

## University of Groningen

### Recirculatie en transformatie van lymphocyten

Bos, Wilhelm Herman

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1967

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Bos, W. H. (1967). *Recirculatie en transformatie van lymphocyten*. [s.n.].

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

RECIRCULATIE EN TRANSFORMATIE  
VAN LYMPHOCYTEN

W. H. BOS

RECIRCULATIE EN TRANSFORMATIE  
VAN LYMPHOCYTEN

## STELLINGEN

### I

De aanwezigheid van follikelrandcellen is via het proces van de "antigen-trapping" een voorwaarde voor het tot stand komen van een "antibody response".

### II

Een beperkte celafgifte door de thymus is voldoende om het van dit orgaan afhankelijke deel van het lymfoïede systeem in stand te houden.

### III

Bij de beoordeling van de benigne lymphoplasieën van de huid kan beter uitgegaan worden van de histofysiologie van de lymphklier dan van de uitsluitend morphologische indeling volgens Mach.  
Arch. f. klin. u. exp. Derm. 222. 325-349 (1965)

### IV

De melanosis praecancerosa (Dubreuilh) heeft een karakteristiek klinisch beeld waarbij de pathologisch-anatomisch gevonden afwijkingen slechts gering kunnen zijn.

### V

De behandeling van psoriasis met folinezuur-antagonisten moet beperkt blijven tot die gevallen welke resistent gebleken zijn tegen iedere locale therapie, en mag alleen geschieden onder nauwgezette controle.

### VI

Tijdens de behandeling van een monilia-vulvovaginitis dient het gebruik van ovulatieremmende contraceptiva te worden afgeraden.

### VII

De leeftijd van de patient is geen factor van belang bij de indicatiestelling tot een stereotactische operatie ter behandeling van de ziekte van Parkinson.



## VIII

Het is waarschijnlijk dat de destructie van gewrichten bij de verschillende gewrichtsaandoeningen, geheel onafhankelijk van de aetiologie, langs een gemeenschappelijke weg verloopt.

## IX

Tegen het gebruik van Lasix bij de behandeling van verhoogde intracranieële druk zijn bedenkingen aan te voeren.

## X

Aan de pharmaca noradrenaline en metaraminol (Aramine) komt geen plaats meer toe bij de behandeling van septische shock.

## XI

Bij zuigelingen met hyperbilirubinaemie dient hypo-albuminaemie uitgesloten te worden.

## XII

Het verdient aanbeveling te onderzoeken in hoeverre de z.g. sensitivity-training een bijdrage kan leveren tot de medische opleidingen.

## XIII

Voor het tot consolidatie brengen van een pseudarthrose is resectie van het weefsel tussen de breukuiteinden niet noodzakelijk.

## XIV

De behandeling van hypertrofische tonsillen met behulp van ioniserende stralen is onjuist.

## XV

Het succes van de bolsjewistische staatsgreep in november 1917 is voor een belangrijk deel te danken juist aan de onwaarschijnlijkheid van dat succes.

Stellingen behorende bij  
W. H. BOS  
RECIRCULATIE EN TRANSFORMATIE  
VAN LYMPHOCYTEN  
Juli 1967



RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

RECIRCULATIE EN TRANSFORMATIE  
VAN LYMPHOCYTEN

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van het doctoraat in de geneeskunde  
aan de Rijksuniversiteit te Groningen  
op gezag van de Rector Magnificus mr. E. H. s' Jacob,  
hoogleraar in de faculteit der rechtsgeleerdheid,  
in het openbaar te verdedigen op woensdag 5 juli 1967  
des namiddags te 4 uur

door

WILHELM HERMAN BOS

geboren te Enschede

1967

DRUKKERIJ VAN DENDEREN  
GRONINGEN

Promotor: Prof. Dr. F. J. KEUNING

Coreferent: Prof. Dr. A. ARENDS

*Aan de nagedachtenis van mijn Vader  
Aan mijn Moeder  
Voor Helga en de Kinderen*



Dit proefschrift werd bewerkt in het Histologisch Laboratorium te Groningen (Hoofd: Prof. Dr. F. J. Keuning). Velen hebben een door mij ten zeerste gewaardeerde medewerking verleend bij de uitvoering van dit onderzoek.

In het bijzonder zou ik hierbij willen noemen de samenwerking met de stafleden van het Histologisch Laboratorium, de hulp o.a. bij de titraties en de bewerking van het histologisch materiaal door Mevr. M. Haagsma-Bakker, Mej. J. Pama en Mej. G. Kuizenga, en de meer „technische” bijstand van de Heren Th. F. Groen, J. Feringa, A. Hermse, J. Holtman, H. R. A. Meiborg, I. Stokroos, M. v. d. Wis en D. Zadel.

De bestralingen werden uitgevoerd in het Radiologisch Instituut (Hoofd: Prof. Dr. J. R. Blickman); voor de hierbij verleende gastvrijheid op de Radiotherapeutische Afdeling door Dr. H. C. Stam en de medewerking van Mej. S. Visser en Mevr. A. Kruizinga-Homan ben ik zeer erkentelijk.

Het paratyphusvaccin werd bereid door het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid.

Het manuscript werd verzorgd door Mej. A. L. v. Driessen en Mej. J. Snoeck.

Allen, die direct of indirect een bijdrage geleverd hebben aan het tot stand komen van dit proefschrift, niet in het minst de medewerkers van de Dermatologische Kliniek (Hoofd: Prof. Dr. M. Ruiten) die met zoveel collegialiteit bereid waren veelvuldig mijn werk over te nemen, betuig ik mijn hartelijke dank.





## INHOUD

INLEIDING . . . . .	1
HOOFDSTUK I DE RECIRCULATIE EN LEVENSLLOOP VAN DE LYMPHOCYTEN	
HOOFDSTUK II MATERIAAL EN METHODEN . . . . .	12
HOOFDSTUK III DE LYMPHEKLIER . . . . .	17
A. Bouw, functie en gevolgen van röntgenbestralingen . . . . .	17
Histologie van de lympheklier . . . . .	17
Recirculatie in de lympheklier . . . . .	20
Immunologische reacties . . . . .	24
Gevolgen van röntgenbestralingen . . . . .	36
B. Experimenten: Histologische veranderingen in de popliteale lympheklier na röntgenbestralingen . . . . .	42
1. Totale lichaamsbestraling . . . . .	43
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	45
2. Locale lympheklierbestraling . . . . .	45
a. Locale lympheklierbestraling . . . . .	45
b. Locale lympheklierbestraling en lympheklierbescherming . . . . .	51
c. Afbinden van de afferente lymphebanen bij locale lympheklierbestraling . . . . .	53
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	53
3. Totale lichaamsbestraling met lympheklierbescherming . . . . .	55
a. Lympheklierbescherming . . . . .	55
b. Locale lympheklierbestraling gevolgd door lympheklierbescherming . . . . .	57
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	59
C. Experimenten: Telling van het aantal bloedlymphocyten . . . . .	59
D. Experimenten: Antilichaamvorming op paratyphus B-vaccin na röntgenbestralingen . . . . .	61
1. Antilichaamvorming bij onbestraalde en totaal bestraalde dieren . . . . .	61
a. subcutane antigeentoediening bij onbestraalde dieren . . . . .	61
b. intraveneuze antigeentoediening bij onbestraalde dieren . . . . .	61
c. subcutane antigeentoediening bij totaal bestraalde dieren . . . . .	63
d. intraveneuze antigeentoediening bij totaal bestraalde dieren . . . . .	63
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	63
2. Antilichaamvorming bij locale lympheklierbestraling . . . . .	63
a. locale lympheklierbestraling . . . . .	63
b. locale lympheklierbestraling met lymphenectomie . . . . .	65

c. locale lymfeklierbestraling gevolgd door lymfeklierbescherming . . . . .	65
d. locale lymfeklierbestraling gevolgd door lymfeklierbescherming en lymfadenectomie . . . . .	67
e. splenectomie met locale lymfeklierbestraling en lymfeklierbescherming . . . . .	67
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	68
3. Antilichaamvorming bij totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming . . . . .	69
a. lymfeklierbescherming, subcutane antigeentoediening . . . . .	69
b. lymfeklierbescherming, subcutane antigeentoediening en lymfadenectomie . . . . .	70
c. lymfeklierbescherming, subcutane antigeentoediening na 48 of 72 uur . . . . .	71
d. lymfeklierbescherming, intraveneuze antigeentoediening . . . . .	72
e. lymfeklierbescherming, splenectomie en lymfadenectomie, intraveneuze antigeentoediening . . . . .	73
f. lymfeklierbescherming, intraveneuze antigeentoediening en toediening van specifiek antiserum . . . . .	74
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	74
HOOFDSTUK IV DE MILT . . . . .	76
A. Bouw, functie en gevolgen van röntgenbestralingen . . . . .	76
Histologie van de milt . . . . .	76
Recirculatie in de milt . . . . .	78
Immunologische reacties . . . . .	79
Gevolgen van röntgenbestralingen . . . . .	81
B. Experimenten: Histologische veranderingen in de milt na röntgenbestralingen . . . . .	83
1. Totale lichaamsbestraling . . . . .	83
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	85
2. Locale miltbestraling . . . . .	85
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	89
3. Totale lichaamsbestraling met miltbescherming . . . . .	90
<i>Nabeschuwing</i> . . . . .	91
C. Experimenten: Telling van het aantal bloedlymphocyten . . . . .	92
D. Experimenten: Antilichaamvorming op paratyphus B-vaccin na röntgenbestralingen . . . . .	93
1. Antilichaamvorming bij locale miltbestraling . . . . .	93
a. locale miltbestraling . . . . .	93
b. splenectomie . . . . .	94
c. locale miltbestraling en splenectomie . . . . .	95
d. toediening van antigeen en specifiek antiserum . . . . .	95
e. locale miltbestraling, toediening van antigeen en specifiek antiserum . . . . .	96

f. locale miltbestraling, toediening van antigeen en specifiek antiserum, splenectomie	97
g. locale miltbestraling, na 3, 5 of 10 dagen toediening van antigeen en specifiek antiserum	97
<i>Nabeschuwing</i>	98
2. Antilichaamvorming bij totale lichaamsbestraling met miltbescherming	99
a. miltbescherming	99
b. miltbescherming met toediening van antigeen en specifiek antiserum	99
<i>Nabeschuwing</i>	99
HOOFDSTUK V DE THYMUS	101
A. Bouw, functie en gevolgen van röntgenbestralingen	101
Histologie van de thymus	101
Lymphocytopoïese en recirculatie in de thymus	103
De functionele betekenis van de thymus	106
Gevolgen van röntgenbestralingen	110
B. Experimenten: Histologische veranderingen na röntgenbestralingen	111
1. Totale lichaamsbestraling	111
<i>Nabeschuwing</i>	112
2. Locale thymusbestraling	113
<i>Nabeschuwing</i>	115
3. Totale lichaamsbestraling met thymusbescherming	116
<i>Nabeschuwing</i>	119
C. Experimenten: Telling van het aantal bloedlymphocyten	120
<i>Nabeschuwing</i>	121
D. Experimenten: Antilichaamvorming op paratyphus B-vaccin na röntgenbestralingen	121
1. Antilichaamvorming bij locale thymusbestraling	122
a. locale thymusbestraling	122
b. totale lichaamsbestraling en herhaalde locale thymusbestralingen	123
c. totale lichaamsbestraling	124
<i>Nabeschuwing</i>	124
2. Antilichaamvorming bij totale lichaamsbestraling met thymusbescherming	125
a. thymusbescherming, intraveneuze antigeentoediening	125
b. thymusbescherming, subcutane antigeentoediening	126
<i>Nabeschuwing</i>	127
HOOFDSTUK VI RECIRCULATIE EN TRANSFORMATIE VAN LYMPHOCYTEN, EEN NABESCHOUWING	128
SUMMARY	146
LITERATUURLIJST	156



## INLEIDING

De verwijdering door phagocytose van lichaamsvreemde stoffen, in het bijzonder van ziekteverwekkende organismen zoals bacteriën, is reeds lang (Virchow, 1860) beschouwd als een zeer belangrijke functie van het lymfoïede systeem. Door de plaatsing van de afzonderlijke lymfoïede organen in de lymphebaan of bloedbaan worden ongewenste bestanddelen van respectievelijk lymfhe of bloed met behulp van dit filtratiemechanisme weggenomen. De betekenis van de lymfocyten in het lymfoïede weefsel was tot voor een tiental jaren vrijwel geheel onbekend; de in de lymfoïede organen veelvuldig voorkomende celdelingen werden gezien als een uiting van lymfocytose. Hellman (1921) was de eerste, die het reactieve karakter van de celvermeerdering met name in de follikels van het lymfoïede weefsel herkende, en een verband veronderstelde met een ander aspect van het afweermecanisme, de specifiek gerichte immuniteit.

De samenhang van de mitotische activiteit in de lymfoïede organen met immunologische processen bleek echter pas nadat door McMaster en Hudack (1935) in de lymfeklieren en door Fagraeus (1948) in de milt de vorming van antilichamen was aangetoond. Door de laatste onderzoekster werd vastgesteld, dat daarbij in de lymfoïede organen plasmacellen - de feitelijke producenten der antilichamen - ontstonden en dat deze „plasmacellulaire reactie” verantwoordelijk was voor een deel van de mitotische activiteit, welke in lymfoïed weefsel kan worden waargenomen. Latere experimenten o.a. van Gowans, McGregor, Cowen en Ford (1962), Gowans, McGregor en Cowen (1963), Turk en Stone (1963) en Oort en Turk (1965) leerden, dat een mitotische activiteit leidende tot lymfocytenvorming een centrale plaats inneemt in een tweede type immuniteitsreactie, de zgn. specifiek cellulaire reactie; de hierbij gevormde lymfocyten bleken verantwoordelijk te zijn voor de

specifiek cellulaire afweer. Ook de met mitotische activiteit gepaard gaande follikelcentrumreactie (vgl. Hellman, 1921) blijkt samen te hangen met een immunologisch proces. Door Thorbecke en medewerkers (1964 e.v.) is waarschijnlijk gemaakt, dat hierbij lymphocyten worden gevormd en wel de zgn. "memory cells" voor de antilichaamvorming, cellen die a.h.w. geconditioneerd zijn om na een volgend contact met hetzelfde antigeen - in een "secondary response" - een veel sterkere plasmacellulaire reactie met antilichaamvorming te kunnen geven.

In alle drie processen lijkt verder de (of een) kleine lymphocyt de zgn. immunocompetente cel te zijn, d.w.z. de cel, die op de antigene prikkel reageert en daarmee de oorsprongscel wordt voor één der immunologische reacties. Voor de cellulaire immuniteit, d.w.z. de specifiek cellulaire reactie is dit bewezen in de reeds genoemde proeven van Gowans en medewerkers; voor de humorale immuniteit, d.w.z. de antilichaamvorming, is het zeer waarschijnlijk gemaakt door McGregor en Gowans (1963); betreffende de follikelcentrumreactie zullen hiervoor in dit proefschrift enkele argumenten naar voren worden gebracht.

Behalve de kleine lymphocyt komt in het lymphoïede weefsel nog een tweede celsoort voor, die betrokken lijkt te zijn in de immunologische processen, namelijk de zgn. follikelrandcel. In dit proefschrift zal ook de relatie van deze cel tot de kleine lymphocyt worden nagegaan.

Sinds 1957 heeft Gowans erop gewezen, dat er een „recirculatie" van kleine lymphocyten bestaat, een voortdurende uitwisseling van deze cellen tussen bloedbaan en het lymphoïede systeem. Hierdoor is het noodzakelijk geworden de bouw en functie van elk der lymphoïede organen te beschouwen tegen de achtergrond van een continue „doorstroming" met lymphocyten, waaronder dus waarschijnlijk de immunocompetente cellen.

In het onderzoek, dat aan dit proefschrift ten grondslag ligt, is door radiologische uitschakeling, hetzij van één bepaald lymphoïed orgaan, hetzij van alle lymphoïede organen met uitzondering van één enkele, het belang van de lymphocytenrecirculatie voor de diverse lymphoïede structuren onderzocht. Enerzijds is na een gelocaliseerde orgaanbestraling het herstel van het histologische beeld en de eventueel daarmee verband houdende immunologische rege-

neratie in afhankelijkheid van recirculerende lymphocyten vervolgd. Anderzijds gaf een totale lichaamsbestraling met bescherming van één enkel lymphoïed orgaan de mogelijkheid de verandering in het histologische beeld in afwezigheid van een aanvoer van circulerende cellen te bestuderen en de daarmee gepaard gaande wijziging in de immunologische reacties van uitsluitend dit éne orgaan.

Als lymphoïede organen respectievelijk opgenomen in lympeafvoer en bloedbaan werden gekozen de popliteale lymfeklier en de milt, organen waarin het voorkomen van immunologische reacties vastgesteld is. Bij de thymus is de situatie geheel anders: de thymus is niet in de lymphocytenrecirculatie opgenomen (Gowans en Knight, 1964) en de aanwezige celdelingen zijn klaarblijkelijk geen uiting van een ter plaatse verlopend immunologisch proces. Na totale lichaamsbestraling onder bescherming van de thymus werd de "outflow" van thymuslymphocyten en de immunologische competentie daarvan nagegaan; de gelocaliseerde thymusbestraling gaf voornamelijk gegevens over de wijze van herstel.

Uit al deze gegevens zal getracht worden een indruk te verkrijgen van de consequenties van de lymphocytencirculatie voor de bouw van de lymphoïede organen en de functionele betekenis ervan voor de immunologische reacties.



## *Hoofdstuk 1*

### DE RECIRCULATIE EN LEVENSLLOOP VAN DE LYMPHOCYTEN

De belangrijke plaats, welke lymphocyten in het lymphoïede systeem en dus ook in de hier te behandelen organen innemen, doet de wenselijkheid naar voren komen allereerst aandacht te besteden aan de levensloop van deze cellen.

Het bestaan van een recirculatie van lymphocyten, door Gowans in 1957 en volgende jaren aangetoond, alsmede de daarna bekend geworden feiten over de levensloop van deze cellen, hebben gemaakt, dat toch vrij recent gepubliceerde overzichten van Fichtelius (1953), Yoffey en Courtice (1956) en Trowell (1958) over de levensgeschiedenis van de kleine lymphocyt in zekere zin als verouderd beschouwd moeten worden.

Het is sinds lang bekend, dat voortdurend een aanzienlijke aanvoer van lymphocyttaire cellen naar het bloed plaats vindt via de lymphebanen, in het bijzonder via de ductus thoracicus, die de lympho aanvoert van het grootste deel van het lichaam, onder meer van de tractus digestivus. Met behulp van canulering van de ductus thoracicus van een zich in een Bollman-kooi bevindende rat toonden Mann en Higgins (1950) een output van 600 tot 1100 x 10<sup>6</sup> lymphocyttaire cellen per 24 uur aan. Uit de vergelijking van dit aantal met de hoeveelheid in de bloedbaan aanwezige lymphocyten blijkt, dat de dagelijkse aanvoer via de ductus thoracicus de totale hoeveelheid bloedlymphocyten, overigens slechts 1 % van de totale lymphocytenpopulatie (Bunting e.a., 1963), met een factor 5 tot 12, afhankelijk van de diersoort, overtreft (Sanders e.a., 1940; Hughes e.a. 1956). Hieruit kan worden afgeleid, dat omgekeerd gelijke aantallen lymphocyten op enige wijze aan de bloedbaan onttrokken moeten worden. Afbinden van de ductus thoracicus veroorzaakt een aanzienlijke daling van het aantal bloedlymphocyten, nl. van 4770 tot 340 per mm<sup>3</sup> (Florey en Gowans, 1962). Dit betekent voorts, dat er waar-

schijnlijk geen grote toevoer van lymphocyten naar de bloedbaan bestaat buiten de ductus thoracicus om.

Doordat men op grond van bepalingen van de mitotische activiteit door Kindred (1942) en Andreasen en Christensen (1949) meende, dat in de lymphoïede organen een aanzienlijke nieuwvorming van lymphocyten plaats vond, ging men er aanvankelijk zonder meer van uit, dat de ductus thoracicus-lymphocyten uit de lymphoïede organen afkomstige, nieuwgevormde cellen waren en heeft men voornamelijk gezocht naar de wijze, waarop de lymphocyten weer buiten de bloedbaan zouden komen. De mogelijkheid dat deze cellen in groten getale binnen de bloedbaan te gronde zouden gaan, werd verworpen op grond van de overweging, dat in de bloedbaan geen verval van lymphocyten wordt waargenomen, hoewel het hier om zeer grote aantallen cellen gaat.

Voor het verdwijnen van lymphocyten uit het bloed zijn verschillende mogelijkheden overwogen. De aanwezigheid van zeer talrijke lymphocyten in en tussen de epitheelcellen van tractus digestivus, tractus respiratorius enz. deed Bunting en Huston (1921) en Kindred (1942) veronderstellen, dat deze cellen door het epitheel naar het tractus-lumen emigreerden en daarbij in groten getale aan de lymphocytenpool onttrokken werden. Door Florey en Gowans (1962) is er evenwel op gewezen, dat in een vloeistof afkomstig uit darmfistels slechts minimale aantallen lymphocyten voorkomen. In het lymphoïede weefsel zelf wordt vrij regelmatig een zekere mate van celverval waargenomen, o.a. in de vorm van de vanouds bekende „tingibele Körper” (Flemming, 1885) in de follikels, maar ook elders in het lymphoïede weefsel en zelfs in de thymus. De omvang van dit proces lijkt echter onder normale omstandigheden beperkt te zijn.

Het is wel zeker, dat bij de verschillende immunologische reacties in het lymphoïede systeem een „verbruik” van lymphocyten optreedt (door transformatie van lymphocyten tot grote pyroninofiele cellen enz.). Alleen bij de antilichaamvorming d.w.z. de plasma-cellulaire reactie, zou men kunnen aannemen, dat hierbij een netto verbruik van lymphocyten optreedt; bij de specifiek cellulaire reactie en het ontstaan van de immunologische „memory” zal waarschijnlijk wel een verbruik van kleine lymphocyten plaats vinden, maar bij beide reacties ontstaan nieuwe lymphocyten in waarschijn-

lijk groter getale dan oorspronkelijk verbruikt werden. Een bijzondere vorm van lymphocytenverbruik, de transformatie van kleine lymphocyten tot follicelrandcellen, zal in dit proefschrift beschreven worden.

Een zeer aanzienlijk verbruik van de bloedlymphocyten is door Yoffey en Courtice (1956) verondersteld plaats te vinden in het beenmerg: zij menen, dat de bloedlymphocyten de stamcellen zouden vormen voor de erythrocytopoiese en de granulocytopoiese, mogelijk ook voor de overige myeloïede elementen. Micklem en Ford (1960) vonden evenwel na injectie van een lymphocyten-suspensie van lymfeklieren geen celdelingen van uit deze suspensie afkomstige cellen (herkenbaar aan het T6-chromosoom) in het beenmerg. Na infusie van in vitro gelabelde ductus thoracicus-lymphocyten zagen Gowans en Knight (1964) in het beenmerg slechts geringe aantallen gelabelde cellen, terwijl nooit gelabelde jonge rode of granulocyttaire cellen werden waargenomen. Tenslotte blijkt een lymphocyten-suspensie in tegenstelling tot een suspensie van beenmergcellen niet in staat te zijn het haematologische effect van een sterke röntgenbestraling te herstellen (Florey en Gowans, 1962).

Uit hierna nog te bespreken experimenten van o.a. Everett c.s. (1964) en Ford (1966) blijkt bovendien, dat in het beenmerg niet een verbruik van lymphocyten kon worden gevonden, maar juist een productie van lymphocytachtige elementen, welke aan het bloed worden afgegeven.

Uitgangspunt voor de proeven, die tenslotte leidden tot het recirculatieconcept vormden de waarnemingen van Mann en Higgins (1950). Deze onderzoekers stelden vast, dat bij voortgezette drainage van de ductus thoracicus de output van lymphocyten een daling vertoonde, dat 5 dagen na het begin van de drainage een peil werd bereikt van  $\pm 30\%$  van de uitgangswaarde en dat dit peil verder gehandhaafd bleef. De experimenten van Mann en Higgins werden op logische wijze voortgezet door Gowans (1957): de daling van de lymphocyten-output van de ductus thoracicus bij langdurige drainage bleef achterwege, indien de opgevangen cellen intraveneus werden teruggegeven aan het proefdier. Op deze waarneming baseerde Gowans zijn concept van de lymphocytenrecirculatie: hij stelde, dat de intraveneus ingespoten cellen vanuit de bloedbaan in de lymphoïede organen terecht zouden komen en vervolgens via de ductus

thoracicus weer in het bloed zouden terugkeren. In een reeks aanvullende proeven heeft hij vervolgens het bestaan van deze lymphocytenrecirculatie kunnen bewijzen. In de eerste plaats bleek reinjectie van celvrije lymfhe of van ductus thoracicus-lymphe met gedode lymphocyten geen herstel van de ductus thoracicus-output te geven. In de tweede plaats kon een verdubbeling van de output bereikt worden door een tweemaal zo groot aantal cellen te reinjiceren als door drainage verkregen was. De toename van de ductus thoracicus-output na reinjectie van lymphocyten bleek verder niet voort te komen uit nieuwvorming van lymphocyten: na een gelijktijdige injectie van  $^3\text{H}$ -thymidine vertonen de ductus thoracicus-cellen slechts een minimale labeling (Gowans, 1959). Tenslotte werden door Gowans en Knight (1964) ductus thoracicus-cellen in vitro gelabeld met  $^3\text{H}$ -adenosine en vervolgens intraveneus gereïnjecteerd: reeds 3 tot 4 uur na de reinjectie keerden de eerste gelabelde cellen terug in de ductus thoracicus; in de loop van enkele dagen werd tenslotte zelfs 98 % van het aantal gereïnjecteerde cellen weer uit de ductus thoracicus opgevangen. Uit de verhouding tussen gelabelde en niet gelabelde cellen in de op diverse tijdstippen genomen monsters uit de ductus thoracicus kon worden afgeleid, dat vrijwel alle ductus thoracicus-lymphocyten onder normale omstandigheden betrokken zijn in deze kringloop.

Het volgende probleem was de vraag, hoe lymphocyten uit de bloedbaan in de lymphoïede weefsels geraken. Door Sjövall was reeds in 1936 verondersteld, dat lymphocyten in de perifere capillairen de bloedbaan verlaten om dan via achtereenvolgens lymfhebanen, lymfheklieren en de centrale lymfhebanen (ductus thoracicus) in het bloed terug te keren. Yoffey en Drinker (1939) hebben opgemerkt, dat slechts een gering aantal lymphocyten deze route zou kunnen volgen: door tellingen in de afferente en de efferente lymfhe van de lymfheklieer bleek nl., dat het aantal lymphocyten in de afferente lymfhevaten slechts een fractie was van dat in de efferente lymfhe. Deze klaarblijkelijke toename van het aantal lymphocyten in de lymfhe bij passage door een lymfheklieer werd door deze onderzoekers nog toegeschreven aan in de lymfheklieer plaats vindende lymphocytose. Gowans en Knight (1964) konden evenwel aantonen, dat in de lymfheklieer zelf grote aantallen lymphocyten uit de bloedbaan emigreren naar het lymphoïede weefsel. In de reeds

eerder genoemde proeven, waarbij ductus thoracicus-lymphocyten na in vitro labeling met  $^3\text{H}$ -adenosine werden gereïnjecteerd, bleken deze cellen in de lymfeklierschors te emigreren door de wand van de daar aanwezige schorsvenulen. Vanuit de lymphocytenvelden van de lymfeklierschors geraakten deze cellen in de mergsinus, waarna ze met de passerende lymfe werden afgevoerd. Migratiebeelden van lymphocyten door de wand van de schorsvenulen waren al zeer lang bekend, maar door Yoffey, Hanks en Kelly (1958) ten onrechte geïnterpreteerd als een afgifte van lymphocyten door het lymphoïede weefsel aan het passerende bloed. Ook de cellen van de periarteriolaire lymphocytenschede in de milt bleken in het recirculatieproces betrokken te zijn; dit is echter in zoverre een bijzonder geval, omdat deze cellen direkt uit het passerende bloed worden opgenomen en daarna ook weer direkt worden teruggegeven. Tenslotte bleek uit het onderzoek van Gowans en Knight, dat gereïnjecteerde ductus thoracicus-lymphocyten in het geheel niet in de thymus terecht kwamen en slechts in zeer beperkte aantallen in het beenmerg.

Het bestaan van een recirculatie van lymphocyten alsmede het feit, dat de ductus thoracicus-lymfe slechts een gering percentage nieuw gevormde cellen bevat, impliceert dat de bij de recirculatie betrokken cellen een veel langere levensduur moeten hebben dan vroeger altijd verondersteld is. De levensduur van lymphocyten is door een aantal onderzoekers (Ottesen, 1954; Hamilton, 1958; Cafrey e.a., 1962 en Everett e.a., 1964) onderzocht door het labelingspatroon van lymphocyttaire cellen te vervolgen na een eenmalige toediening van  $^3\text{H}$ -thymidine.  $^3\text{H}$ -thymidine wordt in DNA geïncorporeerd door cellen, die in de voorbereidingsfase verkeren voor een celdeling, zodat de in de mitose daaruit ontstane dochtercellen een  $^3\text{H}$ -label bezitten in hun kernmateriaal. In al deze experimenten bleken twee soorten lymphocyten te bestaan: één met een zeer korte (enkele dagen) en één met een veel langere levensduur. De ongelijke levensduur van deze twee lymphocytenklassen komt het mooiste naar voren uit de experimenten van Little c.s. (1962) en Everett c.s. (1964), die niet gebruik maakten van een enkelvoudige injectie van  $^3\text{H}$ -thymidine, maar van continue of herhaalde intraveneuze toediening. Gedurende de eerste 5 dagen van de  $^3\text{H}$ -thymidine toediening werd een snelle toename van het aantal gelabelde bloed-

lymphocyten (35 à 40 %) gevonden; daarna neemt het percentage gelabelde lymphocyten veel langzamer toe, zodat aan het eind van de periode van  $^3\text{H}$ -thymidine-toevoer (100 dagen) zelfs de 100 % nog niet bereikt is. Na het stoppen van de  $^3\text{H}$ -thymidine-toediening neemt ook weer gedurende 5 dagen het percentage gelabelde lymphocyten snel af, waarna de verdere afname weer veel langzamer verloopt. Uit deze gegevens blijkt dat er één categorie van lymphocyten is, die na 5 dagen voor 100 % gelabeld is, ook weer na 5 dagen zijn label geheel verloren heeft, en dus een levensduur van 5 dagen heeft; deze cellen vormen 35 à 40 % van de bloedlymphocyten. Een tweede categorie lymphocyten neemt de label veel langzamer op, verliest deze ook langzamer en heeft een levensduur van meer dan 100 dagen; deze celsoort vormt 60 à 65 % van de bloedlymphocyten.

Door Everett en medewerkers (1964) is nagegaan in welke verhouding deze kort en lang levende lymphocyten op diverse plaatsen in het lymfoïede systeem voorkomen. De kort levende lymphocyten bleken in het bloed, de mesenteriale lymfeklier en de ductus thoracicus slechts een minderheid te vormen, respectievelijk 40 %, 25 % en 10 % van het totaal. In het beenmerg, de thymus en de milt daarentegen vormen ze de meerderheid, respectievelijk 100 % (!), 95 % en 75 %.

Wanneer men nu de bloedlymphocyten beschouwt tegen de achtergrond, enerzijds van deze labelingspatronen, anderzijds van de lymphocytenrecirculatie dan is het duidelijk, dat de ductus thoracicus voornamelijk lang levende lymphocyten naar het bloed toevoert en dat het omgekeerd juist de lang levende bloedlymphocyten zijn, die in de recirculatie zijn betrokken. Hierbij kan worden opgemerkt dat de weinige, snel-labelende lymphocyten in de ductus thoracicus mogelijk niet zo zeer kort levende lymphocyten zijn, als wel lang levende cellen, die juist nieuw gevormd zijn in de lymfoïede organen (immunologische reacties). De herkomst van de kort levende lymphocyten in het bloed is niet zonder meer duidelijk; ze zouden uit de milt, de thymus of het beenmerg afkomstig kunnen zijn, alle drie organen met een hoog percentage snel-labelende cellen.

Het lijkt niet waarschijnlijk dat de milt, waar onder normale omstandigheden slechts een geringe mitotische activiteit heerst, in belangrijke mate kort levende lymphocyten zou bijdragen aan het bloed. Het lijkt mogelijk dat eerder omgekeerd kort levende lym-



phocyten uit het bloed in grote aantallen in de milt terecht komen en daar verantwoordelijk zijn voor het hoge percentage snel-labelende cellen.

De thymus vertoont een hoge mitotische activiteit; volgens Everett en medewerkers (1964) worden in een rat van 100 gr. dagelijks  $450 \times 10^6$  thymocyten gevormd. Dit verklaart het hoge percentage snel-labelende cellen in de thymus, zonder dat dit echter hoeft te betekenen dat deze cellen, eenmaal buiten de thymus gekomen, kort levende cellen zijn. Everett c.s. constateerden, dat na intraveneuze injectie van gelabelde thymocyten het aantal van deze cellen in de lymfeklier en de ductus thoracicus weliswaar gering is, maar dat dit percentage in de loop van twee weken slechts in geringe mate terugloopt. Zij berekenden dat 5 % van de productie van de thymus aan lymphocyten voldoende zou zijn om te voorzien in de normale vervanging van de lang levende (recirculerende) lymphocyten. Van belang is in dit verband de conclusie van Metcalf (1966), dat slechts 3 à 4 % van de in de thymus geproduceerde cellen dit orgaan ook inderdaad verlaat; de overige cellen zouden ter plaatse binnen enkele dagen degenereren. Parrott, De Sousa en East (1966) stelden dat, onder de omstandigheden van hun experimenten, de thymus cellen produceert, welke direct terecht komen in de "mobilizable pool of lymphocytes", d.w.z. de populatie van de lang levende, recirculerende lymphocyten. Na injectie van gelabelde thymocyten vonden zij deze cellen terug in de centrale delen van de corticale lymphocytenvelden van de lymfeklier, en in de periarteriolaire lymphocytenscheden van de milt. Dit zijn de gebieden die zij, in overeenstemming met Good en medewerkers, "thymus-dependent areas" noemen op grond van het feit, dat juist deze gebieden na neonatale thymectomie opvallen door hun lymphocytenarmoede. Het zijn ook deze gebieden, waar Gowans en Knight (zie eerder) de aan de recirculatie deelnemende lymphocyten waargenomen hebben, en waar ook de als thymus-afhankelijk beschreven immunologische reactie - de specifiek cellulaire reactie - zich afspeelt (Good en medewerkers, 1962; Oort en Turk, 1965).

Er zijn daarentegen wel redenen om te veronderstellen, dat het beenmerg verantwoordelijk is voor de leverantie van kort levende lymphocyten aan het bloed. Zoals hiervoor is vermeld zijn de beenmerglymphocyten voor 100 % snel-labelende cellen. Volkman (1966)

heeft verder aangetoond, dat de in buikholte-exsudaten verschijnende lymphocytachtige cellen afkomstig zijn van kort levende cellen in het bloed, die op hun beurt weer voortkomen uit een voortdurend delende celpopulatie in het beenmerg. Lijken er dus aanwijzingen te bestaan dat de kort levende lymphocyten uit het bloed mogelijk afkomstig zijn uit het beenmerg, de vraag blijft, wat onder normale omstandigheden het verdere lot van deze cellen is: hun vrij hoge percentage van 35 tot 40 % in het bloed en hun korte levensduur (5 dagen) impliceren, dat ze regelmatig in aanzienlijke aantallen worden aangemaakt, en anderzijds in gelijke aantallen moeten verdwijnen.

Er is nog een tweede vraag die vooralsnog onbeantwoord is. Zoals hiervoor vermeld, is o.a. door Good en medewerkers (1962) gesteld, dat een deel van het lymfoïede systeem en de zich daarin afspelende specifiek cellulaire reacties direkt afhankelijk zouden zijn van de thymus; daarnaast is door enkele medewerkers van Good (Cooper e.a., 1965) opgemerkt, dat een ander deel van het lymfoïede systeem en de antilichaamvorming niet direkt afhankelijk zouden zijn van de thymus, maar bij de kip van de Bursa Fabricii, en bij de zoogdieren van een nog niet met zekerheid omschreven zgn. „Bursa-equivalent”, mogelijk de lymfoïede organen langs de tractus digestivus (Cooper e.a., 1966). Het is nog niet duidelijk welke plaats dit systeem inneemt in het kader van de recirculatie en in welke relatie dit systeem staat tot de hiervoor beschreven lymphocytenklassen. Uit de experimenten welke in dit proefschrift beschreven zullen worden, zijn enkele suggesties betreffende dit probleem naar voren gekomen.



## *Hoofdstuk II*

### MATERIAAL EN METHODEN

#### *Proefdieren*

De proeven werden uitgevoerd met konijnen afkomstig uit eigen stal of het Centraal Proefdierenbedrijf T.N.O. De Goud-Agouti, Chinchilla, Californian en Alaska konijnen van het mannelijk en vrouwelijk geslacht hadden een leeftijd van 6-10 maanden; het gewicht varieerde van 2,5 tot 3,5 kg.

#### *Röntgenbestralingen*

De bestralingen werden uitgevoerd met een Philips RT 200 therapietoestel bij 200 kV en 20 mA, waarbij een filter van 1,0 mm Cu (halveringslaag (= HVL) 1,45 mm Cu) gebruikt werd voor de gelocaliseerde bestralingen en meestal een filter van 0,5 mm Cu (HVL 1,0 mm Cu), wanneer een totale lichaamsbestraling al of niet met bescherming van een orgaan uitgevoerd werd. De wijze, waarop de orgaanbestraling en -bescherming plaats vonden, zal voor elk der organen afzonderlijk behandeld worden. De opgegeven stralendoses zijn inclusief stroostraling.

a. Popliteale lymfeklier: Voor de lokale bestraling van de popliteale lymfeklier (LYKLLOC) werd gebruik gemaakt van een tubus met een focus-huidafstand (FHA) van 40 cm en een oppervlakte van 8 cm bij 10 cm aan het uiteinde (40 x 8 x 10). De tubusopening werd tegen de samengebonden achterpoten van het op een operatieplank gefixeerde konijn geplaatst. De bestralingsdosis op de huid bedroeg 750 R, hetgeen neerkomt op ongeveer 700 R binnen de lymfeklier; de afstand tussen de tubus en de lymfeklier werd hierbij geschat op ongeveer 2 cm.

Bij de totale lichaamsbestraling met bescherming van de popliteale lymfeklier (LYKLSH) werd het konijn weer op de operatieplank vastgebonden, terwijl de achterpoten beschermd werden met loden

kokers of een plaat lood van 6 mm dikte. De bestraling (filter 0,5 mm Cu) geschiedde met behulp van een tubus (50 x 15 x 30), welke zo geplaatst werd, dat het op een afstand van 50 cm van de tubusopening gelegen konijn (FHA: 1 meter) zich geheel in het bestralingsveld bevond. Zo werd een huiddosis van 850 R gegeven; gezien de dikte van het konijn komt dit neer op geschatte doseringen halverwege en op de huid van de achterzijde van respectievelijk 680 en 380 R. Dit zal verder aangegeven worden als 850/380 R.

Omdat bij de overeenkomstige proeven met milt en thymus een dubbelzijdige bestraling technisch onmogelijk was, werd ook bij de lymfeklier aan deze weinig homogene bestraling de voorkeur gegeven. De totale lichaamsbestraling zonder orgaanbescherming werd op dezelfde wijze uitgevoerd.

Bij de gecombineerde bestralingen, d.w.z. lymfeklierbescherming gevolgd door locale bestraling of omgekeerd, is ten dele wel van twee zijden bestraald, en in dit geval met een filter van 1 mm Cu en een FHA van 50 cm; hierbij mag een vrij homogene irradiatie (750 R) aangenomen worden.

Bij de experimenten zal steeds de toegepaste bestralingsprocedure vermeld worden.

b. Milt: Bij de locale bestraling (MILTLOC) werd het orgaan van te voren na incisie van de buikwand naar boven gebracht en met catgut aan de voorste buikwand gehecht. Na sluiting van de wond werd een tubus (40 x 4 x 6) ter plaatse tegen de huid geplaatst; de afstand huid-milt varieert van 1 tot 3 cm, zodat het orgaan 710-550 R ontving.

Bij de totale lichaamsbestraling met bescherming van de milt (MILTSH) werd gebruik gemaakt van een loden koker, een variant op de door Taliaferro c.s. (1956) beschreven miltkoker: een aan de onderzijde afgeronde loden buis met een wanddikte van 6 mm, van boven te sluiten met een even dikke deksel. De buis is in de lengterichting gesplitst in twee gelijke delen, welke met een afgeronde groeve en een verdikte rand in elkaar passen. Aan de onderzijde is ruimte vrij gelaten om bloedvaten in de mesenteriumduplicaturen tijdens de bestraling ongestoord te laten.

Het op een operatieplank gelegen konijn werd onder het röntgen-toestel in narcose gebracht, waarna een ruime, mediane incisie van de buikwand ter hoogte van de milt volgde. De milt werd naar

boven gebracht, in één helft van de koker gelegd, waarna het tweede deel er zodanig op geplaatst werd, dat het ligamentum gastrolienale plaatselijk tussen beide helften verankerd was. De kokerdelen werden met kleefpleister aan elkaar bevestigd, de dop werd op de bovenzijde geplaatst en het geheel opgehangen aan een galg. Hierbij werd erop gelet dat milt en verzorgende bloedvaten niet beschadigd werden. Na de bestraling, welke overigens op dezelfde wijze als bij de lymfeklierbescherming werd uitgevoerd en waarbij dezelfde röntgendosis gegeven werd, kon de koker op eenvoudige wijze verwijderd worden, waarna de wond gehecht werd.

c. Thymus: Het bestralen van de thymus (THLOC) geschiedde door een tubus (40 x 4 x 6) midden op het bovenste deel van de thorax te plaatsen. Het zich direkt achter sternum en ribben bevindende orgaan werd vrij zeker geheel getroffen. De thymus kreeg ongeveer 700 R bij een huiddosis van 750 R.

De thymus werd beschermd (THSH) door loden platen met een totale dikte van 6 mm, aan te brengen boven dit orgaan van een op de operatieplank gelegen konijn. De bestraling werd weer uitgevoerd met de tubus (50 x 15 x 30) en een dosering van 850 R op de huid (850/380 R).

### *Operaties*

De operaties vonden plaats onder zo steriel mogelijke omstandigheden en in een volledige narcose, welke verkregen werd door Veterinair Nembutal (0,8 tot 1,0 cc van een oplossing van 60 mgr/cc) langzaam intraveneus te injecteren. Van te voren werd 0,1 cc Vetranquil ingespoten bij langdurige ingrepen.

a. Popliteale lymfeklier: Bij de verwijdering van de popliteale lymfeklier werd de huid van de achterpoot in de mediaanlijn gespleten, de vena poplitea ter zijde geschoven, waarna het te midden van het vetweefsel gelegen orgaan gemakkelijk en meestal zonder bloedingen geëxideerd kon worden.

Voor het afbinden van de afferente lymphebanen werd op een groot aantal plaatsen in het distale deel van de poot een methyleenblauw- of trypaanblauwoplossing (1 %) subcutaan ingespoten. Alle lymphebanen werden hierdoor na incisie van de huid zichtbaar en konden onderbonden worden.

b. Milt: Voor een biopsie werd na mediane incisie van de buikwand het uiteinde van de milt met de verzorgende bloedvaten afgebonden, waarna dit miltgedeelte verwijderd kon worden. Splenectomie werd op dezelfde wijze uitgevoerd; het afbinden van de vaten geschiedde hierbij in enkele etappes, waarna het orgaan in toto weggenomen werd. Peritoneum plus musculatuur, subcutis en huid werden tenslotte afzonderlijk gehecht.

#### *Histologische technieken*

Direkt na de excisie werd gedurende 5 uur bij kamertemperatuur, of gedurende 24 uur op een temperatuur van 4°, onder voortdurende beweging gefixeerd in een oplossing van de volgende samenstelling: 90 delen Zenker-oplossing, 5 delen formol 30 % en 5 delen trichloorazijnzuur 2 %. Na de fixatie werden de weefselstukjes gedurende 24 uur gespoeld in stromend water en vervolgens doorgevoerd via alcohol, methylbenzooat en benzol naar paraffine. Het materiaal werd in serie gesneden, waarbij de dikte der coupes 7-8  $\mu$  bedroeg.

De kleuring geschiedde als regel volgens Unna-Pappenheim-Brachet (Brachet, 1953) met methylgroenpyronine, waarbij het kernchromatine en de kernmembranen blauw-groen gekleurd worden, nucleolus en basophil cytoplasma een rode kleur aannemen. Voor de bestudering van het lymfoïede systeem verdient deze kleuring de voorkeur boven vele andere, zoals de kleuring volgens Giemsa en met haematoxyline-eosine, welke de verschillende lymfoïede cellen minder goed doen uitkomen.

#### *Tellingen van de bloedlymphocyten*

Het bloed werd verkregen door punctie van de oorvene, de telling geschiedde in de telkamer van Bürker. Door gebruikmaking van een sterke vergroting van de microscoop (objectief: 20 x) kon direkt gedifferentieerd worden in polynucleairen, lymphocyten en monocyten. Gezien de gerichtheid van dit onderzoek op het lymfoïede systeem wordt uitsluitend het aantal lymphocyten vermeld.

#### *Antigeentoeediening*

Als antigeen werd een vaccin gebruikt, dat bereid werd door be-

handeling van de *Salmonella paratyphi B*, variëteit Java, met formale. Dit antigeen is relatief rijk aan H-antigeen. Het vaccin bevatte  $5 \times 10^9$  bacteriën per ml. Bij intraveneuze toediening in de oorvene, bij subcutane injectie in beide achterpoten nabij het distale deel van de tibia of op de voetrug, werd 0,2 ml van dit vaccin ingespoten. Controle-experimenten, uitgevoerd met het supernatant en het sediment van het bij 25000 g gecentrifugeerde vaccin, lieten zien dat we hier met een voornamelijk corpusculair antigeen te maken hadden.

Bij een aantal experimenten werd 12 uur na intraveneuze antigeen injectie 0,1 ml van een homoloog hyperimmuunserum intraveneus toegediend. Hierdoor wordt het contact met vrij circulerend antigeen beperkt in tijd (synchronisatie) en bovendien in localisatie, namelijk tot de milt. (Nieuwenhuis c.s., 1967).

#### *Bepaling van de antilichaamtiter*

Het bloed werd verkregen door punctie van hart of oorvene, plaatsvindend op de dag voorafgaande aan de antigeeninjectie en daarna aanvankelijk dagelijks, doch later met grotere intervallen.

