuchungen über den Einbau und die Retention von ^{45}Ca im Kniegelenk der Ratte nach lokaler Röntgenbestrahlung mit 2000 R", GSF-Bericht 8451, 1973.
- Län87 Längle U. Kerforschungszentrum Karlsruhe, persönliche Mitteilungen
- Mah74 Mahlum D.D. et al., "Distribution and toxicity of monomeric and polymeric ^{239}Pu in immature and adult rats", Rad.Res. 60, 75-88, 1974
- Mah75 Mahlum D.D. et al., "Influence of age on the development of bone tumours in rats injected with ^{239}Pu -citrate", Bericht BNWL-1950, Pt. 1, 79-81, 1975.
- Mal82 Malluche H.H. et al., "A new semiautomatic method for quantitative static and dynamic bone histology", Calcif. Tissue Int. 34, 439-448, 1982.
- Man81 Manaka R.C. et al., "A program package for quantitative analysis of histologic structure and remodeling dynamics of bone", Computer Programs in Biomedicine 13, 191-202, 1981.
- Mar85 Marie P.J. et al., "Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats", in "Metals in Bone", Ed.: Priest N.D., MTP Press Ltd., 117-125, 1985
- Mer70 Merz W.A. et al., "Quantitative structural analysis of human cancellous bone", Acta anat. 75, 54-66, 1970.
- Mil75 Miller S.C. et al., "EHDP effects on growth and modeling of the rat tibia", Calcif.Tissue Res. 18, 215-231, 1975.
- Mil83 Miller S.C. et al., "Studies on the role of vitamin D in early skeletal development mineralization and growth in rats", Calcif.Tissue Int. 35, 455-460, 1983.
- Mil85 Miller S.C. et al., "Effects of EDITEMPA and HEPB on calcium absorption, longitudinal bone growth and bone histology in the growing rat", Toxicol.Appl.Pharmacol. 77, 230-239, 1985.
- Mil86 Miller S.C. et al., "Changes in bone mineral and bone formation rates during pregnancy and lactation in rats",

- Bone 7, 283-287, 1986.
- Min84 Minne H.W. et al., "Inflammation-mediated osteopenia the rat: A new animal model for pathological loss of bone mass", *Endocrinology* 115, 50-54, 1984.
- Mos79 Moskalev Y.I. (Ed.), "Toxicology and Radiobiology of $^{237}\text{Neptunium}$ ", Moscow Atomzidat Publishers, Englische Übersetzung: ORNL-tr-4936, 1979.
- Mül86 Müller H.-L., "Zum biologischen Verhalten von Uran/Plutonium - Mischoxidaerosolen: Inhalationsversuche mit Ur Ratten und in vitro-Studien mit Alveolarmakrophagen", Dissertation, Universität Karlsruhe, 1986.
- Nog80 Nogues C. et al., "Bone remodeling in centrifuged rats: Histomorphometric study after an 18-day run", *Aviat.Space Environ.* 51, 50-55, 1980.
- Owe80 Owen M., "The origin of bone cells in the postnatal organism", *Arthritis&Rheumatism* 23(10), 1073-1079, 1980.
- Par83 Parfitt A.M., "Stereologic basis of bone histomorphometry; Theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension", in "Bone Histomorphometry", Recker R.R. (Ed.), Chpt. 5, CRC Press, Boca Raton, 1983.
- Par84 Parfitt A.M., "The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in the light of recent advances in the cell biology of bone", *Calcif.Tissue Int.* 36, S37-S45, 1984.
- Pöm74 Pömsl H., "Frühschäden an Tibia und Wirbel der Maus nach Inkorporation von $^{227}\text{Thorium}$ und $^{224}\text{Radium}$ ", Dissertation, Fakultät für Medizin der TU München, 1974.
- Pol76 Polig E., "Topographic analysis of the microdistribution of ^{241}Am in the rat femur as influenced by DTPA treatment", *Rad.Res.* 67, 128-141, 1976.
- Pol81 Polig E. et al., "Alpha-Dosimetry and fluorescence label analysis in bone", *Proc.Eulep Symp. "Bone and bone seeking radioneclides"*, EUR 7168 EN, 73-90, 1981.
- Pol84 Polig E. et al., "Microdistribution and localized dosimetry of ^{241}Am in bones of beagle dogs", *Int.J.Radiat. Biol.* 46(2), 143-160, 1984.
- Pol84a Polig E. et al., "Morphometry of bone cell nuclei and their location relative to bone surfaces", *Phys.Med.Biol.*