De antilichaamtiteratie van het serum geschiedde met de agglutinatiereactie uitgevoerd door het samenbrengen van het serum (in een halveringsreeks) en een Fickersuspensie (*Paratyphus B(H)*-antigeen).

De titer van het onderzochte serum komt overeen met de verdunning in dat buisje, waarin nog juist een uitvlokking waargenomen kan worden; het volgnummer van het buisje is de  $^2$ log titer van het betrokken serum. De titers werden zoals gebruikelijk logaritmisch uitgezet.



DE LYMPHEKLIER

A. **Bouw, functie en gevolgen van röntgenbestralingen**

*Histologie van de lymfheklier*

Voor dit onderzoek is als lymfheklier gekozen de popliteale lymfheklier, die enerzijds goed toegankelijk is voor operatieve benadering en röntgenbestralingen, en die anderzijds behoort tot die groep van lymfheklieren, welke onder normale omstandigheden niet voortdurend bloot staan aan immunologische stimulering, zoals bijvoorbeeld de mesenteriale lymfheklier.

De lymphe, die de popliteale lymfheklier toegevoerd krijgt, is afkomstig uit het onderste gedeelte van de achterste extremiteit; antigene stimulering van deze klier geschiedt dan ook door antigeen afkomstig uit dit drainagegebied. De aanvoerende lymphebanen treden het orgaan binnen door een dunne bindweefselkapsel; zij monden hier uit in de randsinus, een spleetvormige ruimte slechts doorschoten met een ijl netwerk van reticulumcellen. Vanuit de randsinus leiden een aantal corridors, de intermediaire sinussen, door de dichte lymphocytenmassa's van de schors naar het merggebied van de lymfheklier. Het stroomgebied van het merg, de mergsinus, vertoont evenals de eerder genoemde sinussen een losmazig netwerk van reticulumcellen. Intermediaire sinussen en mergsinussen zijn t.o.v. de compacte celconglomeraten van de schors en de mergstrengen begrensd door een min of meer aaneengesloten laag van reticulumcellen. Het fagocyterend vermogen van deze cellen en van de zich in de sinusruimte bevindende reticulo-endotheliale cellen is verantwoordelijk voor de filtratie van de passerende lymphe. De lymfheklier kan door dit filtratiemechanisme uit de passerende lymphe vrijwel alle corpusculaire verontreinigingen zoals bacteriën of erythrocyten wegvangen; veel minder efficiënt is de filtratie van virussen en van opgeloste eiwitten zoals bacterietoxines enz. (Yoffey en

Courtice, 1956). Vanuit de mergsinus wordt de lympe afgevoerd door een meestal enkelvoudig vas efferens, dat het orgaan verlaat aan de hilus waar anderzijds de arterie en vene het orgaan binnentreden, respectievelijk verlaten.

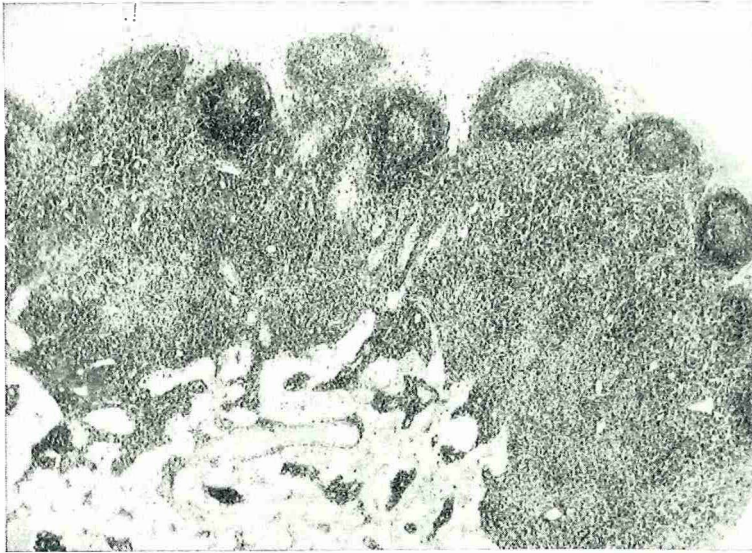


Foto 1.

Popliteale lymfeklier. Partieel overzicht met schors (lymphocytenvelden, follicels) en merggebied. Vergr.: 50 x.

De karakteristieke lympoïede structuren van de lymfeklierschors zijn de direkt onder de randsinus gelegen lymphocytenvelden met daarin geheel aan de buitenzijde de follicels. De corticale lymphocytenvelden kunnen afhankelijk van hierna nog te bespreken omstandigheden zeer sterk in grootte variëren. Ze gaan in het merggebied over in de zgn. mergstrengen, onregelmatige formaties eveneens bestaande uit lympoïede cellen.

De meest kenmerkende celsoort van de lymphocytenvelden met follicels en mergstrengen is de kleine lymphocyt. Deze kleine lymphocyten zijn hier in zeer groten getale aanwezig temidden van een netwerk van reticulumcellen, dat een veel compactere bouw heeft dan het cellenreticulum van de sinus.

De aan de buitenzijden in de lymphocytenvelden gelegen follicels

kunnen voorkomen in de vorm van de zgn. primaire follikels, conglomeraatjes van dicht opeen gelegen kleine lymphocyten, of als secundaire follikels, waarbij de lymphocyten geconcentreerd liggen in een lymphocytenkrans rondom een lichter follikelcentrum. Deze follikelcentra kunnen onder bepaalde, later te bespreken omstandigheden, het karakter hebben van de bekende „kiemcentra”. Aan de buitenzijde van de follikels, en wel aan de naar de randsinus toegekeerde zijde, komen lymphocytachtige cellen voor, die zich van de normale kleine lymphocyten onderscheiden door een wat lichtere kernstructuur en een iets grotere hoeveelheid licht basofiel cytoplasma. Deze cellen, welke in de milt op grond van hun kenmerkende localisatie de naam hebben gekregen van follikelrandcellen (“marginal zone cells”), kunnen zich in een onscherp begrensde zone voortzetten langs de rand van het lymphocytenveld, d.w.z. op de grens tussen randsinus en lymphocytenveld.

De mergstrengen en de overgangen van de lymphocytenvelden naar de mergstrengen bevatten naast lymphocyten vaak grote aantallen rijpe plasmacellen. Deze mergstrengen begeleiden in het algemeen de arteriolen en venulen die het merggebied doorkruisen.

De bloedvoorziening van de lymfeklier geschiedt vanuit de hilus door arteriolen die zich door het merg schorswaarts vertakken en voornamelijk geheel perifeer in de lymphocytenvelden overgaan in een capillairnetwerk; een deel van deze capillairen vormt de vascularisatie van de follikels. De capillairen verenigen zich tot schorsvenulen, die een kenmerkend aspect hebben door het epitheloiede karakter van de endotheelwand, en die de lymphocytenvelden doorlopen in de richting van het merg. De mergvenulen welke weer een normale endotheelwand vertonen, convergeren naar de hilus.

Gedurende zeer lange tijd is als belangrijkste functie van de lymphocyttaire cellenformaties van de lymfeklier beschouwd de lymphocyttopoiese. Dit was voornamelijk gebaseerd op de soms zeer hoge mitotische activiteit in dit weefsel.

Dit klassieke, statische beeld van de bouw van de lymfeklier heeft slechts beperkte betekenis. De voortdurende uitwisseling van cellen in het kader van de recirculatie van de lymphocyten en de reacties van dit lymphoiede weefsel op immunologische prikkels maken dat de bouw van de lymfeklier, zoals men die in een microscopisch praeparaat waarneemt een momentopname is, welke



slechts begrepen kan worden in het licht van deze recirculatie en de immuniteitsreacties. In het volgende zal de betekenis van deze processen voor de bouw van de lymfheklier afzonderlijk worden besproken.

### *Recirculatie in de lymfheklier*

Nadat Gowans (1957 e.v.) had bewezen dat recirculatie van lymfocyten op grote schaal moest plaats vinden, is door Gowans en Knight (1964) nagegaan, waar de lymfocyten vanuit de bloedbaan de lymfhoiede weefsels binnentreden. Deze onderzoekers maakten gebruik van lymfocytensuspensies, welke verkregen waren door canulering van de ductus thoracicus bij ratten, waarna deze lymfocyten in vitro werden gelabeld met  $^3\text{H}$ -adenosine en vervolgens langs intraveneuze weg aan het proefdier werden teruggegeven. In autoradiogrammen van lymfhekliekcoupes werden reeds 15 min. na de injectie gelabelde lymfocyten teruggevonden in de wand van de schorsvenulen en in de direkt daarom heen gelegen perivasculaire ruimte. Door Marchesi en Gowans (1964) is de emigratie van deze lymfocyten door de wand van de schorsvenulen nader bestudeerd door middel van het electronenmicroscop. Hierbij bleek dat de lymfocyten niet zoals granulocyten door de kitlijnen tussen endotheelcellen passeerden, maar een intracellulaire weg volgden dóór het cytoplasma van de epitheloiede endotheelcellen. Deze emigratie van de lymfocyten door de epitheloiede endotheelcellen van de schorsvenulen is ook lichtmicroscopisch goed waarneembaar. In histologische praeparaten gekleurd met methylgroenpyronine (Brachet) hebben deze endotheelcellen een grote, licht gekleurde vesiculaire kern en een duidelijk pyroninophiel (basophiel) cytoplasma; de cellen prominieren daarbij sterk in het lumen van het vat. Door de grote dikte van deze endotheelwand zijn de passerende lymfocyten daarin goed zichtbaar. Deze schorsvenulen met hun kenmerkende epitheloiede endotheelwand kunnen tot in de buitenste gebieden van de schors worden aangetroffen; hoewel een enkele maal duidelijk geconstateerd kan worden dat de schorsvenulen tevoorschijn treden uit de follikels, is door Gowans en Knight nooit een emigratie van gelabelde ductus thoracicus-lymfocyten in de follikels waargenomen. Dit punt komt bij de bestralingsproeven opnieuw aan de orde,

omdat daarbij gegevens zijn verkregen, welke erop wijzen dat een emigratie van lymphocyten uit de bloedbaan naar de follikels wel mogelijk is. In histologische coupes waarin de schorsvenulen in hun verloop naar het merg in de lengterichting getroffen zijn, valt op dat in de nabijheid van de grens schors-merg het hoge epitheloiede endotheel plotseling verandert in het normale platte endotheel.

Ten aanzien van de celbeweging van de geëmigreerde lymphocyten in de lymphocytenvelden, is door Gowans en Knight geconstateerd dat de eenmaal in de lymphocytenvelden aanwezige gelabelde lymphocyten zich mergwaarts begeven en na ongeveer 24 uur in de mergsinussen kunnen worden teruggevonden. In normale histologische praeparaten kan ook dikwijls worden waargenomen dat zich rondom schorsvenulen grotere ophopingen van kleine lymphocyten bevinden. Aanzienlijke concentraties van lymphocyten worden ook wel aangetroffen in de naar het merg toegekeerde delen van de lymphocytenvelden, terwijl in de hieronder gelegen mergsinussen eveneens talrijke vrije lymphocyten voorkomen. Men kan zich afvragen of deze naar het merg gerichte celbeweging door de lymphocytenvelden berust op een actief migratieproces. Wanneer in het drainagegebied van de lymfeklier een phagocyteerbare kleurstof als oostindische inkt wordt ingespoten, blijkt deze kleurstof óók door te dringen in de lymphocytenvelden en daar te worden gefagocyteerd door aanwezige reticulumcellen. Hieruit blijkt dat er in de lymphocytenvelden in ieder geval een mergwaartse lymphestroom plaats vindt, zodat ook een passieve celbeweging mogelijk is. De in de mergsinussen aanwezige vrije lymphocyten worden met de daar aanwezige lymphe afgevoerd via het efferente lymphevat en bereiken op deze wijze weer de bloedbaan. Het grote verschil tussen het geringe aantal lymphocyten in de afferente lymphebanen en de in zeer veel grotere getale voorkomende lymphocyten in efferente lymphevaten (Yoffey en Drinker, 1939) vindt zijn verklaring dus voornamelijk in een aanvoer van lymphocyten direkt vanuit het bloed naar de lymfeklier.

Een bijzonder aspect van deze celbeweging van schors naar merg kan worden waargenomen, wanneer ten gevolge van een antigene stimulering zich in de lymphocytenvelden een plasmacellulaire reactie afspeelt. De plasmacellen vertonen tijdens dit proces een microscopisch duidelijk herkenbare rijping. Hierbij kan worden waar-

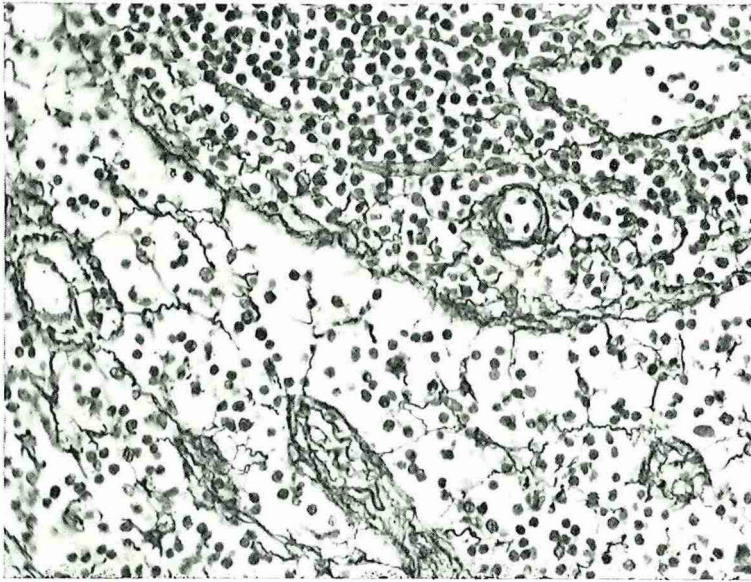


Foto 2.

Popliteale lymfeklier. Verdichting reticulinevezels op de grens lymfocytenveld-mergsinus. Kleuring volgens Gomori. Vergr.: 440 x.

genomen dat de jongere vormen van de plasmacellen voornamelijk ontstaan in de buitenste schorsgedeelten, terwijl de rijpere plasmacellen in groten getale worden aangetroffen in de naar het merg toegekeerde delen van de lymfocytenvelden. Hierbij blijkt een deel van deze plasmacellen op dezelfde wijze als de lymfocyten direct over te gaan in de mergsinussen; een aanzienlijk deel van deze plasmacellen lijkt zich echter op te hopen voor de uit reticulumcellen bestaande grens tussen lymfocytenveld en mergsinus, waarbij ze a.h.w. in de met de lymfocytenvelden samenhangende mergstrengen worden „gedrukt“. Dat de door reticulumcellen gevormde grens tussen lymfocytenvelden en mergsinus een barrière kan zijn voor passerende cellen kan mede voortkomen uit de daar aanwezige verdichting van reticulinevezels; de barrière zet zich verder voort als de begrenzing van de mergstrengen. Vooruitlopende op de beschrijving van de plasmacellulaire reactie kan hier al worden gezegd dat dit de mogelijke verklaring is voor het welbekende voorkomen en langdurig aanwezig blijven van rijpe plasmacellen juist in de merg-



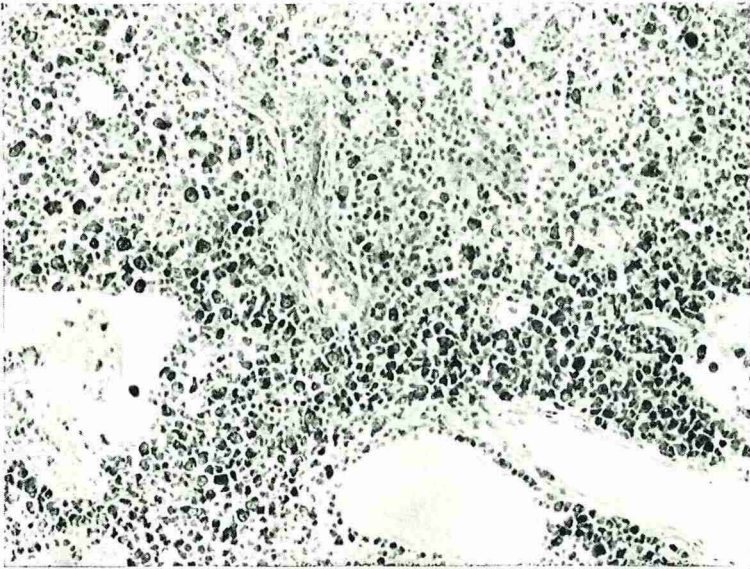


Foto 3.

Popliteale lymfeklier, 3 dagen na subcutane antigeentoediening. Ophopingen van plasmacellen vóór de grens lymphocytenveld-mergsinus en in de mergstrengen. Vergr.: 220 x.

strengen van lymfeklieren, die aan immunologische prikkels zijn blootgesteld geweest (zie foto's 2 en 3).

Twee mogelijke varianten van de hiervoor beschreven migratie van individuele cellen van schors naar merg moeten nog worden genoemd. In de eerste plaats kunnen vaak in de lymphocytenvelden kleine, met reticulo-endotheel beklede holten waargenomen worden, die geheel gevuld zijn met dicht opeen gepakte kleine lymphocyten. Door Yoffey, Hanks en Kelly (1958) werd aangenomen dat via deze zgn. „lymphesinussen” lymphocyten uit de lymphocytenvelden naar de mergsinussen kunnen worden afgevoerd. In seriecoupes is de communicatie tussen deze „lymphesinussen” en de mergsinus vaak moeilijk waarneembaar; mogelijk is de verklaring hiervoor gelegen in de juist op de grens van het lymphocytenveld op deze „sinussen” uitgeoefende druk door de omgevende celmassa's. Het lijkt niet onwaarschijnlijk, dat deze „lymphesinussen” niets anders zijn dan resten van mergsinussen, die tijdens de groei van de lymphocytenvelden a.h.w. ingesloten worden in het groeiende lymphocytenveld.

Een tweede alternatief voor de afvoer van cellen uit de lymfocytenvelden door individuele celfiltratie vormt het door Van Buchem (1962) beschreven proces van „openbreken van de lymfocytenvelden” waarbij dissolutie van een gedeelte van het reticulumcellennetwerk in de lymfocytenvelden leidt tot holtevorming in dit gebied; hierbij komen enerzijds zowel lymfocyten als reticulumcellen (en evt. plasmacellen) in de op deze wijze nieuwgevormde sinussen te liggen en blijven anderzijds de resten van de lymfocytenvelden als mergstrengen achter.

Het zal duidelijk zijn dat de zojuist beschreven veranderingen, welke samenhangen met de recirculatie van de lymfocyten, onmiddellijke consequenties hebben voor de immunologische processen welke zich in de lymfheklier afspelen.

### *Immunologische reacties*

In de lymfheklier, evenals trouwens in andere lymfhoiede organen, kan men een drietal processen onderscheiden die in reactie op een antigene prikkel optreden: de specifiek cellulaire reactie, de antilichaamvorming en de follikelcentrumreactie.

Onder de specifiek cellulaire reactie is o.m. te verstaan het proces dat in de lymfheklier optreedt na plaatsing van een homoloog huidtransplantaat in het betrokken drainagegebied en dat leidt tot de transplantatie-immuniteit, welke verantwoordelijk is voor de uitstoting van het vreemde transplantaat. Geheel op een lijn met deze transplantatie-immuniteit staat waarschijnlijk de contactallergie. Bij de manifestatie van deze vorm van immuniteit spelen humorale antilichamen voor zover bekend geen rol; het gaat hierbij om een afweermecanisme, waarvan de specifieke gerichtheid is gelegen in cellen die bij deze immuniteitsreactie zijn ontstaan.

Door Scothorne c.s. (1955) zijn de veranderingen beschreven welke in de regionale lymfheklier optreden na plaatsing van een homoloog huidtransplantaat. Deze veranderingen omvatten in de eerste plaats een sterke zwelling van de lymfheklier, berustende op een „groei” van de corticale lymfocytenvelden en in de tweede plaats het verschijnen van grote pyroninophile cellen in deze vergrote lymfocytenvelden. Over de ontstaanswijze en de functionele be-

tekenis van deze grote pyroninophile cellen geeft het onderzoek van Scothorne c.s. geen nadere informatie.

Door Turk en Stone (1963) en Oort en Turk (1965) is de specifiek cellulaire reactie bestudeerd door huidsensibilisatie met oxazon; deze stof veroorzaakte een contactallergie van het delayed-type en daarbij werden in de regionale lymfeklier met Scothorne's bevindingen vergelijkbare veranderingen gevonden. Door labeling met  $^3\text{H}$ -thymidine konden zij vaststellen dat uit de grote pyroninophile cellen, welke sterk geleken op de jonge celvorm van de voor de antilichaamvorming verantwoordelijke plasmacellen, geen plasmacellen ontstaan, maar kleine lymphocyten. Bij een nader onderzoek van de "graft-versus-host-reaction", een experimentele variant van de transplantatie-immuniteit, werd door Gowans en medewerkers (1962) aangetoond, dat de hierbij ontstane grote pyroninophile cellen voortkwamen uit kleine lymphocyten van de ductus thoracicus, cellen derhalve, die normaliter betrokken waren in het proces van de recirculatie. Verder konden deze onderzoekers (1963) in proeven met huidtransplantaten aantonen, dat de cellen die tijdens het uitstotingsproces van het transplantaat daarin werden aangetroffen, kleine lymphocyten waren, nieuw ontstaan in de regionale lymfeklier en wel uit de eerder genoemde grote pyroninophile cellen.

De specifiek cellulaire reactie is zo a.h.w. een kringloop van cellen waarbij kleine lymphocyten onder invloed van een antigene prikkel (b.v. transplantaat of contactallergeen) uitgroeien tot grote pyroninophile cellen, waaruit vervolgens via een aantal celdelingen opnieuw kleine lymphocyten voortkomen. Deze laatste zijn echter "committed lymphocytes"; zij onderscheiden zich van de eerste, „virginale lymphocyten" door het vermogen op specifieke wijze te kunnen reageren op het betreffende antigeen met als gevolg de uitstoting van het transplantaat, respectievelijk een "delayed type" huidreactie. In feite betekent de specifiek cellulaire reactie dus een lymphocytose, en wel van reactief karakter.

In tegenstelling tot de hierna te bespreken antilichaamvorming is de specifiek cellulaire reactie niet röntgengevoelig in deze zin, dat na een sublethale bestraling (500 R) de reactie ondanks een vrij aanzienlijke schade aan het lymfoïede weefsel op vrijwel normale wijze tot stand komt (Micklem en Brown, 1961; Van der Slikke en Keuning, 1964), zij het dat daarbij ongetwijfeld de celproliferatie een

stralenschade zal ondervinden. Beide groepen van auteurs hebben erop gewezen, dat onder deze omstandigheden de reactie tot stand komt in afwezigheid van follikels en dat anderzijds zelfs in deze door de bestraling lymphocytenarme dieren de antigene prikkel (het transplantaat) in de regionale lymfeklier nog een sterke groei van de lymphocytenvelden doet ontstaan door emigratie van bloedlymphocyten, zoals ook door Scothorne c.s. in onbestraalde dieren is gezien.

Gedurende de laatste jaren zijn een aantal gegevens verkregen over de rol van de thymus bij de postnatale histogenese van het lymfoïede systeem, en wel de thymus-afhankelijkheid van een deel hiervan. In de lymfeklier bleek juist het gebied waar de specifiek cellulaire reactie plaats vindt, het centrale deel van de corticale velden (Oort en Turk, 1965), thymus-afhankelijk te zijn; na neonatale thymectomie komt dit gedeelte van de lymphocytenvelden niet tot ontwikkeling, terwijl in vitro gelabelde thymuslymphocyten zich na intraveneuze injectie preferent juist naar deze gebieden begeven (Parrott, De Sousa en East, 1966). Op de functionele thymus-afhankelijkheid van de specifiek cellulaire response is reeds door een aantal onderzoekers gewezen: neonatale thymectomie al of niet gecombineerd met een bestraling leidt tot een vrijwel ontbreken van het vermogen tot specifiek cellulaire reacties, terwijl de antilichamvorming in principe ongestoord blijft (Good c.s., 1962; Jankovic c.s., 1962; Miller, 1962).

Ook bij de antilichamvorming vinden in de lymfoïede organen karakteristieke veranderingen plaats en wel de zgn. plasmacellulaire reactie (Fagraeus, 1948). Het proces is in de lymfeklier gelocaliseerd, wanneer het antigeen wordt ingebracht in het betreffende drainagegebied (Van Buchem, 1962). Ook bij deze reactie ontwikkelen zich onder invloed van het antigeen grote pyroninophile cellen, waaruit zich echter nu onder talloze celdelingen plasmacellen ontwikkelen; antilichamen worden daarbij gevormd door zowel de jongere als de oudere ontwikkelingsstadia van deze plasmacellen.

Uiteraard wordt het antigeen aangevoerd via de afferente lymfebanen en komt dus eerst in de randsinus terecht. Door middel van onderzoekingen met radioactief gelabeld antigeen konden Nossal en medewerkers (1965) aantonen, dat het antigeen op een tweetal



plaatsen in de lymfheklier werd vastgehouden: in de eerste plaats - op specifieke wijze - door phagocyterende reticulumcellen voornamelijk in de intermediaire- en mergsinussen, en in de tweede plaats - op specifieke wijze - in de buitenste gedeelten van de corticale lymphoïede structuren. Bij dit laatste proces, door Nossal "antigen trapping" genoemd, heeft geen phagocytose van het antigeen plaats, maar blijft dit extracellulair liggen aan de oppervlakte van hier aanwezige cellen, door deze onderzoekers "dendritic macrophages" genoemd. Deze "antigen trapping" vindt men in de eerste uren na antigeentoeiding in een smalle zone aan de buitenzijde van follikels en lymphocytenvelden, een gebied waar in het normale microscopische beeld de eerder genoemde follikelrandcellen voorkomen. In de loop van 24 uur lijkt het antigeen zich vervolgens te concentreren in de follikelcentra en wel in de naar de randsinus gekeerde gedeelten daarvan. Nossal c.s. menen, dat het deze "antigen trapping" is, welke leidt tot de antilichaamvorming; gezien de typische localisatie lijkt het waarschijnlijk, dat deze niet alleen aansprakelijk is voor de plasmacellulaire reactie, maar ook voor de hierna te bespreken follikelcentrumreactie. Genoemde onderzoekers veronderstellen dat de "antigen trapping" tot stand komt onder invloed van specifieke opsoninen; ook reeds aanwezige (eventueel passief toegediende) antilichamen blijken het proces sterk te bevorderen.

Over de eerste veranderingen welke samenhangen met de plasmacellulaire reactie, bestaat nog steeds een vrij aanzienlijk verschil van mening. Door de groep van Congdon (Congdon en Makinodan, 1961; Hanna, 1965) worden al na enkele uren veranderingen beschreven in de follikelcentra in de vorm van een volumevermeerdering van de centra gevolgd door een verkleining ervan die gepaard zou gaan met een emigratie van cellen. Door deze onderzoekers wordt aangenomen dat de follikelcentra aldus oorsprongsplaatsen zijn van de immunocompetente cellen, d.w.z. de cellen, die na contact met antigeen transformeren tot plasmablasten. Door Van Buchem (1962) zijn de eerste plasmablasten 24 uur na de antigeentoeiding (Paratyphus B-vaccin) waargenomen in groepjes aan de basis van de follikels; hij acht het echter onwaarschijnlijk dat deze plasmablasten voortkomen uit cellen van de follikelcentra. Movat en Fernando (1965) situeren de eerste plasmablasten "in the lym-



phoid tissue between the follicles". Zelf menen wij te hebben waargenomen, dat gedurende de eerste 24 uur na antigeentoeediening grote pyroninophile cellen (plasmablasten?) langs de gehele randzone van de schors ontstaan; de door Van Buchem waargenomen localisatie zou tot stand gekomen kunnen zijn door een migratie vanuit dit gebied. Onze waarnemingen betekenen dat de eerste plasmablasten ontstaan in het zelfde gebied waar de door Nossal en medewerkers beschreven "antigen trapping" plaats vindt, een gebied waar zowel lymphocyten als follikelrandcellen aanwezig zijn.

Door Van Buchem is beschreven dat na toediening van het opgeloste antigeen paardengammaglobuline de eerste grote pyroninophile cellen niet onder de follikels, maar in de centrale gedeelten van de lymphocytenvelden verschijnen rondom de schorsvenulen. Gezien het feit dat Oort en Turk (1965) juist op deze plaats het kenmerkende begin van de specifiek cellulaire reactie waargenomen hebben, lijkt het niet onmogelijk dat deze laatste waarneming van Van Buchem samenhangt met een door antigeen opgewekte specifiek cellulaire reactie, die dit antigeen waarschijnlijk veroorzaakt naast de normale plasmacellulaire reactie.

De oudere opvatting, dat de gehele plasmacellulaire reactie in de lymfeklier zich zou afspelen in het merggebied (o.a. White, 1960), is voornamelijk gebaseerd op de vanouds bekende localisatie van ophopingen van rijpe plasmacellen in de mergstrengen. Deze mening lijkt gezien het bovenstaande niet meer te handhaven; de mogelijke oorzaak van deze medullaire localisatie van rijpe plasmacellen kwam reeds bij de bespreking van de recirculatie in de lymfeklier (blz. 22) ter sprake. Hieronder komen wij er nog nader op terug.

Een punt van discussie is nog steeds de vraag, hoe de inductie van de plasmacellulaire reactie tot stand komt, met name de vraag welke cellen hierbij een rol spelen. Door Fagraeus (1948) en Marshall en White (1950) werd verondersteld dat de plasmablasten zich ontwikkelen uit reticulumcellen. Deze veronderstelling was gebaseerd op de waarneming van celvormen - "transitional cells" - welke zij beschouwen als overgangen tussen reticulumcellen en plasmablasten. Naar de opvatting van deze auteurs zou de reticulumcel zich na phagocytose van antigeen kunnen ontwikkelen tot de antilichaamvormende plasmacel.

Door Langevoort (1961) en Van Buchem (1962) zijn echter in de

milt, respectievelijk in de lymfeklier, in de vroegste stadia van de plasmacellulaire reactie celvormen waargenomen, welke veel kleiner zijn en die zij menen te kunnen plaatsen tussen de kleine lymphocyten en de "transitional cells" van Fagraeus. De hieruit voortkomende suggestie dat niet de reticulumcel, maar de kleine lymphocyt de cel is waaruit de plasmablasten kunnen ontstaan, wordt in zekere zin gesteund door de onderzoeken van McGregor en Gowans (1963): bij ratten, waarin een aanzienlijke lymphocytendepletie werd veroorzaakt door ductus thoracicus-canulering gedurende 5 dagen, bleek het vermogen tot antilichaamvorming vrijwel geheel verdwenen; teruggave van de uit de ductus thoracicus-canule opgevangen kleine lymphocyten gaf een gedeeltelijk herstel van het vermogen tot antilichaamvorming. Hierbij moet opgemerkt worden, dat enerzijds de morphologisch als kleine lymphocyt aangeduide celgroep in functioneel opzicht een heterogene celpopulatie vormt en dat anderzijds het volstrekke, experimentele bewijs nog steeds ontbreekt, dat plasmacellen voortkomen uit een tot de groep van kleine lymphocyten behorende cel.

Waarnemingen van Fishman en Adler (1963) en van Ford, Gowans en Mac Cullagh (1966) suggereren, dat deze immunocompetente cel niet zelf door antigeen geïnduceerd wordt tot plasmacelvorming, maar dat hiervoor de tussenkomst van een macrophaag noodzakelijk is. Fishman en Adler hebben daarbij de hypothese ontwikkeld dat de macrophaag na contact met antigeen een „messenger-RNA" zou produceren, dat na overdracht aan de lymphocyt(?) deze laatste zou induceren tot plasmacellulaire transformatie en antilichaamvorming.

Zeer recent is voorts door Gallily en Feldman (1967) aangetoond dat macrophagen uit een buikholte-exsudaat het vermogen tot antilichaamvorming kunnen herstellen in dieren, welke dit verloren hebben als gevolg van een sublethale(!) röntgenbestraling. Het effect van de sublethale röntgenbestraling zou dus berusten op uitschakelen van de macrophagenwerking. In lethaal bestraalde dieren konden buikholtemacrophagen het vermogen tot antilichaamvorming slechts in zeer geringe mate herstellen; dit wijst erop dat voor de antilichaamvorming niet alleen macrophagen nodig zijn, maar ook lymphocyten, welke bij deze hoge bestralingsdoses in veel grotere mate te gronde gaan.

Betreffende de genoemde buikholte-exsudaten werd door Volkman (1966) aangetoond, dat de daarin aanwezige lymphocyten, maar ook de macrophagen afkomstig zijn van een snel delende celpopulatie uit het beenmerg, terwijl de labelings-karakteristiek van deze macrophagen en lymphocyten suggereert, dat de macrophagen voortkomen uit de lymphocyten; deze lymphocyten hebben ongetwijfeld tijdelijk deel uitgemaakt van de kort levende lymphocytenpopulatie in het bloed. Het lijkt een voor de hand liggende hypothese dat de macrophagen, waar het hier om gaat, dezelfde zouden zijn als de "dendritic macrophages" die volgens Nossal en medewerkers aansprakelijk zouden zijn voor de "antigen trapping" in de schors van de lymfeklier, respectievelijk als de op deze plaatsen aanwezige follikelrandcellen: beide, respectievelijk alle drie celtypen zijn betrokken bij het antigeencontact in de eerste fasen van de "antibody response". Daar komt nog bij, dat deze celsoorten alle drie zekere overeenkomsten vertonen in röntgengevoeligheid: van de buikholte-macrophagen wordt door Gallily en Feldman gepostuleerd dat ze hun vermogen een antilichaamvorming te induceren verliezen door sublethale röntgenbestraling, door Williams (1966) is de afname van de "antigen trapping" in de lymfeklierschors na röntgenbestraling beschreven, terwijl ons tenslotte uit eigen waarneming gebleken is dat de follikelrandcellen met de follikellymphocyten tot de meest stralengevoelige cellen uit het lymfoïede weefsel behoren.

Resumerend kan gezegd worden, dat het op dit ogenblik het meest waarschijnlijk lijkt, dat voor de antilichaamvorming tenminste twee celsoorten nodig zijn: een cel van het macrophaagtype (mogelijk identiek met de "dendritic macrophages" of de follikelrandcel?) voor het antigeencontact, en een lymphocyt, welke zich onder invloed van deze macrophaag kan transformeren tot de antilichaamproducerende plasmacel.

Terugkerende naar de plasmacellulaire reactie in de schors van de lymfeklier kan het verloop hiervan als volgt worden beschreven. De plasmablasten vertonen vanaf het begin van hun verschijnen een zeer grote mitotische activiteit, waardoor het aantal grote pyroninophile cellen in de loop van enkele dagen zeer aanzienlijk toeneemt. Geleidelijk verandert hierbij het cytologisch karakter van deze cellen: uit de plasmablast ontstaan onrijpe plasmacellen, waarin de kern enigszins excentrisch is komen te liggen door de ontwikkeling van

het Golgi-apparaat, licht-microscopisch herkenbaar als een opheldering in het basophile cytoplasma (de zgn. para-nucleaire halo), waarna in de kern een zekere mate van condensatie van het chromatine tot stand komt. Door een voortgaande condensatie van het kernchromatine, waarbij de kern evenals de gehele cel kleiner wordt, ontwikkelen zich uit deze onrijpe plasmacellen de typische rijpe plasmacellen. In het electronenmicroscopische beeld kunnen al deze cellen als eiwitsynthetiserend gekarakteriseerd worden.

Worden de eerste cellen van de hier beschreven plasmacellulaire reeks in het buitenste deel van de cortex gezien, op latere tijdstippen worden de zich sterk vermenigvuldigende onrijpe plasmacellen steeds verder mergwaarts waargenomen; het gebied waar de specifiek cellulaire reactie tot stand komt, wordt hierbij als het ware gepasseerd. Waarschijnlijk voortbewegende op een stroom van door de lymphocytenvelden passerende lymfhe (met lymphocyten) komen tenslotte de plasmacellen tegen de afgrenzing schors-merg te liggen, waar deze cellen met grotere diameter dan de ook aanwezige kleine lymphocyten mogelijk een sterkere barrière op hun weg aantreffen. Juist de grotere cellen zouden daarbij als het ware weggedrukt worden in de mergstrengen; op deze wijze zou de uiteindelijke voorkeurslocalisatie van de plasmacellen in de mergstrengen tot stand kunnen komen.

Reeds door Bjørneboe en Gormsen (1943) werd opgemerkt dat de stijging van de antilichaamtiter in het bloed in direkt verband stond met de toename van het aantal plasmacellen, o.a. in het medullaire gedeelte van de lymfeklier. Door de techniek van de immunofluorescentie (Leduc, Coons en Conolly, 1955) werd het mogelijk specifieke antilichamen in de producerende cellen aan te tonen, al was het op deze wijze niet mogelijk precies vast te stellen in welk stadium van de plasmacellulaire reactie het eerste antilichaam gevormd werd. Zowel bij subcutane als intraveneuze anti-geentoediening wordt echter reeds antilichaam gemeten op een tijdstip waarop blast-type cellen en enkele onrijpe plasmacellen aanwezig zijn in het reagerende orgaan (Van Buchem, 1962; Langevoort c.s., 1961).

Na een eenmalige i.v. antigeentoediening vertoont de curve van de antilichaamtiter van het bloedserum in het algemeen een kenmerkend beeld :na een latente phase, waarin nog geen antilichamen aan-

toonbaar zijn ( $\pm 2d.$ ), volgt een snelle, exponentiële stijging (2e tot 4e à 5e d.) van de antilichaamtiter, waarna de curve afbuigt om zijn maximum te bereiken op de 6e à 7e dag; vervolgens vindt men een zgn. stationnaire phase, die enkele weken of maanden kan duren en waarna de titer langzaam (in maanden of jaren) terugloopt. In de laatste jaren is veel aandacht geschonken aan de relatie tussen dit verloop van de antilichaamtiter en de kinetiek van de plasmacellulaire reactie. Voor dit proefschrift zijn daarvan vooral de gegevens van belang, die betrekking hebben op het verloop van de antilichaamsynthese gedurende de eerste 6 à 7 dagen na antigeentoediening.

Door Makinodan en medewerkers (1963 en 1966) is de snelle, exponentiële titerstijging in het begin van de antilichaamvorming in verband gebracht met sterke, exponentiële vermenigvuldiging van de onrijpe plasmacellen in deze periode. Door Hoekstra, Mulder en Keuning (1967) is zowel de cellenkinetiek van de IgM (19S)- als van de IgG (7S)-antilichaamvorming onderzocht, welke laatste hier verder buiten beschouwing zal blijven. Daarbij bleek dat voor de snelle, exponentiële titerstijging - geheel op rekening van het IgM (19S)-antilichaam te stellen - niet alleen een exponentiële vermenigvuldiging van de antilichaamvormende cellen verantwoordelijk is, maar dat de antilichaamproductie (IgM) per cel in vrijwel gelijke mate toeneemt als het aantal antilichaamvormende cellen. Deze functionele differentiatie van de zich exponentieel vermenigvuldigende onrijpe plasmacellen manifesteert zich electronenmicroscopisch in de progressieve toename van het voor de eiwitsynthese verantwoordelijke "rough surface" endoplasmatisch reticulum in deze cellen (Braams 1961). Beide processen bereiken klaarblijkelijk een eindpunt omstreeks de 4e à 5e dag, aangezien de curve vanaf dit moment afbuigt naar zijn maximum, dat op de 6e à 7e dag wordt bereikt. Vermindering van de antigeendosis bleek te leiden tot een evenredige (!) verlaging van de gehele titercurve, waarbij het moment waarop de curven hun maximum bereikten (6e à 7e dag) hetzelfde bleek, en de vorm van de titercurve - voor de laagste antigeendoses voor zover waarneembaar - gelijk. Deze onderzoekers concluderen hieruit 1e dat elke door antigeen gestimuleerde immunocompetente cel een constant patroon van celdelingen en daarmee parallel verlopende differentiatie ondergaat en zo een plasmacellulaire kolonie van 128 of 256 cellen vormt, en 2e dat de hoogte van het 19S-maximum in



de titercurve bepaald wordt door het aantal immunocompetente cellen, dat door het antigeen is gestimuleerd.

Indien deze opvatting juist is, zou - mits aan bepaalde voorwaarden is voldaan - de hoogte van het 6e-dags-maximum een maat zijn voor het aantal „beschikbare” (althans door het antigeen bereikte) immunocompetente cellen; een langzaam, gedurende langere tijd stijgende 19S-titercurve zou wijzen op een geleidelijk ter beschikking komen (of door antigeen bereikt worden) van immunocompetente cellen. Bij de bespreking van de experimenten zal van deze interpretatiemogelijkheid gebruik worden gemaakt.

De invloed van röntgenstralen op de antilichaamvorming zal hierna nog tezamen met de andere röntgeneffecten op de lymfeklier ter sprake komen.

Kwam bij de behandeling van de specifiek cellulaire reactie de thymusafhankelijkheid van dat proces naar voren (Good c.s., 1962), de verwijdering van de Bursa Fabricii bij het kuiken of van een aantal lymfhoïede organen langs de tractus digestivus (appendix, sacculus rotundus, platen van Peyer) bij het konijn bleek steeds (na bestraling) te leiden tot een significante reductie van het vermogen tot antilichaamvorming (Cooper c.s., 1965, 1966, 1966). De experimenten van Parrott, De Sousa en East (1966) lieten zien hoe alleen de centrale delen van de lymphocytenvelden „thymus-dependant” zijn. De buitenzijde van de cortex zou dus mogelijk ook Bursa-afhankelijk kunnen zijn, zoals dit voor de follikels - en de plasmacellen - door Cooper en medewerkers is aangetoond.

Van oudsher zijn in de lymfeklier de veranderingen, welke in de follikels optreden het meest opgevallen. Het voorkomen van zo talrijke celdelingen in het centrum van de follikels, vooral van bepaalde lymfhoïede organen zoals mesenteriale lymfeklieren, deed Flemming (1885) vermoeden dat in deze follikels, „Keimzentren”, een nieuwvorming van lymphocyten plaats heeft, waarbij de in de krans gelegen cellen een verzameling van zo juist geproduceerde cellen zou vertegenwoordigen. Fliedner c.s. (1964) konden echter door labeling met  $^3\text{H}$ -thymidine aantonen, dat het follikelcentrum zeker niet verantwoordelijk is voor het ontstaan van de eromheen gelegen lymphocyten.

Het naast elkaar voorkomen van follikels met en zonder actief

centrum (blasten, celdelingen) deed Conway (1937) veronderstellen, dat deze follikels een regelmatige serie van cyclische veranderingen doormaken. Reeds 16 jaar eerder was het echter Hellman (1921) opgevallen, dat de mitotische activiteit in het follikelcentrum juist optrad in reactie op een schadelijke beïnvloeding („noxious substances”); hij noemde de follikelcentra „Reaktionszentren” en stelde ze verantwoordelijk voor de antilichaamvorming. Tot in deze tijd heeft zich bij een aantal onderzoekers (o.a. Ortega en Mellors, 1957; Congdon en Makinodan, 1961; Hanna, 1965) de mening gehandhaafd, dat de follikels betrokken zijn bij de productie van immuunstoffen. Zeker is dat in de follikelcentra een “trapping” van het antigeen plaatsvindt in de vorm van een na 24 uur verschijnen van door labeling herkenbaar antigeen in het follikelcentrum (Nossal c.s., 1965). Volgens Hanna en Congdon treden er echter al eerder veranderingen in de follikelcentra op, die volgens deze auteurs het uitgangspunt voor de plasmacellulaire reactie zouden vormen. Door Lennert c.s. (1966) zijn in de follikelcentra van de menselijke tonsil cellen waargenomen met de (ook electronenmicroscopische) kenmerken van jonge plasmacellen. Algemeen wordt echter beschreven (o.a. Hanna, 1965), dat onder de pyroninophile cellen in de actieve follikelcentra juist zeer weinige met “rough surface” endoplasmatisch reticulum zouden voorkomen.

Werd door Leduc, Coons en Conolly (1955) met behulp van de fluorescentietechniek en na herhaalde antigeeninjectie slechts weinig antilichaam in het follikelcentrum aangetroffen, enigszins grotere hoeveelheden hiervan werden eveneens na herhaalde antigeeninjectie waargenomen door Ortega en Mellors (1957), White (1960), Mellors en Korngold (1963). Pernis c.s. (1965, 1966) lieten echter zien dat, terwijl de plasmacellen dieper in de schors in het algemeen slechts één enkel specifiek antilichaam bevatten, in het follikelcentrum daarentegen een combinatie van immuunstoffen voorkomt en dat deze bovendien extracellulair gelegen zijn. Deze laatste resultaten en de noodzaak van herhaalde antigeentoediening om nog enige fluorescentie waar te nemen, maken het reeds minder waarschijnlijk, dat in de follikel de antilichaamproductie plaats vindt. De waarneming dat slechts weinig follikels voorkomen in steriel opgegroeide dieren (Glimstedt, 1936) en het feit, dat zowel de follikels als de antilichaamvorming „Bursa-afhankelijk” zijn, zouden niettemin als argumenten voor een

verband follikel-follikelcentrumreactie-antilichaamvorming opgevat kunnen worden.

De kenmerkende veranderingen - de „echte” follikelcentrumreactie met het verschijnen van talrijke grote pyroninophile cellen (waaruit?), talrijke celdelingen, het toenemen van het aantal “medium sized” lymphocyten en tenslotte de “tingibele Körper” (gephagocyteerde kernresten) - komen pas tot stand op een ogenblik (4e en 5e dag na antigeentoediening), dat reeds grote hoeveelheden antilichaam in circulatie zijn (Van Buchem, 1962; Langevoort, 1963). Bovendien bleek, dat ook zonder de aanwezigheid van de follikel - namelijk na sublethale röntgenbestraling ongeveer simultaan met de antigeeninjectie - een normale hoeveelheid antilichaam gevormd wordt (Langevoort c.s., 1961; Van Buchem, 1962).

Over de betekenis van de follikelcentrumreactie zijn echter een aantal gegevens bekend, welke erop wijzen dat in dit follikelcentrum de voorbereiding voor de reactie op latere antigeentoediening (“secondary response”) plaats vindt. Volgens Thorbecke c.s. (1964) zouden er namelijk de zgn. “memory cells” worden gevormd, welke een secundaire response op de kenmerkende en efficiënte wijze doen verlopen. Zo zagen deze onderzoekers, dat het vermogen tot een typische “secondary response” pas ontstaat, wanneer de follikelcentrumreactie na de antigeentoediening tot ontwikkeling gekomen is. Zolang deze follikelcentrumreactie actief was (tot  $\pm$  30e dag), kon door een sublethale bestraling weliswaar het vermogen tot een “secondary response” onderdrukt worden, maar daarvan was een herstel mogelijk. Na het einde van de follikelcentrumreactie, bijv. 40 dagen na antigeentoediening, veroorzaakte de bestraling wel een vermindering van de “secondary response”, maar een herstel trad niet op.