- 29(8), 939-952, 1984.
- Pol85 Polig E., Kernforschungszentrum Karlsruhe, persönliche Mitteilungen
- Pol85a Polig E. et al., "Automated trabecular bone histomorphometry", *Bone* 6, 357-359, 1985.
- Pol86 Polig E. et al., "Cell-specific radiation dosimetry in the skeleton", *Calcif. Tissue Int.* 39, 119-122, 1986.
- Pri80 Priest N.D. et al., "Uptake and loss of plutonium from osteoclasts and macrophages in the mandibular condyle of the rat", *Calcif. Tissue Int.* 30, 15-20, 1980.
- Pri83 Priest N.D. et al., "Pattern of uptake of ²⁴¹Americium by the rat skeleton and its subsequent redistribution and retention: Implications for human dosimetry and toxicology", *Human Toxicol.* 2, 101-120, 1983.
- Rah80 Rahn B.A. et al., "Methode zur Fluoreszenzmorphometrie des Knochenanbaues", *acta traumatol.* 10, 109-115, 1980.
- Rec83 Recker R.R. (Ed.), "Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation", CRC Press, Boca Raton, Florida, 1983.
- Rev83 Revell P.A., "Histomorphometry of bone", *J.Clin.Pathol.* 36, 1323-1331, 1983.
- Rin79 Ringler D.H. et al., "Hematology and clinical biochemistry" in "The laboratory rat", Vol.I, 105 ff., Ed.: Baker H.J. et al., 1979.
- Rom68 Romeis B., "Mikroskopische Technik", 138, 168, 315, Oldenbourg Verlag, München, 1968.
- Sac68 Sachs L., "Statistische Auswertungsmethoden", Springer, Berlin, 1968.
- San81 Sanderson J.H. et al., "An atlas of laboratory animal haematology", 38 ff., Clarendon Press, Oxford, 1981.
- Sav83 Savelkoul T.J.F. et al., "A rapid method for preparing undecalcified section of bone for autoradiographic investigation with short-lived radionuclides", *Stain Technol.* 58, 1-5, 1983.
- Schä84 Schäffer u. de Fries, GSF/Neuherberg, persönliche Mitteilungen.
- Sche69 Schenk R.K. et al., "A quantitative histological study on bone resorption in human cancellous bone", *Acta anat.* 74, 44-53, 1969.