Komt uit deze experimenten van Thorbecke en medewerkers een verband naar voren tussen de processen van het follikelcentrum en de “secondary response”, met behulp van gelabelde cellen maakten Wakefield c.s. (1966) aannemelijk, dat het hier zou kunnen gaan om de vorming van een lymphocytachtige cel. Deze laatste, uit de „lymphoblast” van het actieve centrum ontstaan, zou de “memory cell” kunnen zijn.

Door André c.s. (1962) werden follikelcentrumreacties waargenomen bij de specifiek cellulaire reactie (transplantatie-reactie), en werden deze zelfs als het kenmerkende substraat van deze cellulaire



immunititeit beschouwd. Door Micklem en Brown (1961) en Van der Slikke en Keuning (1964) is de onjuistheid hiervan echter aangetoond (zie blz. 25); de eerstgenoemden concludeerden bovendien, dat de door André c.s. waargenomen follikelcentrumreacties de antilichaamvorming begeleiden, welke naast de cellulaire transplantatiereactie steeds door antigeen uit het transplantaat wordt opgewekt. Dat de follikelcentrumreactie door de vorming van "memory cells" de voorbereiding voor een hernieuwde antilichaamvorming zou kunnen zijn, past in het beeld, dat zowel de antilichaamproductie als de follikelcentrumreactie als "Bursa-dependent" aangemerkt kunnen worden.

### *Gevolgen van röntgenbestralingen*

Eén van de bekendste effecten van röntgenbestraling op levende cellen is de belemmering van de celdeling. De histologische veranderingen, welke na röntgenbestraling worden gevonden in bepaalde organen, zoals beenmerg en darmslijmvlies, zijn terug te voeren op deze celdelingsbelemmering. In het lymfhoïede weefsel, eveneens één van de meest stralengevoelige weefsels, komt daar nog een ander effect bij: een direkt destructieve werking op cellen, die niet in deling zijn, de zgn. interphase-dood, waaraan juist de kleine lymfocyten ten offer vallen.

Door Heineke is bij een vergelijkend onderzoek naar de invloed van röntgenstralen op diverse weefselsoorten reeds in 1904 opgemerkt, dat juist in de lymfhoïede organen een aanzienlijke destructie optreedt. Door De Bruyn (1948) zijn de histologische veranderingen in de lymfhekklier onderzocht na een totale lichaamsbestraling met uiteenlopende stralendoses (tot 800 R). Hieruit bleek de schade in  $\pm$  8 uur volledig tot ontwikkeling te komen; de sterkste schade werd steeds gevonden in de lymfocyten van de follikels; ook in de lymfocytenvelden werd wel enig lymfocytenuerval waargenomen, maar zelfs bij de hoogste stralendoseringen (800 R) bleven hier nog lymfocyten gespaard. Ook door Van Buchem (1962) is dit verschil in stralenschade tussen follikels en lymfocytenvelden waargenomen. De oorzaak van dit merkwaardige verschil is niet bekend. Van de follikelrandcellen, waarvan in de milt is beschreven (Keuning c.s., 1963), dat ze mét de follikellymfocyten na bestraling te gronde gaan, is in de lymfhekklier niets bekend.

Van de bij de immunologische reacties in de lymfeklier ontstane cellen vertonen die van de plasmacellulaire reeks geen zichtbare stralenschade; dit lijkt evenmin het geval te zijn met de bij de specifiek cellulaire reactie en de follikelcentrumreactie optredende blastcellen. Al deze cellen zullen uiteraard wel een invloed van de stralen ondergaan in de vorm van een celdelingsbelemmering. De bij de laatst genoemde reacties (SCR en FCR) ontstane lymphocyten zijn morfologisch niet te onderscheiden van de „normale lymphocyten”, zodat het niet zonder meer duidelijk is, of ook deze cellen na bestraling in interphase-dood te gronde kunnen gaan.

Het herstel van de lymfeklier na de röntgenbestraling zou gedeeltelijk een gevolg kunnen zijn van een redistributie van in het lichaam nog aanwezige, gespaarde lymphocyten door middel van de recirculatie, gedeeltelijk door een nieuwvorming van cellen al of niet binnen de lymfeklier.

Het zal duidelijk zijn, dat al deze door röntgenbestralingen veroorzaakte histologische en cytologische veranderingen hun weerslag zullen vinden in de immunologische reacties. Reeds in 1908 hebben Benjamin en Sluka vastgesteld, dat de antilichaamvorming door bestraling beïnvloed wordt.

Van de verschillende immunologische reacties bleek de specifiek cellulaire reactie door een sublethale irradiatie verrassend weinig beïnvloed te worden (Micklem en Brown, 1961; Van der Slikke en Keuning, 1964). Zelfs indien een transplantaat 24 uur na een totale lichaamsbestraling aangebracht werd - een tijdstip waarop het bestralings-effect op de antilichaamvorming maximaal is - werd slechts een geringe vertraging in de uitstoting van het transplantaat waargenomen. Een belangrijk uitstel van de uitstoting van een transplantaat kon slechts bereikt worden door een zo sterke bestraling, dat van een maximale lymphocytendepletie in het gehele organisme kon worden gesproken. Het lijkt waarschijnlijk dat de geringe vertraging van de uitstoting van het transplantaat na sublethale bestraling voornamelijk een gevolg is van de celdelingsbelemmering bij de onder normale omstandigheden met veel mitosen gepaard gaande specifiek cellulaire reactie. In de regionale lymfeklier werd bij deze proeven ook een min of meer normale specifiek cellulaire reactie waargenomen.

De antilichaamvorming vertoont in tegenstelling tot de specifiek

cellulaire response een zeer uitgesproken stralengevoeligheid: niet alleen bleek er een sterke afhankelijkheid te bestaan van de stralendosis, maar ook van het tijdstip waarop de bestraling wordt gegeven, zoals reeds door Benjamin en Sluka (1908) werd waargenomen. De invloed van bestraling op de antilichaamvorming is door een groot aantal onderzoekers nagegaan (Dixon c.s., 1952; Taliaferro, 1957; Gengozian en Makinodan, 1958; Keuning c.s., 1963 en vele anderen).

Hoge stralendoses (700-800 R), gegeven na de antigeentoediening, blijken de antilichaamvorming in beperkte mate te beïnvloeden. Dit is in overeenstemming met de geringe stralengevoeligheid van de cellen uit de plasmacellulaire reeks; het lijkt waarschijnlijk, dat de geringe effecten, die werden waargenomen een gevolg zijn van de celdelingsbelemmering van de plasmacellulaire reactie.

Indien een hoge stralingsdosis wordt gegeven voor of tegelijk met de antigeentoediening is de antilichaamvorming in zeer ernstige mate gestoord. Het lijkt aannemelijk dat één van de hiervoor verantwoordelijke factoren de sterke lymphocytendestructie is, die bij deze hoge stralendoses wordt gevonden.

Een sublethale bestraling, gegeven na de toediening van het antigeen veroorzaakt eveneens, zoals te verwachten, slechts een gering effect op de antilichaamvorming. Door Hoekstra, Mulder en Keuning (1967) is aangetoond, dat de geringe veranderingen, die hierbij in het verloop van de antilichaamvorming worden waargenomen, terug te voeren zijn op de celdelingsbelemmering van de zich ontwikkelende plasmacellen, terwijl de celdifferentiatie, d.w.z. de ontwikkeling van het antilichaamvormend vermogen per cel, ongestoord is.

Bij bestraling vóór, respectievelijk tezamen met antigeentoediening doet zich het merkwaardige feit voor, dat een sublethale bestraling (400 - 500 R), gegeven ongeveer simultaan met de antigeentoediening slechts een gering effect heeft op de daarop volgende antilichaamvorming, terwijl dezelfde stralendosis, gegeven 24 uur of meer vóór de antigeentoediening, een vrijwel volledige onderdrukking kan geven van de antilichaamvorming (zie o.a. Keuning c.s., 1963). Door Dixon c.s. (1952) is deze merkwaardige afhankelijkheid van het moment van de bestraling toegeschreven aan een veronderstelde stralengevoeligheid van de inductie-phase van de anti-

lichaamsvorming; deze opvatting lijkt onwaarschijnlijk, omdat een bestraling direct na de antigeentoediening, d.w.z. in de inductiephase zelf, een bijzonder geringe invloed op de antilichaamsvorming heeft. Gebleken is (Keuning c.s., 1964), dat na een sublethale bestraling het vermogen van het lymfoïede weefsel om op een antigene prikkel te reageren met een antilichaamsvorming in de loop van 24 uur verloren gaat, en dat dit vermogen na  $\pm 7$  dagen weer terugkeert. Dit herstel van het immunologisch vermogen bleek samen te vallen met de herverschijsing van de follikelrandcellen. Hierbij kan worden opgemerkt, dat door Nossal en medewerkers (1965, 1966) de door hen beschreven "antigen trapping" juist met deze cellen in verband is gebracht, en dat deze "antigen trapping" na een bestraling sterk terugloopt (Williams, 1966).

Zoals op blz. 29 reeds is opgemerkt, is zeer recent door Gallily en Feldman (1967) vastgesteld, dat de onderdrukking van de antilichaamsvorming door een sublethale röntgenbestraling 24 uur vóór de antigeentoediening voorkomen kan worden, indien aan de betreffende dieren buikholte-exsudaat-cellen intraveneus werden toegediend. Deze buikholte-exsudaten bevatten lymphocyten en macrophagen, zodat niet aanstonds duidelijk was, welke van deze beide celtypen verantwoordelijk was voor het herstel van de antilichaamsvorming in de bestraalde dieren. Het bleek evenwel, dat deze celsuspensie ook nog in staat was de antilichaamsvorming te herstellen in sublethaal bestraalde dieren, indien de cellen gedurende 4 dagen gekweekt werden, waarbij het grootste deel van de lymphocyten te gronde ging, en vrijwel uitsluitend een macrophagensuspensie overbleef. Deze onderzoekers concludeerden dan ook, dat de verwerking van het antigeen door macrophagen een voorwaarde is voor het op gang brengen van het inductieproces van de antilichaamsvorming. Bestraling van deze macrophagensuspensie in vitro maakte de cellen in dezen onwerkzaam. Hieruit werd geconcludeerd, dat de onderdrukking van de antilichaamsvorming door sublethale röntgenbestraling een gevolg is van het uitschakelen van deze macrophagenwerking. Werden de proefdieren aan sterkere röntgenbestralingen blootgesteld, dan waren de macrophagensuspensies niet meer in staat het vermogen tot antilichaamsvorming te herstellen; verondersteld werd, dat onder deze omstandigheden de nu veel grotere schade aan de lymphocyten oorzaak was, dat deze laatste cellen nu



de begrenzende factor vormden. Indien deze opvatting, dat voor antilichaanvorming zowel lymphocyten als macrophagen nodig zijn, juist is, dan zou dit t.a.v. de specifiek cellulaire reactie, welke door een voorafgaande sublethale röntgenbestraling nauwelijks beïnvloed wordt, betekenen dat voor dit proces een soortgelijke verwerking van antigeen door macrophagen niet noodzakelijk is.

Wat de stralengevoeligheid van de follikelcentrumreactie betreft, kan allereerst worden opgemerkt, dat reeds een sublethale röntgenbestraling een vrijwel totale destructie van de follikels teweeg brengt, met name van de follikellymphocyten. Onder deze omstandigheden blijkt een follikelcentrumreactie niet meer op te wekken; ook indien de bestraling tegelijk met de antigentoediening wordt gegeven, waarbij nog wel een antilichaanvorming wordt gevonden, ontbreekt de follikelcentrumreactie geheel (Van Buchem, 1962).

Zoals reeds bij de bespreking van de histologische röntgenschade aan de follikels is opgemerkt (blz. 37), gaan eventueel in het follikelcentrum aanwezige blastcellen en "medium sized" lymphocyten niet te gronde. Bestraling op een moment, dat een actieve follikelcentrumreactie aanwezig is, resulteert dan ook slechts in een tijdelijke onderdrukking daarvan (Thorbecke c.s., 1964; Keuning en Bos, 1966); na enige dagen blijkt de follikelcentrumreactie te regenereren. Het ligt voor de hand om te veronderstellen, dat deze tijdelijke onderdrukking een gevolg is van de celdelingsbelemmering. Door Thorbecke c.s. werd met deze reversibele schade aan de follikelcentrumreactie de tijdelijke vermindering van het vermogen met een typische "secondary response" te kunnen reageren, in verband gebracht.

Bij de locale bestraling van de lymfeklier moet op grond van hetgeen bekend is in zake de recirculatie van lymphocyten rekening gehouden worden met een op de röntgenbeschadiging volgend herstel door aanvoer van lymphocyten via de bloedbaan vanuit de niet bestraalde delen van het lymfoïede systeem. Door de onderzoekers die de gevolgen van een locale bestraling van de (popliteale) lymfeklier onderzochten, werden hiervoor vrijwel steeds röntgendoseringen gebruikt, welke aanzienlijk hoger waren dan de bij de totale lichaamsbestraling toegepaste. Door Jolly (1924) werden bij doseringen van 1900 tot 2500 R alleen veranderingen beschreven in de

follikels: een snel optredende destructie van lymphocyten, daarna phagocytose van de celresten en tenslotte op de 3e à 4e dag een regeneratie van de follikels gepaard gaande met mitosen. Aikawa en Takeshima (1930) zagen na 2000 à 3000 R vergelijkbare veranderingen; het follikelherstel werd door deze onderzoekers echter reeds 24 tot 48 uur na de bestraling opgemerkt. Door Hall en Morris (1964) werden na lokale lymfeklierbestralingen met 400 tot 2000 R niet de histologische veranderingen in de lymfeklier gevolgd doch het verloop van het aantal lymphocyten in het vas efferens van het bestraalde orgaan. De output van lymphocyten door de bestraalde lymfeklier bleek aanvankelijk wel een daling te vertonen, en wel tot 40 à 50 % van de uitgangswaarde, doch reeds binnen 20 uur werd het normale peil weer bereikt; in dit opzicht lijkt de lokaal bestraalde lymfeklier zich spoedig te herstellen.

Door Süssdorf en Draper (1956) werden de immunologische gevolgen van een lokale bestraling van de popliteale lymfeklier nagegaan; de gebruikte stralendosis was 1400 R en het antigeen werd 24 uur na de bestraling toegediend. Deze onderzoekers vonden na een normale latente periode een eveneens normale antilichaamproductie. Bij deze experimenten werd echter de histologie van de bestraalde lymfeklier niet onderzocht, terwijl ook niet werd nagegaan, of de gemeten antilichaamproductie in de bestraalde lymfeklier dan wel elders in het lichaam plaats vond. Hall en Morris (1964) gebruikten bij hun immunologische proeven een meer betrouwbare proefopstelling: na subcutane antigeentoediening, 24 uur na de bestraling, werd de hoeveelheid antilichaam bepaald in het vas efferens van de bestraalde lymfeklier. Hierbij werd een antilichaamproductie gemeten, welke gelijk was aan die in een onbestraalde lymfeklier. Daar echter voorafgaande aan de antigeeninjectie al een, zij het geringe hoeveelheid antilichaam in de lymfe aanwezig was, lijkt het waarschijnlijk dat bij deze experimenten ongewild een "secondary response" werd gemeten, waarvan bekend is dat deze in bepaalde opzichten minder röntgengevoelig is dan de "primary response".

Een andere bestralingsmethode bestaat uit een totale lichaamsbestraling met bescherming van de lymfeklier; hierbij kunnen de overige - bestraalde - lymfoïede organen via de recirculatie in elk geval tijdelijk geen cellen meer aanvoeren. De beweging of transfor-

maties van de in het orgaan aanwezige cellen, alsmede de functionele betekenis hiervan kunnen bij afwezigheid van een aanvoer van elders beter beoordeeld worden. Van de histologische gevolgen van de lymfeklierbescherming bij de totale lichaamsbestraling hebben wij in de literatuur geen beschrijving gevonden. Door Süssdorf en Draper (1956) werd de antilichaamproductie van de beschermde lymfeklier bij een totale lichaamsbestraling van 500 R geschat op ongeveer 18 % van de normale capaciteit; bij subcutane antigeeninjectie 24 uur na de bestraling werden een matig verlengde (1 dag) latente periode en een slechts weinig stijgende antilichaamtiter in het serum opgemerkt. Bij intraveneuze antigeeninjectie werd een weliswaar betere antilichaamproductie gemeten, doch de latente periode was hierbij aanzienlijk verlengd. Ook bij deze experimenten werd de werkelijke productieplaats van het waargenomen antilichaam niet nagegaan, hetgeen hier minder storend is dan bij de locale bestraling, omdat men mag aannemen dat antilichaamproductie buiten de gespaarde lymfeklier onder deze omstandigheden tijdelijk onmogelijk zal zijn. In deze proeven werden evenals in onze experimenten niet alleen de popliteale lymfeklieren beschermd, maar ook een aanzienlijk gedeelte van het beenmerg in de onderste extremiteiten.

Bij de in het volgende hoofdstuk te beschrijven experimenten was het de bedoeling om door locale lymfeklierbestraling, respectievelijk totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming een indruk te krijgen over de betekenis van de lymphocytenrecirculatie voor de histologie van het orgaan en het vermogen tot antilichaamvorming; dit zowel in kwalitatief als in kwantitatief opzicht.

#### **B. Experimenten: Histologische veranderingen in de popliteale lymfeklier na röntgenbestralingen**

Bij de experimenten, waarbij de lymfeklier lokaal wordt bestraald, moet bedacht worden dat hierbij ook een gedeelte van het beenmerg van de achterpoot wordt bestraald; evenzeer wordt in experimenten, waarbij het gehele dier wordt bestraald, maar de lymfeklier lokaal wordt beschermd ook een deel van het beenmerg van de achterpoot gespaard.

Aangezien een biopsie uit een lymfeklier technisch vrijwel on-

uitvoerbaar is en overigens ook minder wenselijk, wordt in deze experimenten het histologische beeld van de contralaterale popliteale lymfeklier als controle gebruikt.

1. *Histologische veranderingen in de lymfeklier na een totale lichaamsbestraling (RÖTOT)*

In enkele oriënterende proeven werd vastgesteld, dat er geen wezenlijke verschillen bestonden tussen de histologische röntgenschade in de popliteale lymfeklieren van het proefdier, dat een bestraling van 850/380 R (enkelzijdig, zie Hoofdstuk II) kreeg en van de dieren, welke een homogene stralendosis van 500 R (tweezijdige bestraling) ontvingen. Bij de navolgende beschrijving van de röntgenschade in de lymfeklier wordt dan ook geen onderscheid gemaakt tussen beide wijzen van bestraling. Op de veranderingen, die deze bestralingen veroorzaken in de overige lymfoïede organen, zal in dit hoofdstuk niet nader worden ingegaan.

De belangrijkste stralenschade wordt in de lymfeklier gevonden in de follikels. Vijf uur na de bestraling is nog slechts een gering

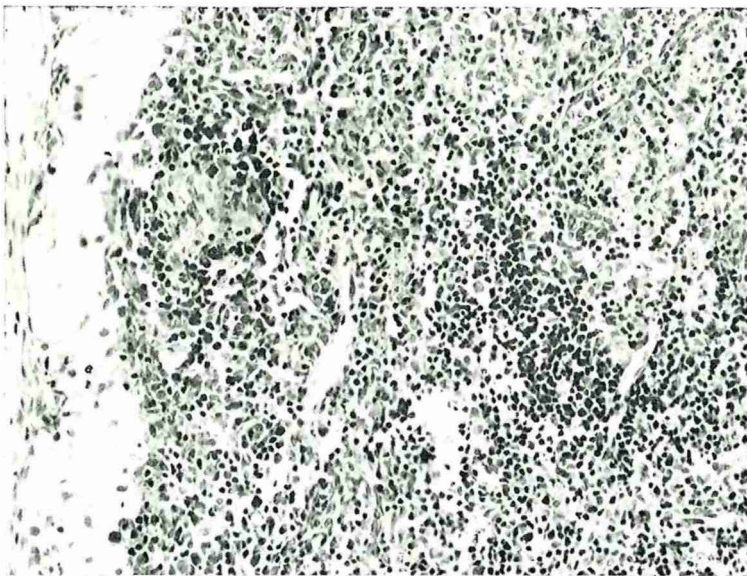


Foto 4.

Popliteale lymfeklier, 24 uur na een totale lichaamsbestraling. Lege follikel en matig gedepleteerd lymfocytenveld. Vergr.: 220 x.



aantal „normale” lymphocyten aanwezig; het grootste deel vertoont duidelijk pycnotische kernen. Ook de weinige follicelrandcellen zijn op dit tijdstip reeds volledig te gronde gegaan. Zoals op foto 4 te zien is, zijn 24 uur na bestraling vrijwel alle follicellymphocyten afgestorven en grotendeels gefagocyteerd door de aanwezige reticulocellen. Deze gefagocyteerde lymphocytenresten zijn 48 uur na de bestraling volledig verteerd, zodat vanaf dit moment de follicels nog slechts te herkennen zijn als conglomeraten van bleekgekleurde reticulocellen. Eventuele op het tijdstip van bestraling in het follicelcentrum aanwezige grote pyroninophile cellen ondervinden van de bestraling geen zichtbare schade, al moet worden aangenomen dat het celdelingsvermogen van een groot percentage van deze cellen verloren is gegaan. Het herstel van de follicels begint tussen de 5e en de 9e dag na bestraling met het herverschijnen van kleine ophopingen van lymphocyten meestal op de plaats van de te gronde gegane follicels. Omstreeks de 9e dag komen aan de buitenzijde van deze nieuwe follicels weer follicelrandcellen tot ontwikkeling. Het normale beeld van de follicels met follicelrandcellen, lymphocytenkrans en follicelcentrum wordt pas rond de 12e tot 15e dag weer gezien.

De bestralingsschade in de lymphocytenvelden lijkt in vergelijking met die in de follicels slechts gering. Gedurende de eerste 24 uur gaan er verspreid wel een aantal lymphocyten te gronde, maar tot een ernstige lymphocytendepletie leidt dit niet (zie foto 4). Het herstel van de lymphocytenvelden tot een normale toestand verloopt dan ook vrijwel ongemerkt.

In de schorsvenulen worden al spoedig na de bestraling geen lymphocyten meer aangetroffen; wel vindt men er gedurende de eerste 24 uur wat meer granulocyten dan normaal. Pas omstreeks de 9e dag na de bestraling worden weer lymphocyten in de schorsvenulen gevonden. Gedurende deze gehele periode na de bestraling blijft het kenmerkende aspect van de schorsvenulen gehandhaafd.

In de mergsinussen worden gedurende de eerste dagen na de bestraling opvallend weinig lymphocyten aangetroffen. Parallel aan het herstel van de schors neemt ook het aantal lymphocyten in de mergsinussen weer toe.

## *Nabeschouwing*

De door ons waargenomen schade en het herstel van de lymfeklier na röntgenbestraling komen in grote trekken overeen met de eerder vermelde waarnemingen van De Bruyn (1948) en Van Buchem (1962).

Voor het ook door beide genoemde auteurs waargenomen verschil in stralenschade tussen follikels en lymphocytenvelden zouden onder meer de drie volgende oorzaken in overweging genomen kunnen worden. In de eerste plaats zou dit verschil kunnen berusten op een verschil in stralengevoeligheid van de in beide structuren aanwezige lymphocyten. Een dergelijk verschil in stralengevoeligheid zou kunnen samenhangen met een verschillende herkomst van de betreffende lymphocyten, zoals wordt aangegeven door o.a. Good c.s. (1962), Cooper c.s. (1965 e.v.), Parrott, De Sousa en East (1966). Een tweede mogelijkheid is een eventueel verschil in plaatselijke zuurstofspanning: aangezien de capillairnetwerken zich voornamelijk bevinden in de buitenste schors en de follikels is het niet ondenkbaar dat hier een hogere zuurstofspanning heerst, waardoor bij gelijke stralendoses aan de cellen in dit gebied een grotere schade wordt toegebracht. Als derde moet met de mogelijkheid rekening worden gehouden, dat een eventuele schade aan lymphocyten juist in de velden gecamoufleerd wordt door een repletie via de schorsvenulen vanuit het - na een totale bestraling overigens slechts geringe aantallen lymphocyten bevattend - bloed.

## 2. *Histologische gevolgen van een locale lymfeklierbestraling met bijbehorende experimenten*

### a. *Histologische gevolgen van locale lymfeklierbestraling (LYKLLOC)*

Bij de experimenten met locale lymfeklierbestraling wordt beoogd een aanzienlijke destructie van de lymfeklier te veroorzaken en vervolgens na te gaan of het herstel geschiedt door het orgaan zelf, dan wel of via de lymphocytenrecirculatie de overige - niet bestraalde - organen aansprakelijk zijn voor een aanvoer van cellen en zo leiden tot het herstel van de lymfeklier. Bij deze proeven werd een locale lymfeklierbestraling toegepast van ongeveer 700

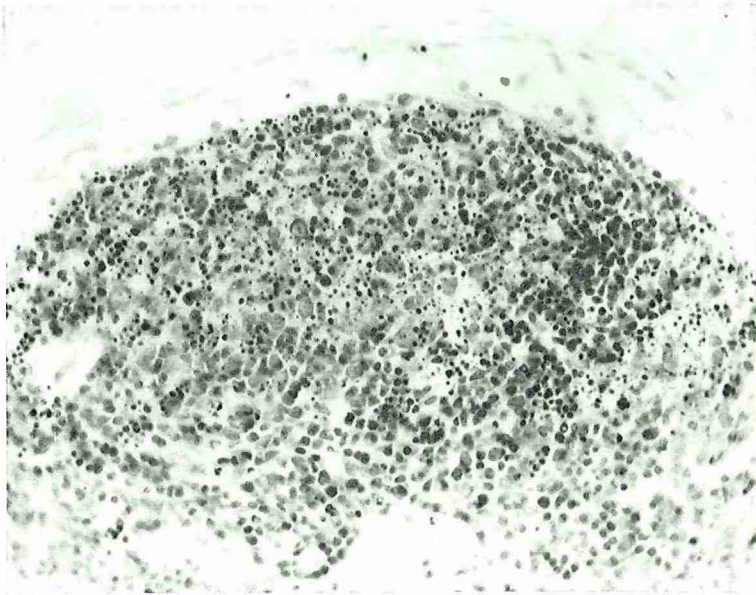


Foto 5.

Popliteale lymfeklier, 6 uur na locale bestraling. In de follicels nog aanzienlijke bestralingsschade (kerndébris), maar ook reeds beginnende repletie. Vergr.: 340 x.



Foto 6.

Popliteale lymfeklier, 12 uur na locale bestraling. Lymphocytenrepletie van de follicel; gefagocyteerde kernresten. Vergr.: 220 x.



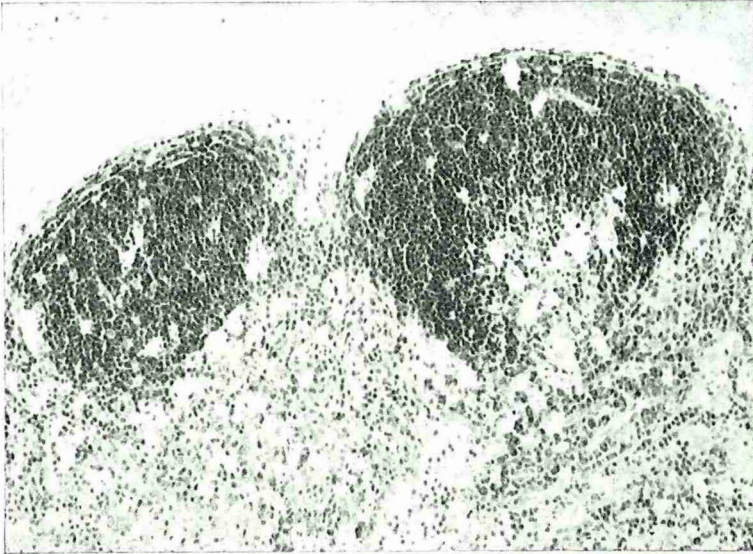


Foto 7.

Popliteale lymfeklier, 24 uur na lokale bestraling. Maximale lymphocytenrepletie in de follicels. Vergr.: 170 x.

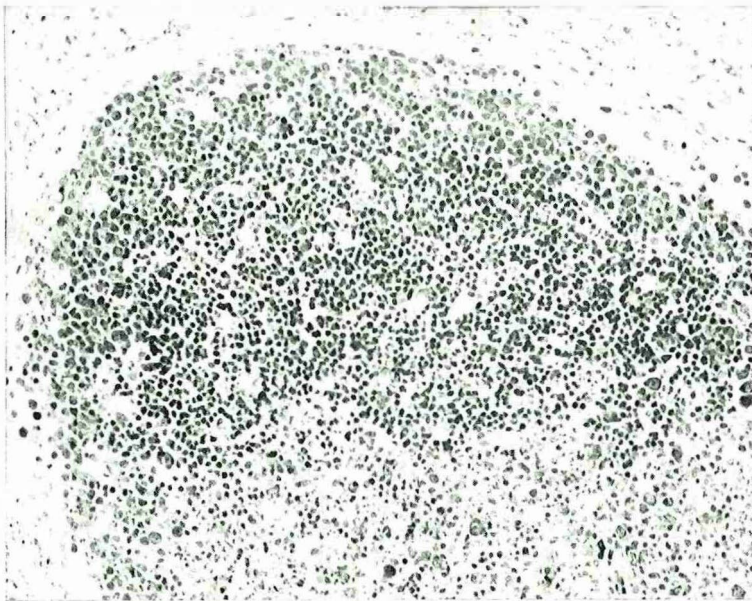


Foto 8.

Popliteale lymfeklier, 3 dagen na lokale bestraling. Herstel follicelrandcellen door transformatie uit follicellymphocyten (preparaat afkomstig van dier, dat 24 uur na de lokale bestraling ook nog een totale bestraling met lymfeklierbescherming onderging, experiment 3b). Vergr.: 220 x.

R, de hoogste dosering die indien toegediend aan het gehele dier, nog in het sublethale gebied valt. Biopsiën werden onderzocht 15 minuten, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 en 24 uur na de bestraling en 2, 3, 4 en 5 dagen nadien. Op dit laatste tijdstip bleek het histologisch herstel weer volledig te zijn.

Het meest opvallend na de lokale lymfheklierbestraling zijn de veranderingen in de follikels, met name de wijze van herstel.

Gedurende de eerste 4 uur na de bestraling wordt in een toenemend aantal follikellymphocyten kernpynose zichtbaar. Dit celverval zet zich weliswaar gedurende de daarop volgende 4 uren voort, maar in deze periode wordt ook reeds weer een toename van het aantal morfologisch normale lymphocyten opgemerkt, hetgeen op foto 5 te zien is. De follikelrandcellen in de periferie van de follikels en aan de buitenzijde van de lymphocytenvelden zijn inmiddels geheel te gronde gegaan. Vanaf 8 uur na de bestraling wordt het duidelijk, dat het aantal normale lymphocyten in de voordien ernstig beschadigde follikels sterk toeneemt. Zoals in de foto's 6 en 7 duidelijk te zien is, ontwikkelen de follikels zich tussen 8 en 24 uur na de bestraling door deze toename van het aantal lymphocyten tot opvallend grote conglomeraten van klaarblijkelijk normale kleine lymphocyten waartussen slechts enkele reticulumcellen aanwezig zijn met de phagocytoseresten van te gronde gegane lymphocyten en eventueel resten van een follikelcentrumreactie. Tijdens dit hele proces worden geen mitosen waargenomen, die de sterke vermeerdering van het aantal lymphocyten in de follikels zouden kunnen verklaren. Uit de histologische beelden kan de aanvoerweg van deze binnengekomen follikellymphocyten niet met zekerheid afgeleid worden; het voorkomen van rijtjes kleine lymphocyten in de onmiddellijke omgeving van follikelcapillairen, met name aan de periferie van de oorspronkelijke lymphocytenkrans, suggereert een uitreden van bloedlymphocyten op deze plaats.

Zijn 24 uur na de bestraling in de follikel vrijwel uitsluitend kleine lymphocyten en verspreide macrophagen aanwezig, een etmaal later heeft dit beeld zich gewijzigd door het herverschijnen van follikelrandcellen in de periferie van het lymphocytenconglomeraat. Behalve de kleine lymphocyten en follikelrandcellen lijken in dit gebied ook cellen voor te komen, welke als intermediairen tussen beide cel-

soorten beschouwd zouden kunnen worden. Het aantal follikelrandcellen neemt tussen de 2e en 4e dag nog toe (foto 8).

Indien na locale bestraling van beide achterpoten slechts aan één zijde antigeen wordt toegediend, blijkt dat enerzijds de lymphocytenvermeerdering in de follikels, en ook in de hierna te bespreken lymphocytenvelden, nog grotere vormen aangenomen heeft, anderzijds dat het ontstaan van follikelrandcellen niet bevorderd wordt door de gerichte antigene stimulering.

De subcutane injectie van antigeen leidt bij het normale dier behalve tot een plasmacellulaire reactie ook na ongeveer 4 à 5 dagen tot een follikelcentrumreactie. In aansluiting aan een locale bestraling worden zonder noemenswaardige vertraging in de follikel vergelijkbare veranderingen - het optreden van conglomeraten van blasten in de centra - waargenomen.

Door de transformatie van cellen (follikelrandcellen, follikelcentrumreactie) en mogelijk ook door vermindering van het aantal lymphocyten heeft de lympheklierfollikel na ongeveer 5 dagen het normale aspect herkregeen. Uit de follikelregeneratie is af te leiden, dat de herstelde follikel op dezelfde plaats als de bestraalde voorganger tot stand komt.

Ook in de lymphocytenvelden worden in aansluiting aan de locale lympheklierbestraling aanvankelijk verschijnselen van celverval waargenomen: in de coupes van 1, 2, 3 en 4 uur na de bestraling lijkt de hoeveelheid in de velden voorkomend kerndébris groter dan in de normale - onbestraalde - lymphocytenvelden. In de daaropvolgende phase wordt het normale aspect van de velden hersteld zonder dat dit gepaard gaat met een toegenomen aantal celdelingen ter plaatse. Het voorkomen van opvallend veel lymphocyten in het lumen en de wand van de schorsvenulen gedurende de eerste 4 uur en de daarna waar te nemen concentraties van lymphocyten rondom de schorsvenulen, duidelijk zichtbaar op foto 9, wijzen erop dat langs deze weg een aanvoer van lymphocyten tot stand is gekomen. In de tegen de randsinus gelegen zone van de lymphocytenvelden lijkt het celverval groter te zijn; het herstel van de follikelrandcellen in dit gebied is echter door het betrekkelijk geringe aantal van deze cellen moeilijker te volgen dan in de follikels, maar lijkt omstreeks de 3e dag te beginnen.

Toediening van het Salmonella-vaccin doet in de zich herstellende



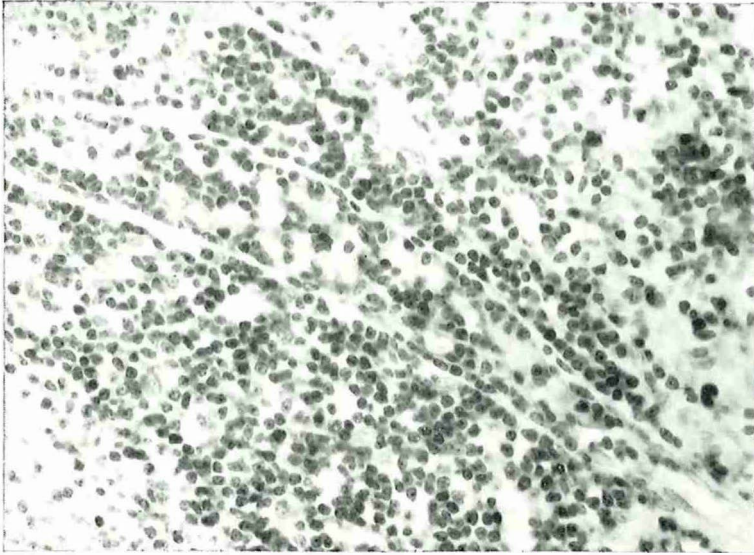


Foto 9.

Popliteale lymfeklier, 24 uur na lokale bestraling. Lymphocytenrepletie in de lymphocytenvelden rondom een schorsvenule. Vergr.: 425 x.

lymfeklierschors ook nog een bijzonder sterke plasmacellulaire reactie optreden; grote pyroninophile cellen van het blast-type worden daarbij in het begin niet alleen onder de follicels waargenomen (Van Buchem, 1962), maar ook in gedeelten van de "outer cortex", waar zich geen follicels bevinden en in de periferie van de follicel.

De celpopulatie in de mergsinussen zou een indruk kunnen geven van de "outflow" van cellen uit de lymfeklier. Van 2 tot 6 uur na de lokale bestraling worden in dit gebied voornamelijk beschadigde cellen aangetroffen, daarna vertoont het mergsinusbeeld geen duidelijke afwijkingen van het normaal waargenomene. Hoewel veel minder exact bevestigt deze waarneming toch de door Hall en Morris (1964) na lokale lymfeklierbestraling gevonden veranderingen van het aantal lymphocyten in het vas efferens.

Indien 24 uur na de lokale lymfeklierbestraling, dus op het tijdstip met maximale hoeveelheden lymphocyten in het orgaan, de lokale bestraling nog eens herhaald wordt, ontwikkelt zich gedurende het daarop volgende etmaal nog eens hetzelfde beeld. Het aspect van de twee keer bestraalde lymfeklier onderscheidt zich in geen enkel

opzicht van het beeld na een enkelvoudige bestraling. Elders in de lymphoïede organen worden door de lokale lymfheklierbestraling geen veranderingen veroorzaakt.

- b. Bestraling van het gehele dier met bescherming van de lymfheklier, onmiddellijk voorafgegaan of gevolgd door een lokale bestraling van deze lymfheklier (LYKLLOC-LYKLSH, LYKLSH-LYKLLOC)

De bij locale bestraling waargenomen snelle vermeerdering van het aantal lymphocyten in de follicel zonder begeleidende mitosen en ook de celophopingen in en om de venulen wijzen op een reconstructie van de bestraalde lymfheklier door aanvoer van elders. Door de overige lymphoïede organen direkt vóór of na de locale bestraling eveneens aan een irradiatie bloot te stellen zal deze aanvoer zoveel mogelijk beperkt kunnen worden, waardoor een zuiverder beeld verkregen wordt van de reële gevolgen van de locale bestraling. Bij de totale lichaamsbestraling met lymfheklierbescherming werd hier een tweezijdige bestraling uitgevoerd met een dosering van 750 R; de reden van deze hogere dosis ligt in de wenselijkheid in het bestraalde gebied een zo sterk mogelijke destructie teweeg te brengen en toch niet in het lethale gebied terecht te komen. De bestralingen werden zowel in de volgorde lymfheklierbescherming-lymfheklierbestraling als in de omgekeerde volgorde uitgevoerd om uit te sluiten, dat de waargenomen veranderingen bij de eerstgenoemde proefopstelling veroorzaakt zouden zijn door een stresseffect, voortkomend uit de voorafgaande bestraling van het grootste gedeelte van het proefdier. Daar de contralaterale popliteale lymfheklier bij deze experimenten wel steeds gespaard werd, doch niet lokaal bestraald, kon dit orgaan als controle gebruikt worden. De histologische veranderingen bij de genoemde bestralingscombinaties bleken volkomen met elkaar overeen te stemmen; biopsieën werden hierbij genomen  $1/2$ , 4, 8, 12 en 24 uur na de laatste irradiatie.

In de follicel treedt na het vierde uur een toenemend celverval op; het follicelbeeld na 24 uur komt overeen met het bij totale lichaamsbestraling waargenomene: een conglomeraat van bleke reticulocellen met een enkele pyroninophile cel. Morphologisch normale lymphocyten zijn op dit tijdstip practisch niet meer aanwezig.



Bij deze experimenten werd ook in de lymphocytenvelden een aanzienlijk lymphocytenuitval waargenomen: van het 4e tot het 12e uur een toenemende hoeveelheid kerndébris verspreid in de lymphocytenuitvelden. Op het laatstgenoemde tijdstip bestonden de velden uit reticulocellen met verspreid en ten dele gefagocytiseerd kernmateriaal; morfologisch normale lymphocyten waren er slechts in zeer geringe aantallen aanwezig (foto 10). Ook in en om de venulen



Foto 10.

Popliteale lymfeklier, 12 uur na een lokale lymfeklierbestraling, onmiddellijk gevolgd door totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming. Lege follicels en ook gedepleteerde lymphocytenuitvelden. (vergelijk foto 6). Vergr. 170 x.

worden geen normale lymphocyten in noemenswaardige aantallen gezien. In de mergsinussen bevinden zich gedurende de eerste uren nog beschadigde lymphocyten; er zijn geen aanwijzingen dat de lymphocytenafvoer gedurende de eerste 24 uur weer op gang komt.

- c. Het effect van afbinden der aanvoerende lymphebanen op het herstel van de lympheklier na locale bestraling

Om uit te sluiten dat het herstel van de lympheklier na locale bestraling door een toevoer van kleine lymfocyten via de aanvoerende lymphevaten zou plaats vinden, werden de proeven met locale bestraling van de lympheklier herhaald bij dieren, waarin tevoren de afferente lymphebanen waren onderbonden. In enkele oriënterende experimenten, waarbij de aanvoerende lymphebanen werden afgebonden zonder dat een locale bestraling werd toegepast, werd eerst vastgesteld dat deze onderbinding op zich zelf, althans gedurende de eerste 24 uur, geen verandering in de bouw van de lympheklier teweeg brengt.

Werd na de onderbinding van de aanvoerende lymphevaten een locale bestraling toegepast, dan volgde het normale herstel zoals beschreven onder 2a: na 24 uur werd ook hier een sterke overvulling van de follikels met kleine lymfocyten gevonden, terwijl in de lymfocytenvelden normale aantallen lymfocyten waargenomen werden.

#### *Nabeschouwing*

Het is duidelijk dat bij de locale bestralingsproeven in de follikels een aanzienlijke schade werd aangebracht. In de lymfocytenvelden echter, waar slechts een betrekkelijk gering lymfocytenuitval werd waargenomen, bestond enige twijfel over de werkelijke omvang van de toegebrachte schade. Uit de controleproeven, waarbij de locale bestraling van de lympheklier voorafgegaan of gevolgd werd door een bestraling van de rest van het lichaam (met bescherming van de lympheklier), waarbij dus de mogelijkheid van een repletie met lymfocyten via de bloedbaan uit de andere lymfoïede organen in sterke mate gereduceerd werd, bleek dat niet alleen in de follikels, maar ook in de lymfocytenvelden een zeer aanzienlijk deel van de aanwezige lymfocyten te gronde gaat. Hieruit mag worden geconcludeerd dat al zeer spoedig na de locale bestraling zowel naar de follikels als naar de lymfocytenvelden een aanvoer van nieuwe lymfocyten van buitenaf plaats vindt. Doordat dit proces van repletie door aanvoer van nieuwe lymfocyten al begint voordat de histologische schade volledig tot ontwikkeling is gekomen, wordt

de werkelijke omvang van de schade min of meer gecamoufleerd. Het lijkt niet onwaarschijnlijk dat de vrijwel normale toestand, zoals na totale lichaamsbestraling juist in de lymfocytenvelden wordt waargenomen, eveneens veroorzaakt wordt door een preferente aanvoer van lymfocyten uit de bloedbaan naar dit gebied. Hierbij moet bedacht worden, dat bij de hier besproken gecombineerde bestraling een hogere stralendosis toegediend is dan in de proeven met totale lichaamsbestraling.

Uit de proeven, waarbij de afferente lymphebanen werden afgebonden, blijkt dat deze aanvoer van nieuwe lymfocyten niet via deze lymphebanen plaats heeft, zodat de waargenomen histologische beelden - ophopingen van lymfocyten in en om de folliculaire capillairen en de schorsvenulen - inderdaad geduid mogen worden als een uiting van emigratie van lymfocyten uit de bloedbaan naar deze lymfekliergedeelten.

Het meest opvallende verschijnsel bij deze proeven met locale bestraling van de lymfeklier is de aanzienlijke aanvoer van lymfocyten naar de röntgenbeschadigde follicels. Door Gowans en Knight (1964) is na intraveneuze injectie van gelabelde lymfocyten in niet bestraalde dieren wel een emigratie door de schorsvenulen naar de lymfocytenvelden waargenomen, maar in de follicels werden door deze auteurs klaarblijkelijk geen gelabelde cellen waargenomen. Het is mogelijk dat dit laatste proces in het normale, niet bestraalde proefdier een zo geringe omvang heeft dat het aan de waarneming ontsnapt is.

In onze proeven werd voorts een veel sneller begin van het follicelherstel waargenomen - reeds na enkele uren waren er tekenen van lymfocytenaanvoer merkbaar - dan door Jolly (1924) en door Aikawa en Takeshima (1930) beschreven werd; door deze laatste onderzoekers werden echter hogere röntgendoses toegepast. De overvulling met kleine lymfocyten kan zeker ten dele verklaard worden door het tijdelijk afwezig zijn van follicelrandcellen en cellen van de follicelcentrumreactie.

Het bijzonder snelle herstel met name van de follicels na locale lymfeklierbestraling laat vooral in vergelijking met het herstel na totale lichaamsbestraling op een tweetal punten nog verdergaande conclusies toe. In de eerste plaats blijkt uit de vergelijking van het snelle herverschuiven van follicelrandcellen na locale bestraling en het

langzame herstel van de follikelrandcellen na een totale lichaamsbestraling, het herstel van dit celsysteem afhankelijk te zijn van een aanvoer van kleine lymphocyten naar de follikels. Tezamen met het voorkomen van overgangsvormen tussen kleine lymphocyten en follikelrandcellen wijst dit erop, dat follikelrandcellen door transformatie uit kleine lymphocyten ontstaan.

In de tweede plaats blijkt dat de snelle influx van grote aantallen kleine lymphocyten in de follikels er ook toe leidt dat het vermogen om op een antigene prikkel te reageren met een follikelcentrumreactie eveneens zeer snel terug keert, dit in tegenstelling tot de situatie na een totale lichaamsbestraling, waar de mogelijkheid tot een follikelcentrumreactie pas 12 tot 15 dagen na de bestraling weer aanwezig is. Ook hier lijkt een transformatie van kleine lymphocyten tot in dit geval grote pyroninophile cellen van de follikelcentrumreactie (en wel onder invloed van de antigene stimulering) waarschijnlijk, al zijn overgangsvormen in dit geval niet waargenomen.

Bij dit alles dient men zich te realiseren dat de hier beschreven processen zich niet noodzakelijkerwijze ook in de normale lymfeklier afspeelen, respectievelijk in dezelfde mate.

3. *Histologische gevolgen van een totale lichaamsbestraling met bescherming van de popliteale lymfeklier en bijbehorende experimenten*

a. *Histologische veranderingen na totale lichaamsbestraling met bescherming van de lymfeklier (LYKLSH)*

Indien bij een totale lichaamsbestraling een enkel orgaan, in casu de popliteale lymfeklier wordt beschermd, zal in dit orgaan weliswaar geen directe röntgenshade optreden, maar aan de andere kant zal via de recirculatie slechts een minimale aanvoer van lymphocyten uit de overige sterk beschadigde lymphoïede organen kunnen plaats vinden. Het was de bedoeling bij afwezigheid van deze influx een betere indruk te krijgen over de wijze, waarop de lymphoïede cellen de lymfeklier verlaten, respectievelijk in hoeverre het orgaan zich zonder aanvoer van lymphocyten weet te handhaven.

Zoals reeds vermeld werd bij deze experimenten steeds een aan-



zienlijk deel van het beenmerg in de achterpoot eveneens beschermd voor irradiatie; dit zou eventueel effect kunnen hebben op de regeneratie van de bestraalde organen (Ford, 1966). De histologische veranderingen werden zowel in de lymfeklier als in een aantal andere lymfoïede organen gevolgd van  $1/2$  tot  $8\frac{1}{2}$  dag.

In de follikels van de beschermde lymfeklier worden geen opvallende veranderingen waargenomen, met name treedt geen duidelijke depletie van lymphocyten op in dit gebied. Het ontbreken van abnormale tekenen van celverval in het gebied met röntgengevoelige lymphocyten en follikelrandcellen bewijst dat het orgaan voldoende voor de röntgenstralen beschermd is. De follikelrandcellen handhaven zich niet alleen, maar tonen in de beelden van 6 tot  $8\frac{1}{2}$  dag na bestraling zelfs een duidelijke vermeerdering in aantal. Indien de beschermde lymfeklier antigeen (*Salmonella paratyphi*) aangeboden krijgt, treedt in het follikelcentrum op de normale wijze en op het gebruikelijke tijdstip de zgn. follikelcentrumreactie op. In de overigens normale lymphocytenvelden suggereert de aanwezigheid van kleine ophopingen van gedegeneerde lymphocyten rond de schorsvenulen 12 uur na de bestraling, dat deze laatste cellen elders (in het bloed?) de bestraling ondergingen, doch eerst na het binnentreden in de lymfeklier te gronde gegaan zijn. In de coupes van de latere biopsieën worden van tijd tot tijd rond de schorsvenulen opvallend lege veldgedeelten aangetroffen, in iets sterkere mate in door antigeen gestimuleerde lymfeklieren. Dit zou kunnen berusten op een snellere doorstroming van de lymphocytenvelden of op een transformatie van de aanwezige cellen tot plasmocytair elementen.

Er zijn geen aanwijzingen dat de lymphocyten bij deze experimenten op een andere wijze de schors verlaten dan normaal, d.w.z. door een individuele celfiltratie, eventueel ook via een „openbreken” van de lymphocytenvelden of via „lymphesinussen”.

Tot ongeveer de 3e dag worden in de mergsinussen nog redelijke aantallen normaal uitzijende lymphocyten aangetroffen. Daarna blijft het tot aan het einde van de door ons onderzochte periode opvallend leeg in dit gebied; een en ander zou er op kunnen wijzen, dat de afvoer van lymphocyten mogelijk enkele dagen voortgaat, maar vervolgens tot stilstand komt.

In de overige lymfoïede organen, o.a. milt en thymus, wordt

een opeenvolging van schade en herstel waargenomen, welke niet afwijkt van die bij een totale lichaamsbestraling. Het sparen van de popliteale lymfeklier - en een aanzienlijke hoeveelheid beenmerg - resulteert dus niet in een histologisch waarneembare versnelling van de regeneratie in deze organen.

- b. Histologische gevolgen van een locale lymfeklierbestraling, na 24 uur gevolgd door bestraling van het gehele proefdier onder bescherming van het voordien bestraalde orgaan (LYKLLOC - 24 u - LYKLSH).

Bij de hiervoor beschreven experimenten (3a) werd geen duidelijk „leeglopen” van de lymfeklier opgemerkt. Door een voorafgaande locale irradiatie van het orgaan kan echter een sterke overvulling met lymphocyten verkregen worden, waarna dit „leeglopen” mogelijk wel zichtbaar zou kunnen worden. Daarnaast zijn deze experimenten van belang om vast te stellen, in hoeverre de veranderingen, welke zich na de eerste 24 uur in de lokaal bestraalde lymfeklier voltrekken (zie 2a) nog een gevolg zouden kunnen zijn van de in deze fase binnenkomende cellen dan wel, of de celveranderingen - de transformatie van lymphocyten tot follikelrandcellen of cellen van de follikelcentrumreactie - geheel op rekening van de ogenschijnlijk volledig uit kleine lymphocyten bestaande influx gedurende de eerste 24 uur geschreven moet worden.

Bij deze experimenten werd één der twee lokaal bestraalde popliteale lymfeklieren voorafgaand aan de tweede bestraling verwijderd als controlebiopsie.

De op de vorige experimenten gebaseerde verwachting, dat de lymphocytenvelden zich na deze twee bestralingen in een vrij normale toestand zouden handhaven, werd bewaarheid.

In de follikels werd enige teruggang van het aantal lymphocyten t.o.v. de 24 uur na locale bestraling opgetreden „overvulling” opgemerkt; deze achteruitgang van het aantal lymphoïede cellen is mogelijk iets sterker dan na uitsluitend locale bestraling. Er werden geen aanwijzingen gevonden betreffende de weg waarlangs de cellen de follikels verlaten. Ook bij deze experimenten werd het ontstaan van follikelrandcellen waargenomen. Dat er verder na anti-gentoeediening ook nog een duidelijke follikelcentrumreactie (foto



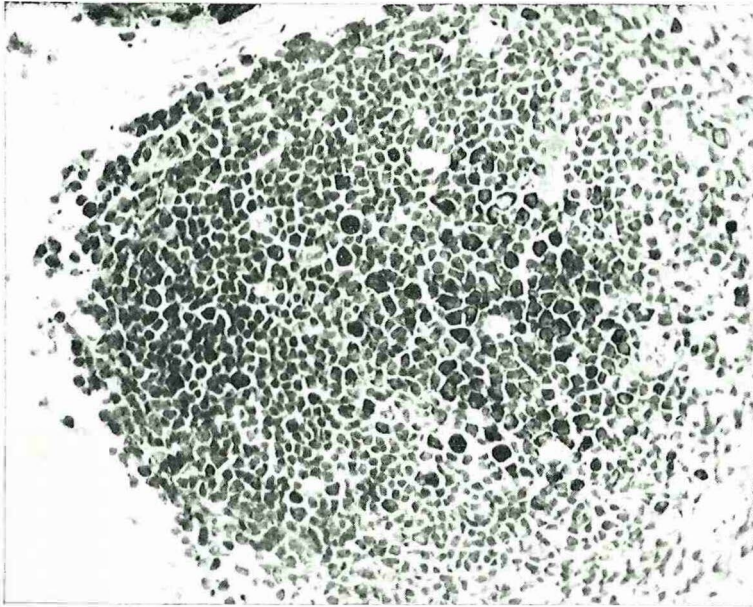


Foto 11.

Popliteale lymfeklier, respectievelijk 7, 6 en 5 dagen na lokale lymfeklierbestraling, totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming en subcutane antigeentoediening. Herstel follikelcentrumreactie na een aanvoer van lymfocyten gedurende 24 uur (de enigszins afwijkende kleur van dit preparaat is een gevolg van de fixatie met glutaraaldehyde). Vergr.: 340 x.

11) op gang kon komen, wees er wel op dat dit proces en de hiervoor genoemde transformatie tot follikelrandcellen niet afhankelijk waren van een voortgaande aanvoer van kleine lymfocyten, maar dat in de eerste 24 uur de follikel binnengekomen lymfocyten hiervoor toereikend waren. Na de subcutane antigeentoediening werden de eerste tekenen van een plasmacellulaire reactie, het ontstaan van grote pyroninophile cellen, gezien aan de buitenzijde van de follikels en in de tegen de randsinus aan gelegen zone van de lymfocytenvelden, beide localisaties waar zich als gevolg van de influx van lymfocyten na de eerste bestraling niet alleen lymfocyten bevonden maar ook follikelrandcellen. De rijpere cellen van de plasmacellulaire reeks werden later dieper in de lymfocytenvelden terug gevonden.

## *Nabeschouwing*

De totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming leverde geen direkte gegevens op, welke passen in het kader van de circulatie van lymfocyten in dit orgaan: ondanks het ontbreken van een lymfocytenaanvoer en een waarschijnlijk nog enkele dagen voortgaande afvoer handhaven de follikels en lymfocytenvelden zich. Het lijkt waarschijnlijk dat de onderbroken aanvoer van lymfocyten uit het bloed de afvoer na enige dagen doet ophouden.

De follikelrandcellen en de cellen, welke aansprakelijk zijn voor de follikelcentrumreactie lijken voort te komen uit binnengekomen lymfocyten. Uit de locale bestraling na 24 uur gevolgd door lymfekliershielding valt af te leiden, dat deze lymfocyttaire voorgangers gedurende de eerste 24 uur na locale bestraling binnengekomen moeten zijn. In de bij totale lichaamsbestraling beschermde lymfeklier blijken ook de reeds aanwezige cellen tot de vorming van follikelrandcellen en tot een follikelcentrumreactie in staat te zijn. Van de follikelrandcellen kan in de eerste plaats gezegd worden, dat deze ontstaan zijn uit lymfocyten afkomstig uit de circulatie, die na emigratie gedurende langere tijd in de lymfeklier aanwezig lijken te kunnen blijven en in de tweede plaats, dat op de plaatsen waar zich naast kleine lymfocyten juist deze follikelrandcellen bevinden de jongste stadia van de plasmacellulaire reeks aangetroffen worden.

### **C. Experimenten: Telling van het aantal bloedlymfocyten bij het lymfeklieronderzoek; fig. 1**

Bij het normale onbestraalde proefdier varieert het lymfocytenaantal in het perifere bloed vrij sterk: er werden waarden van 5000 tot 7000 lymfocyten per  $\text{mm}^3$  waargenomen. Na de verschillende bestralingstechnieken werd het gemiddelde van het aantal bloedlymfocyten in een bepaalde experimentele groep vergeleken met de gemiddelde, op 100 % gestelde uitgangswaarde van deze proefdieren.

Een totale lichaamsbestraling van 500 R of 850/380 R veroorzaakte een zeer aanzienlijke vermindering van het aantal circulerende lymfocyten: na 24 uur was nog slechts 8 % van de uitgangswaarde aanwezig. Het herstel gaat zeer langzaam (op de 9e dag

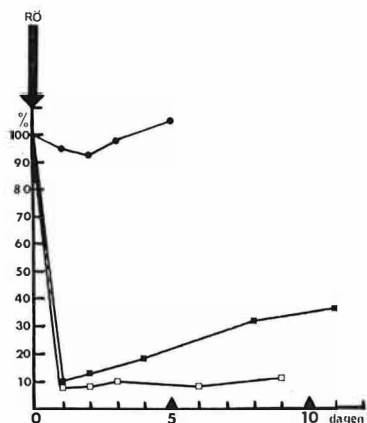


Fig. 1.

Verandering van het aantal bloedlymphocyten bij lymfeklierexperimenten; de gemiddelde uitgangswaarde per experimentele groep = 100 %. a. ●-● Locale lymfeklierbestraling. b. ■-■ Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming. c. □-□ Totale lichaamsbestraling.

11 0/0); uit niet gepubliceerde gegevens van Van Buchem blijkt, dat pas na maanden weer het normale peil bereikt wordt. De lymfoïede organen hebben dan reeds lang weer hun normale aspect.

Een locale bestraling van de lymfeklier (LYKLLOC) veroorzaakte geen opvallende veranderingen in het lymphocytenaantal van het bloed; dit lijkt ook niet zo vreemd gezien de verhouding tussen de aantallen in de lymfeklier te gronde gaande cellen en de geweldige hoeveelheden onbeschadigde lymphocyten elders in het lichaam.

Indien bij een totale lichaamsbestraling de beide achterpoten, d.w.z. de popliteale lymfeklieren en het aanwezige beenmerg, beschermd werden, was de vermindering van het aantal bloedlymphocyten vrijwel gelijk aan het bij totale lichaamsirradiatie waargenomen. Na 24 uur is het aantal lymphocyten teruggelopen tot 10 0/0 van de uitgangswaarde, op de 11e dag is dit echter al weer tot 35 0/0 hersteld. Dit gegeven moet natuurlijk gezien worden tegen de achtergrond van de uitermate geringe depletie van de lymfeklier en het tevens beschermen van beenmerg bij deze bestralingsmethode.

#### D. Experimenten: Antilichaamvorming op paratyphus B-vaccin na röntgenbestralingen

Met gebruikmaking van een aantal van de hiervoor toegepaste bestralingsmethoden, de lokale irradiatie, de totale lichaamsbestraling met lymfheklierbescherming en de gecombineerde bestraling werd hier nagegaan of de optredende histologische veranderingen, welke terug te brengen zijn op de begrippen recirculatie en transformatie van lymphocyten, ook immunologische consequenties hebben. Uitsluitend de antilichaamvorming en wel op het vrijwel geheel corpusculaire paratyphus-vaccin werd hierbij gecontroleerd. Tussen de laatst uitgevoerde bestraling en de antigeeninjectie werd steeds een termijn gekozen van 24 of 48 uur: bij experimenten met lokale bestraling, omdat na 1 à 2 dagen in de lymfheklier een zeer uitgesproken beeld bestond, bij experimenten met orgaanbescherming om het vermogen tot antilichaamproductie in het bestraalde gebied tot een minimum te laten dalen. Door Nieuwenhuis en Keuning (1967) was vastgesteld dat een subcutane injectie van het antigeen, dat ook door ons gebruikt is, tot een antilichaamproductie vrijwel uitsluitend in het eerste lymfheklierstation leidde; verwijdering van het orgaan onder meer 3 en 5 dagen na de antigeentoeiding deed de antilichaamvorming namelijk stoppen.

##### 1. *Antilichaamvorming bij onbestraalde en totaal bestraalde dieren*

###### a. Subcutane antigeentoeiding bij onbestraalde proefdieren (AG<sup>sc</sup> - controle); fig. 2

Na een latente periode van 4 dagen - 2 dagen langer dan bij de hierna te bespreken intraveneuze antigeentoeiding - werd een langzame stijging van de serumtiter gevonden; de maximale titer werd pas op de 10e dag bereikt. Het afwezig zijn van een snelle primaire stijging (logphase) maakt dat de eraan ten grondslag liggende celkinetiek niet zo goed beoordeeld kan worden als bij intraveneuze antigeentoeiding.

###### b. Intraveneuze antigeentoeiding bij onbestraalde proefdieren (AG<sup>iv</sup>-controle); fig. 3

De latente periode bedraagt hier slechts 2 dagen. Het verloop

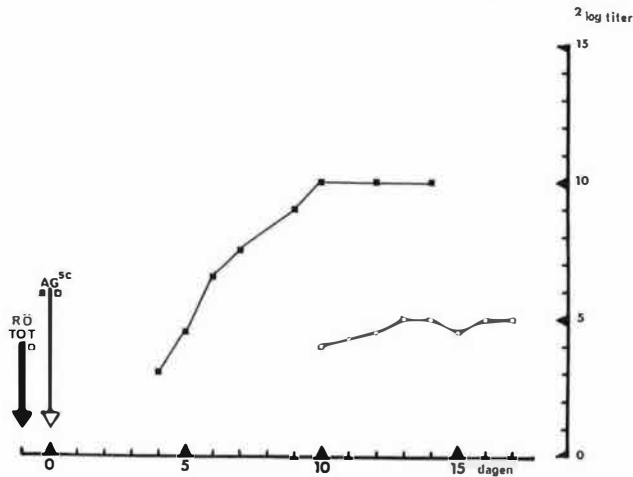


Fig. 2.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ■—■ Subcutane antigeentoediening bij onbestraalde dieren (AG<sup>sc</sup>-controle); gem. van 6 dieren. b. □—□ Subcutane antigeentoediening 24 uur na totale lichaamsbestraling (RÖTOT-24 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 4 dieren.

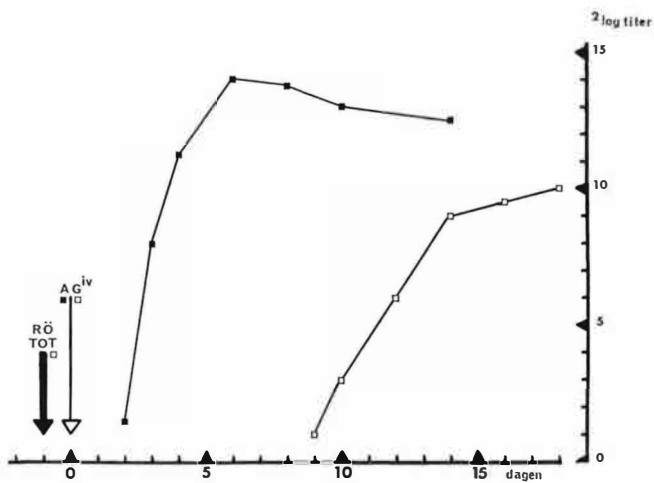


Fig. 3.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ■—■ Intraveneuze antigeentoediening bij onbestraalde dieren (AG<sup>iv</sup>-controle); gem. van 4 dieren. b. □—□ Intraveneuze antigeentoediening 24 uur na totale lichaamsbestraling (RÖTOT-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 4 dieren.



van de titercurve is gekenmerkt door een 2 dagen durende snelle stijging, gevolgd door een geringe afbuiging van de titercurve naar een maximum, dat bereikt wordt op de 6e dag.

- c. Totale lichaamsbestraling, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeeninjectie (RÖTOT-24 u-AG<sup>sc</sup>); fig. 2

Het door de röntgenbestraling veroorzaakte verschil met de antigeen<sup>sc</sup>-controle (1a) is evident: een aanzienlijk verlengde latente periode (10 dagen) en daarna een beperkte antilichaamvorming (tot het 5e buisje).

- d. Totale lichaamsbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (RÖTOT-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig. 3

De gevolgen van de röntgenbestraling komen hier ook zeer duidelijk in de titercurve tot uiting: een latente periode van 9 dagen en daarna een langzaam doorstijgende curve.

### *Nabeschouwing*

De antilichaamproductie na intraveneuze antigeentoediening bij de onbestraalde zowel als bij de bestraalde dieren is in overeenstemming met het door Keuning c.s. (1963) beschrevene.

De langzame stijging van de titercurve bij subcutane antigeeninjectie is mogelijk ontstaan, doordat over een vrij lange periode (enkele dagen) nog steeds nieuwe immunocompetente cellen worden geïnduceerd. Door Van Buchem (1962) werd overigens met hetzelfde antigeen wel een snelle stijging van de serumtiter waargenomen. Bij totale lichaamsbestraling en subcutane antigeentoediening lijkt slechts een beperkt aantal immunocompetente cellen met een aanzienlijke vertraging aan het proces deel te nemen.

### *2. Antilichaamvorming bij de locale bestraling van de popliteale lymfeklier met bijbehorende experimenten*

- a. Locale lymfeklierbestraling, na 24 of 48 uur gevolgd door subcutane antigeentoediening (LYKLLOC-24 u-AG<sup>sc</sup> en LYKLLOC-48 u-AG<sup>sc</sup>); respectievelijk fig. 4 en 5

De lymfeklier waar het antigeen aankomt, is 24 of 48 uur voor



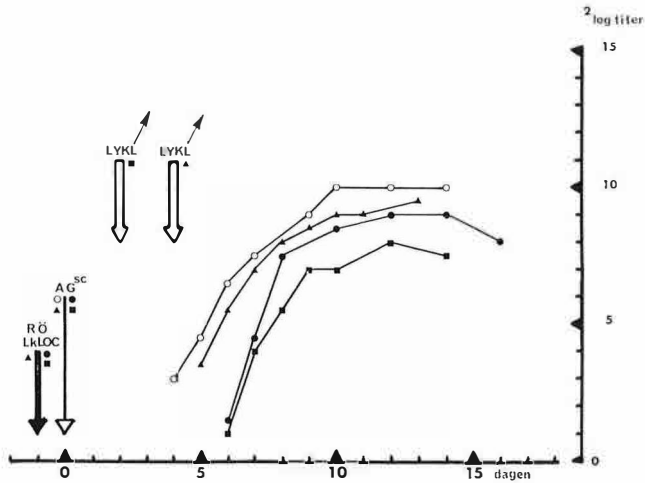


Fig. 4.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ●—● Locale lymfeklierbestraling, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeentoediening (LYKLLOC-24 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 4 dieren. b. ■—■ Locale lymfeklierbestraling, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeentoediening en na nog eens 48 uur lymfadenectomie (LYKLLOC-24 u-AG<sup>sc</sup>-48 u-lymfadenectomie); gem. van 3 dieren. c. ▲—▲ Als b, maar lymfadenectomie na 96 uur (LYKLLOC-24 u-AG<sup>sc</sup>-96 u-lymfadenectomie); gem. van 2 dieren. d. ○—○ AG<sup>sc</sup>-controle.

de antigeentoediening door de röntgenstralen beschadigd en vervolgens vanuit de bloedbaan weer volgestroomd met kleine lymfocyten. Met uitzondering van een gering verschil in de latente periode - 5 dagen bij een interval van 48 uur, 6 dagen indien slechts één etmaal verloopt tussen lokale bestraling en antigeeninjectie - zijn beide titercurven vrijwel identiek. Zij vertonen ook aanzienlijke overeenkomsten met het verloop van de antilichaamvorming in de AG<sup>sc</sup>-controledieren, al is in dit laatste geval de latente periode korter (4 dagen) en de uiteindelijk bereikte piektiter iets hoger. Op het eerste gezicht lijkt het dat de antilichaamproductie in de lokaal bestraalde en daarna gerepleteerde lymfeklier niet sterk afwijkt van de antilichaamvorming in een normale popliteale lymfeklier, althans indien men zou mogen aannemen dat ook na lokale bestraling de antilichaamvorming vrijwel geheel beperkt blijft tot het eerste lymfeklierstation. Om hierover zekerheid te verkrijgen is het hier volgende controle-experiment uitgevoerd.

- b. Locale lymfheklierbestraling, 24 uur later subcutane antigeeninjectie, na resp. 48 of 96 uur gevolgd door lymphadenectomie (LYKLLOC-24 u-AG<sup>sc</sup>-48/96u-lymphadenectomie); fig. 4

Verwijdering van het orgaan waarin de antilichaamproductie plaats vindt, zal leiden tot onderbreking, respectievelijk achterwege blijven van de titerstijging in het serum. Indien de lokaal bestraalde en met antigeen gestimuleerde lymfheklier echter na 48 uur weggenomen wordt, heeft dit slechts een betrekkelijk geringe vermindering van de te meten hoeveelheden antilichaam ten gevolge. Bij een lymphadenectomie 96 uur na de subcutane antigeeninjectie is de antilichaamproductie zeker niet verminderd; er is zelfs een kortere latente periode en een iets hogere piektiter dan bij LYKLLOC-24 u-AG<sup>sc</sup>. Dit positieve effect van de lymphadenectomie is niet goed te verklaren; het betreft echter slechts waarnemingen bij twee dieren. Deze experimenten wijzen er dus op, dat een antigeeninjectie in het drainagegebied van een bestraalde popliteale lymfheklier tot een antilichaamproductie leidt, welke voor een zeer aanzienlijk gedeelte buiten dit orgaan tot stand kan komen. Om het werkelijke immunologische effect van de lokale bestraling op de lymfheklier te kunnen beoordelen werd daarom de volgende proef, waarbij de overige lymfhoïede organen niet meer aan antilichaamproductie kunnen deelnemen, uitgevoerd.

- c. Locale bestraling van de lymfheklier, na 24 uur gevolgd door bestraling van de rest van het lichaam en na nog eens 24 uur subcutane antigeeninjectie (LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); fig. 5

Bij de bespreking van de histologie na röntgenbestraling bleek dat het effect van een lokale bestraling, op een geringe depletie na, niet sterk beïnvloed wordt door de irradiatie van de rest van het lymfhoïede systeem na 24 uur.

Een antilichaamproductie door de lymfhoïede organen buiten de bestraalde lymfheklier kan in principe een tiental dagen voorkomen worden door irradiatie van deze organen. Na de totale lichaamsbestraling met lymfheklierbescherming moet dan wel nog eens 24 uur gewacht worden met de antigeentoediening.

De antilichaamvorming in een op een dergelijke wijze functioneel

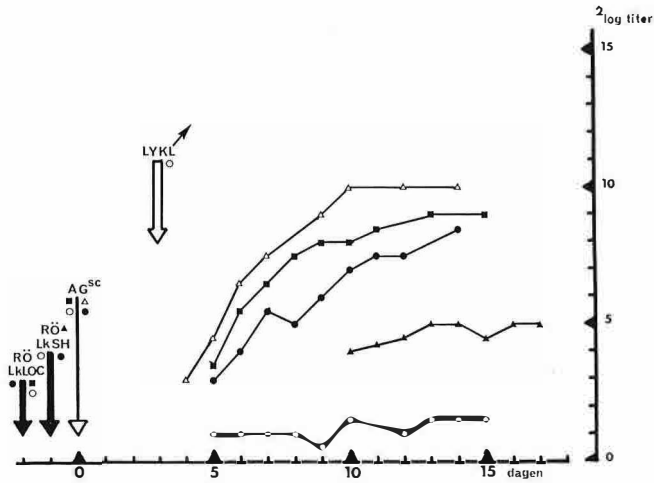


Fig. 5.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ■—■ Locale lymfeklierbestraling, na 48 uur gevolgd door antigeeninjectie (LYKLLOC-48 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 2 dieren. b. ●—● Locale lymfeklierbestraling, na 24 uur gevolgd door totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming en na nog eens 24 uur subcutane antigeeninjectie (LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 4 dieren. c. ○—○ Als b, maar drie dagen na de antigeentoeiding lymphadenectomie (LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>-72 u-lymphadenectomie); gem. van 3 dieren. d. ▲—▲ AG<sup>sc</sup>-controle. e. ▲—▲ RÖTOT-24 u-AG<sup>sc</sup>.

„geïsoleerde”, bestraalde lymfeklier blijkt nog wel mee te vallen: de toename van de hoeveelheid circulerend antilichaam blijkt tot stand te komen in een tweetal fasen waarvan de eerste op de 5e dag een aanvang neemt en de tweede na de 8e dag. De hoeveelheid circulerend antilichaam is wel steeds minder dan in het normale onbestraalde dier. Het „positieve” effect van de lymphocytenflux na locale irradiatie zal afgeleid kunnen worden uit het verschil tussen de hier verkregen titercurve en die bij het totaal bestraalde dier (RÖTOT-24 u-AG<sup>sc</sup>). Ook hier kan men zich natuurlijk weer afvragen of de waargenomen productie werkelijk in de bestraalde lymfeklier plaats vindt, hetgeen onderzocht is in de volgende proefopstelling.

d. Locale lymfeklierbestraling, 24 uur later totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door anti-geeninjectie en tenslotte 3 dagen nadien lymphadenectomie (LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>-72 u-lymphadenectomie); fig 5

Uit het feit dat bij deze proefopstelling slechts een minimale hoeveelheid antilichaam geproduceerd wordt - de titer bereikt niet eens het tweede buisje - kan afgeleid worden, dat de bij het vorige experiment (2°) waargenomen antilichaamproductie inderdaad in de bestraalde lymfeklier tot stand kwam.

e. Splenectomie, na respectievelijk 3 en 4 dagen gevolgd door locale bestraling van de lymfeklier en totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming en na nog eens 24 uur subcutane antigeeninjectie. (splenectomie-72 u-LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); fig. 6.

Vooruitlopend op de in het volgend hoofdstuk te bespreken experimenten kan opgemerkt worden, dat de milt een relatief grote

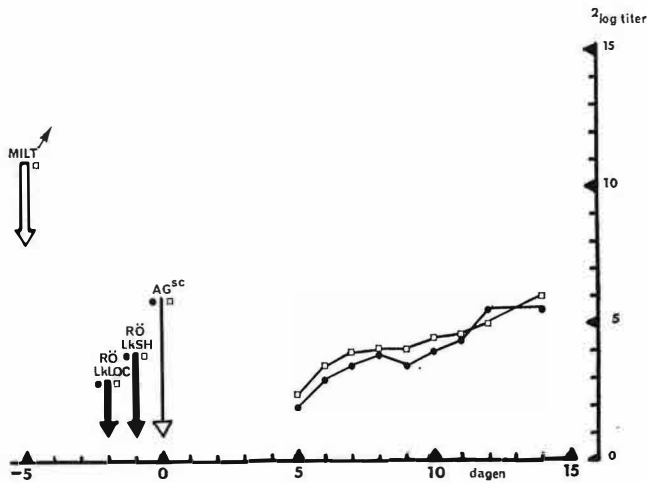


Fig. 6.

Verloop van de antilichaamtiter. a. □-□ Splenectomie, na 3 en 4 dagen gevolgd door respectievelijk locale lymfeklierbestraling en totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, weer 24 uur later subcutane antigeeninjectie (verminderde hoeveelheid) (splenectomie-72 u-LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 2 dieren. b. ●-● Als a, doch geen voorafgaande splenectomie (LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 2 dieren.

capaciteit tot antilichaamproductie heeft. Ter beantwoording van de vraag of de na locale bestraling in de lymfeklier binnentredende cellen, welke verantwoordelijk zijn voor een immunologisch herstel, afkomstig zijn uit de celpopulatie van de milt, werd dit orgaan voorafgaand aan de onder 2<sup>c</sup> beschreven en bij 2<sup>d</sup> betrouwbaar gebleken procedure verwijderd. Daar het eerder gebruikte vaccin niet meer aanwezig was op het tijdstip dat dit experiment uitgevoerd werd, is een op vergelijkbare wijze bereide bacteriesuspensie gebruikt, welke echter een geringer aantal bacteriën per ml bevat ( $10^9$  tegenover  $5 \times 10^9$  bij de vroegere experimenten). Om vergelijking mogelijk te maken werd dan ook het bijbehorende controle-experiment (LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>) met dit nieuwe antigeen herhaald. Beide experimenten geven eenzelfde resultaat, n.l. een eerste stijging na de 5e dag, gevolgd door een verder toenemen van de hoeveelheid circulerend antilichaam na de 9e dag. Het vooraf verwijderen van de milt heeft in het geheel geen invloed op het titerverloop. Dat de titercurven beide minder hoog stijgen dan die bij de vorige experimenten (2<sup>c</sup>) kan worden toegeschreven aan de veranderde samenstelling van het antigeen.

### *Nabeschouwing*

Een eerste en in zekere zin negatief resultaat van deze experimenten is dat de antilichaamproductie na het subcutaan toedienen van een antigeen in het drainagegebied van een bestraalde lymfeklier, zoals door ons en ook door Süssdorf en Draper (1956) waargenomen is, voor een aanzienlijk gedeelte niet plaats heeft in dit bestraalde orgaan, maar gezien het effect van een erop volgende lymphadenectomie elders in het lymfoïede apparaat. Er mag dus ook geen verband worden gelegd tussen de histologische veranderingen in het bestraalde orgaan en de zonder voorzorgsmaatregelen gemeten antilichaamtiter. Süssdorf en Draper hebben de histologische veranderingen in de lymfeklier overigens ook niet in hun beschouwingen betrokken.

Wanneer vervolgens gesteld wordt dat de lokaal bestraalde lymfeklier na uitschakeling van de overige lymfoïede organen toch tot een redelijke antilichaamvorming in staat blijkt te zijn, lijkt dit in tegenspraak met het hiervoor genoemde. Men moet zich daarbij realiseren dat de titercurven logaritmisch uitgezet zijn, zodat een

50 % geringere antilichaamvorming een titercurve geeft, die slechts één buisje lager is.

De antilichaamproductie na gecombineerde bestraling (locale bestraling na 24 uur gevolgd door totale bestraling met lymfeklierbescherming) mag alleen dan met de antigeencontrole vergeleken worden, indien er rekening mee gehouden wordt dat het beschermen van de lymfeklier bij een totale bestraling op zich zelf, dus zonder voorafgaande bestraling, ook al een vermindering van de antilichaamproductie ten gevolge heeft (zie experiment 3<sup>a</sup>). De daarbij optredende titercurve komt weliswaar overeen met die bij de gecombineerde bestraling, maar blijft er toch steeds onder. Hieruit kan afgeleid worden dat de locale bestraling en de daarop volgende repletie met lymfocyten uit de bloedbaan een bevordering van de antilichaamproductie veroorzaakt. Zoals reeds opgemerkt blijkt de immunologische betekenis van de aanvoer van deze cellen in nog grotere mate uit het feit, dat na een totale lichaamsbestraling (en subcutane antigeentoediening) pas op een veel later tijdstip een antilichaamvorming waargenomen wordt en dan nog in geringere mate. Dat het herstel van het vermogen tot antilichaamvorming niet afhankelijk is van de aanwezigheid van de milt, werd nog eens vastgesteld door experimenten waarbij splenectomie verricht werd. Op de mogelijk bestaande correlatie tussen enerzijds de antilichaamproductie in de lymfeklier, en anderzijds de histologische gevolgen van de bestralingen, d.w.z. de aanvoer van lymfocyten en de transformatie van deze cellen tot o.a. de follikelrandcellen zal in Hoofdstuk VI uitvoerig teruggekomen worden.

3. *Antilichaamvorming bij totale lichaamsbestraling onder bescherming van de popliteale lymfeklier met bijbehorende experimenten*

- a. Totale lichaamsbestraling met bescherming van de lymfeklier, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeeninjectie (LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); fig. 7

De titercurve is bij deze proefopstelling gekenmerkt door een in twee fasen verlopende stijging: na een normale latente periode werd een slechts zeer matige antilichaamtiter bereikt, rond de 8e dag begint de titer echter opnieuw te stijgen.



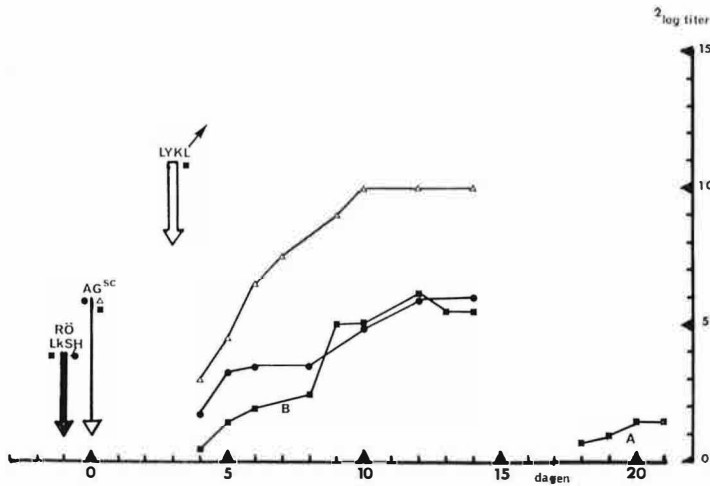


Fig. 7.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ●—● Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeeninjectie (LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 6 dieren. b. ■—■ Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 en 96 uur gevolgd door respectievelijk antigeen-toediening en lymphadenectomie (LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>-72 u-lymphadenectomie). Twee curves: A: Gemiddelde van 4 dieren. B: Gemiddelde van 2 dieren. c. △—△ AG<sup>sc</sup>-controle.

Rekening houdend met het feit, dat door Nieuwenhuis c.s. met hetzelfde antigeen vastgesteld werd, dat bij onbestraalde dieren de antilichaamvorming na subcutane antigeeninjectie praktisch geheel in het eerste lymfeklierstation plaats vindt, kan uit de vergelijking van de hier verkregen curve met die bij onbestraalde dieren afgeleid worden, dat er in de lymfeklier ondanks het ontbreken van een duidelijke depletie toch een reductie van het vermogen antilichaam te vormen opgetreden is in de eerste 24 uur na de bestraling.

- b. Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeeninjectie, 3 dagen nadien lymphadenectomie (LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>-72 u-lymphadenectomie); fig. 7

Daar de antilichaamvorming als gevolg van de sublethale bestraling in alle lymfoïede organen buiten de popliteale lymfeklieren

ernstig beschadigd moet zijn, kan het onder 3a waargenomene met vrij grote zekerheid toegeschreven worden aan de cellen, welke in de beschermde lymfeklier gevrijwaard zijn voor deze bestraling. Het is echter voorstelbaar dat de waargenomen antilichaamproductie niet in het gespaarde orgaan zelf, doch elders plaats vindt, mogelijk gemaakt door uit deze lymfeklier afkomstige cellen.

Door verwijdering van de beschermde lymfeklier drie dagen na de antigeentoediening gelukte het bij 4 van de 6 proefdieren praktisch de gehele antilichaamvorming te voorkomen; pas na 18 dagen werd een uiterst geringe antilichaamtiter gemeten. Bij de andere 2 dieren was de primaire stijging van de titercurve wel aanwezig, maar deze bleef ten achter bij die van dieren, welke geen lymphenectomie ondergingen. De tweede fase begon bij deze dieren ook omstreeks de 8e dag en was volkomen gelijk aan die bij de controledieren (LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>).

- c. Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na respectievelijk 48 en 72 uur gevolgd door subcutane antigeeninjectie (LYKLSH-48 u-AG<sup>sc</sup> en LYKLSH-72 u-AG<sup>sc</sup>); fig. 8

Gezien de aanzienlijke reductie van de antilichaamproductie in

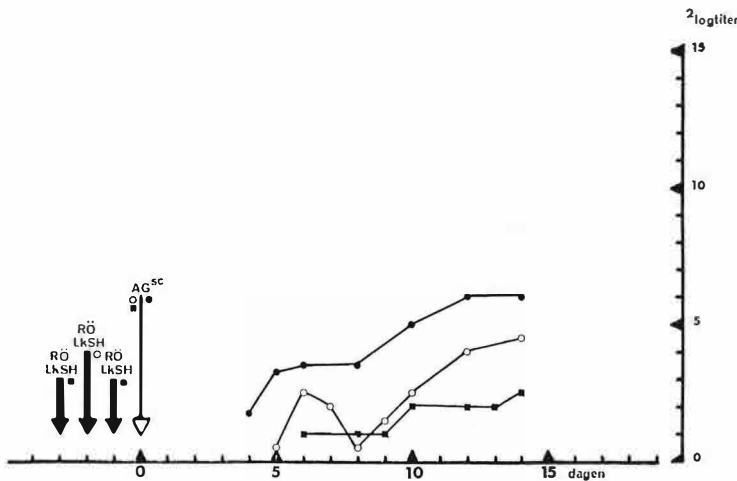


Fig. 8.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ○—○ Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 48 uur gevolgd door subcutane antigeentoediening (LYKLSH-48 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 2 dieren. b. ■—■ Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 72 uur gevolgd door subcutane antigeentoediening (LYKLSH-72 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 2 dieren. c. ●—● LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>.

de lymfeklier gedurende de eerste 24 uur na een totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming (vgl. 1<sup>a</sup> en 3<sup>a</sup>), dus in afwezigheid van een influx van lymphocyttaire cellen van elders, kan men zich afvragen of de immunologische capaciteit van het orgaan nog verder terugloopt.

Bij een interval van 48 uur tussen bestraling en antigeeninjectie blijkt zowel de primaire als de secundaire stijging aanwezig, doch gereduceerd ten opzichte van het waargenomen bij LYKLSH-24 u-AG<sup>sc</sup>. Een en ander geldt in nog sterkere mate voor de curve, verkregen door antigeeninjectie 72 uur na de bestraling.

d. Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie (LYKLSH-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig. 9

Door Schultze (1925) werd aangenomen dat de lymfeklier ook zou kunnen reageren op antigenen welke direct vanuit de bloed-

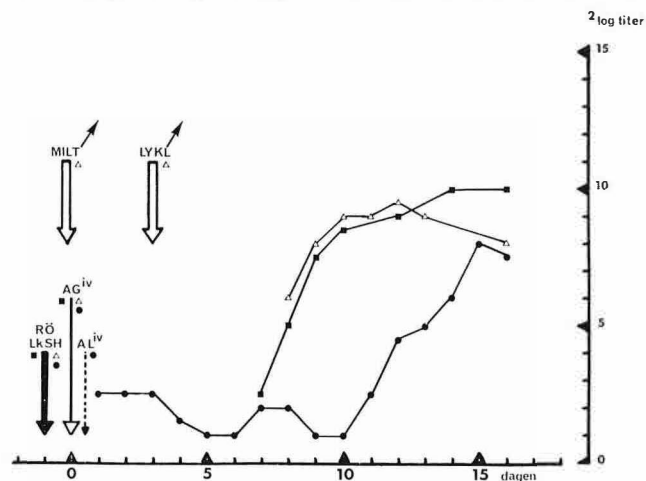


Fig. 9.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ■—■ Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoeiening (LYKLSH-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 4 dieren. b. △—△ Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door splenectomie en onmiddellijk daarna intraveneuze antigeeninjectie en tenslotte na nog eens 3 dagen lymphadenectomie (LYKLSH-24 u-splenectomie-AG<sup>iv</sup>-72 u-lymphadenectomie); gem. van 2 dieren. c. ●—● Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie en weer 12 uur later toediening (intraveneus) van specifiek antiserum (LYKLSH-24 u-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren.

baan via de „stomata” in de wand van de schorsvenulen in het orgaan zouden binnendringen. De beschermde lymfheklier, die na 24 uur nog op via de ductus afferentes aangevoerd antigeen kan reageren (zie 3<sup>a</sup>), zou dan ook vrij snel op intraveneus toegediend antigeen tot antilichaamvorming moeten kunnen komen. Indien het antigeen in de periferie uit de bloedbaan zou treden en zo indirect in de lymfheklier terecht zou komen, zou een vertraging en eventueel tengevolge daarvan een vermindering (vgl. 3<sup>c</sup>) van de antilichaamproductie verwacht mogen worden. Het titerverloop verschilt echter aanzienlijk van het waargenomen bij subcutane antigeeninjectie 1, 2 of 3 dagen na de bestraling. Pas op de 7e dag begint een antilichaamvorming, welke wat betreft de primaire stijging en piektiter vergelijkbaar is met die bij onbestraalde proefdieren. Er werden nog een tweetal experimenten uitgevoerd om na te gaan op welke plaats deze antilichaamproductie tot stand kwam.

- e. Totale lichaamsbestraling met lymfheklierbescherming, na 24 uur gevolgd door splenectomie en onmiddellijk daarna intraveneuze antigeeninjectie, en na nog eens drie dagen lymphadenectomie (LYKLSH-24 u-splenectomie-AG<sup>iv</sup>-72 u-lymphadenectomie); fig. 9

Een drietal organen of orgaangroepen lijkt in aanmerking te komen voor de onder 3<sup>d</sup> waargenomen antilichaamproductie: het beschermde orgaan zelf - waarbij de vertraging dan verklaard zou moeten worden door een moeilijke passage van de vaatwand in de lymfheklier of door de te volgen omweg via het perifere drainagegebied - de milt of de overige lymfoïede organen, waarheen de in de lymfheklier beschermde cellen zich begeven zouden kunnen hebben om daar na enige tijd op antigeen te kunnen reageren.

Indien echter zowel de milt - direkt voorafgaand aan de antigeen-toediening, als de lymfheklier - 3 dagen nadien - verwijderd zijn, wordt een titerverloop waargenomen, dat vrijwel geheel overeenkomt met het onder 3<sup>d</sup> beschrevene: de latente periode is weliswaar een dag langer maar de curven lopen verder vrijwel parallel. Men kan dus aannemen dat de hier waargenomen antilichaamvorming niet in de betrokken gespaarde lymfheklier tot stand komt en dat ook de aanwezigheid van de milt hiervoor geen noodzaak is.

- f. Totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming, na 24 uur gevolgd door een intraveneuze antigeeninjectie en weer 12 uur later intraveneuze toediening van een specifiek antiserum (LYKLSH-24 u-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); fig. 9

In het volgend hoofdstuk betreffende de miltexperimenten zal de door Nieuwenhuis c.s. (1967) aangegeven methode om de antilichaamproductie tot de milt te beperken door middel van specifiek antilichaam nader besproken worden. Van deze methode wordt nu reeds gebruik gemaakt om vast te stellen of de antilichaamvorming bij totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming in de milt plaats heeft indien dit orgaan aanwezig is. Door de antilichaamtoediening wordt het antigeencontact mogelijk in tijd beperkt, de immunologisch competente cellen zouden in totaal gedurende 36 uur de gelegenheid gehad hebben om van de lymfeklier naar de milt te gaan, waarbij een antigeencontact in de laatste 12 uur tot stand gekomen kan zijn.

In deze proefopstelling wordt wel een stijging van de hoeveelheid circulerend antilichaam waargenomen rond de 7e en 8e dag, deze blijft echter beperkt. Een op dit ogenblik onverklaarbare 2e stijging treedt ongeveer 3 dagen later op.

#### *Nabeschuwing*

Hoewel in de bij totale lichaamsbestraling beschermde lymfeklier geen duidelijk waarneembare depletie optreedt, is bij deze experimenten wel een zeer aanzienlijke teruggang van het vermogen antilichaam te vormen gedurende de eerste 24 uur na de bestraling, welke zich ook nog verder voortzet, gevonden. Bij de meeste dieren gelukte het door lymphadenectomie vast te stellen, dat de antilichaamproductie bij totale bestraling met lymfeklierbescherming na subcutane antigeentoediening inderdaad in de lymfeklier plaats vindt; het is niet onmogelijk, dat de ondanks de lymphadenectomie bij de andere dieren optredende antilichaamvorming voortkomt uit manipulaties bij de lymphadenectomie, waardoor antilichaamproducerende cellen uit het orgaan gedrukt zijn en elders hun productie voortgezet hebben.

De door ons zowel bij subcutane als intraveneuze antigeentoediening verkregen titercurven vertonen grote overeenkomst met het-

geen door Süssdorf en Draper waargenomen werd. De histologische achtergrond werd door hen niet nagegaan, zij stelden slechts de hypothese, dat òf de door de lymfeklierbescherming gespaarde competente, mobiele cellen òf een niet-cellulaire factor ten grondslag ligt aan een antilichaamproductie op daarvoor bestemde plaatsen.

Indien de bij lymfeklierbescherming (24 uur-antigeen<sup>sc</sup>) verkregen curve vergeleken wordt met die, waarbij een locale lymfeklierbestraling voorafgegaan is, dan valt op dat in het laatste geval „ondanks” deze bestraling d.w.z. waarschijnlijk „dankzij” de influx van cellen na de bestraling een relatief betere antilichaamvorming bereikt wordt.