- Sche73 Schenk R.K. et al., "Effect of EHDP and Cl₂MDP on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats", *Calcif. Tissue Res.* 11, 196-214, 1973.
- Sche84 Schenk R.K. et al., "Preparation of calcified tissue for light microscopy", in Dickson G.R. (Ed.), "Methods of Calcified Tissue Preparation", Chpt 1, 1-54, 1984.
- Scho85 Schoeters G. et al., "The study of damage to bone marrow cells as a biological dosimeter after contamination with osteotropic alpha emitters", in "Metals in Bone", Ed.: Priest N.D., 51-61, 1985.
- Schu85 Schulz A. u. Braungart, Universität Gießen, persönliche Mitteilungen.
- See81 Seelmann-Eggebert W. et al., "Karlsruher Nuklidkarte", Gersbach Verlag, München, 1981.
- Sei72 Seidel A. et al., "Rapid determination of some transuranium elements in biological material by liquid scintillation counting", *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes* 23, 1-4, 1972.
- Sei74 Seidel A. "Tierexperimentelle Untersuchungen zur Dekorporation von Americium (III) durch Diäthylentriaminpentaacetat", Habilitationsschrift, Universität Karlsruhe, 1974.
- Sik76 Sikov M.R. et al., "Influence of age and physico-chemical form on the effects of ²³⁹Pu on the skeleton of the rat", in "The Health Effects of Plutonium and Radium", 33 ff, Ed.: Jee W.S.S., J.W. Press, 1976.
- Sin76 Sinyakov E.G., *Radiobiologia* 16, 631, 1976 (in russisch).
- Sno72 Snodgrass A.B., "Conventional histopathologic staining methods compatible with epon-embedded, osmicated tissue", *Lab. Invest.* 26(3), 329-337, 1972.
- Son80 Sontag W., "An automatic microspectrophotometric scanning method for the measurement of bone formation rates in vivo", *Calcif. Tissue Int.* 32, 63-68, 1980.
- Son83 Sontag W., "The early distribution of ²³⁹Pu, ²⁴¹Am and ²³³U in the soft tissues and skeleton of old rats. A comparative study", *Human Toxicol.* 2, 91-100, 1983.
- Son84 Sontag W., "Distribution of ²³⁹Plutonium in the

- skeleton of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) during the first 15 month after injection", *Int.J.Radiat.Biol.* 45(1), 51-64, 1984.
- Son84a Sontag W., "Long-term behaviour of ^{239}Pu , ^{241}Am and ^{233}U in different bones of one-year-old rats: Macro-distribution and macrodosimetry", *Human Toxicol.* 3, 469-483, 1984.
- Son85 Sontag W., "The pattern of calcium deposition in rat bone as demonstrated by Calcein labeling", in "Metals in Bone", Ed.: Priest N.D., 29-37, MTP Press, 1985.
- Sta73 Stannard J.N., "Biomedical aspects of Plutonium", in "Uranium, Plutonium, Transplutonic Elements", Ed.: Hodge, Stannard, Hursh, "Handbook Exp. Pharm. XXXVI", Chpt. 8, 390 ff., Springer, Berlin, 1973.
- Ste82 Stenström A. et al., "Effect of ovariectomy on longitudinal bone growth in the rat", *Anat.Embryol.* 164, 9-18, 1982.
- Sul85 Sullivan M.F. et al., "Further studies on the influence of chemical form and dose on absorption of Np, Pu, Am and Cm from the gastrointestinal tracts of adult and neonatal rodents", *Health Phys.* 48(1), 61-73, 1985.
- Sve85 Svensson O. et al., "The effect of manganese ingestion, phosphate depletion and starvation on the morphology of the epiphyseal growth plate", *Clin.Orthop.* 187, 286-294, 1985.
- Tam78 Tam C.S. et al., "Bone apposition rate as an index of bone metabolism", *Metabolism* 27(2), 143-150, 1978.
- Tap66 Tapp E., "Tetracycline labelling methods of measuring the growth of bones in rats", *J.Bone Joint Surg.* 48, 517-525, 1966.
- Tay61 Taylor D.M. et al., "The metabolism of Americium and Plutonium in the rat", *Phys.Med.Biol.* 6, 73-86, 1961.
- Tay73 Taylor D.M., "Chemical and physical properties of Plutonium", in "Uranium, Plutonium, Transplutonic Elements", Ed.: Hodge, Stannard, Hursh, "Handbook Exp.Pharm. XXXVI, Chpt.9, 323 ff., Springer, Berlin.
- Tay83 Taylor D.M., "The comparative retention of bone-seeking radionuclides in the skeleton of rats", *Health Phys.*

45(3), 768-772, 1983.

Tra82 Tran Van P. et al., "Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat", *Anat.Rec.* 202, 445-451, 1982.