Komt dus enerzijds uit alle experimenten waarbij een locale bestraling toegepast werd, naar voren dat de hierbij optredende influx van cellen een toename van het vermogen antilichaam te vormen met zich meebrengt, anderzijds leidt het ontbreken van een influx, zoals bij lymfeklier-shielding tot reductie van de immunologische capaciteit van de lymfeklier.

De experimenten waarbij na totale lichaamsbestraling met lymfeklierbescherming het antigeen intraveneus toegediend werd, laten zien dat de perifere lymfeklier in tegenstelling tot het door Schulze (1925) vermoede, niet direkt op het door de bloedbaan passerend antigeen kan reageren, verder dat de milt nauwelijks verantwoordelijk is voor de zeer redelijke, zij het laat optredende antilichaamproductie. De localisatie van dit proces, kennelijk elders in het lymphoïede systeem, is met de hier gebruikte technieken niet te benaderen.

Mogelijk is bij deze proeven een bevordering van het herstel van het lymphoïede systeem verkregen, hetzij door een outflow van gespaarde cellen uit de beschermde lymfeklier, hetzij door cellen uit het eveneens beschermde beenmerg van de achterpoten.



## Hoofdstuk IV

### DE MILT

#### A. Bouw, functie en gevolgen van röntgenbestralingen

##### *Histologie van de milt*

Ook de milt is een orgaan met o.a. een filtratiefunctie en een taak in immunologische reacties, maar anders dan de lymfeklier opgenomen in de bloedbaan. In het miltweefsel onderscheidt men de witte pulpa, het lymfoïede weefsel van de milt, en de rode pulpa, bestaande uit een complex van bloedsinussen. De witte pulpa volgt de vertakkingen van de art. lienalis, welke de milt binnengedren zijn aan de langgerekte hilus van het orgaan, daarna een eindweegs gelegen zijn in de bindweefseltrabekels en tenslotte slechts door lymfoïed weefsel omgeven zijn. Dit lymfoïede weefsel is samengesteld uit de voornamelijk uit kleine lymfocyten bestaande periarteriolaire lymfocytenscheden (p.a.l.s.) en langs het verloop hiervan de follikels of lichaampjes van Malpighi. De p.a.l.s. bestaat uit een grondpatroon van reticulumcellen, dat zich naar de rode pulpa voortzet in de scheidingswanden tussen de sinusoiden, en in de mazen van dit cellenreticulum een grote massa voornamelijk kleine lymfocyten. In deze p.a.l.s. is na een antigene stimulering de specifiek cellulaire reactie en de plasmacellulaire reactie gelocaliseerd. De in de p.a.l.s. aanwezige lymfocyten zouden volgens Langevoort (1963) te onderscheiden zijn van de lymfocyten in de hierna nog te bespreken follikels door een grotere kern en een lichtere kernstructuur. Rondom de lymfocytenschede is vooral in de nabijheid van de follikels veelal een aantal van de hierna nog te bespreken follikelrandcellen gelegen. De diameter van de p.a.l.s. neemt met het kaliber van het bloedvat geleidelijk af. De centraal gelegen arteriole vertoont een normale endotheel- en spierwand. Snook (1946) meende dat zich rond deze arteriolen nog een lymphevat bevindt; in

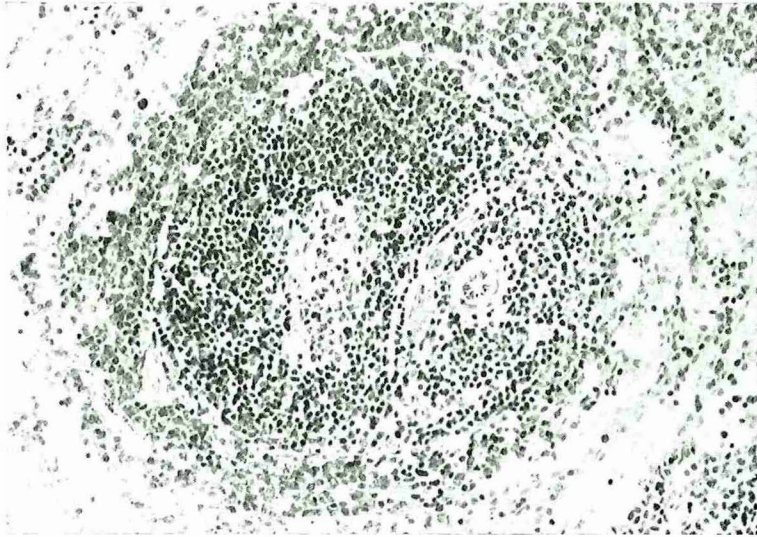


Foto 12.

Milt. Periarteriolaire lymphocytenschede met follikel. Vergr.: 220 x.

een electronenmicroscopisch onderzoek (Weiss, 1964) werden deze lymphebanen echter niet waargenomen.

In het verloop van de periarteriolaire lymphocytenscheden, met een zekere voorkeur voor de vertakkingsplaatsen, liggen de bolvormige follikels. De begrenzing tussen p.a.l.s. en follikel, beide grotendeels uit lymphocyten bestaand, is in het algemeen duidelijk. De opbouw van de miltfollikels is dezelfde als die van de follikels in de lymfeklier: een licht gekleurd centrum bestaande uit reticulumcellen, enkele zogenaamde "medium-sized" lymphocyten, weinig kleine lymphocyten en slechts na een antigene prikkel de typische follikelcentrumreactie (blastcellen, mitosen, „tingibele Körper”), omgeven door een brede krans van voornamelijk kleine lymphocyten met een donkere kern (Langevoort, 1963). De lymphocytenkrans (corona) is meestal onderbroken aan de naar de p.a.l.s. toegekeerde zijde.

In de peripherie van de follikels bevinden zich de follikelrandcellen, cellen welke zich ook hier van de lymphocyten onderscheiden door een smalle rand licht-basophil cytoplasma en een vrij bleke wat grotere kern. Deze „Knötchenrandzone” (Weidenreich,

1901) is als het ware in tweeën gesplitst door een krans van capillairen, welke om de follikel gelegen is: er binnen ligt een meestal beperkt aantal follikelrandcellen vermengd met de buitenste lymfocyten van de corona, en erbuiten een brede t.o.v. de omgevende rode pulpa onscherp begrensde zgn. "marginal zone", vrijwel geheel bestaande uit follikelrandcellen. Dit follikelrandcellensysteem kan tot hyperplasie gebracht worden door uiteenlopende prikkels: frequent herhaalde antigeeninjecties, endotoxine, cytostatica en met enige vertraging door röntgenbestraling (Scholten c.s., 1965). Het is in deze celformaties, dat Fitch (1953) en meer gepreciseerd Nossal en medewerkers (1966) de specifieke "antigen trapping" opgemerkt hebben.

De rode pulpa bestaat uit onregelmatige en onderling samenhangende sinusoiden gevuld met bloed, en de scheidingswanden tussen deze sinusoiden - de strengen van Billroth - die uit reticulair bindweefsel bestaan. Het bloed van de sinusoiden wordt direct afgevoerd door de takken van de vena lienalis. De rode pulpa is het feitelijke filtratieapparaat van de milt: zowel de reticulumcellen van de strengen van Billroth als de wandcellen van de sinusoiden zijn tot fagocytose in staat. De bloedstroomvertraging bevordert de filterwerking. Zowel in deze „sinussen" als in de strengen worden cellen van het bloed aangetroffen alsmede uit de witte pulpa afkomstige elementen: vooral lymfocyten en ook rijpe plasmacellen. Het met de arteriolen aangevoerde arteriele bloed komt via capillairen (penseel-, „arterien", huls-, „arterien"), afhankelijk van de diersoort, of terecht tussen de reticulumcellen van de Billrothse strengen (open circulatie), dan wel direct in de sinusoiden (gesloten circulatie).

#### *Recirculatie in de milt*

Recirculatie in de door Gowans bedoelde zin betekent voor de milt: opname van lymfocyten uit het arteriele bloed door het lymfhoïede weefsel van de witte pulpa, na enige tijd gevolgd door een afgifte van deze cellen naar het via de rode pulpa afgevoerde bloed. Passage van lymfocyten, zoals waargenomen in de schorsvenulen van de lymfieklieren, lijkt hier praktisch niet aanwezig. Vanuit de arteriolen gaan echter capillairen naar de omgevende schede (Weiss, 1964); een emigratie uit de bloedbaan op deze plaats lijkt

mogelijk, maar is niet duidelijk in het microscopisch beeld. Gowans en Knight (1964) zagen echter wel de in vitro gelabelde en daarna intraveneus ingespoten lymphocyten verschijnen in de p.a.l.s.. De door Langevoort (1963) waargenomen centrifugale verplaatsing van de plasmacellen in de p.a.l.s. zou een uiting kunnen zijn van de „doorstroming” van dit gebied. De lymphocyten en eventuele plasmacellen zullen tenslotte in de rode pulpa terecht komen en met het bloed afgevoerd worden.

Evenals bij de lymfhekklier werden door Gowans en Knight geen ingespoten gelabelde cellen teruggevonden in de follikels. Bij het hier te beschrijven onderzoek wordt echter wel een „emigratie” van bloedlymphocyten naar de follikels waargenomen.

### *Immunologische reacties*

Bij de bespreking van de lymfhekklier (hoofdstuk III, pag. 24) werden de drie immunologische reacties reeds uitvoerig behandeld; hier zal slechts aangegeven worden op welke punten de processen in de milt afwijken van hetgeen bij de lymfhekklier beschreven werd.

Specifiek cellulaire reacties zijn in de milt in twee experimentele situaties bestudeerd. Door Gowans (1962) is beschreven hoe tijdens een „graft-versus-host” reactie, opgewekt door intraveneuze injectie van niet-histocompatibele ductus thoracicus-lymphocyten, in de p.a.l.s. van de gastheer-milt grote pyroninophile cellen tot ontwikkeling kwamen. Deze cellen ontstonden uit de ductus thoracicus-lymphocyten en waren de uitgangscellen voor de specifieke „committed” kleine lymphocyten (Gowans c.s., 1962). Verder is door Strober en Gowans (1965) waargenomen dat lymphocyten, welke buiten het lichaam in contact kwamen met een lichaamsvreemde nier en teruggevoerd werden naar de bloedbaan, zich ook naar de p.a.l.s. begaven, waar met behulp van een labeling ook nog een ontwikkeling tot blastcellen gevolgd kon worden.

De antilichaamvorming treedt in de milt op na een intraveneuze antigeentoediening. De „antigen trapping” geschiedt ook hier in de zone met follikelrandcellen, eerst in de „marginal zone”, door nog onbegrepen oorzaak pas enkele uren later in het gebied waar zich aan de binnenzijde van de capillairen ook follikelrandcellen bevinden en tenslotte, ongeveer 24 uur na de antigeentoediening, in een



deel van het follikelcentrum. De ontwikkeling van de plasmablasten lijkt echter niet zoals in de lymfeklier in deze follikelrand te beginnen, maar juist in het centrale gedeelte van de p.a.l.s., zij het vooral nabij de follikel (Langevoort, 1963). Uit waarnemingen van Ford, Gowans en Mc Cullagh (1966) bleek dat een milt gefundeerd met antigeen en lymphocytenarm bloed en vervolgens ingebracht in een isologe gastheer geen antilichaam vormde. Antilichaamvorming werd wel gevonden, indien aan de perfusie-vloeistof grote aantallen ductus thoracicus-lymphocyten waren toegevoegd. Maar ook vanuit de milt zelf kwamen na enkele uren perfusie lymphocyten in de passerende vloeistof en op dat tijdstip resulteerde antigeentoediening wel in een antilichaamproductie. Dit zou erop kunnen wijzen, dat een regelmatige aanvoer van cellen via het arteriële bloed belangrijker is voor de antilichaamvorming dan hun aanwezigheid in de milt, en ook dat de milt meer immunologisch competente cellen „levert” dan de ductus thoracicus.

De ontwikkeling van de plasmacellen komt tot stand in de p.a.l.s.: er worden achtereenvolgens overgangscellen tussen lymphocyten en blastcellen (Langevoort, 1961), de “transitional cells” van Fagraeus (1948), plasmablasten en de rijpere cellen van de plasmacellulaire reeks gezien. Langevoort (1963) heeft er op gewezen dat de jongste celvormen bij de plasmacellulaire reactie dicht bij de centrale arteriole liggen en dat bij de celvermenigvuldiging en de differentiatie van deze cellen een verplaatsing naar de rode pulpa tot stand komt.

Door Nieuwenhuis c.s. (1967) werd vastgesteld, dat de antilichaamproductie na een intraveneuze antigeeninjectie vrijwel geheel tot de milt beperkt kan worden door enkele uren na de immunisatie specifiek antilichaam in te spuiten.

Dat weefselkweken van witte pulpa uitgeprepareerd na antigeentoediening, in tegenstelling tot die van rode pulpa vrijwel geen antilichaamproductie te zien gaven (Fagraeus, 1948), moet worden toegeschreven aan het feit, dat als „witte pulpa” alleen de follikels gekweekt werden en de periarteriolaire lymphocytenscheden achterbleven in de „rode pulpa”-fractie (Thorbecke en Keuning, 1956). Dat antilichaamvormende cellen met de immunofluorescentietechniek voornamelijk in de rode pulpa werden opgemerkt (Leduc, Coons en Conolly, 1955) berust op het feit, dat met de gevolgde techniek antilichaam vrijwel alleen aangetroffen wordt in rijpere plasmacellen

en dat deze cellen door emigratie in de rode pulpa terecht komen.

Voor de beschrijving van de follikelcentrumreactie zij verwezen naar Hoofdstuk III, omdat de verschijnselen in de follikelcentra van de milt en de lymfheklier geheel met elkaar overeenkomen.

Neonatale verwijdering van de thymus of Bursa van Fabricius (samen met röntgenbestraling) liet ook in de milt enkele hiervan afhankelijke structuren en functies uitkomen. Thymectomie veroorzaakte histologisch een onderontwikkeling van de periarteriolaire lymphocytenscheden, functioneel een preferent achterwege blijven van de specifiek cellulaire reactie (Good e.a., 1962; Miller, 1962). "Bursa-dependent" bleken te zijn de follikels met follikelcentra en ook de plasmacellen, welke merkwaardigerwijze juist in de thymusafhankelijke p.a.l.s. lijken te ontstaan. Bij afwezigheid van een Bursa (of daarmee te vergelijken organen) ontstond een onvermogen om antilichaam te vormen (Cooper, 1965 e.v.).

#### *Gevolgen van röntgenbestralingen*

Röntgenstralen veroorzaken natuurlijk in de veel lymphocyten bevattende milt een aanzienlijke beschadiging (Heineke, 1904; Murray, 1948; Langevoort e.a., 1961). Ook hier gaan de follikellymphocyten en de follikelrandcellen te gronde; in de periarteriolaire lymphocytenschede daarentegen lijkt slechts een beperkte lymphocytendood op te treden.

De immunologische gevolgen van een röntgenbestraling kwam reeds uitvoerig ter sprake in Hoofdstuk III. Ondanks de opvallende plaats van de follikelrandcellen in de milt en de stralengevoeligheid van deze cellen werd het mogelijke verband tussen de beschadiging van deze cellen en de vermindering van de antilichaamvorming aanvankelijk niet onderzocht.

Ook bij de milt waren de histologische gevolgen van een locale bestraling geheel anders dan die van een totale lichaamsbestraling, hetgeen tegen de achtergrond van de recirculatie achteraf ook wel verklaarbaar is. Pohle en Bunting (1936) volgden de histologische veranderingen na locale miltbestralingen bij diverse doses: bij bestralingen tot 500 R was het meest stralengevoelige gebied, de follikel, binnen 24 uur weer hersteld, bij doseringen van 1000 tot 5000 R was dit na ongeveer drie dagen het geval. Locale miltbestraling door



Süssdorf en Draper (1956, 1400 R) en Taliaferro en Taliaferro (1956, 500-10.000 R) waarbij één respectievelijk twee dagen na de bestraling het antigeen intraveneus toegediend werd, lieten echter na een niet-verlengde latente periode een normale tot zelfs verhoogde (bij hoge röntgendoseringen) antilichaamvorming zien; de vorm van de titercurve was hierbij steeds normaal.

Simic en medewerkers (1965) injecteerden het antigeen op diverse tijdstippen tussen 2 en 15 dagen na locale miltbestraling (10.000 R); zij zagen na een steeds met ongeveer 2 dagen verlengde latente periode een ook kwantitatief gereduceerde antilichaamvorming, het sterkst bij antigeeninjectie 6 dagen na de bestraling.

In al deze experimenten werd echter niet met behulp van histologische onderzoek of door splenectomie nagegaan waar de antilichaamvorming gelocaliseerd was. Bij ons onderzoek is een poging gedaan om vast te stellen in hoeverre antilichaamvorming in een bestraalde milt kan plaatsvinden. Hierbij werd 12 uur na de i.v. antigeeninjectie een kleine hoeveelheid hyperimmuunserum tegen het betreffende antigeen toegediend om de antilichaamvorming tot de milt te beperken en werd in controledieren een splenectomie verricht om de localisatie van de gevonden antilichaamvorming in de milt te verifiëren (Nieuwenhuis c.s., 1967).

Ook het effect van totale lichaamsbestraling met miltbescherming is door een aantal onderzoekers nagegaan. Jacobson c.s. (1950) beschermden de milt tijdens de bestraling met een loden koker en merkten op, dat dit leidde tot een lymfocytendepletie in de gespaarde milt en een versneld herstel van de andere lymfoïede organen. Volgens Süssdorf (1959) zou bij deze miltbescherming een kortdurende vermindering van de hoeveelheid witte pulpa (inclusief de follicelrandcellen) tot stand komen, waarna rond de vierde dag een herstel zou plaats vinden. Bij de totale lichaamsbestraling (500 R) met miltbescherming werd ook het resterende, aan de milt toe te schrijven vermogen tot antilichaamvorming getest (Taliaferro en Taliaferro, 1956; Süssdorf en Draper, 1956); daarbij werd een antilichaamproductie waargenomen, welke gekenmerkt was door een vrijwel normale latente periode en een langzaam stijgende titercurve. Door verwijdering van de beschermde milt 1 of 2 dagen na de antigeeninjectie konden Taliaferro en Taliaferro (1956) de anti-

lichaamsvorming slechts in vrij geringe mate reduceren, zodat het erop leek dat deze slechts ten dele in de milt tot stand kwam.

In ons onderzoek werden dezelfde bestralingstechnieken toegepast: totale lichaamsbestraling, al of niet met miltbescherming, en locale miltirradiatie. Ook hier was het de opzet de eventuele correlaties tussen de histologische veranderingen en het vermogen tot antilichaamsvorming onder verschillende omstandigheden na te gaan.

## B. Experimenten: Histologische veranderingen in de milt na röntgenbestralingen

Voor de gelocaliseerde bestraling van de milt werd geen loden schild onder dit orgaan aangebracht zoals door Taliaferro en Taliaferro (1956) beschreven is. Er werd de voorkeur gegeven aan een bevestiging van de milt aan de voorste buikwand - slechts een kleine ingreep in vergelijking met het inbrengen van de loden beschermingsplaat - waarna bestraald werd met behulp van een tubus. Een nadeel van deze methode is dat ook enkele andere organen in deze omgeving bestraald zullen worden, zoals bijvoorbeeld de mesenteriale lymfeklieren en enkele lymfoïede organen langs de tractus digestivus. Daar deze op veel grotere afstand liggen dan de aan de buikwand gefixeerde milt zal de bestralingsdosis in de andere organen in ieder geval geringer zijn dan in de milt. Bij de miltbescherming werd wel een operatieve methode verkozen, waarbij de milt zich tijdens de bestraling in een loden koker (variant van de koker van Taliaferro c.s., 1956) bevond. Daar bekend is (Süssdorf en Draper, 1956) dat b.v. appendixshielding een sterke (100 %) bescherming van de antilichaamsvorming met zich mee brengt, leek het bij de miltbescherming noodzakelijk de lymfoïede organen langs de tractus digestivus mee te bestralen, reden waarom hier niet volstaan werd met het aanbrengen van loden platen boven een aan de buikwand vastgehechte milt.

### 1. *Histologische gevolgen van een totale lichaamsbestraling (RÖTOT)*

Evenals bij de lymfeklier werd ook hier materiaal beoordeeld, dat verkregen was door een homogene bestraling van 500 R, met steekproeven door biopsieën bij dieren, welke een eenzijdige irradia-

tie van 850/380 R ondergingen. Het resultaat van beide bestralings-technieken was volkomen vergelijkbaar.

Het aantal lymphocyten in de p.a.l.s. lijkt slechts weinig beïnvloed te worden door de totale lichaamsbestraling; uitsluitend in de 5- en 12-uurs biopsieën is een kleine hoeveelheid kerndébris waar te nemen, na enkele uren gevolgd door een lichte depletie in in dit gebied. Eventueel aanwezige grote pyroninophile cellen en rijpe plasmacellen lijken de bestraling te doorstaan.

In tegenstelling tot de p.a.l.s. is er na de bestraling wel een aanzienlijke destructie van de follikels: reeds na 5 uur blijken de follikellymphocyten en ook de follikelrandcellen, zowel binnen als buiten de capillairenkrans, voor een aanzienlijk deel te gronde gegaan en zelfs al ten dele gefagocyteerd. In op het ogenblik van de bestraling kennelijk actieve follikelcentra blijven nog korte tijd blast-type cellen aanwezig. Na verdwijning van het celdébris (12-24 uur) en de resten van het follikelcentrum resteren van de follikels slechts conglomeraten van bleke reticulumcellen (foto 13). Het herstel van de follikels begint rond de achtste dag: in het verloop van

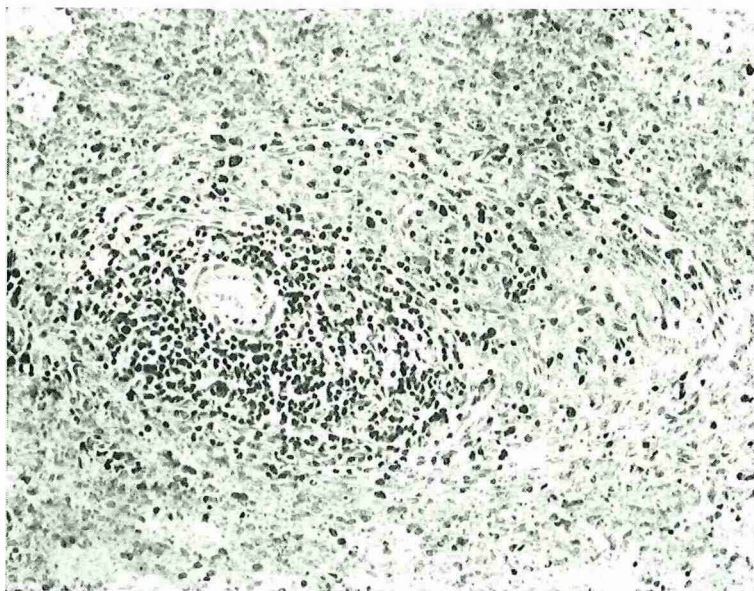


Foto 13.

Milt, 24 uur na totale lichaamsbestraling. Lege follikel en vrijwel normale periarteriolaire lymphocytenschede. Vergr.: 220 x.

de p.a.l.s. verschijnen dan weer haardjes van follikelrandcellen, welke later het gehele follikelbeeld gaan beheersen. Niet vastgesteld kon worden hoe de infiltraatjes van follikelrandcellen ontstaan zijn. Rond de 15e dag bestaat de follikel uit zeer talrijke follikelrandcellen met daartussen slechts enkele kleine lymphocyten.

In de rode pulpa zijn kort na de bestraling de kleine lymphocyten verdwenen, gespaard blijven evenwel de plasmacellen en de reticulumcellen; het herstel komt hier slechts zeer geleidelijk op gang.

### *Nabeschuwing*

De schade en het herstel in de milt na een totale lichaamsbestraling, zoals hier beschreven, komt in grote trekken overeen met het door Murray (1948) en Langevoort (1961) daarbij waargenomene. In verband met de hierna naar voren komende transformatiemogelijkheden van lymphocyten moet hier opgemerkt worden, dat wij evenals Keuning c.s. (1964) een herstel van de aanvankelijk beschadigde follikelrandcellen aan het begin van de tweede week zagen.

Leken in de lymfheklier de lymphocyten van de lymphocytenvelden aan de beschadiging door de bestraling te ontsnappen, hetzelfde geldt in de milt voor de lymphocyten van de p.a.l.s. De bij de lymfheklier hiervoor vermelde mogelijke oorzaken, een verschil in radiogevoeligheid door eigenschappen van de cel of veroorzaakt door de omgeving (zuurstofspanning), of overdekking van de schade door een snelle influx, zouden ook voor het „verschil” in stralengevoeligheid tussen p.a.l.s. en miltfollikel verantwoordelijk kunnen zijn. Evenals het herstel van de lymfheklier komt ook het miltherstel na een totale lichaamsbestraling op gang geruime tijd voordat de bloedlymphocyten hun normale peil weer bereikt hebben.

## *2. Histologische gevolgen van locale miltbestraling (MILTLOC)*

In tegenstelling tot de situatie bij een totale lichaamsbestraling kan bij een locale miltbestraling met de mogelijkheid van een na de beschadiging optredende repletie vanuit de “circulating pool of lymphocytes” rekening gehouden worden.

Biopsieën uit de bestraalde milt werden uitgevoerd 8, 12, 24 en 36 uur na de bestraling en vervolgens op de 2e, 3e, 5e en 12e dag.

In de eerste biopsieën treffen we in de p.a.l.s. naast de lymphocy-



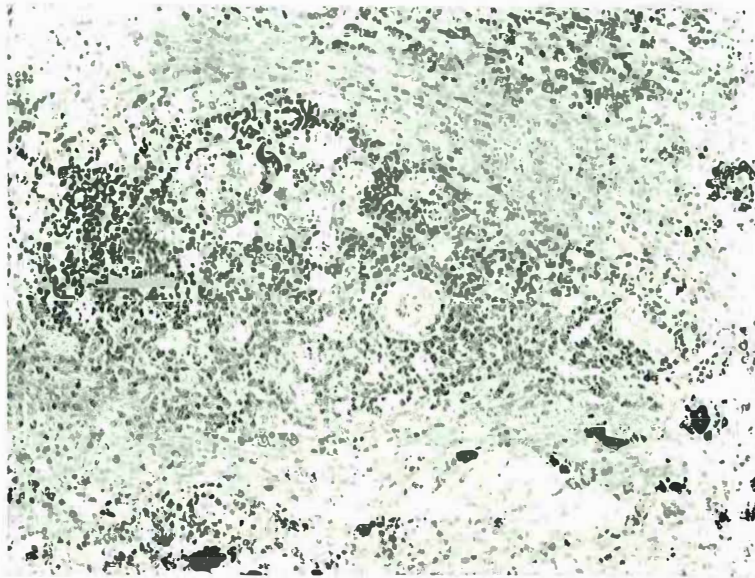


Foto 14.

Milt, 8 uur na locale bestraling. Follikeldestructie en beginnende repletie met lymphocyten. Vergr.: 220 x.



Foto 15.

Milt, 24 uur na locale bestraling. Maximale repletie van de follicels met kleine lymphocyten; follicelrandcellen nog afwezig. Vergr.: 170 x.

ten, welke slechts weinig in aantal verminderd lijken, enkele phagocyterende cellen met pycnotische kernresten aan; het beeld van de p.a.l.s. onderscheidt zich daarna niet duidelijk meer van het normale.

In tegenstelling tot de p.a.l.s. vertoont de follikel acht uur na de bestraling een aanzienlijk celverval in de lymphocytenkrans en daarbuiten. De te gronde gegane cellen zijn ten dele reeds gefagocyteerd; daarnaast zijn er echter ook reeds weer donkerkernige lymphocyten in het gebied van de lymphocytenkrans aanwezig (zie foto 14). Evenals in de lymfeklierfollikel neemt het aantal van deze lymphocyten in de volgende uren sterk toe; foto 15 laat zien, hoe na 24 uur de follikel uit dicht opeengelegen lymphocyten met daartussen enkele verspreide macrophagen bestaat. De toename van het aantal lymphocyten gaat ook hier niet gepaard met celdelingen in de follikel of elders in de milt, zodat een aanvoer van buitenaf met zekerheid mag worden aangenomen; de aanvoerroute kon echter niet worden vastgesteld, al valt het op dat de eerste toename van het aantal lymphocyten (8 uur na de bestraling) gevonden wordt in de peripherie van de follikel.

De follikelrandcellen waren evenals de kleine lymphocyten van de follikel kort na de bestraling geheel verdwenen; direct buiten de capillairenkrans werden nog slechts reticulumcellen gezien. Zoals hiervoor beschreven bevinden zich 24 uur na de locale bestraling binnen de capillairenkrans slechts kleine lymphocyten en enkele macrophagen; aan de buitenzijde van deze „overvulde” corona worden reeds na 36 uur weer follikelrandcellen waargenomen. Ook hier zijn weer cellen aanwezig, welke als intermediair tussen kleine lymphocyten en follikelrandcellen te beschouwen zijn. Het aantal follikelrandcellen neemt vervolgens toe, spoedig verschijnen ze ook weer buiten de capillairenkrans (zie foto 16). Tijdens het herstel van deze marginale zone zijn ter plaatse behalve de overgebleven reticulumcellen ook enkele kleine lymphocyten aanwezig.

Na het eerste etmaal neemt tijdens de ontwikkeling van follikelrandcellen het aantal lymphocyten in de follikel geleidelijk weer af, ook het centrum wordt minder celrijk. Op de vierde à vijfde dag heeft zich het beeld van de normale follikel hersteld.

Bij toediening van een antigeen na de locale bestraling blijkt niet alleen de gebruikelijke plasmacellulaire reactie in de p.a.l.s. weer op te kunnen treden, maar ook een normale follikelcentrumreactie,



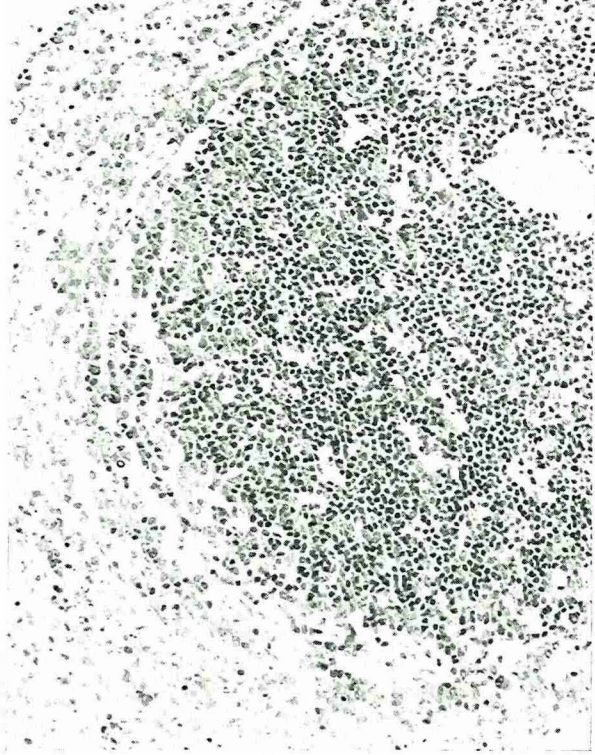


Foto 16.

Milt, 3 dagen na locale bestraling. Herstel van follikelrandcellen door transformatie van binnengekomen lymphocyten. Vergr.: 220 x.

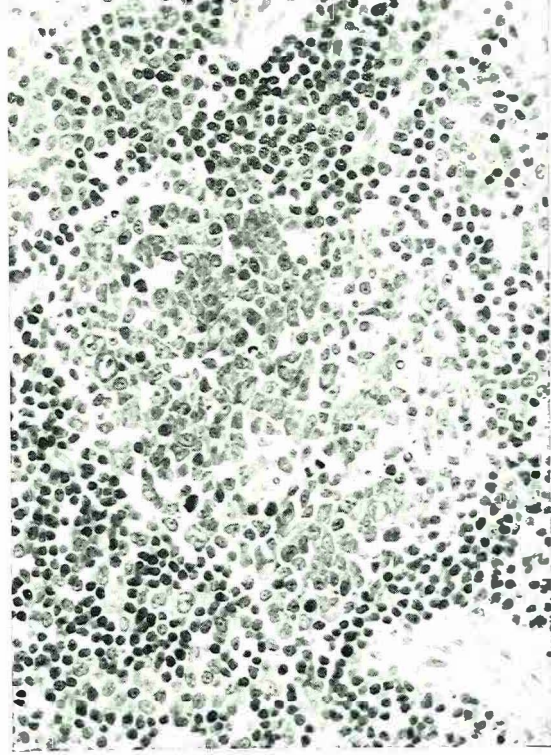


Foto 17.

Milt, 6 dagen na locale bestraling en 5 dagen na intraveneuze antigeentoediening. Follikelcentrumreactie. Vergr.: 220 x.

waarbij rond de vijfde dag blastcellen in het centrum tot ontwikkeling komen (foto 17). In de overige lymphoïede organen worden bij locale miltbestraling geen duidelijke veranderingen waargenomen.

### *Nabeschouwing*

De gevolgen van de locale miltbestraling zijn volkomen vergelijkbaar met het bij de lymfheklierexperimenten waargenomene: een beschadiging onmiddellijk gevolgd door repletie van de follikels, leidend tot „overvulling” met lymphocyten, terwijl de periarteriële lymphocytenscheden vrijwel stationnair blijven evenals de lymphocytenvelden in de lymfheklier. Dit snelle „herstel” van de follikel werd ook reeds opgemerkt door Pohle en Bunting (1936).

De afwezigheid van celdelingen in de follikels wijst erop dat de repletie door influx tot stand moet komen. Door Gowans en Knight (1964) werden intraveneus toegediende ductus thoracicus-lymphocyten, door labeling herkenbaar gemaakt, evenals in de lymfheklier ook in de milt niet in de follikels aangetroffen, terwijl in onze proeven na bestraling wel een aanvoer naar de follikels lijkt te bestaan. Dit zou erop kunnen wijzen dat onder normale omstandigheden slechts een geringe doorstroming van de follikel bestaat. Uit de <sup>3</sup>H-thymidine labelingsproeven van Fliedner c.s. (1964) (zie pag. 33) blijkt dat de kranslymphocyten niet in de follikelcentra ontstaan, zodat de veronderstelling gerechtvaardigd is, dat ook onder normale omstandigheden de lymphocyten van de follikelkrans uit de circulatie afkomstig zijn. De mogelijke oorzaak van het ontbreken van een lymphocytinflux in de follikels bij de experimenten van Gowans en Knight zal in Hoofdstuk VI ter sprake komen.

Het was om praktische redenen bij de milt onmogelijk met behulp van een gecombineerde bestraling, zoals bij de lymfheklier, de influx met zekerheid te bewijzen en vast te stellen of het vrijwel ontbreken van lymphocytendepletie in de p.a.l.s. voortkomt uit een relatieve röntgenresistentie, dan wel berust op een zeer snelle repletie of doorstroming van de p.a.l.s. met bloedlymphocyten. Gowans en Knight (1964) zagen in de onbestraalde milt wel een migratie van gelabelde lymphocyten door de p.a.l.s. Evenals in de lymfheklier treden ook in de miltfollikel weer spoedig, zelfs nog eerder waarneembaar dan in de lymfheklier, follikel-

randcellen op. Ook hier zijn eerst uitsluitend kleine lymphocyten, later follikelrandcellen en mogelijke overgangscellen tussen beide hiervoor genoemde soorten waargenomen, hetgeen in sterke mate een transformatie suggereert.

Dat het verschijnen van follikelrandcellen en het ook spoedig weer mogelijk zijn van een follikelcentrumreactie inderdaad afhankelijk zijn van lymphocyten-influx, blijkt ook nog eens bij een vergelijking met het herstel na een totale bestraling: de follikelrandcellen verschijnen daar pas na ongeveer 8 dagen, het vermogen een follikelcentrumreactie te geven komt nog later.

### 3. *Histologische gevolgen van een totale lichaamsbestraling met bescherming van de milt (MILTSH)*

Behalve de milt werden hierbij alle organen aan de bestraling (850/380 R) blootgesteld. Na 24 uur zijn zeer opmerkelijke veranderingen waarneembaar: in de follikels komen nog maar weinig kleine lymphocyten voor, het gebied van de lymphocytenkrans wordt vrijwel geheel ingenomen door follikelrandcellen. Deze celsoort is ook buiten de capillairenkrans in de gebruikelijke vorm aanwezig. Slechts een gering aantal kleine lymphocyten komt nog in het centrum voor (foto 18).

In de latere biopsieën neemt het aantal lymphocyten in de follikels nog verder af; de hyperplasie van de follikelrandcellen blijft gehandhaafd gedurende de periode (8 dagen), waarin biopsieën verricht zijn. Incidenteel werden tussen de follikelrandcellen binnen de capillairenkrans holten aangetroffen, gevuld met een homogene substantie, welke enige verwantschap lijkt te vertonen met amyloid (Scholten c.s., 1964). Na antigeeninjectie is in de lymphocytenarme follikels van de beschermde milt wel een follikelcentrumreactie mogelijk: op de vijfde dag na de bestraling werden temidden van de follikelrandcellen conglomeraten van grote pyroninophile cellen gezien.

In de periarteriolaire lymphocytenschede treedt ook een lymphocytendepletie op, mogelijk door een emigratie van cellen; een outflow van lymphocyten is echter niet waargenomen. Na antigeen-toediening wordt in deze lege p.a.l.s. een bijzonder floride plasmacellulaire reactie gezien, zodat een transformatie tot plasmacellen



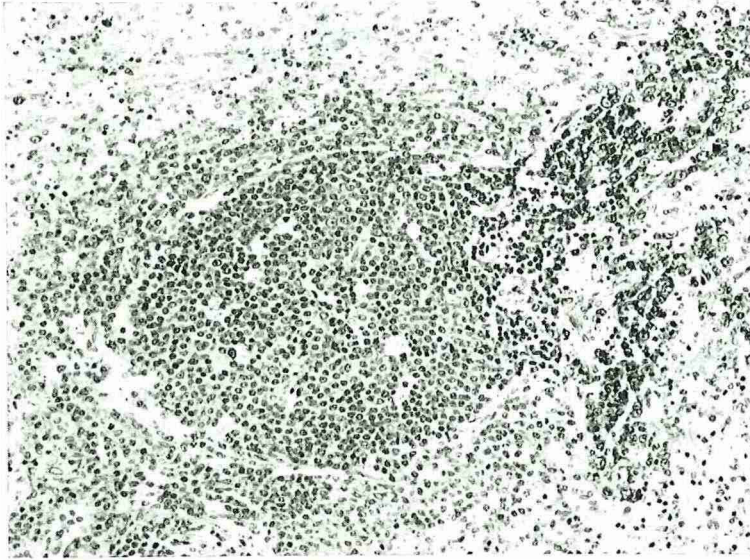


Foto 18.

Milt, 3 dagen na totale lichaamsbestraling met miltbescherming en 2 dagen na intraveneuze antigeentoeediening. Vrijwel geheel uit follicelrandcellen bestaande follicel; sterke plasmacellulaire reactie in lymphocytenarme periarteriulaire lymphocytenschede. Vergr.: 170 x.

ook aansprakelijk kan zijn voor de vermindering van het aantal lymphocyten. Tenslotte zouden mogelijk ook de follicelrandcellen in dit gebied voortgekomen kunnen zijn uit de lymphocyten van de p.a.l.s. De schade en het herstel van de overige lymphoïede organen onderscheidt zich niet duidelijk van hetgeen bij totale irradiatie gezien werd.

#### *Nabeschouwing*

De milt onderscheidt zich van de bij totale bestraling beschermde lymfieklier door een sterke vermindering van het aantal lymphocyten zowel in de follicels als in de p.a.l.s..

Deze lymphocytendepletie komt overeen met het door Jacobson c.s. (1950) waargenomene; de primaire vermindering van de hoeveelheid witte pulpa, door Süssdorf (1959) planimetrisch vastgesteld, lijkt in onze beelden niet te bestaan, in zoverre dat de plaats van de lymphocyten ingenomen lijkt te zijn door follicelrandcellen.

De afname van het aantal lymphocyten in de follikel tegelijk met een vermeerdering van het aantal follikelrandcellen suggereert ook nog eens een transformatie.

De lymphocytendepletie in de p.a.l.s. leidt er niet toe, dat na toediening van antigenen een minder goede ontwikkeling van plasmacellen tot stand komt. Bij de immunologische experimenten zal dan ook blijken dat de antilichaamproductie redelijk is.

In ons materiaal blijkt niet dat miltshielding een versneld herstel van de overige lymphoïede organen meebrengt, ook niet van de "outer cortex" der lympheklieren, waar Parrott, De Sousa en East (1966) ingespoten, gelabelde miltcellen teruggevonden hebben.

### C. Experimenten: Telling van het aantal bloedlymphocyten bij het miltonderzoek; fig. 10

De locale bestraling van de milt veroorzaakt wel een, zij het tijdelijke vermindering van het aantal circulerende lymphocyten: na een dieptepunt (74-72 %) 24 en 48 uur na de bestraling is er een vrij snel herstel. Splenectomie veroorzaakt vergelijkbare veranderingen van het aantal bloedlymphocyten.

Totale lichaamsbestraling met miltbescherming doet het bloed-

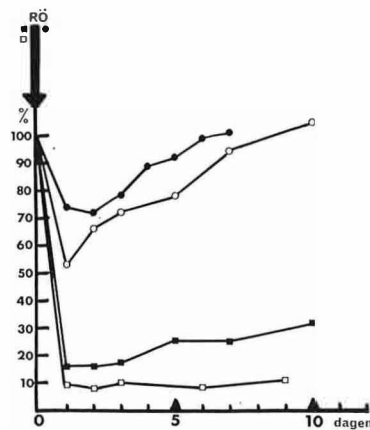


Fig. 10.

Verandering van het aantal bloedlymphocyten bij miltexperimenten; de gemiddelde uitgangswaarde per experimentele groep = 100 %. a. ●-● Locale miltbestraling. b. ○-○ Splenectomie. c. ■-■ Totale lichaamsbestraling met miltbescherming. d. □-□ Totale lichaamsbestraling.



lymphocytenpeil in 24 uur dalen tot gemiddeld 16 % van de uitgangswaarden (vergelijk 10 % bij lymfhekliershielding). Reeds spoedig is er weer een, zij het zeer langzame toename van het aantal lymphocyttaire cellen; bij totale bestraling wordt in deze periode nog geen herstel gezien.

Dat de miltbescherming niet eenzelfde „verhoging” van het aantal bloedlymphocyten veroorzaakt als waartoe de geïsoleerde milt bij een perfusie-experiment (Ford, Gowans, Mc Cullagh, 1966) in staat was, zal voortkomen uit het feit dat in het eerste geval niet alleen het totale bloedvolume groter zal zijn, maar in onze proeven zeker ook cellen de bloedbaan zullen verlaten in andere lymfoïede organen.

#### D. Experimenten: Antilichaamvorming op paratyphus B-vaccin na röntgenbestralingen

Ook hier werd gebruik gemaakt van de hiervoor toegepaste bestralingstechnieken; het antigeen werd steeds intraveneus toegediend. Om de antilichaamvorming geheel tot de milt te beperken werd de door Nieuwenhuis c.s. (1967) aangegeven methode (toediening van enig specifiek immuunserum na de antigeeninjectie) toegepast. De antigeeninjectie werd in alle gevallen 24 uur na de bestraling uitgevoerd in de eerste plaats, omdat de door de stralen getroffen organen op dat ogenblik een maximale vermindering van het vermogen tot antilichaamvorming vertonen, ten tweede, omdat na één etmaal zowel na miltbestraling als bij miltbescherming de histologische veranderingen het meest uitgesproken zijn.

##### 1. *Antilichaamvorming bij locale miltbestraling en bijbehorende experimenten*

##### a. *Locale miltbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig. 11*

Na deze locale miltbestraling lijkt nog een zeer redelijke antilichaamproductie mogelijk te zijn. Na een vertraging van twee dagen t.o.v. de AG<sup>iv</sup>-controle werd een snel stijgende titercurve waargenomen; de bij de controlegroepen gemeten piektiter wordt echter niet bereikt. Bij deze locale miltbestraling zijn de overige lymfoïede or-

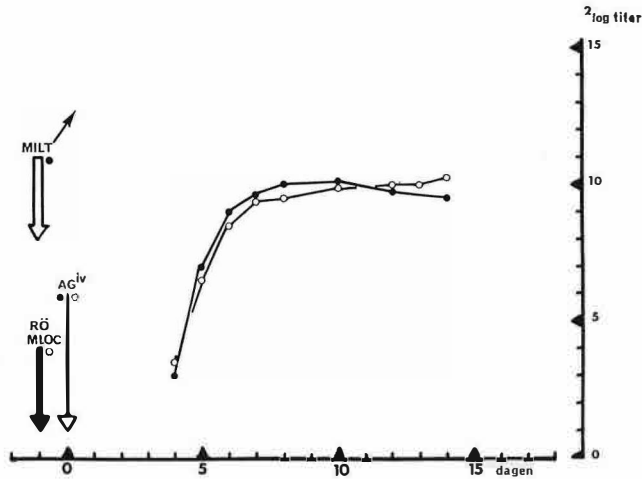


Fig. 11.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ○-○ Locale miltbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 6 dieren. b. ●-● Splenectomie, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (splenectomie-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren.

ganen in principe onbeschadigd; met behulp van splenectomie - eveneens 24 uur voor de antigeentoediening om een vergelijkbare situatie te verkrijgen - werd het vermogen tot antilichaamvorming elders in het lymfoïede systeem gecontroleerd.

b. Splenectomie, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (splenectomie-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig. 11.

De antilichaamproductie na splenectomie blijkt identiek te zijn met die na locale miltbestraling; ook hier een latente periode van 4 dagen, een vrij snelle stijging tot een - subnormale - piektiter en vervolgens een horizontaal verlopende titercurve.

Dit resultaat doet de vraag rijzen in hoeverre de onder 1a beschreven antilichaamproductie in de bestraalde milt plaatsvindt, dan wel daar buiten tot stand komt.

- c. Locale miltbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie en respectievelijk 48 of 96 uur daarna splenectomie (MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>-48 u-splenectomie) (MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>-96 u-splenectomie); fig 12

Verwijdering van de lokaal bestraalde milt bleek geen enkel effect te hebben: het titerverloop bij de dieren waar splenectomie verricht werd, was praktisch gelijk aan de in uitsluitend lokaal bestraalde dieren bereikte titercurve. Deze experimenten wijzen er wel op dat na lokale miltbestraling het antilichaam voor een aanzienlijk deel

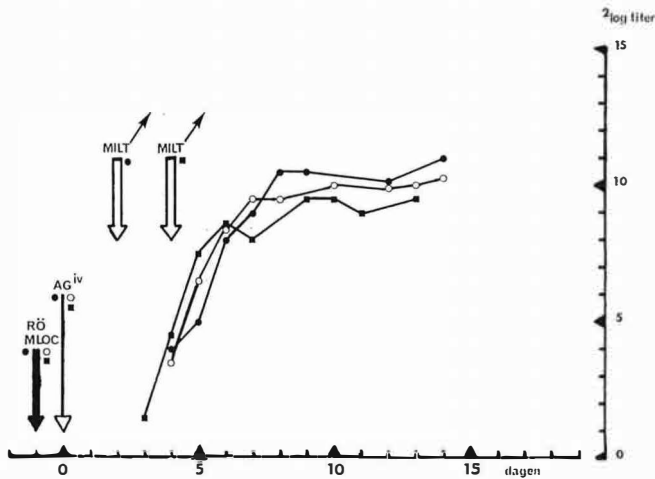


Fig. 12.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ●—● Locale miltbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening en na nog eens 48 uur splenectomie (MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>-48 u-splenectomie); gem. van 2 dieren. b. ■—■ Locale miltbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening en na nog eens 96 uur splenectomie (MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>-96 u-splenectomie); gem. van 2 dieren. c. ○—○ MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>.

buiten de milt gevormd wordt. Om de antilichaamproductie tot de milt te kunnen beperken, werd vervolgens dan ook gebruik gemaakt van de passieve immunisatie na de antigeentoediening (Nieuwenhuis, 1967).

- d. Intraveneuze antigeeninjectie, na 12 uur gevolgd door specifiek antiserum (AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); fig 13

De antilichaamvorming blijkt hier slechts weinig minder te zijn

dan die van het gehele lymfoïede systeem ( $AG^{iv}$ -controle); alleen de piektiter van  $AG^{iv}$ -12 u- $AL^{iv}$  blijft een weinig onder die van de controledieren.

- e. Locale miltbestraling, na 24 uur intraveneuze antigeeninjectie en weer 12 uur later toediening van specifiek antiserum ( $MILTLOC-24$  u- $AG^{iv}$ -12 u- $AL^{iv}$ ); fig. 13

In de lokaal bestraalde milt komt slechts een beperkte antilichaamvorming tot stand in vergelijking met de antilichaamproductie in de milt onder meer normale omstandigheden ( $AG^{iv}$ -12 u- $AL^{iv}$ ): de antilichaamtiter begint pas op de vierde dag duidelijk te stijgen, de

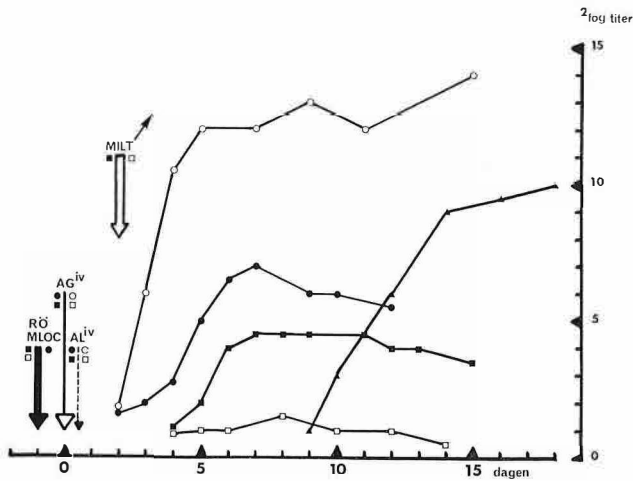


Fig. 13.

Verloop van de antilichaamtiter. a.  $\circ-\circ$  Intraveneuze antigeeninjectie, na 12 uur gevolgd door specifiek antiserum ( $AG^{iv}$ -12 u- $AL^{iv}$ ); gem. van 6 dieren. b.  $\bullet-\bullet$  Locale miltbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie en weer 12 uur later toediening van specifiek antiserum ( $MILTLOC-24$  u- $AG^{iv}$ -12 u- $AL^{iv}$ ); gem. van 4 dieren. c.  $\square-\square$  Locale miltbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie, 12 uur later toediening van specifiek antiserum en 36 uur hierna splenectomie ( $MILTLOC-24$  u- $AG^{iv}$ -12 u- $AL^{iv}$ -36 u-splenectomie); gem. van 7 dieren. d.  $\blacksquare-\blacksquare$  Als c, doch een gemiddelde van 2 dieren. e.  $\blacktriangle-\blacktriangle$   $RÖTOT-24$  u- $AG^{iv}$ .

vrij lage maximale titer wordt pas op de 7e dag bereikt en de titer daalt daarna weer snel.

Het is natuurlijk noodzakelijk met behulp van splenectomie-experimenten na te gaan of de hier beschreven antilichaamvorming inderdaad aan de bestraalde milt toegeschreven mag worden.

f. Locale miltbestraling, na 24 en 36 uur gevolgd door i.v. toediening van respectievelijk antigeen en specifiek antilichaam, en twee dagen na de antigeeninjectie splenectomie (MILTLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>-36 u-splenectomie); fig. 13

Bij 7 van de 9 proefdieren werd door splenectomie de antilichaamvorming praktisch geheel voorkomen. Slechts twee dieren lieten toch nog een, zij het verminderde antilichaamproductie zien. Redelijkerwijs mag dus aangenomen worden dat de onder 2e beschreven antilichaamvorming inderdaad in de milt heeft plaatsgevonden.

g. Locale miltbestraling, na respectievelijk 3, 5 of 10 dagen toediening van antigeen, na 12 uur gevolgd door specifiek antiserum (MILTLOC-3 dgn-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>; MILTLOC-5 dgn-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>; MILTLOC-10 dgn-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); fig. 14

Ondanks de histologische regeneratie, d.w.z. influx van lymfocyten, is 24 uur na de locale miltbestraling het vermogen tot anti-

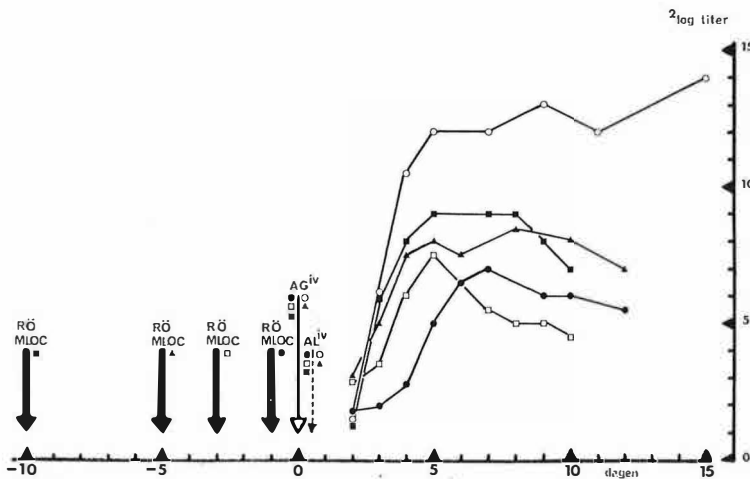


Fig. 14.

Verloop van de antilichaamtiter. a. □-□ Locale miltbestraling, na 3 dagen antigeeninjectie en weer 12 uur later toediening van specifiek antiserum (MILTLOC-3 dgn-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren. b. ▲-▲ Locale miltbestraling, na 5 dagen antigeeninjectie en weer 12 uur later gevolgd door specifiek antiserum (MILTLOC-5 dgn-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren. c. ■-■ Locale miltbestraling, na 10 dagen toediening van antigeen, na nog eens 12 uur gevolgd door specifiek antiserum (MILTLOC-10 dgn-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren. d. ●-● MILTLOC-1 dag-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>; e. ○-○ AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>.



lichaamsvorming in de milt nog maar zeer beperkt. In de experimenten waarbij het antigeen 3, 5 of 10 dagen na de locale bestraling toegediend werd, bleek een geleidelijk herstel van het immunologisch vermogen op te treden. Zelfs na 10 dagen bleef de maximale titer echter nog duidelijk beneden die van de controledieren (AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>). De latente periode en het tijdstip waarop de maximale titer bereikt werd, waren bij deze experimenten weer normaal.

Het is niet duidelijk of dit herstel een gevolg is van de lymphocyten, die in de eerste 24 uur binnen kwamen of van later binnengekomen cellen; een dubbele bestraling kon hier niet uitgevoerd worden, maar bij de lymfeklierexperimenten bleek de influx van de eerste 24 uur verantwoordelijk voor het immunologisch herstel.

### *Nabeschuwing*

Na intraveneuze antigeeninjectie volgend op locale miltbestraling zagen wij evenals Simic (1965) en in tegenstelling tot Süssdorf en Draper (1956) en Taliaferro en Taliaferro (1956) een, zij het beperkte vermindering van de antilichaamsvorming. De controle-experimenten waarbij 2 dagen na de antigeentoediening splenectomie uitgevoerd werd, lieten echter zien dat deze productie niet aan de milt mag worden toegeschreven.

Met behulp van de passieve immunisatie was het vermogen tot antilichaamsvorming van de milt na locale bestraling beter te beoordelen. Hierbij mag de gevonden antilichaamsvorming wel aan de milt toegeschreven worden. In deze laatste proefopstelling bleek, dat het orgaan 24 uur na de bestraling wel tot antilichaamsvorming in staat was, zij het met enige vertraging. In de daarop volgende dagen is de vertraging niet meer aanwezig, maar het quantitatief herstel gaat slechts langzaam. Het is duidelijk dat ook in de milt de influx van lymphocyten uit de bloedbaan een herstel van immunologische functie met zich meebrengt, evenals dat in de lymfeklier het geval was. Het beperkte herstel wijst erop, dat de milt door andere factoren een normaal peil van antilichaamsvorming niet bereikt.

Indien de antilichaamsvorming na locale miltbestraling geheel aan binnenkomende cellen toegeschreven moet worden, is het opmerkelijk dat de rest van het lymfoïede systeem, dat toch tot een

redelijke antilichaamvorming in staat is, slechts een beperkt herstel van de antilichaamproductie in de milt kan bewerkstelligen. Het lijkt erop dat óf de milt de voor eigen antilichaamvorming nodige immunocompetente cellen zelf moet vormen door transformatie van binnengekomen lymphocyten, óf dat de aanvoer uit de circulatie juist naar de milt slechts beperkt is.

2. *Antilichaamvorming bij totale lichaamsbestraling met miltbescherming*

a. Totale lichaamsbestraling met miltbescherming, na 24 uur gevolgd door antigeentoediening (MILTSH-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig 15

Na een met een dag verlengde latente periode wordt een aanzienlijke antilichaamproductie gemeten, de antilichaamtiter stijgt echter zeer langzaam.

b. Totale lichaamsbestraling met miltbescherming, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie en weer 12 uur later toediening van specifiek antiserum (MILTSH-24 u-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); fig. 15

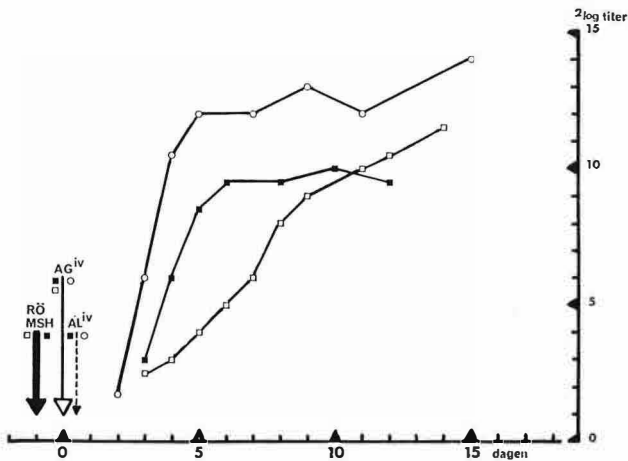


Fig. 15.

Verloop van de antilichaamtiter. a. □-□ Totale lichaamsbestraling met miltbescherming, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie (MILTSH-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 3 dieren. b. ■-■ Totale lichaamsbestraling met miltbescherming, na 24 uur en 36 uur gevolgd door toediening van respectievelijk antigeen en specifiek antiserum (MILTSH-24 u-AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>); gem. van 3 dieren. c. O-O AG<sup>iv</sup>-12 u-AL<sup>iv</sup>.

Om na te gaan of de onder 2a beschreven antilichaamvorming ook werkelijk in de beschermde milt tot stand kwam, werd de proef herhaald met passieve immunisatie. Na een nauwelijks verlengde latente periode werd nu een normaal stijgende titercurve waargenomen. De maximale titer werd vrijwel op het normale tijdstip bereikt maar bleef onder die van de controle-proef.

### *Nabeschouwing*

De resultaten van onze experimenten waarbij geen passief antilichaam werd gegeven, komen sterk overeen met die van Taliaferro en Taliaferro (1956) en van Süssdorf en Draper (1956): ook door deze onderzoekers werd in het algemeen na een vrijwel normale latente periode een langzaam stijgende titercurve waargenomen. Merkwaardigerwijze werd door passieve immunisatie na de anti-geentoediening een veel normaler verloop van de antilichaamproductie waargenomen. Een verklaring hiervoor zouden wij niet kunnen geven; het zou echter een gevolg kunnen zijn van een betere "antigen trapping" door het antilichaam, zoals beschreven door Williams (1966). Deze proeven vormen als het ware een in-vivo-imitatie van de experimenten van Ford, Gowans en Mc Cullagh (1966) waarbij een milt in vitro doorstroomd werd met lymfocytenarm bloed en waaraan pas na verloop van tijd antigeen toegevoegd werd. Er is een duidelijke tegenstelling tussen de proeven met locale miltbestraling en die met miltbescherming. Na locale miltbestraling blijft het aantal bloedlymphocyten vrij hoog (70-75 %), terwijl het antilichaamvormend vermogen van de milt beperkt is en zich ook slechts langzaam herstelt. Bij de miltshielding daarentegen is het aantal bloedlymphocyten zeer laag (16 %) en is de milt tot een vrij goede antilichaamvorming in staat.

De histologische waarnemingen suggereren een verband met de follikelrandcellen: bij de locale bestraling veel lymphocyten, doch weinige en langzaam tot ontwikkeling komende follikelrandcellen, bij de miltbescherming juist veel follikelrandcellen en slechts een minimaal aantal lymphocyten.

## Hoofdstuk V

### DE THYMUS

#### A. Bouw, functie en gevolgen van röntgenbestralingen

##### *Histologie van de thymus*

Vertonen de milt en de lymfeklier opmerkelijke onderlinge overeenkomsten, niet alleen in bouw maar ook in functioneel opzicht, de thymus lijkt geheel andere eigenschappen te hebben. De kleine lymphocyt is er weliswaar de meest voorkomende cel, maar er komen geen follikels en plasmacellulaire reacties voor (Fagraeus, 1948), er heeft geen filtratie van passerend bloed of lympe plaats en er wordt geen antilichaamvorming gevonden (Fagraeus, 1948). Het is vooral wegens de exceptionele positie van de thymus in de kringloop van lymphocyttaire cellen en om na te gaan of de thymuscellen een functie kunnen hebben bij de immunologische reacties op andere plaatsen, dat dit orgaan in het onderzoek betrokken werd.

De thymus bevindt zich bij het konijn en de mens intrathoracaal. Bij het konijn waar nauwelijks ander mediastinaal weefsel aanwezig is, ligt de uit twee kwabben bestaande thymus in een ruimte, die begrensd wordt door de pleura van beide longen, het pericard en het sternum. De grootte van het orgaan varieert ook binnen één diersoort aanzienlijk. De thymus bestaat uit talrijke lobuli, waarin microscopisch duidelijk twee componenten te onderscheiden zijn, die zich overigens continue in de lobuli voortzetten: een centraal relatief lymphocytenarm gedeelte, het merg, en daaromheen de schors met veel meer kleine lymphocyten. Het verschil in celdichtheid maakt de overgang merg-schors zeer goed waarneembaar, van een structurele begrenzing lijkt echter geen sprake.

De kleine lymphocyten van de schors liggen dicht opeen zonder een bepaalde rangschikking. Tussen de kleine lymphocyten met hun compacte donkere celkern bevinden zich een verhoudingsgewijs gering aantal blast-type-cellen en "medium sized" lymphocyten

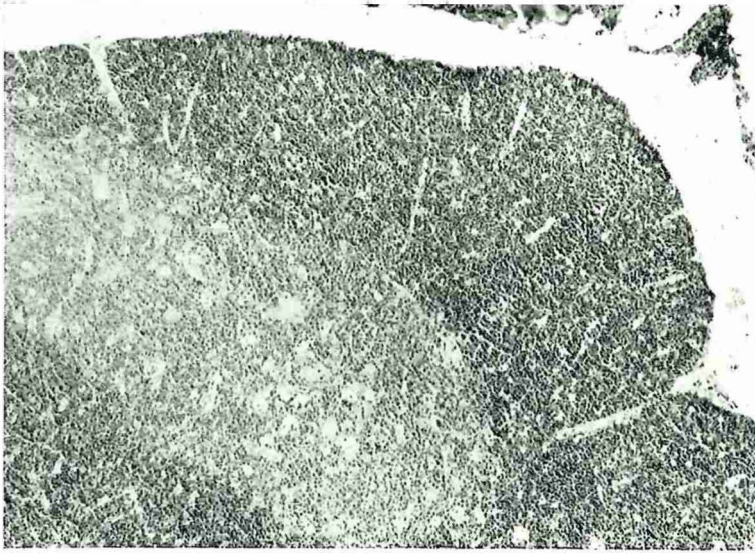


Foto 19.

Thymus. Partieel overzicht met schors en merg. Vergr. 110 x.

met een iets blekere kern en een smalle zoom licht-basofiel cytoplasma. Het tussen de lymphocyttaire cellen aanwezige netwerk van reticulumcellen, hoofdzakelijk van epitheliale afkomst, is vrij ijl; alleen in omstandigheden, waarbij een lymphocytendepletie opgetreden is (bijvoorbeeld na röntgenbestraling) is het duidelijk zichtbaar.

Opvallend is het zeer grote aantal celdelingen van de lymphocyten in de thymus (Kindred, 1942), in het bijzonder in de schors (Leblond en St. Marie, 1960). Volgens Metcalf en Ishidate (1961) zou deze celvermeerdering haardsgewijs, rond PAS-positieve cellen tot stand komen.

In microscopische praeparaten is het merg veel lichter gekleurd dan de omgevende schors, enerzijds omdat de in de medulla aanwezige lymphocyten een veel minder compacte kernstructuur hebben en ook minder talrijk zijn, en anderzijds omdat de reticulumcellen er in groteren getale voorkomen en bovendien de zogenaamde lichaampjes van Hassal vormen.

De bloedvoorziening in de thymus geschiedt door vaatjes, welke vanuit het omgevende bind- en vetweefsel het orgaan binnentreden



en vervolgens als wijde capillairen (venulen?) radiaal door het schorsweefsel naar het merg lopen. Venulen met een „gezwollen” endotheelwand zoals de schorsvenulen in de lymfeklieren komen in de thymus niet voor. Centraal in het merg bevinden zich weer grotere veneuze vaten omgeven door een zogenaamde “perivascular lymphatic channel” (Smith, 1955), een om de vene gelegen ruimte met wisselende diameter, welke van het omgevende merggebied gescheiden is door een laag van reticulumcellen (Weiss, 1963) en waarin grote aantallen kleine lymphocyten (incidenteel ook een grotere thymuscel) aangetroffen kunnen worden (Leblond en St. Marie, 1960); volgens Smith (1955) begeleiden zij de venen slechts tot de plaats waar de venen uit de thymus treden. Een directe verbinding van de “perivascular lymphatic channels” met de grote lymphanen van de thorax zou volgens de laatstgenoemde onderzoekers niet bestaan.

Rondom de bloedvaatjes van de kapsel bevinden zich vrij talrijke rijpe plasmacellen, die met de vaatjes ook de schors binnendringen. Onrijpe plasmacelvormen komen in de thymus niet voor (St. Marie, 1965); in “germ free” opgegroeide kuikens zijn de rijpe plasmacellen veel minder talrijk (Thorbecke e.a., 1957).

#### *Lymphocytopoïese en recirculatie in de thymus*

In de normale histologische beelden worden nooit verschijnselen van een lymphocytenemigratie uit de bloedbaan aangetroffen, wel zijn in de corticale bloedvaten plasmacellen in de wand opgemerkt. Na intraveneuze injectie van gelabelde ductus thoracicus-lymphocyten werd door Gowans en Knight (1964) in de thymus ook geen emigratie van deze cellen vanuit de bloedbaan waargenomen. Zij postuleerden dat endotheelcellen van de thymusvaten in tegenstelling tot de epitheloïede cellen van de schorsvenulen in de lymfeklier lymphocytenafwerende eigenschappen bezitten.

De thymus is dus niet op de normale wijze opgenomen in de recirculatie van kleine lymphocyten. Een aanvoer van cellen is echter wel geconstateerd tijdens het herstel van de thymus in een lethaal bestraald proefdier; na intraveneuze injectie van door een specifiek chromosomaal patroon (T6-Marker) in de celdeling herkenbare beenmergcellen werden namelijk in de thymus delingen

van deze beenmergcellen waargenomen, terwijl celsuspensies van andere lymfhoiede organen de thymus daarentegen niet konden repopuleren (Ford en Micklem, 1963). Een vergelijkbaar resultaat verkregen Gengozian e.a. (1957): de toediening van homologe beenmergcellen aan een lethaal bestraald dier veroorzaakte een snel herstel van de thymus, injectie van een heterologe beenmergcellsuspensie liet ook een - trager - thymusherstel door de donorcellen zien. Bij geen van deze experimenten werd aangegeven welke beenmergcel in de thymus en mogelijk ook direkt in de andere lymfhoiede organen (Ford, 1966) terecht zou kunnen komen.

In thymusweefsel, in vitro bestraald en vervolgens subcutaan in een homologe receptor geplaatst, werden door Dukor c.s. (1965) echter voorafgaand aan het optreden van blast-type-cellen "small lymphocyte-like cells", lymphocytachtigen met opvallend kleine, donkere kern waargenomen. Over de mogelijke betekenis in dit verband van de rondom de vaten aangetroffen rijpe plasmacellen hebben wij geen gegevens in de literatuur gevonden; in het beenmerg komt wel een gering aantal plasmacellen voor, maar deze celsoort is in groten getale aanwezig in andere lymfhoiede organen, welke niet de thymus kunnen repopuleren (Ford en Micklem, 1963).

Daar de thymus dus niet (Gowans en Knight, 1964) of op zeer speciale wijze (Ford en Micklem, 1963) vanuit de rest van het lichaam een aanvoer van cellen te verwerken krijgt, zal een eventuele "outflow" van cellen praktisch geheel op rekening van een celproductie in het orgaan zelf geschreven moeten worden. Op grond van het aantal celdelingen en de DNA-synthese hadden Kindred (1942), Andreasen en Christensen (1949) reeds vastgesteld, dat in dit orgaan een geweldige nieuwvorming van lymphocyten moest plaatsvinden. Door Leblond en St. Marie (1960) werd nagegaan, waar deze productie van lymphocyten in de thymus tot stand kwam: op grond van tellingen van het aantal cellen in schors en merg en het aantal celdelingen op die plaatsen, beide gedifferentieerd naar celsoort, kwamen deze onderzoekers tot de conclusie, dat de productie van kleine lymphocyten voornamelijk in de schors plaatsvond en dat deze cellen via de merggebieden, waar veel minder celdelingen gezien werden, afgevoerd werden. Leblond en St. Marie namen aan, dat de lymphocyten in de "perivascular lymphatic channels" geraken en van daaruit op enige wijze in de bloedbaan terecht

komen. Een direkte afvoer naar de bloedbaan zou afgeleid kunnen worden uit de waarnemingen van Ernström c.s. (1965), dat het aantal lymphocyten in het veneuze thymusbloed groter is dan in het naar het orgaan toegevoerde bloed. Daar afbinden van de ductus thoracicus echter het aantal bloedlymphocyten doet teruglopen tot minder dan 10 % (Florey en Gowans, 1962), kan de bijdrage van de thymus aan de bloedlymphocyten buiten de ductus thoracicus om slechts gering zijn. De thymus lijkt echter zijn cellen ook niet af te voeren via de ductus thoracicus: het aantal daarin aanwezige lymphocyten neemt niet toe tijdens de passage door de thorax (Schooley c.s., 1959). De eventuele afvoer van de thymuslymphocyten is dus nog niet duidelijk.

Het lijkt overigens nog allerminst zeker of de cellen die in de thymus in aanzienlijke hoeveelheden gevormd worden, het orgaan verlaten dan wel binnen de thymus te gronde gaan. Voor een afvoer van cellen pleiten de waarnemingen van Kindred (1942), dat de hoeveelheid kerndébris in de thymus correleert met een celverval van ongeveer 15 % van de gevormde cellen, verder de uitzaaïing van door een "chromosomen-marker" herkenbare cellen uit een thymusgraft (Leuchars e.a., 1965) en de lymphocytenarmoede, die optreedt na een thymectomie (Bierring, 1960; Metcalf, 1960). Het effect van de thymectomie werd echter door Metcalf (1960) toegeschreven aan het ontbreken van de hierna nog ter sprake komende, in de thymus geproduceerde "Lymphocytosis Stimulating Factor". Geïsoleerde thymuscellen hebben zeker wel het vermogen naar de lympheklier en milt te gaan (Ford en Micklem, 1963; Parrott, De Sousa en East, 1966). Parrott, De Sousa en East (1966) nemen op grond van deze celbeweging en het ontbreken van lymphocyten in de centra van de lymphocytenvelden van neonataal gethymectomeerde dieren aan, dat de thymus zeker in de neonatale periode en waarschijnlijk het gehele leven cellen levert voor de "mobilizable pool of lymphocytes", d.w.z. de grote groep van recirculerende lymphocyten.

Anderzijds hebben experimenten waarbij de thymuscellen op enige wijze gelabeld werden argumenten opgeleverd voor een lymphocytendegeneratie binnen de thymus. Een intraveneuze injectie van <sup>3</sup>H-thymidine voert binnen enkele dagen tot een labeling van meer dan 80 % van de lymphocyten in de thymus en van minder

dan 20 % in de lymfeklier; zelfs indien de hoeveelheid thymusweefsel door thymusimplantaten in het proefdier sterk verhoogd is, wordt hiervan geen weerslag in de vorm van een uitzaaiing van veel gelabelde cellen waargenomen (Metcalf, 1966). In de tweede plaats werd na toediening van  $^3\text{H}$ -thymidine uitsluitend aan de thymus een slechts zeer beperkte hoeveelheid gelabelde cellen in de overige lymfoïede organen waargenomen (Nossal, 1964).

Onze eigen waarnemingen wijzen erop (zie blz. 117), dat uit een bij bestraling beschermde thymus wel een "outflow" van cellen plaats heeft.

### *De functionele betekenis van de thymus*

De thymus zou op twee manieren een bijdrage kunnen leveren tot de immunologische reacties, namelijk in de vorm van in het orgaan zelf plaatsvindende processen, zoals waargenomen in lymfeklier en milt, of door de vorming van een cel of een substantie, die elders in het lymfoïede apparaat de reacties bevordert, dan wel onderdrukt.

Reeds opgemerkt werd dat de thymus een orgaan is dat niet duidelijk als filter opgenomen is in een bloed- of lymfestoornis. Na de intraveneuze toediening van antigeen werd door Marshall en White (1961) geen antigeen in het thymusweefsel, dus buiten de bloedbaan aangetroffen; zij spraken dan ook van een "blood-thymus-barrier". Mechanische destructie van de thymus deed de antigenen wel in het thymusweefsel doordringen (Marshall en White, 1961). Nossal c.s. (1966) lieten zien dat in de normale thymus de „barrière zeker niet voor alle antigenen bestaat. De celsoort welke zich in lymfeklieren en milt bevindt op de plaatsen waar de "antigen trapping" tot stand komt, de follikelrandcel, komt in de thymus niet voor.

Na een normale, b.v. intraveneuze antigeeninjectie treedt in de thymus geen „plasmacellulaire reactie" op, terwijl thymuscellen, nadien in weefselkweek gebracht ook niet in staat zijn antilichaam te produceren (Fagraeus, 1948). Stoner en Hale (1955) meenden, dat het door hen in de voorste oogkamer van een bestraalde receptor geïmplanteerde thymusweefsel wel antilichaam zou produceren. Williams c.s. (1958) volgden echter het histologisch beeld van deze thy-

mustransplantaten gedurende enkele dagen en vonden slechts gedegeneerde lymphocyten en geen plasmacellen. Opgemerkt moet worden dat in de thymus wel immunologische reacties en follikels aangetroffen worden bij enkele processen, die als autoimmuunziekten bekend staan.

De lymphocytopoïese in de thymus lijkt niet een reactief karakter te hebben, zoals in de lymfeklier en milt beschreven werd (specifiek cellulaire reactie, follikelcentrumreactie), maar lijkt een op zichzelf staand proces te zijn.

De thymus is een orgaan, dat al zeer vroeg in de embryonale fase ontstaat als eerste van de lymfoïede organen. Bij de histogenese van het orgaan zijn entodermaal epitheel en mesenchym betrokken. Uit het epitheel ontstaat later het epitheliale cellenreticulum, terwijl in dit weefsel ook een aantal mesenchymale cellen zouden voorkomen. Volgens Auerbach zouden lymphocyten het eerst in de thymus verschijnen en zouden ze daar ontstaan uit de aanwezige epitheliale elementen (Ball en Auerbach, 1960; Auerbach, 1960; Auerbach, 1961; Auerbach, 1966).

De rol welke de thymus speelt bij de ontwikkeling van de andere lymfoïede organen en het tot stand brengen van de immunologische potenties daar ter plaatse, werd vooral door Miller en medewerkers (1961 e.v.) nagegaan met behulp van experimenten, waarbij direkt na de geboorte of later de thymus verwijderd werd. De "peripheralization", de verspreiding van de lymfoïede cellen, komt niet bij alle diersoorten op hetzelfde tijdstip tot stand, zodat een neonatale thymectomie niet steeds dezelfde gevolgen zal hebben.

Door een neonatale thymectomie worden ernstige histologische veranderingen in de andere lymfoïede organen veroorzaakt: een sterke reductie van het aantal lymphocyten in de lymphocytenvelden van de lymfeklieren en in de periarteriële lymphocytenscheden van de milt (Waksman e.a., 1962; Good e.a., 1962; Parrott, De Sousa en East, 1966). Waksman (1962) en Miller (1961) hebben verder na een neonatale thymectomie ook een reductie van het aantal follikellymphocyten en van de follikelcentrumactiviteit opgemerkt. Als gevolg van een neonatale thymectomie daalt het aantal bloedlymphocyten tot 27 % (Schooley en Kelly, 1961) of 50 % (Miller, 1961) van de normale waarden. De gethymectomeerde dieren gaan voor een aanzienlijk deel later te gronde aan het zgn. "wasting syn-



drome": vermagering, haaruitval, darmverschijnselen en dodelijk verlopende intercurrente infecties (Miller, 1962). Door De Vries c.s. (1964) is erop gewezen dat alle verschijnselen, welke na een neonatale thymectomie optreden, terug te voeren zouden zijn op een verlies van herkenningsvermogen, waardoor als het ware een auto-immuunziekte zou ontstaan.

De immunologische betekenis van de neonatale thymectomie kan min of meer afgeleid worden uit de histologische gevolgen van deze ingreep, namelijk uit de localisatie van de lymphocytendepletie. De in de lymfheklieren in de lymphocytenvelden tot stand komende specifiek cellulaire response bleek na de ingreep vrijwel verdwenen (Good e.a., 1962; Miller, 1962). Dit effect is te voorkomen door het tijdig inbrengen van een thymustransplantaat (Miller, 1962). Het bleek dat ook een thymustransplantaat in een zgn. "Millipore chamber" het effect van de thymectomie kan opheffen (Osoba en Miller, 1963, 1964). Op grond van deze laatste waarnemingen concludeerden deze auteurs, dat een humorale thymus-factor een wezenlijke rol zou spelen bij de histogenese van het perifere lymfoïede systeem. Een homogenaat van de thymus kon echter geen terugkeer van de specifiek cellulaire reactie bewerkstelligen (Miller, 1962); gedissocieerde thymuscellen konden slechts in zeer grote aantallen geïnjecteerd de transplantatie-immuniteit in een neonataal gethymectomeerd dier herstellen (Yunis c.s., 1964). Zoals te verwachten was, konden de gevolgen van de neonatale thymectomie op de transplantatie-immuniteit wel opgeheven worden door celsuspensies van milt en lymfhekklier, die immers immunocompetente cellen bevatten, tenminste als de celdonor zelf in de neonatale periode geen thymectomie onderging (Dalmaso e.a., 1963).

Door gebruik te maken van "chromosomen-markers" kon aangetoond worden, dat de lymphocyten in een thymusgraft na enkele weken vervangen worden door gastheer-lymphocyten (Miller, 1965). Na de plaatsing van een homoloog thymustransplantaat in een neonataal gethymectomeerde receptor accepteert de receptor huidtransplantaten zowel van de thymusdonor als van de gastheer, echter niet van een derde dier (Miller, 1962). Deze waarnemingen zouden erop kunnen wijzen dat het thymusepitheel, dat in deze implantatieproeven het donorkarakter behouden heeft, een rol speelt bij het herkenningsvermogen in latere immunologische reacties. Bij

cellulaire reacties in deze dieren opgewekt, werden in de lymphenklieren aanvankelijk celdelingen van lymfoïede cellen van de donor waargenomen later van de gastheer (Davies c.s., 1966).

De gevolgen van een neonatale thymectomie voor de antilichaamvorming zijn niet geheel gelijklopend: afhankelijk van de aard van het antigeen zou de antilichaamvorming verzwakt of geheel afwezig zijn (Archer en Pierce, 1962; Arnason e.a., 1962; Good e.a., 1962; Miller, 1961). Ook hier kon het vermogen tot antilichaamproductie hersteld worden met een onbeschadigd thymusimplantaat, vrij of in "Millipore chamber" (Miller, 1962; Osoba en Miller 1963, 1964).

Uit de resultaten van de neonatale thymectomie hebben Good en medewerkers (1962 e.v.), Parrott c.s. (1966) de thymus-afhankelijkheid afgeleid van de specifiek cellulaire immuniteit en de plaatsen, waar deze tot stand komt i.c. de lymphocytenvelden en de periarteriolaire lymphocytenscheden. De antilichaamvorming leek slechts ten dele "thymus-dependent"; voor het vermogen tot antilichaamproductie was de aanwezigheid van de Bursa van Fabricius of eventueel daarmee overeenkomende organen langs de tractus digestivus (Cooper c.s., 1965 e.v.) van veel groter belang. Dit "Bursa-dependent" systeem omvat de antilichaamproductie en in morphologische zin de follikels (follikelrandcellen?) en de plasmacellen.

Thymectomie op volwassen leeftijd heeft geen onmiddellijke nadelige gevolgen voor de immunologische functies (Hamar, 1939; Mc Lean c.s., 1957; Miller, 1962). De immunologische functies - zowel de specifiek cellulaire reactie als de antilichaamvorming - lopen in een aantal maanden echter wel terug (Metcalf, 1965; Miller, 1965; Taylor, 1965). Voor het herstel van de antilichaamvorming en van de cellulaire immuniteit na een lethale bestraling is de aanwezigheid van een thymus noodzakelijk: het eigen bestraalde orgaan (Miller c.s., 1963) of bij een gethymectomeerd dier een thymustransplantaat (Leuchars e.a., 1965). De thymectomie op volwassen leeftijd veroorzaakt een geleidelijke daling van het aantal bloedlymphocyten tot ongeveer 60 % van het normale aantal en zoals reeds vermeld een lymphocytendepletie in de lymfoïede organen (Bierring, 1960; Metcalf, 1960). Deze daling van het aantal bloedlymphocyten na thymectomie zou natuurlijk het gevolg kunnen zijn van het wegnemen van een lymphocytenproducent of te verklaren zijn door aan te nemen dat de thymus een stof produceert welke elders in

het lymfhoïede systeem de celproductie bevordert. Metcalf (1956) isoleerde uit het bloed van patienten o.a. met een chronische lymfatische leucaemie en later ook in niet-pathologisch materiaal o.m. de thymus (Metcalf 1956, 1958, 1960) een door hem "Lymphocytosis Stimulating Factor" (L.S.F.) genoemde stof, welke na intracerebrale (!) injectie het aantal bloedlymphocyten deed toenemen.

Een derde humorale factor welke uit de thymus geïsoleerd werd, is een door Mowbray (1963) het eerst in de serum -  $\alpha$  2 - globulinefractie van de koe aangetroffen stof, welke de antilichaamproductie juist zou belemmeren indien op het juiste ogenblik geïnjecteerd.

### *Gevolgen van röntgenbestralingen*

Reeds Heineke (1904) merkt op dat vooral de lymphocyten in de thymusschors door een röntgenbestraling in sterke mate beschadigd werden. Men heeft wel verondersteld (Murray, 1948) dat het spoedig weer optredende herstel van deze cortex tot stand kwam vanuit het merg, waar de röntgenshade veel geringer was. Door Smith en Kieffer (1957) is echter reeds vastgesteld, dat tijdens de thymusregeneratie na een bestraling het aantal celdelingen in de cortex veel groter was dan in de medulla.

De op de thymus terug te voeren immunologische gevolgen van een irradiatie (Miller, 1962; Leuchars c.s., 1965) kwamen reeds uitvoerig ter sprake.

De histologische veranderingen van een thymus na locale bestraling in vivo zijn voor zover ons bekend nog niet onderzocht. Een in vitro bestraalde (500 en 2000 R) en vervolgens in een neonataal gethymectomeerd dier overgeplaatste thymus bleek zich echter nadien spoedig te herstellen, terwijl alleen bij 500 R de immunologische functies in de receptor hersteld werden (Miller, 1966).

Betreffende een totale lichaamsbestraling met thymusbescherming hebben wij in de literatuur ook geen gegevens aangetroffen.

Bij dit onderzoek is in de eerste plaats nagegaan, hoe de lokaal bestraalde thymus zich herstelt en of het hierbij waargenomene zich onderscheidt van de thymusregeneratie bij totale lichaamsbestraling. Ook is het herstel van de "antibody response" na totale sublethale lichaamsbestraling bij een „radiologische uitschakeling" van de thymus onderzocht.

Bij de totale lichaamsbestraling met thymusshielding werd gelet op een eventueel „leeglopen” van de thymus en een mogelijke repletie in andere lymphoïede organen. De immunologische gevolgen hiervan werden ook getest. De gevolgen van de thymusbescherming voor het vermogen tot antilichaamvorming werden eveneens nagegaan. Van de immunologische reacties werd hierbij alleen het vermogen tot antilichaamvorming onderzocht.

## B. Experimenten: Histologische veranderingen na röntgenbestralingen

De localisatie van de thymus in het mediastinum maakt dat bij elke hier gebruikte bestralingsmethode een aantal in de directe omgeving van de thymus gelegen organen onontkoombaar dezelfde behandeling zal ondergaan.

Bij de locale bestraling zullen aldus de lymfeklieren in dit gebied, het beenmerg, o.a. van het sternum en de in bloedbaan en ductus thoracicus passerende lymphocyten eveneens bestraald worden. Bij totale bestraling met thymusshielding zullen deze lymphocyten bevattende formaties evenals de thymus gevrijwaard blijven voor de röntgenstralen.

### 1. *Histologische veranderingen in de thymus bij een totale lichaamsbestraling (RÖTOT)*

Ook dit materiaal is afkomstig van dieren, welke een tweezijdige bestraling van 500 R ondergingen. Steekproeven met bestralingen van 850/380 R leverden geen significante verschillen op.

De röntgenshade ontwikkelt zich reeds snel: 5 uur na de totale lichaamsbestraling zijn in de schors reeds de meeste lymphocyten te gronde gegaan. Na 24 uur zijn in dit gebied vrijwel alle lymphocyten gedegeneerd, de verwijdering van de brokken kernchromatine neemt een aanvang en twee dagen na de bestraling is het kerndébris volkomen verdwenen. Deze verwerking van het kernchromatine komt practisch zonder phagocytose tot stand. De veranderingen in het merggebied vertonen een geheel andere ontwikkeling: slechts weinig kerndébris in de beginphase, de typische merglymphocyten laten nauwelijks röntgenshade zien. Op deze wijze ontstaat het „inversie”-beeld van Heineke (1904): onbeschadigd merg en gedepteerde schors.

De nu volgende regeneratie van de thymus kan zeer aanzienlijk in tijd variëren. Gedurende een wisselend aantal dagen blijft de schors „leeg”; in deze vrijwel lymphocytenloze schors kunnen reeds vanaf de 2e dag rond de vaatjes van de cortex en later ook in het corticale weefsel zelf toenemende aantallen plasmacellen waargenomen worden. Hierbij lijkt een passage door de vaatwand op te treden. In een volgende phase, soms al vanaf de 4e dag, ontstaan in de cortex zeer talrijke blast-type cellen (vergelijk foto 22). De herkomst van deze blastcellen is uit de opeenvolgende histologische beelden niet af te leiden; een influx van “small lymphocyte-like cells” (Dukor c.s., 1965) is door ons niet opgemerkt. De grote pyroninophile cellen ontwikkelen reeds spoedig een sterke mitotische activiteit, waarbij weer toenemende aantallen lymphocyten in de schors verschijnen. In de medulla worden noch in deze phase van het thymusherstel, noch later celdelingen gezien; een repopulatie vanuit het merg (Murray, 1948) lijkt dan ook onwaarschijnlijk.

In enkele dagen, tussen de 5e en 9e dag, herstelt zich kwalitatief het normale thymusbeeld: een lymphocytenrijke schors met veel celdelingen, een merg met minder lymphocyten en vrijwel geen mitosen. In deze phase lijkt de afvoer van lymphocyten ook weer op gang te komen, indien de met lymphocyten gevulde perivasculaire ruimten in de medulla tenminste als een uiting daarvan beschouwd mogen worden.

De thymus herstelt zich dus eerder dan de milt en de lymfeklier en veel vroeger dan het aantal bloedlymphocyten.

### *Nabeschoowing*

Omdat in de thymusschors na de bestraling een vrijwel totale destructie van de lymphocyten optreedt, kan het herstel van dit gebied goed gevolgd worden. Ten aanzien van de terugkeer van de schorslymphocyten kan in de eerste plaats gezegd worden, dat geen voorafgaande influx van lymphocytachtigen (Dukor c.s., 1965) is opgemerkt, in de tweede plaats dat dit herstel plaats vindt in aansluiting aan het optreden van een snel delende populatie van blastcellen in de cortex, en tenslotte dat mogelijk de in de vroegste stadia binnengekomen(?) plasmacellen het uitgangspunt voor de blastenpopulatie zouden kunnen vormen. Het merg leek zeker niet verant-



woordelijk voor het thymusherstel zoals verondersteld door Murray (1948).

2. *Histologische gevolgen van een locale bestraling van de thymus (THLOC)*

Evenals bij het milt- en lymfeklieronderzoek de regeneratie na totale bestraling, waarbij vrijwel geen influx mogelijk is, geplaatst werd tegenover de veranderingen na locale bestraling, dus een situatie mét aanvoermogelijkheid, zal dit ook voor de thymus vergeleken worden.

De veranderingen in de lokaal bestraalde thymus blijken grote overeenkomsten te vertonen met hetgeen hiervoor in de thymus van het totaal bestraalde proefdier waargenomen werd: eerst een fase van destructie van de kleine lymphocyten in de schors en in veel mindere mate een schade in het merg (foto 20); de schorslymphocyten zijn ook hier na 24 uur vrijwel totaal gedestruëerd en een etmaal later verdwenen.

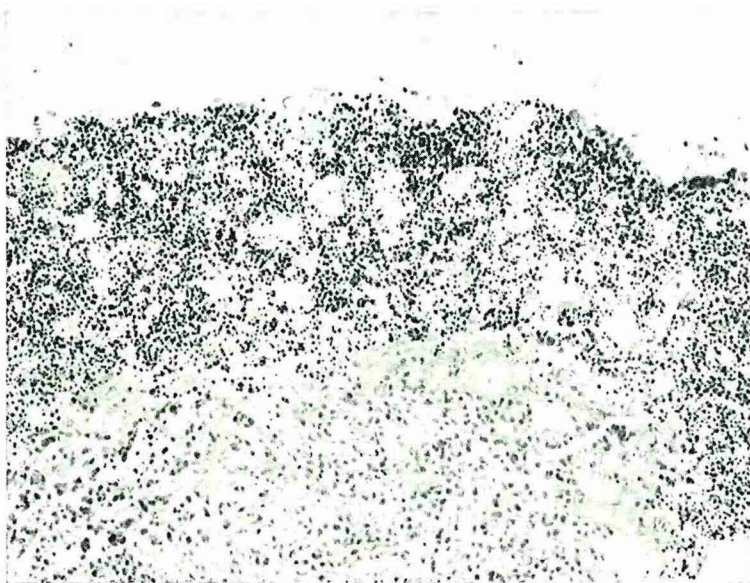


Foto 20.

Thymus, 24 uur na locale bestraling. Ernstige destructie van lymphocyten in de schors; intacte merglymphocyten. Verg. 220 x.

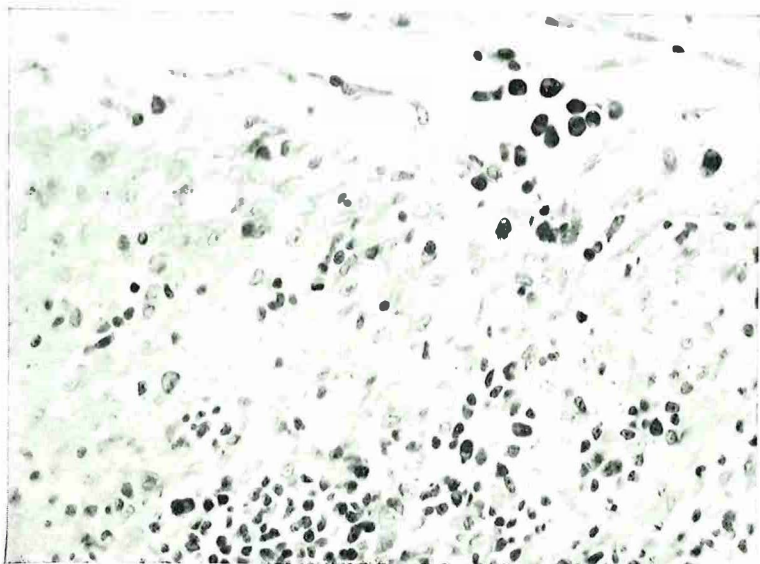


Foto 21.

Thymus, 2 dagen na locale bestraling. Sterk gedepleteerde schors; groepjes plasmacellen nabij bloedvat; intacte merglymphocyten. Vergr. 440 x.