Uen85 Ueno K. et al., "The effect of prostaglandin E2 in rapidly growing rats: Depressed longitudinal and radial growth and increased metaphyseal hard tissue mass", *Bone* 6, 79-86, 1985.

Urb84 Urban M.F., "Dosisbestimmung durch gleichzeitiges Messen der Radon/Thoronkonzentration und der Gleichgewichtsfaktoren in Luft mit Hilfe eines passiven Dosimeters", Dissertation, Universität Karlsruhe, 1984.

Vau73 Vaughan J., "Distribution, excretion and effects of Plutonium as a bone seeker", in "Uranium, Plutonium and Transplutonic Elements", Ed.: Hodge, Stannard, Hursh, "Handbook Exp.Pharm. XXXVI", Chpt.10, 359 ff., Springer, Berlin.

Vau73a Vaughan J., "The effects of irradiation on the skeleton", Chpt.9 "Plutonium Isotopes", Clarendon Press, 1973.

Vau81 Vaughan J., "Osteogenesis and Haematopoiesis", *The Lancet*, July 18, 133-135, 1981.

Ver85 Vernejoul M.C. de et al., "Histomorphometric evidence of deleterious effects of aluminum on osteoblasts", *Bone* 6, 15-20, 1985.

Ver85a Vernejoul M.C. de et al., "Effects of iron overload on bone remodeling in pigs", in "Metals in Bone", Ed.: Priest N.D., MTP Press Ltd., 321-333, 1985.

Voi84 Voisin M.C. et al., "Study on static morphometric parameters for a diagnostic approach of osteoporosis", *Path.Res.Pract.* 178, 378-383, 1984.

Vol74 Volf V., "Experimental background for prompt treatment with DTPA of ²³⁹Pu-contaminated wounds", *Health Phys.* 27, 273-277, 1974.

Vol78 Volf V., "Treatment of incorporated transuranium elements", IAEA, STI/DOC/10/184, Wien 1978.

Vol79 Volf V. et al., "Prevention of late effects by removal of radionuclides from the body ?", IAEA-SM-237/23, 41-51,

1979.

- Wat81 Watts R.H. et al., "Improvements in histological techniques for epoxy-resin embedded bone specimens", *Stain Technol.* 56(3), 155-161, 1981.
- Wei84 Weinstein R.S. et al., "Bone histomorphometry in vitamin D deficient rats infused with calcium and phosphorus", *Am.J.Physiol.* 246, 499-505, 1984.
- Wir85 Wirth R.E., "Biologie des Neptuniums", Dissertation, Universität Karlsruhe, 1985.
- Woo84 Woodard J.C. et al., "Effect of diet and intranephronic calculosis on bone modeling and parathyroid volume in rats", *J.Nutrition* 114, 2339-2352, 1984.
- Wro80 Wronski T.J., "The microdistribution and retention of injected ^{239}Pu on trabecular bone surfaces of the beagle: Implications for the induction of osteosarcoma", *Rad.Res.* 83(2), 74-89, 1980.
- Wro82 Wronski T.J. et al., "Skeletal abnormalities in rats induced by simulated weightlessness", *Metab.Bone Dis.Rel.Res.* 4, 69-75, 1982.
- Wro85 Wronski T.J. et al., "Skeletal alterations in ovariectomized rats", *Calcif.Tissue Int.* 37, 324-328, 1985.
- Wro86 Wronski T.J. et al., "Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats", *Bone* 7, 119-123, 1986.
- Xip74 Xipell J. et al., "A method for the preparation of undecalcified bone sections for light microscopy and microradiography", *Stain Technol.* 49(2), 69-76, 1974.
- Yen68 Yensen J., "Removal of Epoxy Resin from Histological Sections following Halogenation", *Stain Technol.* 43, 344-346, 1968.
- Zal85 Zallone A.Z. et al., "Autoradiographic demonstration of in vitro fusion of blood monocytes with osteoclasts", *Bas.Appl.Histochem.* 29, 45-48, 1985.