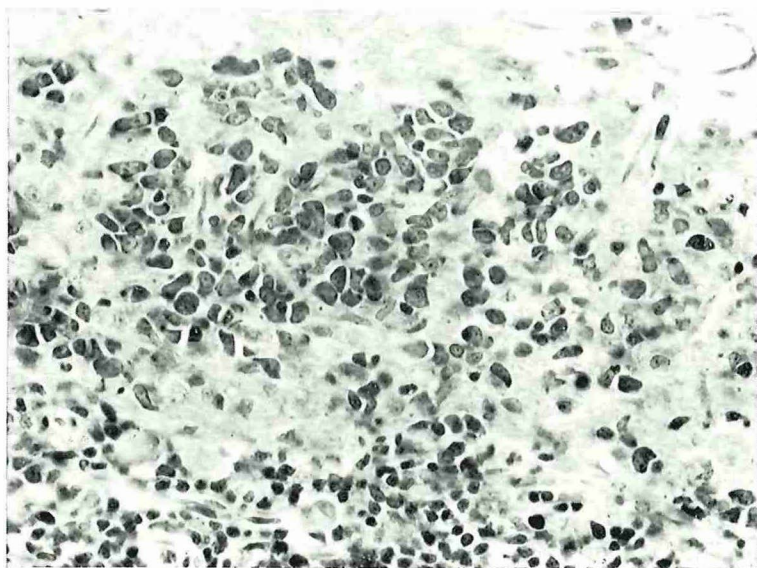


Foto 22.

Thymus, 4 dagen na locale bestraling. Schorsregeneratie met blast-cellen en mitosen. Vergr. 440 x.

Na locale bestraling worden op de tweede dag en de hieropvolgende dagen eveneens plasmacellen om de vaten en in de lege schors gezien (foto 21), daarna reeds op de 3e-4e dag weer talrijke grote pyroninophile cellen met celdelingen (foto 22). Normaal uitziende lymphocyten worden in de schors vanaf de vierde dag weer gezien en reeds spoedig daarna ook weer in de "perivascular lymphatic channels". De herkomst van de blastcellen kon ook bij deze experimenten niet met zekerheid vastgesteld worden: een influx van lymphocyten vanuit de bloedbaan, zoals in milt en lymfeklier, werd hier niet waargenomen. Ook de door Dukor c.s. (1965) beschreven "small lymphocyte-like cells" werden niet opgemerkt. Het merg blijft na de aanvankelijke destructie van enkele lymphocyten vrijwel onveranderd. Het normale thymusbeeld met de zeer lymphocytenrijke schors keert ook hier rond de 7e tot 9e dag terug.

De milt en de lymfeklier ondervinden geen waarneembare gevolgen van de thymusirradiatie, wat gezien de slechts tijdelijke uitschakeling van het orgaan ook nauwelijks te verwachten is.

In het kader van de onder D1b te beschrijven experimenten werd nog materiaal verkregen van dieren welke in aansluiting aan een totale lichaamsbestraling na 6, 12 en 18 dagen nog een drietal locale thymusbestralingen ondergingen. Zeven dagen na de laatste thymusbestraling werd daarbij geen lymphocytair thymusweefsel meer waargenomen. Deze bestralingen hadden echter opmerkelijke gevolgen voor het herstel van de milt en de lymfeklier. In de milt bestonden de follikels practisch geheel uit follikelrandcellen, terwijl in de p.a.l.s. zeer weinig lymphocyten aanwezig waren. Foto 24 laat het merkwaardige lymfeklierbeeld zien: een practisch ontbreken van de centrale gedeelten van de lymphocytenvelden. De cortex bestaat uit follikels en daartussen een eveneens voornamelijk uit follikelrandcellen opgebouwde veldrand; aan de mergzijde van deze "outer cortex" zijn nog wel plasmacellen aanwezig.

### *Nabeschoowing*

Zagen Gowans en Knight (1964) in de follikels van lymfeklier en milt geen doorstroming met gelabelde ductus thoracicus-lymphocyten, terwijl in onze proeven na een locale bestraling wel een influx op die plaatsen waargenomen werd, de gegevens van Gowans en

Knight inzake de thymus stemmen geheel overeen met de onze: zelfs na locale bestraling is er geen repletie vanuit de circulerende „pool” van lymphocyten. Evenmin als bij de totale bestraling kon hier achterhaald worden welke celsoort verantwoordelijk is voor het herstel van de lymphocytopoïese in de schors, tenzij de plasmacellen, die het orgaan onder deze omstandigheden binnenkomen, deze rol zouden kunnen vervullen. Het lijkt echter nauwelijks waarschijnlijk dat een cel met een „immunologisch verleden” als de plasmacel het uitgangspunt kan zijn voor de nieuwvorming van „virginale” lymphocyten. Er is praktisch geen verschil tussen het herstel van de thymus in totaal bestraalde dieren en na een locale bestraling, dit dus in tegenstelling tot het in milt en lymfeklier waargenomene; het pleit dus of voor een herstel vanuit in de thymus aanwezige cellen, of voor een medewerking van aangevoerde, radioresistente cellen.

Uit deze experimenten kan ook niet afgeleid worden welke „beenmergcel” (Ford en Micklem, 1963; Gengozian e.a., 1957) zich naar de thymus zou kunnen begeven; zowel de door ons overigens niet waargenomen kleine lymphocytachtige cellen van Dukor c.s. (1965) als de door ons wel opgemerkte plasmacellen zouden de beenmergcellen kunnen zijn, waarvan door voornoemde onderzoekers is aangetoond, dat deze verantwoordelijk zijn voor het thymusherstel. Het herstel van de röntgenschade bij een „radiologische thymectomie” leverde in de milt en lymfeklier beelden op, welke een grote gelijkenis vertonen met die, welke Parrott, de Sousa en East (1966) zagen als gevolg van een neonatale thymectomie: afwezigheid van lymphocyten in de p.a.l.s. en de centrale gedeelten van de lymphocytenvelden. Naast deze depletie in de “thymus-depedent areas” is er echter een volkomen normaal follikel-“outer-cortex”-systeem met follikelrandcellen; dit lijkt dus onafhankelijk van een cellulaire bijdrage van de thymus tot stand te kunnen komen. Het laatstgenoemde is ook het gebied, waarvan door Coopers c.s. (1965, e.v.) gesuggereerd is dat het afhankelijk zou zijn van een „Bursa-systeem”.

### 3. *Histologische gevolgen van een totale lichaamsbestraling met bescherming van de thymus (TSHS)*

Tegen de achtergrond van de tegenstrijdige meningen over de vraag of de in de thymus geproduceerde lymphocyttaire cellen het



orgaan al dan niet verlaten en om de wijze van emigratie na te gaan, werd totale lichaamsbestraling met thymusbescherming uitgevoerd. Twaalf uur na de bestraling is de beschermde thymus nog onveranderd op een geringe vermindering van het aantal lymphocyten in de schors na. Weer twaalf uur later heeft deze ontwikkeling zich echter voortgezet: verspreide reticulumcellen en capillairen worden zichtbaar tussen de in aantal afgenomen schorslymphocyten waardoor een vlekkelig aspect ontstaat. Van de 2e tot de 4e dag treedt er een aanzienlijke depletie in de schors op, het eerst in het centrale schorsgedeelte. Lymphocyten worden dan nog wel in een smalle band aan de peripherie, soms ook nog tegen het merg aan waargenomen (foto 23). Deze beelden suggereren een centripetale afvoer van

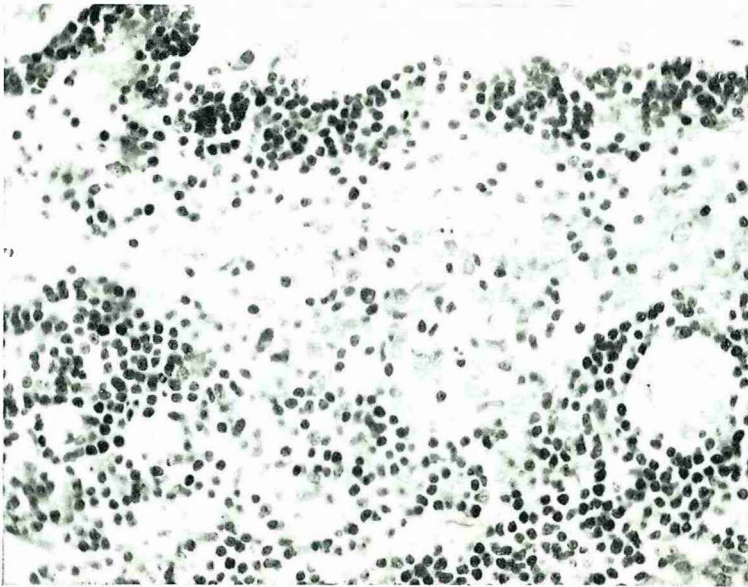


Foto 23.

Thymus, 2 dagen na totale lichaamsbestraling met thymusbescherming. „Leeglopende” schors met peripheer nog een smalle rand van lymphocyten. Vergr. 440 x.

schorslymphocyten. Het aantal kleine lymphocyten in het merg is in deze periode, waarin het aantal schorslymphocyten terugloopt, tijdelijk toegenomen; in de perivasculaire lymfhebanen worden veelvuldig



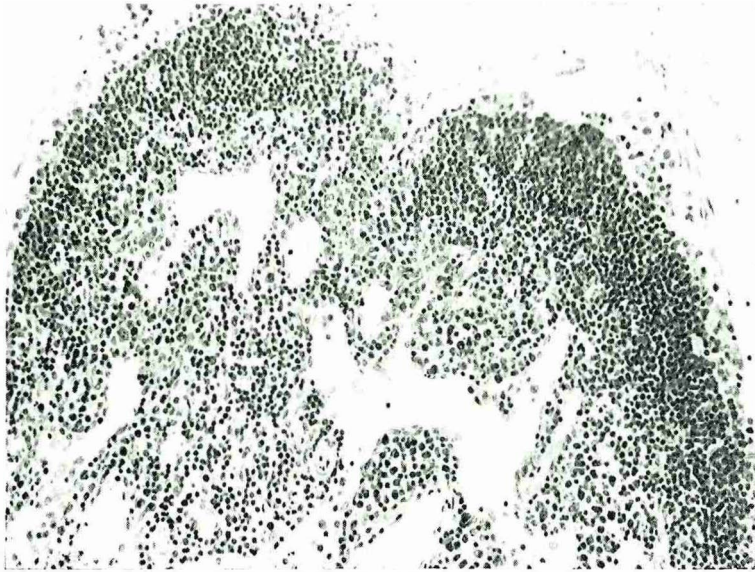


Foto 24.

Lymfeklier, 26 dagen na totale lichaamsbestraling, gevolgd door herhaalde thymusirradiatie. Lymphocytenrepletie en transformatie tot follikelrandcellen, uitsluitend in de buitenste schorszone. Vergr.: 170 x.

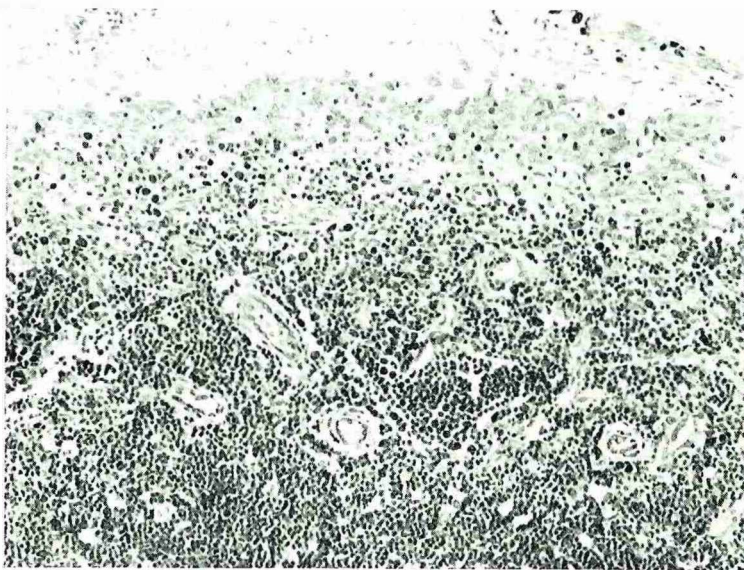


Foto 25.

Lymfeklier, 3 dagen na totale lichaamsbestraling met thymusbescherming. Lymphocytenrepletie centraal in lymfocytenveld; geen repletie in de buitenste schorszone. Vergr.: 170 x.

ophopingen van kleine lymphoïede cellen gezien. De vermindering van het aantal lymphocyten in de schors gaat niet gepaard met het optreden van celdegeneratie in dit gebied. Na de kennelijk door afvoer tot stand gekomen lymphocytendepletie van de schors treden dezelfde regeneratiebeelden op als na de locale en totale bestraling: plasmacellen, grote pyroninophile cellen met celdelingen en ten slotte ook weer kleine lymphocyten. In het merg worden met uitzondering van de tijdelijke verhoging van het aantal kleine lymphocyten, geen duidelijke veranderingen opgemerkt; celdelingen komen hier praktisch niet voor.

In de lymfeklier wordt bij de thymusshielding aanvankelijk de gebruikelijke schade waargenomen; na 1 à 2 dagen worden echter in de centrale gedeelten van de lymphocytenvelden rond de schorsvenulen aanzienlijke ophopingen van kleine lymphocyten gezien. De follikels en de buitenste veldrand zijn in deze phase nog opvallend leeg (foto 25). Het follikelherstel begint omstreeks de zevende dag, spoedig gevolgd door het herverschuiven van follikelrandcellen. In de milt lijkt de repletie vooral in de periarteriolaire lymphocytenschede op te treden; ook hier leidt de thymusshielding niet tot een vervroegd follikelherstel.

### *Nabeschouwing*

De vermindering van het aantal schorslymphocyten en het daaropvolgende verschijnen van deze cellen in het merg en in de "perivascular lymphatic channels" kan uitgelegd worden als een teken van een "outflow" langs deze weg (vergelijk Leblond en St. Marie, 1960). De depletie treedt zeer langzaam op; pas na twee dagen is het orgaan „leeggestroomd". Indien het orgaan gedepleteerd zou geraken ten gevolge van "stress" zou een veel sneller effect en een celdegeneratie waargenomen zijn.

Het spoedige, zij het partiële herstel van de lymfeklier en de milt in de vorm van de repletie van de lymphocytenvelden en p.a.l.s. (thymus-dependent areas) is in overeenstemming met de waarnemingen van Parrott, De Sousa en East (1966), verkregen door inspuiting van gelabelde thymocyten. Het ontbreken van een follikelrepletie kan natuurlijk een gevolg zijn van het te geringe aantal bloedlymphocyten, maar dit bedraagt op het dieptepunt nog altijd 33 % van de normale

waarde. Waarschijnlijker lijkt het dat het ontbreken van follikelherstel berust op de afhankelijkheid van lymphocyten van andere oorsprong. Deze gegevens vormen overigens een fraaie aanvulling op de bij de totale lichaamsbestraling met herhaalde locale thymusbestralingen beschreven beelden: in afwezigheid van een thymus juist een lymphocytendepletie in de na thymusshielding goed gevulde p.a.l.s. en lymphocytenvelden.

De niet in de lymphocytenrecirculatie opgenomen thymus lijkt dus niet alleen lymphocyten te produceren, maar deze cellen ook te kunnen afstaan en wel aan "thymus-dependent areas" in de perifere lymphoïede organen.

### C. Experimenten: Telling van het aantal bloedlymphocyten bij de thymusexperimenten; fig. 16

Een enkele gelocaliseerde bestraling van de thymus veroorzaakt een daling van het aantal bloedlymphocyten tot gemiddeld 53 % van het oorspronkelijke aantal. Dit percentage werd 24 uur na de bestraling aangetroffen; direct hierop begint reeds een herstel, zodat omstreeks de negende tot tiende dag de uitgangswaarde weer bereikt

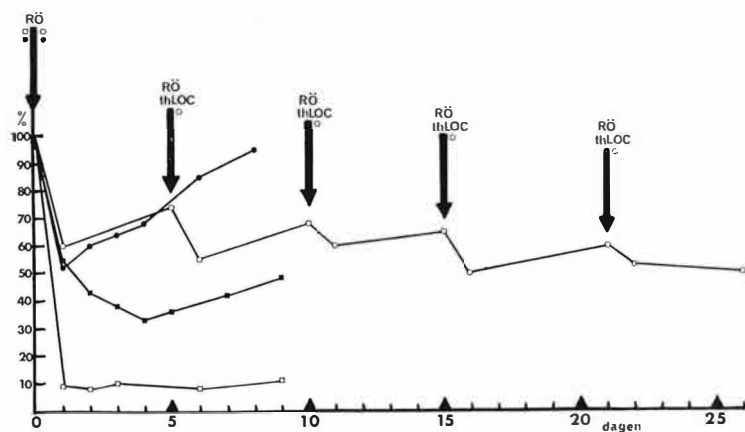


Fig. 16.

Verandering van het aantal bloedlymphocyten bij thymusexperimenten; de gemiddelde uitgangswaarde per experimentele groep = 100 %. a. ●—● Locale thymusbestraling. b. ○—○ Herhaalde locale thymusbestraling. c. □—□ Totale lichaamsbestraling. d. ■—■ Totale lichaamsbestraling met thymusbescherming.

is. De curve begint reeds weer te stijgen voordat van een redelijk histologisch herstel in de thymus sprake is. Herhaalde thymusbestraling (500 R om de 5-6 dagen) doet het aantal bloedlymphocyten ook niet verder dan  $\pm 50\%$  dalen; dit peil komt vrijwel overeen met hetgeen door Bierring (1960) en Metcalf (1960) gevonden werd na thymectomie (60 %).

Ook na een totale lichaamsbestraling met thymusshielding daalt het aantal circulerende lymphocyten in 24 uur tot ongeveer 50 % van de normale waarde. Daarna loopt het aantal langzaam verder terug tot 33 % waarop weer herstel volgt.

### *Nabeschuwing*

Door de thymusshielding daalt het aantal bloedlymphocyten veel minder sterk dan bij totale lichaamsbestraling, hetgeen in correlatie is met het „leeglopen” van de thymusschors; ook het herstel naar normale waarden is sneller en lijkt een weerspiegeling van het weer opgang komen van de lymphocytenvorming in de schors.

Uit onze waarnemingen mag geconcludeerd worden, dat onder de omstandigheden van dit experiment, totale bestraling met thymusshielding, waarbij de bestraling op zich een aanzienlijke vermindering van het aantal bloedlymphocyten veroorzaakt, de thymus lymphocyten afstaat aan het circulerend bloed en via het bloed aan de periphere lymphoïede organen. Het feit dat hierbij wel een depletie van de thymusschors optreedt, die onder normale omstandigheden niet waargenomen wordt, geeft aan dat dit proces, voorzover het ook bij het normale dier voorkomt, daar althans quantitatief een veel geringere omvang heeft.

### **D. Experimenten: Antilichaamvorming op paratyphus B-vaccin na röntgenbestralingen**

Daar de thymus niet duidelijk als filter opgenomen is in enige circulatie, de antigeenopname afwezig lijkt (Marshall en White, 1961) en in het algemeen in het orgaan ook geen antilichaamvorming plaats vindt, is het niet mogelijk de plaatselijke histologische veranderingen te vergelijken met het vermogen tot antilichaamvorming. De immunologische competentie zoals naar voren komend bij de thymus-experimenten zal dus afhankelijk zijn van hetgeen in andere lympho-



iede organen verandert als gevolg van de uitgevoerde behandeling van de thymus. Gezien de beschreven thymus-afhankelijkheid van de specifiek cellulaire reactie (Good c.s., 1962) zouden de bestralingsgevolgen het beste te testen zijn met behulp van de transplantatie-immuniteit of de delayed-type sensibilisatie; bij de in onze experimenten gebruikte stralendoses wordt de specifiek cellulaire reactie echter niet onderdrukt, zodat ook hier alleen het antilichaamvormend vermogen van het perifere lymfoïede systeem getoetst kan worden. Bij de beoordeling van de hier te verkrijgen resultaten moet in het oog gehouden worden, dat enkele lymfoïede organen in de thorax en enig beenmerg met de thymus bestraald respectievelijk beschermd worden.

1. *Antilichaamvorming bij locale thymusbestraling en bijbehorende experimenten*

- a. Locale thymusbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (THLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig. 17

Het orgaan waar onder normale omstandigheden de reactie op

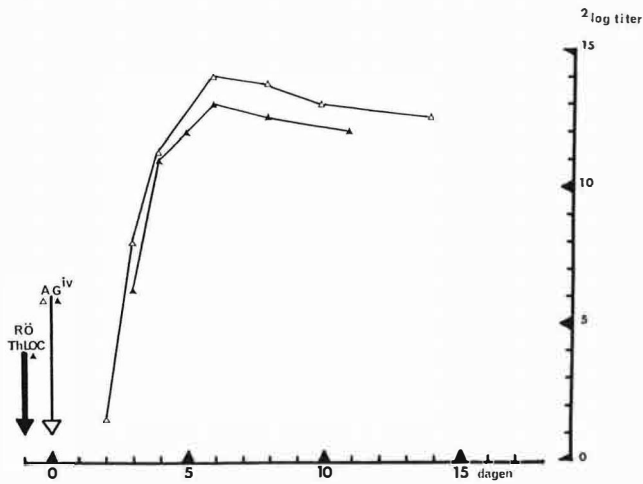


Fig. 17.

Verloop van de antilichaamtiter. a.  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$  Locale thymusbestraling, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (THLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren. b.  $\triangle$ - $\triangle$  AG<sup>iv</sup>-controle.



intraveneus toegediend antigeen plaatsvindt, de milt, lijkt evenals trouwens de meeste lymphoïede organen buiten de thymus niet beïnvloed door de thymusbestraling. Het is dan ook niet verwonderlijk dat de titercurve volkomen overeenkomt met die bij onbestraalde proefdieren.

- b. Totale lichaamsbestraling (500 R), daarna met intervallen van 6 dagen een drietal lokale thymusbestralingen (700R) en 24 uur na de laatste bestraling een intraveneuze injectie van het antigeen (RÖTOT-3x(6 dgn-ThLOC)-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig 18

Daar de aanwezigheid van de thymus juist noodzakelijk is voor het immunologisch herstel na lethale röntgenbestraling van een vol-

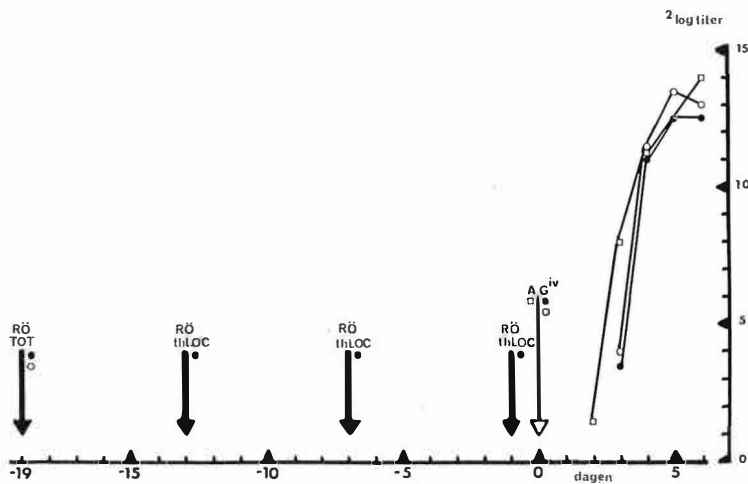


Fig. 18.

Verloop van de antilichaamtiter. a ●—● Totale lichaamsbestraling, met intervallen van 6 dagen een drietal lokale thymusbestralingen en 24 uur na de laatste daarvan intraveneuze antigeeninfectie (RÖTOT-6 dgn.-THLOC-6 dgn.-THLOC-6 dgn.-THLOC-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren. b. ○—○ Totale lichaamsbestraling, na 19 dagen gevolgd door intraveneuze antigeeninfectie (RÖTOT-19 dgn.-AG<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren. c. □—□ AG<sup>iv</sup>-controle.

wassen dier (Miller, 1962) werd een poging gedaan door herhaalde thymusbestraling de lymphocytvorming in de thymus tijdens de herstelfase uit te schakelen. Zeven dagen na de laatste bestraling, dat is 26 dagen na RÖTOT, werd geen intact thymusweefsel meer waargenomen.

Bij de antigeentoediening in deze proefopstelling, 19 dagen na de totale lichaamsbestraling, werd geen enkel effect van de herhaalde thymusbestraling gezien, noch ten opzichte van de onbestraalde proefdieren, noch bij vergelijking met dieren welke 19 dagen na een totale bestraling (zonder thymusirradiaties) een antigeeninjectie kregen: de drie curves zijn volledig gelijkvormig.

- c. Totale lichaamsbestraling (500R), na 19 dagen gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie (RÖTOT-19 dgn-AG<sup>iv</sup>); fig. 18

Negentien dagen na de bestraling heeft het vermogen tot antilichaamproductie zich volkomen hersteld.

### *Nabeschouwing*

Gezien het feit dat een thymectomie op volwassen leeftijd vrijwel geen directe nadelige gevolgen heeft voor het vermogen tot antilichaamvorming (Hamar, 1939; McLean c.s., 1957) is het niet verwonderlijk dat een locale thymusbestraling, waarbij alleen de schorslymphocyten en dan nog tijdelijk afwezig zijn, geen enkel effect heeft op de "antibody response".

Kon een volwassen dier na een lethale röntgenbestraling slechts een herstel van de antilichaamvorming laten zien in aanwezigheid van de thymus (Miller, 1962) of een thymusimplantaat (Leuchars c.s., 1965), herhaalde thymusbestralingen blijken het herstel van het vermogen tot antilichaamvorming na een sublethale bestraling niet te kunnen voorkomen. In de overige lymfoïede organen heeft zich dus het vermogen het antilichaamproductie hersteld zonder een cellulaire, maar mogelijk wel met een humorale bijdrage van de thymus. Dit lijkt niet in overeenstemming met de resultaten van de experimenten van Miller (1962) en Leuchars c.s. (1965); men moet echter bedenken dat deze onderzoekers een hogere totale bestraling toepasten en de thymus volkomen verwijderd hadden, terwijl hier slechts sprake is van een radiologische destructie, waarbij overigens 7 dagen na de laatste bestraling geen lymphocytair thymusweefsel werd aangetroffen. Het histologische beeld laat zien dat in onze experimenten het follikel-follikelrandcellen-systeem zich wel hersteld had (foto 24); uit de proeven van Miller en Leuchars is hierover niets bekend.

2. *Antilichaamvorming bij totale lichaamsbestraling met thymusbescherming*

- a. Totale lichaamsbestraling met thymusshielding, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeeninjectie (THSH-24 u-AG<sup>iv</sup>); fig. 19.

De histologische beelden en de tellingen van het aantal bloedlymphocyten wijzen erop dat de thymuslymphocyten hierbij het orgaan verlaten en waarschijnlijk in de lymphocytenvelden van de lymfeklier en in de p.a.l.s. terecht komen en niet in de folliculaire structuren.

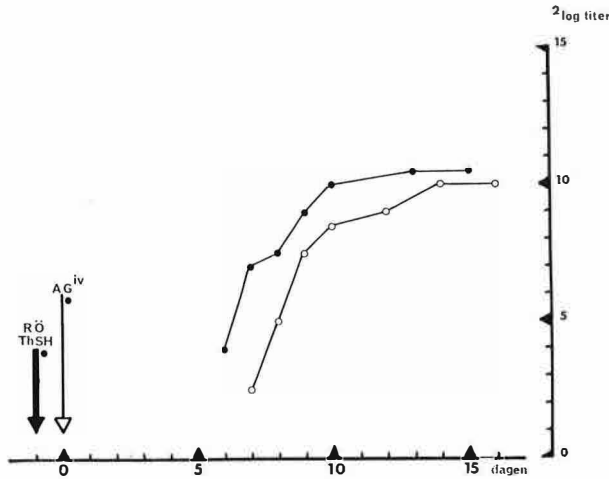


Fig. 19.

Verloop van de antilichaamtiter. a. ●● Totale lichaamsbestraling met thymusbescherming, na 24 uur gevolgd door intraveneuze antigeentoediening (THSH-24 u-AG<sup>iv</sup>); gem. van 2 dieren. b. ○○ LYKLSH-24 u-AG<sup>iv</sup>.

De lymfeklieren in de omgeving van de thymus, welke ook gespaard zijn bij de totale lichaamsbestraling met thymusshielding zouden eventueel verantwoordelijk gesteld kunnen worden voor een antilichaamproductie, welke waarschijnlijk overeenkomt met het waargenomen bij shielding van de popliteale lymfeklier met intraveneuze antigeentoediening. Het daarnaast beschermen van de thy-

mus met haar zeer talrijke en ook uitzwermende lymphocyten blijkt nauwelijks een verbetering van de antilichaamvorming te veroorzaken: de latente periode wordt met 1 dag verkort en de piektiter is iets hoger.

- b. Totale lichaamsbestraling met bescherming van de thymus, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeentoediening (THSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); fig. 20.

Het antigeen wordt hierbij aangeboden aan de lymfheklier, waarvan het eigen vermogen tot antilichaamvorming door de bestraling een aantal dagen afwezig zal zijn. In dit orgaan lijkt er echter een

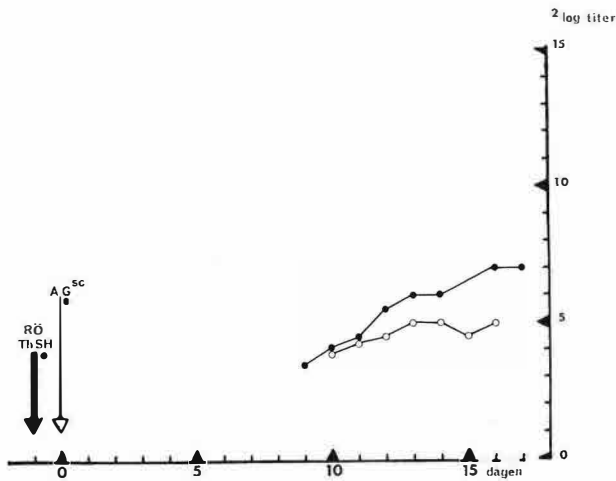


Fig. 20.

Verloop van de antilichaaftiter. a. ●—● Totale lichaamsbestraling met thymusbescherming, na 24 uur gevolgd door subcutane antigeeninfectie (THSH-24 u-AG<sup>sc</sup>); gem. van 2 dieren. b. ○—○ RÖTOT-24 u-AG<sup>sc</sup>.

aanzienlijke repopulatie met thymuscellen van de lymfheklier, zij het alleen van de lymphocytenvelden, te hebben plaatsgevonden. De titercurve wijkt echter vrijwel niet af van die bij een totale lichaamsbestraling: een latente periode van 9 dagen en ook een slechts geringe antilichaaftproductie.

### *Nabeschoowing*

De geringe invloed van de beschermde thymus op de antilichaamvorming kan fraai afgeleid worden uit het bij 2b verkregen resultaat: ondanks een repletie van de lymphocytenvelden, het redelijke aantal bloedlymphocyten (minimaal 33 % van de normale waarde), echter in afwezigheid van normale follikels, is de antilichaamproductie praktisch gelijk aan die bij een totale lichaamsbestraling. De cellen van de eveneens beschermde thoracale lymfeklieren vormen bij de intraveneuze antigeentoediening een complicerende factor: in vergelijking echter met de antilichaamvorming bij bescherming van de popliteale lymfeklier blijft ook hier weinig over om een invloed van de thymus aan te nemen.

Kon uit de experimenten met de „radiologische thymectomie” afgeleid worden dat voor het herstel van de “antibody-response” de aanwezigheid van de thymus niet nodig is, de experimenten met thymusshielding laten zien dat omgekeerd de intacte thymus geen duidelijke bijdrage levert voor het herstel van de antilichaamvorming. Het resultaat van deze experimenten lijkt niet in overeenstemming met die van Leuchars c.s. (1965), die in thymusloze, lethaal bestraalde proefdieren wel een goed herstel van de antilichaamvorming konden verkrijgen door implantatie van thymusweefsel. In onze experimenten is echter een sublethale bestraling toegepast, zodat slechts geconcludeerd kan worden, dat het herstel van de antilichaamvorming na een sublethale bestraling niet thymus-afhankelijk is. Nagegaan zou moeten worden of de thymus-afhankelijkheid bij lethale bestralingen berust op cellenleverantie van de thymus dan wel op een humorale factor. Zowel onze immunologische als histologische waarnemingen bij de totale lichaamsbestraling, gevolgd door herhaalde thymusirradiaties als de totale lichaamsbestraling met thymusbescherming lijken in overeenstemming met de door Cooper c.s. (1965, e.v.) beschreven afhankelijkheid van de antilichaamvorming én het follikelsysteem, niet van de thymus, maar van een “Bursa” of “Bursa-aequivalent”.



RECIRCULATIE EN TRANSFORMATIE VAN  
LYMPHOCYTEN, EEN NABESCHOUWING

De hier beschreven experimenten hebben een aantal nieuwe gegevens opgeleverd over de kleine lymphocyten. Het is noodzakelijk deze te toetsen aan hetgeen reeds bekend is over de recirculatie (Gowans, 1957), de levensduur van de kleine lymphocyten en de rol van deze cellen bij de immunologische reacties, in het bijzonder bij de antilichaamvorming.

De recirculatie van kleine lymphocyten manifesteert zich in onze experimenten als een influx van lymphocyten na een lokale bestraling en het bewegingspatroon van deze cellen in de bij een totale lichaamsbestraling beschermde lymfheklier of milt. Ook het normale histologische beeld van de lymfheklier toont overigens reeds verschijnselen van de recirculatie, zoals de celemigratie in de schorsvenulen en de klaarblijkelijke beweging van de cellen door de lymphocytenvelden naar de mergsinus; in de milt is normaliter weinig te zien van de doorstroming met lymphocyten.

In de lokaal bestraalde milt en lymfheklier was het meest opvallend de snelle repletie van de follikels met lymphocyten, reeds optredend tijdens het verval door de irradiatie van de aanwezige cellen. Daar deze terugkeer van lymphocyten niet gepaard gaat met celdelingen en het follikelherstel voorkomen kan worden door ook de overige lymphoïede organen te bestralen, kan met zekerheid aangenomen worden dat we hier te maken hebben met een aanvoer van van cellen. Bovendien werd vastgesteld, dat de lymphocyten niet via de afferente lymphebanen, maar direct vanuit de bloedbaan in de lymfheklier terecht komen. Deze waarnemingen lijken niet in overeenstemming met die van Gowans en Knight (1964), welke onderzoekers noch in de milt, noch in de lymfheklier een "homing" van de door hen intraveneus geïnjecteerde, gelabelde ductus thoracicus-lymphocyten in de follikels opgemerkt hebben. Dit zou natuurlijk

een gevolg kunnen zijn van een slechts geringe doorstroming met lymphocyten van dit gebied onder normale omstandigheden; de gelabelde cellen werden echter 4 dagen gevolgd en na een zo lang tijdsverloop zou men dan toch wel een enkele gelabelde cel in de follikels verwachten. Ook is het voorstelbaar dat de aanzienlijke aanvoer van lymphocyten naar de follikel na locale bestraling een direct bestralings-effect is; bij een totale lichaamsbestraling en nog duidelijker bij de thymusbescherming - waarbij vrij veel bloedlymphocyten aanwezig blijven - komt in de beginphase echter geen follikelrepletie tot stand.

De situatie zoals aanwezig bij de experimenten van Gowans en Knight (1964) verschilt evenwel op een ander, mogelijk zeer essentieel punt van die in onze onderzoeken: de proeven van Gowans en Knight betreffen namelijk uitsluitend de influx van ductus thoracicus-lymphocyten, welke voor tenminste 90 % tot de lang levende categorie behoren, terwijl in onze experimenten voor de influx bloedlymphocyten beschikbaar waren. Deze laatste celpopulatie bevat naast de lang levende cellen bovendien  $\pm$  40 % kort levende lymphocyten (Everett, 1964). Dit doet veronderstellen dat de opvallende follikelrepletie samenhangt met de aanwezigheid van deze kort levende lymphocyten. Dit zou betekenen dat de lang levende cellen niet in de follikels terecht zouden komen, maar zich juist naar de andere structuren in milt en lymfeklier, respectievelijk p.a.l.s. en lymphocytenveld begeven, terwijl de cellen van de snel proliferende "pool" daarentegen terecht zouden komen in de follikels. De waarnemingen van Fliedner c.s. (1964) met  $^3\text{H}$ -thymidine-toediening geven hiervoor helaas geen uitsluitel: indien deze follikellymphocyten al afkomstig zijn uit deze snel proliferende "pool" van bloedlymphocyten, eenmaal in de follikels aangekomen nemen zij na toediening van  $^3\text{H}$ -thymidine vrijwel geen label meer op (Fliedner c.s., 1964). Wel toonden deze laatste experimenten duidelijk aan dat de follikellymphocyten in ieder geval niet in de follikelcentra geproduceerd worden.

De thymusexperimenten geven op twee verschillende manieren nog informatie over de herkomst van de follikellymphocyten. Enerzijds werd bij een totale lichaamsbestraling gevolgd door herhaalde thymusbestralingen, een situatie waarbij de thymus als bron van lympho-

cyten tijdens het herstel van de röntgenshade is uitgeschakeld, wel een herstel van de follikels (en follikelrandcellen) gezien, maar de p.a.l.s. en lymphocytenvelden waren opvallend lymphocytenarm. Anderzijds was er in de proefdieren welke een totale lichaamsbestraling met thymusbescherming ondergingen, geen vervroegd herstel van de follikels ondanks het feit dat er een redelijk aantal bloedlymphocyten aanwezig was (50-30 %); in deze situatie is er echter juist wel een repletie van de p.a.l.s. en lymphocytenvelden met lymphocyten. Deze elkaar geheel aanvullende experimentele resultaten zijn in overeenstemming met de waarnemingen van Parrott, De Sousa en East (1966): in afwezigheid van een thymus (neonatale thymectomie) ontwikkelen zich wel de follikels en de "outer cortex", terwijl ingespoten thymuslymphocyten zich juist naar p.a.l.s. en lymphocytenvelden begeven, de "thymus-dependent areas".

Ook onze experimenten wijzen er dus op dat er naast de "thymus-dependent areas" - gebieden bevolkt met recirculerende, van de thymus afkomstige (lang levende) lymphocyten - een tweede systeem bestaat waartoe de follikels en de "outer cortex" van de lymfeklieren behoren. Dit laatste systeem lijkt overeen te komen met het door Cooper c.s. (1965 e.v.) beschreven "Bursa-dependent" deel van het lymfoïede weefsel. Door deze onderzoekers en Good (1962) wordt het "thymus-dependent" systeem verantwoordelijk geacht voor de specifiek cellulair immunologische reactie, het "Bursa-dependent" (vogels) of "Bursa-equivalent-dependent" systeem (zoogdieren) voor de antilichamvorming. Onze immunologische resultaten lijken ook deze opvatting te steunen. Bij totale bestraling met thymusbescherming werd ondanks een snelle repletie met lymphocyten van de lymphocytenvelden en p.a.l.s. geen vervroegd herstel gevonden van het vermogen tot antilichamvorming; bij een totale bestraling gevolgd door herhaalde thymusbestralingen herstelde zich het vermogen tot antilichamvorming normaal, ondanks de vertraagde repletie van de "thymus-dependent areas". Opgemerkt moet worden, dat uit onze experimenten niet valt af te leiden, welke structuur of orgaan met de Bursa Fabricii overeen zou komen.

De gevolgen van de locale bestralingen voor de p.a.l.s. en lymphocytenvelden van milt, resp. lymfeklier zijn veel minder opvallend dan die voor de follikels. Door de influx uit te schakelen

met behulp van bestralingen van de overige lymphoïede organen hebben we echter kunnen aantonen, dat bij een locale bestraling van de lymfheklier in de velden wel lymphocyten te gronde gaan, maar dat een zò snelle repletie optreedt, dat de schade in de lymphocytenvelden nauwelijks waargenomen wordt. Het is denkbaar, dat het gespaard blijven van de lymphocytenvelden bij een sublethale bestraling (van Buchem, 1962) op eenzelfde repletie vanuit de altijd nog wel voor een klein gedeelte gespaarde "pool" van lymphocyten tot stand komt. Voor de lymphocyten in de p.a.l.s. zou hetzelfde kunnen gelden, bewijzen hebben we hiervoor niet verkregen. Een verschil in röntgengevoeligheid tussen de lang levende lymphocyten in p.a.l.s. en lymphocytenveld en de follicellymphocyten is niet geheel uit te sluiten.

Uit de verdere ontwikkeling van de na de locale bestraling volgestroomde lymfheklier-, resp. miltfollikels kon afgeleid worden, dat uit de binnengekomen lymphocyten zich de zogenaamde follicelrandcellen ontwikkelen. Waren immers na een totale lichaamsbestraling pas na ongeveer een week weer follicelrandcellen aanwezig, in aansluiting op de influx van zo te zien uitsluitend kleine lymphocyten ontstonden deze cellen alweer na 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> tot 3 dagen. Men zou kunnen veronderstellen dat deze cellen op dit tijdstip alsnog van elders aangevoerd worden; bestraling van de overige lymphoïede organen (alleen bij het lymfheklieronderzoek uitgevoerd) 24 uur na de locale bestraling, dus aan het eind van de influx van kleine lymphocyten en vóór het follicelrandcellenherstel, vormde echter in het geheel geen belemmering voor het vervroegde herstel van de follicelrandcellen. Bovendien werden overgangscellen tussen lymphocyten en follicelrandcellen waargenomen in de periferie van de follicel. De conclusie lijkt gerechtvaardigd dat de follicelrandcellen uit follicellymphocyten voortkomen; de toediening van antigeen lijkt dit proces niet direct te bevorderen. Het is echter ook niet duidelijk welke invloeden de transformatie van lymphocyten tot follicelrandcellen dan wel beheersen. Voorzover ons bekend is de herkomst van de toch al zoveel aan de aandacht ontsnapte follicelrandcel niet eerder beschreven.

Wanneer de lymphocyten die na een locale bestraling de follikels weer gaan bevolken inderdaad afkomstig zijn van een „Bursa" of

“Bursa-equivalent” en mogelijk snel delende celpopulatie, zal dit ook ten aanzien van de follikelrandcellen moeten gelden. Overigens blijken beide celsoorten, eenmaal deel uitmakend van de follikels, niet meer het karakter van kort levende cellen te hebben: in de beschermde milt en lymfeklier werd geen celdegeneratie waargenomen. Ook het labelingspatroon van de follikellymphocyten in de experimenten van Fliedner c.s. (1964) wijst in deze richting.

De aanvoer van kleine lymphocyten betekent ook een herstel van de mogelijkheid tot follikelcentrumreactie. Kon in een totaal bestraald dier pas na ongeveer 2 weken weer een follikelcentrumreactie tot stand komen, bij een locale bestraling van milt of lymfeklier - dus na een influx - kan een antigeentoediening reeds op de vijfde dag weer blasten in het follikelcentrum doen ontstaan. Voor de lymfeklier kon ook weer vastgesteld worden dat dit vermogen in de eerste 24 uur, dus door of tijdens de aanvoer van kleine lymphocyten herkregeen werd. De grote polymorphie van de cellen in het follikelcentrum maakt dat eventuele overgangscellen tussen lymphocyten en blast-cellen minder goed naar voren komen. Een influx als zodanig is overigens geen noodzakelijke voorwaarde tot het ontstaan van een follikelcentrumreactie: bij milt- en lymfeklierbescherming ontstaan in afwezigheid van een celaanvoer op het gebruikelijke tijdstip follikelcentrumreacties. Onze resultaten en die van Fliedner c.s. (1964) lijken er tezamen op te wijzen, dat onder invloed van een antigene prikkel uit de follikellymphocyten de snel prolifererende celpopulatie van de (re)actieve follikelcentrumreactie voortkomt. Indien hieruit weer “memory cells” ontstaan (Thorbecke c.s., 1964) zullen deze laatste op grond van hun functie vrij zeker tot de lang levende groep behoren. De follikelcentrumreactie zelf lijkt op deze wijze - zij het indirect - voort te komen uit de groep van kort levende bloedlymphocyten. Ook de follikelcentrumreactie moet op grond van deze gegevens gerekend worden tot het „Bursa-afhankelijke systeem”.

De bescherming van milt of lymfeklier bij een totale lichaamsbestraling leverde op zich zelf geen aanwijzingen op voor het concept van de recirculatie. De beschermde lymfeklier vertoonde nauwelijks een lymphocytendepletie in velden en follikels; bij de milt kwam uit de vermindering van het aantal lymphocyten in follikels



en p.a.l.s. en het tegelijk daarmee optreden van respectievelijk follikelrandcellen en een plasmacellulaire reactie slechts de suggestie naar voren van een transformatie van lymphocyten in deze beide laatstgenoemde celsoorten.

Hiervoor werd er reeds op gewezen dat thymusbescherming tijdens een totale bestraling geen versneld follikelherstel kan teweegbrengen, doch vrij zeker wel een versnelde repletie van p.a.l.s. en lymphocytenveld. Het langzaam en zonder celverval optreden van een lymphocytendepletie in de thymusschors en de slechts beperkte reductie van het aantal bloedlymphocyten wijzen er op, dat thymuscellen onder deze omstandigheden wel in circulatie komen. Het feit dat deze afvoer van de thymuslymphocyten gepaard gaat met een depletie in de thymus, terwijl een zo lege thymuscortex onder normale omstandigheden nooit waargenomen wordt, is op zich zelf in overeenstemming met de opvatting van Metcalf (1966) en Ford (1966), dat onder normale omstandigheden slechts een beperkt aantal cellen de thymus verlaten. Het is overigens niet duidelijk onder welke invloed de thymus in onze experimenten „leegloopt”.

Na locale bestraling van de thymus wordt niet een snelle repletie met lymphocyten vanuit de bloedbaan gevonden zoals bij de lymfieklier en de milt. De thymus blijkt dus inderdaad niet opgenomen te zijn in de recirculatie van de lymphocyten, noch van de categorie die de lymphocytenvelden resp. de p.a.l.s. bevolken, noch van de categorie die voor het follikelherstel verantwoordelijk is. Ook een influx van lymphocyten of “small-lymphocyte-like cells” zoals Dukor c.s. (1965) o.a. na bestraling vonden, hebben wij niet opgemerkt; kleine lymphocyten verschijnen pas nadat in de schors blastcellen en celdelingen waargenomen zijn. De volgens Ford (1966) uit het beenmerg afkomstige cellen die in de thymus uitgangspunt voor de lymphocytenproductie zouden zijn, zijn door ons niet geïdentificeerd, tenzij het de plasmacellen zijn die gedurende de eerste dagen na een bestraling (locaal of totaal) de thymus lijken binnen te komen.

De aanvoer van kleine lymphocyten zoals waargenomen na een locale bestraling van milt of lymfieklier leidt niet alleen tot een histologisch herstel van de organen, maar betekent ook een herstel

van het vermogen tot antilichaamvorming in milt of lymfeklier. Dit immunologisch herstel komt vooral tot uitdrukking indien de antilichaamproductie in het lokaal bestraalde - en dus gerepleteerde - orgaan vergeleken wordt met de situatie na een totale lichaamsbestraling waar geen of nauwelijks een aanvoer van lymfocyten tot stand zal komen en de antilichaamvorming ook sterk gereduceerd is. Het is verder zelfs zo, dat een „overvulde” lymfeklier na een lokale bestraling tot een betere antilichaamvorming in staat is dan het normale, onbestraalde orgaan. Het immunologisch herstel van de milt na de lokale bestraling is kwantitatief geringer dan in de lymfeklier, mogelijk doordat bij de miltbestraling meer lymfoïed weefsel aan de bestraling wordt blootgesteld.

Na een totale röntgenbestraling met bescherming van lymfeklier of milt is een influx van cellen in het beschermde orgaan vrijwel geheel uitgeschakeld. In vergelijking met de niet-bestraalde controledieren blijkt dit in de lymfeklier en in iets mindere mate ook in de milt te leiden tot een afname van het vermogen tot antilichaamvorming. Hierbij gaan wij er van uit, dat in de controledieren na subcutane toediening van het gebruikte antigeen, resp. na intraveneuze toediening gevolgd door passieve immunisatie, de antilichaamvorming tot de lymfeklier resp. milt beperkt blijft.

Uit het herstel van de immunologische competentie door aanvoer van lymfocyten en het verlies hiervan bij het ontbreken van deze aanvoer komt duidelijk naar voren, dat beide organen voor een handhaven van het vermogen tot antilichaamvorming afhankelijk zijn van via het bloed aangevoerde lymfocyten; het is echter nog niet zonder meer duidelijk welke lymfocytencategorie - kort levende of lang levende - verantwoordelijk is voor het herstel.

MacGregor en Gowans (1963) konden een sterke reductie van het vermogen tot antilichaamvorming verkrijgen door een 5 dagen durende canulering van de ductus thoracicus, waarbij voornamelijk recirculerende, lang levende cellen onttrokken werden aan het proefdier; omgekeerd konden zij het vermogen tot antilichaamvorming weer herstellen door ductus thoracicus-lymfocyten - en dus weer voornamelijk lang levende cellen - terug te geven aan het proefdier. De kort levende cellen zullen bij deze gedepleteerde dieren door de snelle proliferatie van de uitgangscelpopulatie echter ongetwijfeld aanwezig blijven (zie ook Caffrey c.s., 1962), terwijl het waarschijn-

lijk is dat de mogelijk uit de kort levende lymphocyten voortkomende follicelrandcellen met hun lange levensduur (vergelijk miltshielding) zich tijdens de canulering hebben gehandhaafd. Het ziet er dus naar uit, dat in de experimenten van McGregor en Gowans de lang levende cellen voor de antilichaamproductie na de canulering de beperkende, en na de teruggave van de cellen de voor het herstel verantwoordelijke factor vormen. In onze experimenten is de situatie een geheel andere: voor het herstel van de immunologische competentie in de lokaal bestraalde lymfeklier of milt kunnen zowel de aangevoerde lang levende als de kort levende bloedlymphocyten verantwoordelijk zijn. Uit de histologische experimenten werd afgeleid dat de lang levende, recirculerende en uit de thymus afkomstige cellen zich naar de lymphocytenvelden van de lymfeklier en de p.a.l.s. van de milt begeven, terwijl de tweede groep van lymphocyten - mogelijk kort levende en niet thymus-afhankelijke - de follicels en de outer cortex van de lymfeklier bevolken. Uit de correlatie tussen deze structuren en het vermogen tot antilichaamproductie zou mogelijk kunnen blijken, welke lymphocytencategorie verantwoordelijk is voor het immunologisch herstel.

Daar bij onze experimenten slechts sublethale bestralingsdoses toegepast werden, was de destructie van de lang levende lymphocyten - onder meer aanwezig in lymphocytenvelden en p.a.l.s. - beperkt. Er zijn echter een aantal gegevens welke erop wijzen dat de toestand van deze structuren met recirculerende, lang levende cellen niet direct correleert met het vermogen tot antilichaamvorming. Zo is 24 uur na een sublethale totale lichaamsbestraling het vermogen tot antilichaamproductie tijdelijk geheel onderdrukt, terwijl voldoende lang levende lymphocyten beschikbaar zijn om na een huidtransplantaat in de lymfeklier een groei van de lymphocytenvelden en een transplantatiereactie mogelijk te maken (Micklem en Brown, 1961; Keuning, 1965). Verder is er na een totale lichaamsbestraling met thymusbescherming een aanzienlijke aanvoer van lymphocyten - thymuslymphocyten en dus vrij zeker lang levende - naar p.a.l.s. en lymphocytenvelden, maar dit betekent nauwelijks een herstel van de antilichaamproductie.

Ook in de beschermde lymfeklier is ondanks de redelijke cel-dichtheid in de lymphocytenvelden een lage en teruglopende antilichaamproductie waargenomen. Omgekeerd is reeds bij een beperkt

aantal lymphocyten in p.a.l.s. of lymphocytenveld, zoals na een totale bestraling met miltbescherming of bij een totale lichaamsbestraling gevolgd door herhaalde thymusirradiaties, nog een vrij goede tot zelfs normale antilichaamvorming mogelijk.

Al deze gegevens wijzen er dus op dat de aanwezigheid van de recirculerende, lang levende cellen in de ook in onze experimenten als "thymus-dependent areas" naar voren komende gebieden niet de enige voorwaarde is voor het tot stand komen van een antilichaamvorming. Dit is in overeenstemming met de waarnemingen van Good en medewerkers (1962) waarbij aangetoond werd dat de antilichaamvorming slechts in beperkte mate thymus-afhankelijk is. Wij zijn verder van mening, dat in de canuleringsexperimenten van McGregor en Gowans (1963) en in die proeven van Gallily en Feldman (1967) met macrophagen, waarbij een zeer hoge (900R) bestralingsdosis gegeven werd, deze lang levende lymphocyten wel de beperkende factor geweest zullen zijn.

De gegevens, welke wij verkregen hebben over de relatie tussen follikels en antilichaamvorming zijn veel duidelijker, omdat enerzijds onze bestralingsdoses een totale destructie van de follikels veroorzaakt en anderzijds de influx ook hier juist het best waargenomen kan worden.

Tegenover de situatie bij een totale lichaamsbestraling, waarbij zowel de antilichaamproductie als de follikels ernstige schade ondervinden staan de waarnemingen bij locale milt- of lymfeklierbestraling: een duidelijk follikelherstel en ook een herstel van het vermogen tot antilichaamvorming. Ook bij de totale lichaamsbestraling gevolgd door herhaalde thymusirradiaties, waarbij naast de lege "thymus-dependent areas" goed ontwikkelde follikels en een normale "outer cortex" bestaan, kan een normale antilichaamproductie tot stand komen. Het lijkt er dus op dat de aanvoer van lymphocyten naar de follikels - en de "outer cortex" - een voorwaarde vormt, welke van wezenlijk belang is voor de antilichaamvorming.

Eerder in dit hoofdstuk werd reeds opgemerkt dat het mogelijk de kort levende categorie van bloedlymphocyten is welke de follikels gaan bevolken en het lijkt er dus op dat het deze cellen zijn, welke een rol vervullen bij het tot stand komen van de antilichaamproductie. Konden wij slechts aantonen dat de follikels - en de "outer cortex" van de lymfeklier - niet afhankelijk zijn van een cellulaire

bijdrage van de thymus, Cooper c.s. (1965) hadden reeds vastgesteld dat niet alleen het tot stand komen van follikels na een totale bestraling afhankelijk is van de aanwezigheid van een Bursa van Fabricius (vogels) of enkele lymfhoïede organen langs de tractus digestivus (zoogdieren), maar dat ook het vermogen tot antilichaamvorming hier direct mee samenhangt. Het lijkt buiten twijfel dat bij de experimenten van McGregor en Gowans (1963) dit Bursa-afhankelijk systeem in voldoende mate aanwezig was na de lymfocyten-depletie door de canulering.

De bloedlymfocyten welke zich naar de follikels begeven, zouden hetzij als lymfocyten, hetzij als een daaruit ontstane celsoort (follikelrandcel of cel van het follikelcentrum) medewerking kunnen verlenen bij het tot stand komen van de antilichaamproductie. Daar hier uitsluitend de "primary response" onderzocht is en aangenomen wordt (Thorbecke c.s., 1964), dat de follikelcentrumreactie vooral van belang is voor de "secondary response", zullen we de verschijnselen in het follikelcentrum hier buiten beschouwing laten. De in onze experimenten verkregen gegevens over de aanwezigheid of het tijdstip van ontstaan van de follikellymfocyten en van de follikelrandcellen zijn tezamen met de antilichaamproductie en de hierbij in een aantal gevallen optredende vertraging opgenomen in het schema op pagina 138.

De aanwezigheid van follikellymfocyten lijkt beter te correleren met het vermogen tot antilichaamvorming dan de aanwezigheid van lymfocyten in p.a.l.s. of lymfocytenveld. In alle situaties waarin lymfocyten in de follikels aanwezig zijn op het ogenblik van de antigeentoeediening (AG-controle, LYKLLOC-24u-LYKLSH, MILTLOC en LYKLSH) is vrij snel een antilichaamvorming mogelijk; omgekeerd is bij de experimenten waarbij zich aanvankelijk (de eerste 6 dagen) geen lymfocyten in de follikels bevinden, een daarmee vergelijkbare verlenging van de latente periode geconstateerd (RÖTOT, THSH). Er zijn echter ook enkele waarnemingen waarbij geen *directe* correlatie tussen de aanwezigheid van follikellymfocyten en de antilichaamvorming bestaat: na de gecombineerde lymfeklierbestraling (LYKLLOC-24u-LYKLSH) en 24 uur na de locale miltbestraling (MILTLOC-24u-AG<sup>iv</sup>-12u-AL<sup>iv</sup>) zijn er weliswaar voldoende lymfocyten in de follikels - zelfs meer dan in de



Experiment	Antilichaam- vorming in de eerste dagen	Vertraging van de antilichaamvorming	Aanwezigheid van follikel lymphocyten op het tijdstip van AG-toediening	Tijdsverloop tussen AG-injectie en het verschijnen van follikel lymphocyten	Aanwezigheid van follikelrandcellen op het tijdstip van AG-toediening	Tijdsverloop tussen AG-injectie en het verschijnen van follikelrandcellen
AG-controle	+	0	+	0	+	0
RÖTOT-24 u-AG <sup>iv</sup>	—	7 dagen	—	± 7 dagen	—	± 7 dagen
RÖTOT-24 u-AG <sup>sc</sup>	—	6 dagen	—	± 6 dagen	—	± 8 dagen
LYKLLOC-24 u-LYKLSH-24 u-AG <sup>sc</sup>	+	± 1 dag	++	0	—	1-2 dagen
MILTLOC-1 dag-AG <sup>iv</sup> -12 u-AL <sup>iv</sup>	+	1-2 dagen	++	0	—	± 1 dag
MILTLOC-3 dgn.-AG <sup>iv</sup> -12 u-AL <sup>iv</sup>	+	0	+	0	+	0
MILTLOC-5 dgn.-AG <sup>iv</sup> -12 u-AL <sup>iv</sup>	+	0	+	0	+	0
MILTLOC-10 dgn.-AG <sup>iv</sup> -12 u-AL <sup>iv</sup>	+	0	+	0	+	0
LYKLSH-24 u/72 u-AG <sup>sc</sup>	+	0	+	0	+	0
THSH-24 u-AG <sup>sc</sup>	—	5 dagen	—	± 6 dagen	—	± 7 dagen
MILTSH-24 u-AG <sup>iv</sup> -12 u-AL <sup>iv</sup>	+	0	— <sup>*)</sup>	? <sup>*)</sup>	++	0
RÖTOT-3xTHLOC-24 -AG <sup>iv</sup>	+	0	— <sup>*)</sup>	? <sup>*)</sup>	+	0

\*) In deze follikels zijn alleen in de centra nog enkele lymphocyten aanwezig; het terugkeren van de follikelkranslymphocyten is door ons niet waargenomen.

normale toestand - maar de antilichaamvorming is niettemin 1 à 2 dagen vertraagd. Ook bij MILTSH en RÖTOT-3x (THLOC) bestaat er een discongruentie: ondanks zeer lymphocytenarme follikels (met echter veel follikelrandcellen) is er toch een redelijke tot normale antilichaamvorming.

Een *directe* correlatie lijkt wel te bestaan tussen de aanwezigheid, respectievelijk de terugkeer van de uit de follikellymphocyten voortkomende follikelrandcellen en het herstel van het vermogen tot antilichaamvorming. In die gevallen waarbij follikelrandcellen aanwezig zijn in het antilichaamvormend orgaan ten tijde van de antigeeninjectie (AG-controle, MILTLOC-3, 5 of 10 dagen -AG, LYKLSH en ook bij MILTSH en RÖTOT-3x (THLOC) is praktisch zonder vertraging een antilichaamvorming waargenomen. Zijn er géén follikelrandcellen op het ogenblik van de antigeentoediening dan treedt een vertraging van de antilichaamvorming op, die vrij nauwkeurig blijkt te corresponderen met het tijdsverloop tussen de antigeeninjectie en het herverschuiven van de follikelrandcellen (RÖTOT, THSH, en ook bij LYKLLOC-24u-LYKLSH en MILTLOC-1 dag-AG<sup>iv</sup>-12u-AL<sup>iv</sup>).

Ondanks de klaarblijkelijke correlatie tussen de aanwezigheid van follikelrandcellen en het vermogen tot antilichaamvorming blijkt er echter geen samenhang te bestaan tussen de *hoeveelheid* follikelrandcellen - overigens een moeilijk te schatten grootte - en de *mate* van antilichaamvorming. Zo is er in de dagen na een locale miltbestraling (MILTLOC-1, 3, 5 en 10 dagen -AG) wel een voortdurende toename van het vermogen tot antilichaamproductie in de milt ( $\pm$  verdubbeling per periode van 2 tot 5 dagen), maar daarbij wordt niet een overeenkomstige vermeerdering van het aantal follikelrandcellen gevonden. Ook loopt het vermogen tot antilichaamvorming in de beschermde lymfeklier (LYKLSH-1, 2 of 3 dagen-AG) terug zonder zichtbare reductie van het aantal follikelrandcellen en tenslotte vertoont de beschermde milt (MILTSH) met de zeer talrijke follikelrandcellen een weliswaar redelijke, maar toch verminderde antilichaamproductie.

Samenvattend suggereren onze experimenten dat de aanwezigheid van de follikelrandcellen een belangrijke voorwaarde is voor het tot stand komen van een antilichaamvorming. Dit sluit aan bij de gegevens van Nossal en medewerkers (1965, 1966) betreffende de

primaire "antigen trapping" welke deze onderzoekers waargenomen hebben in de follicelrandzone van de milt, de periferie van de follicels en de "outer cortex" van de lymfheklier. Op deze laatste localisaties hebben de genoemde onderzoekers de follicelrandcellen overigens niet herkend. De conclusie lijkt gerechtvaardigd, dat de follicelrandcel verantwoordelijk is voor deze "antigen trapping" en als zodanig een voorwaarde vormt voor het tot stand komen van de antilichaamvorming. Het door de follicelrandcellen geproduceerde glycoproteïne zou verantwoordelijk kunnen zijn voor de vorming van extracellulair gelegen antigeen-aggregaten, welke nodig zouden kunnen zijn om het inductieproces van de antilichaamvorming in te leiden. De follicelrandcellen bevinden zich verder op localisaties die blijkens de experimenten van Cooper c.s. (1965 e.v.) en van Parrott, de Sousa en East (1966) als niet-thymus-afhankelijk beschouwd moeten worden en in bepaalde omstandigheden afhankelijk zouden zijn van een Bursa Fabricii of een "Bursa-equivalent"; ook in verband hiermee mag een relatie met de antilichaamvorming verwacht worden (vgl. Cooper c.s. 1965, 1966). In overeenstemming daarmee bleken in onze experimenten de follicelrandcellen niet uit de thymus afkomstig te zijn; een herkomst uit een Bursa of "Bursa-equivalent" hebben wij overigens niet kunnen achterhalen.

Bij de experimenten van Ford, Gowans en McCullagh (1966) en ook bij de proeven van Gallily en Feldman (1967) zijn geen gegevens vermeld over de eventuele aanwezigheid van follicelrandcellen, maar aangenomen mag worden dat ze althans in de lymfoïede organen van het receptordier na de bestraling volledig afwezig zullen zijn. Het lijkt voorstelbaar dat onder normale omstandigheden zowel follicelrandcellen als macrophagen nodig zijn om de „instructie" (Gallily en Feldman, 1967) door te geven aan de lymfocyten. In onze experimenten hebben macrophagen zich echter nooit duidelijk gemanifesteerd in het histologisch beeld, terwijl omgekeerd in de experimenten van Ford, Gowans en McCullagh en die van Gallily en Feldman de follicelrandcellen waarschijnlijk ontbroken zullen hebben, daar immers het proefdier waarin de antilichaamvorming opgewekt wordt, een sublethale bestraling ondergaan heeft. Hierbij moet opgemerkt worden dat het op zich zelf mogelijk zou kunnen zijn dat in de experimentele situatie van Gallily c.s. en Ford c.s. een geheel ander mechanisme de antilichaamvorming inleidt dan bij

de normale histofysiologie van dit proces en dat deze laatste waarschijnlijk in onze experimenten dichter benaderd wordt. Indien men beide celsoorten met elkaar gaat vergelijken, blijken op een drietal punten gelijkenissen maar tegelijk ook weer discrepanties te bestaan. In de eerste plaats wordt van beide celsoorten gepostuleerd dat ze betrokken zijn bij de primaire verwerking van het antigeen; de "antigen trapping" in de follikelrandcellen ("dendritic macrophages") blijft echter volgens Nossal extracellulair, terwijl bij de macrophagen de suggestie gewekt wordt (Fishman en Adler, 1963; Ford c.s., 1966) dat hierbij een fagocytose van het antigeen plaatsvindt. In de tweede plaats zouden beide cellen verantwoordelijk gesteld kunnen worden voor de röntgengevoeligheid van de antilichaamvorming bij sublethale bestraling; de macrophaag wordt daarbij echter slechts in functioneel opzicht uitgeschakeld (Gallily en Feldman, 1967), terwijl de follikelrandcellen door de bestraling in interphase te grond gaan. Tenslotte kan de herkomst van de follikelrandcellen en de macrophagen vergeleken worden. De experimenten van Volkman (1966) lieten daarbij zien, dat de buikholte-macrophagen voortkomen uit een snel prolifererende celpopulatie van het beenmerg, en mogelijk via een korter of langer rijpingsproces ontstaan uit cellen die als kort levende lymphocyten met de bloedbaan worden aangevoerd. In onze experimenten is het vrij zeker dat de follikelrandcellen voortkomen uit bloedlymphocyten; een afdoend bewijs dat deze lymphocyten in het bloed tot de kort levende categorie behoren en uit het beenmerg komen, ontbreekt vooralsnog, al wijzen onze proeven er wel op dat ze niet uit de lang levende, "thymus-derived" lymphocyten voortkomen. Meer zekerheid over de functie van de follikelrandcel bij de antilichaamvorming moet verkregen kunnen worden door deze cel op een zelfde wijze experimenteel te toetsen als door Gallily en Feldman met de macrophagen is uitgevoerd.

Uit de experimenten van Gallily en Feldman (1967) komt verder naar voren hoe de informatie door de macrophagen doorgegeven wordt aan een tweede celsoort, een lymphocyt die zonder medewerking van een macrophaag niet op antigeen zou kunnen reageren met een "antibody response" en verder pas bij 900R zover beschadigd is, dat ook een macrophaag geen antilichaamvorming meer tot stand kan doen komen. Ook de proeven van Ford, Gowans en

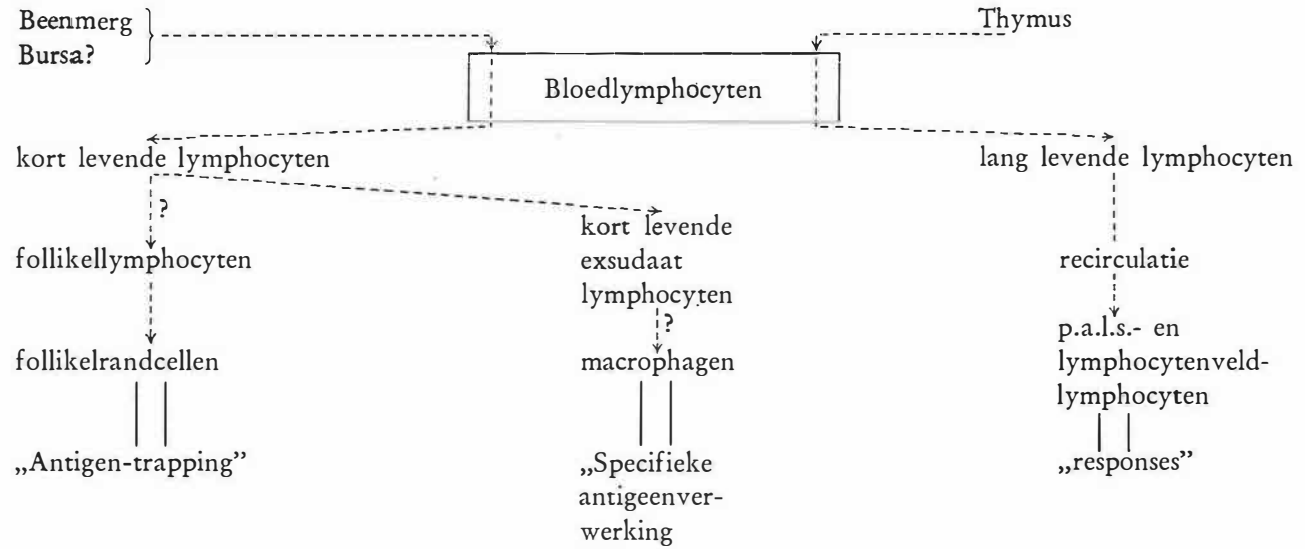
McCullagh (1966) tonen aan dat de lymphocyten - en wel lang levende, recirculerende - naast de macrophagen nodig zijn voor het proces van de antilichaamvorming. In onze histologische experimenten bleven na sublethale bestraling nog steeds lymphocyten aanwezig in p.a.l.s. en lymphocytenvelden, plaatsen waar recirculerende lang levende cellen aanwezig zijn en welke thymus-afhankelijk zijn (vgl. Good c.s., 1962; Parrott, de Sousa en East, 1966). Tenslotte geven ook de proeven van McGregor en Gowans (1963) nog informatie over de rol van deze lang levende lymphocyten: door de in deze experimenten toegepaste langdurige drainage van de ductus thoracicus zal een tekort ontstaan veeleer aan de categorie van recirculerende, lang levende lymphocyten dan aan de macrophagen en follikelrandcellen. De eerste en mogelijk ook de tweede komen immers voort uit een snel prolifererende celpopulatie en van de tweede is gebleken dat ze lang in de lymphoïede organen kunnen achterblijven. Het lijkt dus waarschijnlijk dat na de drainage van de ductus thoracicus de eerstgenoemde celgroep de begrenzendende factor geweest is. In onze immunologische experimenten is de toegepaste röntgenbestraling steeds onvoldoende geweest om deze tweede celpopulatie geheel uit te schakelen; het voorkomen van lymphocyten in p.a.l.s. of lymphocytenveld en het vermogen tot antilichaamvorming bleken dan ook nauwelijks met elkaar te correleren (zie pag. 135). Slechts de histologische beelden na de gecombineerde bestraling van de lymfeklier (LYKLLOC-LYKLSH of vice versa) lieten zien dat bij een dosering van ongeveer 750R in de gebieden waar deze lang levende lymphocyten voorkomen de destructie veel groter is dan bij een totale bestraling van 500R. Dit is dan in overeenstemming met de resultaten van Gallily en Feldman (1967). De experimenten waarbij slechts zeer weinig lymphocyten aanwezig zijn in p.a.l.s. of lymphocytenveld (MILTSH en RÖTOT-3x(THLOC) lieten overigens zien dat maar weinig cellen op deze plaats nodig zijn om een goede plasmacellulaire reactie en een redelijke tot normale antilichaamvorming te verkrijgen. De localisatie van de plasmacellulaire reactie in de p.a.l.s. van de milt zou ook nog een argument kunnen zijn voor de rol van deze lymphocyt; dit proces begint immers op een plaats waar vrijwel uitsluitend kleine lymphocyten voorkomen en geen follikelrandcellen. De situatie in de lymfeklier is in dezen minder duidelijk. Het is verder vooralsnog niet duidelijk op welke wijze de



interactie van macrophaag respectievelijk follikelrandcel en de recirculerende lymphocyten tot stand komt; reeds genoemd werd de mogelijkheid, dat het door de follikelrandcellen geproduceerde glycoproteïne hierbij een rol zou spelen of dat de macrophagen een "messenger-RNA" (Fishman en Adler, 1963) doorgeven aan de lymphocyten.

Ten aanzien van de specifiek cellulaire reactie bestaan voldoende gegevens (Good c.s., 1962; Gowans en medewerkers, 1962, 1963; Oort en Turk, 1965; Parrott c.s. 1966) dat het de uit de thymus afkomstige, recirculerende en dus lang levende lymphocyten zijn, welke het uitgangspunt vormen voor deze vorm van immuniteit; op grond van de bestralingsproeven - geen onderdrukking van de specifiek cellulaire reactie door sublethale bestraling - kan aangenomen worden dat een samenwerking met de stralengevoelige macrophagen c.q. follikelrandcellen hierbij in ieder geval niet nodig is. De localisatie van de specifiek cellulaire reactie lijkt ook in het geheel geen relatie te vertonen met de gebieden waar follikelrandcellen aanwezig zijn. De uit deze gegevens voortvloeiende hypothesen over de rol van lymphocyten, follikelrandcellen en macrophagen in de immunologische reacties zijn op de volgende pagina's samengevat.

Hypothesen over de immunologische reacties



De immunologische reacties zouden verder als volgt weergegeven kunnen worden:

- a. Antigeen  $\longrightarrow$  lang levende lymphocyten  $\rightarrow$  S. C. R.  $\rightarrow$  "committed lymphocytes"
- b. Antigeen  $\longrightarrow$  (Follikelrandcel + lang levende lymphocyten)  $\longrightarrow$  P. C. R.  $\longrightarrow$  antilichaam

Door Gowans c.s. (1962, 1963) is vastgesteld dat de immuno-competente cel voor de specifiek cellulaire reactie ("transplantation response" etc.), d.w.z. de cel waaruit de immunoblast zich ontwikkelt, een lang levende recirculerende lymphocyt is. De beschikbare gegevens lijken er op te wijzen, dat deze cellen als "thymus-derived" moeten worden beschouwd. Voorts lijken deze cellen hun transformatie tot immunoblasten te kunnen ondergaan zonder tussenkomst van follikelrandcellen of macrophagen, mogelijk dus door een direct contact met het betreffende antigeen.

Bij de antilichaamvorming ("antibody response") zijn er aanwijzingen dat ook hier de immunologisch competente cellen d.w.z. de cellen, die tot immunoblasten (i.c. plasmablasten) transformeren de langlevende, recirculerende en "thymus-derived" cellen zijn. Om tot deze transformatie te kunnen induceren moet het antigeen evenwel een primaire verwerking ondergaan door cellen die niet "thymus-derived" zijn: de uit follikellymphocyten ontstane follikelrandcellen ("antigen trapping") en/of exsudaat-macrophagen. Deze cellen lijken dus het "Bursa-aequivalent" te vertegenwoordigen. Daarbij blijft de vraag open of voor de antigeenverwerking beide celsoorten, of slechts één van beide nodig is. Deze hypothese over het inductieproces van de "antibody response" zou een verklaring kunnen zijn voor de waarneming van Miller c.s. (1963), dat in volwassen dieren het herstel van het vermogen tot antilichaamvorming na supralethale bestraling thymus-afhankelijk is.

Dat bovendien de thymus op geheel andere wijze, mogelijk via humorale factoren, een rol speelt in het complex van immunologische herkenning, immunologische competentie en immunologische tolerantie, waardoor alle immunologische reacties nog in een tweede opzicht thymus-afhankelijk kunnen zijn, blijft hier buiten beschouwing.

Het lijkt aangewezen om door labelingsproeven de herkomst resp. het lot van macrophagen, follikelrandcellen en lang levende lymphocyten nader te onderzoeken.

## SUMMARY

In the experiments described in this thesis the role of blood-borne small lymphocytes in maintaining and restoring histological and immunological integrity of lymph nodes, spleen and thymus has been investigated with the aid of various irradiation procedures. This investigation was induced by the experiments of Gowans and collaborators on the recirculation of lymphocytes, i.e. the passage of small lymphocytes from the bloodstream into the lymphoid organs and from these - via lymphatics (thoracic duct!) - back into the blood. Recirculation of small lymphocytes has been shown by these investigators to constitute one of the bases of the structural dynamics of lymphoid organs and of the functional i.e. immunological strategy of the lymphoid system by effecting a continuous redistribution of immunologically competent and immunologically committed lymphocytes. The immunological competence of recirculating thoracic duct lymphocytes has been demonstrated by Gowans et al. (1962, 1963) with respect to specific cellular responses and by McGregor and Gowans (1963) and Ford, Gowans and MacCullagh (1966) with regard to the antibody response.

Thoracic duct lymphocytes are long-lived for appr. 90 %; blood lymphocytes on the other hand comprise a large proportion (40 %) of short-lived lymphocytes (Everett et al., 1964). Various experimental data suggest that this latter category is bone marrow-derived. The present experiments have provided data giving evidence of a distinctly different role of two respective classes of blood lymphocytes in maintaining and restoring histology and immunological function of lymph nodes and spleen; one appears to correspond to the long-lived category including the majority of thoracic duct lymphocytes, the other might possibly represent the short-lived class.

The use of irradiation as an experimental tool in this investigation was based on two radiation effects: the well known high interphase-

radiosensitivity of small lymphocytes and the observation that sub-lethal total body irradiation brings about in rabbits a temporary ( $\pm 7$  days) unresponsiveness as far as the antibody response is concerned (Keuning et al., 1964).

Regarding the thymus, our experiments demonstrated the absence of a dependency on blood-borne lymphocytes, thus confirming the thymus not being involved in lymphocyte recirculation in a normal way (Gowans and Knight, 1964). Our observations appear to support the concept of structurally and functionally defined thymus-dependent areas in the lymph nodes and the spleen (Parrott, de Sousa and East, 1966).

*Lymph nodes.* Histology of the normal - non-stimulated - popliteal lymph nodes clearly shows the well known signs of lymphocyte recirculation: the emigration of blood-borne lymphocytes in the cortical epitheloid venules and the release of cortical lymphocytes into medullary sinuses. Upon antigenic stimulation (parathyphoid B-H vaccine) initiation of plasma cell development was observed to be localized in the outer cortex over and between the follicles. In this same region we observed the presence of marginal zone cells comparable to those around the splenic Malpighian corpuscles. Actively multiplying plasmablasts and maturing plasma cells were subsequently seen traversing the cortical lymphocyte areas towards the medulla; at the cortical-medullary border these cells appear to meet some kind of barrier („foto 2 and 3”) which some of them succeed in passing, while others are obviously “forced” into medullary strands. This process, apart from demonstrating cell movement from cortex to medulla, comparable to lymphocyte movement, explains the well-known accumulation of mature plasma cells in the medullary strands, which has been often misinterpreted as representing a medullary localization of the plasma cell development, i.e. the antibody response.

Total body irradiation (500 or 850/380 rads) of the rabbit caused severe structural damage to the lymph node. Follicles underwent complete destruction within 24 hrs. by interphase death of follicular lymphocytes; marginal zone cells present in the outer cortex were also completely destroyed; on the other hand lymphocyte damage in the large cortical lymphocytic areas and in the medullary strands was only partial. Apart from effecting structural damage, the irra-



diation caused a retardation of the antibody response corresponding to the post-irradiation period of immunological unresponsiveness mentioned above; immunological repair coincided with definite signs of structural repair of the outer cortex, in the form of reappearing primary follicles and marginal zone cells.

After local irradiation (700 rads) of the popliteal lymph nodes on the other hand, histological damage was immediately overcome by a rapid repletion with large numbers of small lymphocytes. This lymphocyte repletion was most marked in the follicles („foto 5, 6 and 7”, taken 6, 12 and 24 hrs. after irradiation) and less striking in the cortical lymphocytic areas around cortical epitheloid venules („foto 9”).

Destroying the rest of the lymphoid tissue by irradiation immediately before or after the local irradiation of the lymph nodes not only prevented the lymphocyte repletion of the follicles, but also visualized the real damage in the cortical lymphocytic areas („foto 10”). By ligating afferent lymph vessels it was shown that repletion of follicles after local irradiation was due to direct emigration of lymphocytes from the blood stream. At 48 hrs. post-irradiation marginal zone cells had reappeared („foto 8”) obviously by transformation from small follicular lymphocytes. Upon antigenic stimulation (24 hrs. post-irradiation) a normal germinal centre reaction („foto 11”) was found after 4-5 days.

Reappearance of marginal zone cells at 48 hrs. and inducibility of germinal centre reactions were also observed in animals in which local irradiation of the popliteal lymph nodes was followed 24 hrs. later by irradiation of the rest of the body to stop further immigration of lymphoid cells from the blood.

Antibody responses were almost normal (fig. 4a) if the antigen was administered in the hind leg 24 hrs. after local irradiation of the corresponding popliteal lymph nodes; as, however, these antibody responses could not be prevented by removal of the nodes 48 and 96 hrs. after antigen administration (fig. 4b en c), it was concluded that antibody formation was for the greater part localized elsewhere. If on the other hand local irradiation of the lymph nodes was followed after 24 hrs. by irradiation of the rest of the animal and antigen was administered after another 24 hrs., a fair though subnormal antibody response was observed (fig. 5b), which lymphadenectomy

3 days after antigen, demonstrated to be situated in the locally irradiated lymph nodes (fig. 5c).

From these experiments together it is concluded that in the locally irradiated lymph nodes both the follicular lymphocytes and the reappearing marginal zone cells are derived from small blood-borne lymphocytes and that the rapid immunological repair of the irradiated lymph nodes and the inducibility of the germinal centre reaction also depends on this influx of small lymphocytes from the blood.

Shielding of popliteal lymph nodes during total body irradiation did not markedly affect the histology of these nodes: minor depletion of lymphocytes was only observed around cortical epitheloid venules. Release of cortical lymphocytes into medullary sinuses stopped after a few days. However, the immunological competence of these nodes, as tested by subcutaneous antigen administration, decreased considerably during the first 24 hrs. (fig. 7a), and this decrease went on for at least two more days (fig. 8a and b). Intravenous administration of antigen did not induce an immediate antibody response in the shielded nodes (fig. 9a); a retarded response was observed but proved to be localized elsewhere in the lymphoid system, as determined by lymphadenectomy (fig. 9b). This response may depend on lymphoid cells derived from the shielded nodes or hind leg bone marrow.

*Spleen.* Normal splenic histology shows neither clear signs of a passage of lymphocytes through periarteriolar lymphocyte sheaths as demonstrated by Gowans and Knight (1964) by intravenously injecting labeled thoracic duct lymphocytes, nor changes in follicular lymphocyte population.

Total body irradiation (500 or 850/380 rads) completely destroyed Malpighian corpuscles, affecting periarteriolar lymphocytes to a far lesser degree („foto 13”). Immunological responsiveness as regards to primary antibody response is abolished within 24 hrs. following total body irradiation and reappears about 9 days after irradiation.

Local irradiation of the spleen, as in the lymph nodes, was followed by a rapid (12 to 24 hrs.) repletion with lymphocytes, most prominently so of the follicular coronas and to a lesser extent of the periarteriolar lymphocyte sheaths („foto 14 and 15”). Marginal zone cells, which had disappeared upon irradiation, reappeared after 36-48

hrs. („foto 16”) apparently by transformation of newly invaded follicular lymphocytes in the same way as in the lymph nodes. Antigen, administered 24 hrs. after the irradiation, induced a germinal centre reaction 5 days later („foto 17”). Experiments in which local irradiation of the spleen was followed after 24 hrs. by total body irradiation with spleen shielding (cf. lymph nodes) were not performed in view of the technical difficulties involved.

Antibody responses in the locally irradiated spleen upon intravenous administration of the antigen 24 hrs. after irradiation at first seemed to be practically normal (fig. 11a). However, splenectomy did not markedly affect this antibody production, which consequently could be attributed to extra-splenic sites (fig. 12a and b). Now, under certain conditions antibody formation can be completely restricted to the spleen by intravenous injection of a small quantity of homologous hyperimmune serum following intravenous antigen administration (Nieuwenhuis et al., 1967). By using this technique the antibody production in the locally irradiated spleen itself upon antigen administration 24 hrs. post-irradiation could be estimated and was found to be retarded and strongly reduced (cf. fig 13a and b). Splenectomy controls demonstrated the antibody formation to be localised in the spleen indeed in 7 out of 9 animals (fig. 13c and d). If antigen was administered 3, 5 or 10 days post-irradiation, rather unexpectedly, only moderate repair of antibody-forming capacity was found to occur during this period (fig. 14), although the spleen had returned to normal histology by this time. In conclusion, the influx of blood-borne lymphocytes into the locally irradiated spleen appears to be responsible for repair of follicular lymphocyte coronas, marginal zone cells, capacity to react with a germinal centre reaction and to a lesser degree of immunological capacity (antibody response).

Shielding of the spleen during total body irradiation (850/380 rads) resulted in considerable histological changes („foto 18”): lymphocyte numbers decreased markedly both in the follicular coronas and in the periarteriolar lymphocyte sheaths, though no clear signs of lymphocyte outflow were observed. In the follicles the lymphocyte depletion would seem to be due to transformation into marginal zone cells in view of the considerable increase of these cells without replenishment of lymphocytes from the blood. In the periarteriolar lymphocyte sheaths a transformation into plasmablasts (upon antigen

administration) may be partly responsible for lymphocyte depletion.

Antibody responses of the shielded spleen proved to be fairly well, though somewhat subnormal (fig. 15). Apparently the presence of large numbers of marginal zone cells, together with only small numbers of lymphocytes, is compatible with reasonable immunological capacity.

*Thymus.* Total body irradiation (850/380 rads) resulted in a nearly complete lymphocyte destruction in the thymic cortex whereas fair numbers of medullary lymphocytes remained alive. Regeneration of cortical lymphocytopoiesis may vary considerably, but usually starts after some 4 days with blast type lymphoid cells repopulating the depleted cortical areas. Normal cortical histology is usually restored after about 9 days. After local irradiation of the thymus essentially the same pattern of regeneration was seen. The almost total destruction of cortical lymphoid cells („foto 20”) was followed by an actively dividing blast cell repopulation („foto 22”) at 3-4 days, and lymphocytes were only observed 2-3 days later. Apparently a rapid repletion with blood-borne lymphocytes as observed in the lymph nodes and the spleen, does not occur in the thymus.

The cells responsible for thymus regeneration could not be ascertained; “small lymphocyte-like cells” as described by Dukor et al. (1966) in regenerating thymus grafts, have not been observed. A marked, though small scale “invasion” of plasma cells mostly along the cortical arterioles and in the cortical tissue („foto 21”) suggested a possible role of these cells in re-establishing thymic lymphocytopoiesis.

As might be expected, local irradiation of the thymus did not affect the immunological competence of the rest of the lymphoid tissue (fig. 17). To obtain further information in this respect total body irradiation (500 rads) was performed, followed by 3 local irradiations of the thymus (at 6-day's intervals). This procedure resulted in a complete lymphoid atrophy of the thymus at the 26th day, and a profound reduction of lymphocyte numbers in splenic periarteriolar lymphocyte sheaths and in cortical lymphocytic areas of lymph nodes by this time. However, in both spleen and lymph nodes small primary follicles had regenerated together with a definite marginal zone around the follicles (spleen) and along the outer cortex of the lymph nodes („foto 24”); the repair of these structures seems

to be caused by non-thymus-derived cells. In these animals immunological responsiveness (antibody formation) had returned to the same degree as in non-thymus-irradiated controls (fig. 18).

Shielding of the thymus during total body irradiation (850/380 rads) gave a more or less complementary result. Though no direct irradiation change was observed in the thymus, a lymphocyte depletion of the thymic cortex developed gradually in 2-3 days („foto 23”). Blood lymphocyte numbers decreased to a minimum of 33 % as compared to 8 % in non-thymus-shielded controls (fig. 16), whereas periarteriolar lymphocyte sheaths of the spleen and cortical lymphocytic areas of lymph nodes („foto 25”) showed lymphocyte numbers markedly above those of controls. It may be noted that these regions in spleen and lymph node correspond to the so-called „thymus-dependent areas” as described by Parrott et al. (1966). In irradiated thymus-shielded animals return of immunological response in the popliteal lymph nodes (subcutaneous administration of antigen) was not enhanced as compared with non-thymus-shielded controls (fig. 20). In the spleen (intravenous administration of antigen) immunological repair was slightly better, comparable to antibody production found in lymph node-shielded, irradiated animals (fig. 19). Apparently thymus lymphocytes in these experiments, though rapidly repopulating the “thymus-dependent areas” in spleen and lymph nodes, do not contribute noticeably to restoration of antibody-forming capacity of these organs.

### *Conclusions and discussion*

The main conclusions of the present investigations are twofold and may be summarized as follows:

1. Apart from the long-lived class(es) of lymphocytes, shown by Gowans and collaborators to be recirculating, i.e. passing from the blood into the lymphoid organs and (i.a. via the thoracic duct) back into the blood etc. etc., another category of lymphocytes was found to be migrating from the blood into the lymphoid organs.

2. Lymphocytes of this second category, possibly representing short-lived bone marrow-derived lymphocytes as described by various investigators, upon emigration into lymphoid tissue - in a morphological respect - constitute the lymphocyte coronas of lymphoid



follicles and by transformation give rise to the marginal zone cells and - functionally - appear to control the inducibility of primary antibody responses and germinal centre reactions.

Apparently both categories of lymphocytes together are responsible for maintaining the characteristic structure and immunological function of peripheral lymphoid organs: the long-lived, recirculating class(es) homing into cortical lymphocytic areas of lymph nodes and periarteriolar lymphocyte sheaths of the spleen, the second category being led to the outer cortex and follicles of lymph nodes and the Malpighian corpuscles of the spleen.

Regarding the long-lived, recirculating lymphocyte class, the experiments lend support to the hypothesis that it contains long-lived thymus-derived cells, and that these cells home into the thymus-dependent areas in lymph nodes and spleen as defined by Parrott, de Sousa and East (1966) i.e. the cortical lymphocytic areas (lymph nodes) and periarteriolar lymphocyte sheaths (spleen). Data have been accumulating in recent years to suggest that these cells are in fact the immunologically competent cells in the transplantation response, graft versus host reaction and delayed-type sensitization response; their possible significance in the antibody response will be discussed hereafter.

As regards the second category of lymphocytes our experiments with repeated thymus irradiation have shown these cells not to be thymus-derived; the hypothesis is ventured that they represent "short-lived" bone marrow-derived elements. Though being led to the lymphoid organs by the blood stream, they do not seem to participate in recirculation on a large scale.

Regarding their immunological function two things stand out clearly. Firstly the inducibility of primary antibody responses in our experiments appears to depend on the presence of marginal zone cells, which were shown to be derived by transformation from this second class of lymphocytes. In view of the characteristic localisation of marginal zone cells - in the outer cortex of the lymph nodes over and between the follicles and around Malpighian corpuscles in the spleen - there can be little doubt that it are these cells, which are responsible for the antigen-trapping as described by Nossal and co-workers. It seems logical to assume, hypothetically, that the glycoprotein produced by these cells is in fact the active substance in

antigen-trapping. Apparently the marginal zone cell system constitutes the limiting factor as regards the inducibility of antibody responses in post-irradiation conditions, in the perinatal period and possibly in other experimental or pathological conditions. Secondly the question arises whether these cells themselves moreover represent the immunologically competent cells in the antibody response. The experiments of McGregor and Gowans (1963) and of Ford, Gowans and McCullagh (1966) would seem to rule out this possibility. McGregor and Gowans, by thoracic duct drainage during 5 days, could suppress antibody response towards sheep-R.B.C.; thoracic duct drainage can be assumed to deplete the pool of long-lived recirculating lymphocytes possibly including thymus-derived elements, but can hardly be supposed to have seriously affected structure and functioning of the marginal zone cell system. In addition Ford, McGregor and Gowans have shown thoracic duct lymphocytes to be immunologically competent in an experimental system containing "macrophages" as antigen-processing elements. Consequently the immunologically competent cell for the antibody response as well as for the specific cellular responses would seem to be contained in the thoracic duct cell population and may be the same thymus-derived lymphocytes. Therefore the hypothesis emerges that the antibody response depends on the marginal zone cell system as far as antigen-trapping is concerned and on the long-lived recirculating thymus-derived cells as immunologically competent cells proper, whereby the latter transform into antibody-producing plasma cells. The role of "macrophages" as shown in the experiments of Fishman and Adler (1963), Gallily and Feldman (1967) and those of Ford et al. mentioned above is not clear: either macrophages might be a third necessary link in the cell chain, or macrophages - possibly more specifically exudate macrophages - might function in a similar way as marginal zone cells. Further experiments are needed to clear up this problem. The marginal zone cell system might conceivably itself represent the bursa-equivalent structure as postulated by Good and Cooper to be specifically responsible for inducibility of antibody responses in mammals.

Experiments by Micklem et al. (1961) and v. d. Slikke and Keuning (1964) demonstrate that the specific cellular response (transplantation-immunity) on the contrary does not depend on the co-

operation of radiosensitive marginal zone cells (macrophages); thus these responses seem to originate from the long-lived, thymus-derived lymphocytes alone.

## LITERATUUR

- Aikawa, H. and Takeshima, M. 1930 - The reaction of lymphoid tissue to röntgenradiation. *Am. J. Röntg. Radiother.* 24:42.
- André, J. A., Schwartz, R. S., Mitus, W. J. and Dameshek, W. 1962 - The morphologic responses of the lymphoid system to homografts. I. First and second set responses in normal rabbits. *Blood* 14:313.
- Andreasen, E. and Christensen, S. 1949 - The rate of mitotic activity in the lymphoid organs of the rat. *Anat. Rec.* 103:401.
- Archer, O. K. and Pierce, J. C. 1961 - The role of thymus in development of the immune response. *Fed. Proc.* 20:26.
- Archer, O. K., Sutherland, D. E. R. and Good, R. A. 1964 - The developmental biology of lymphoid tissue in the rabbit. Consideration of the role of thymus and appendix. *Lab. Invest.* 13:259.
- Arnason, B. G., Jankovic, B. D. and Waksman, B. H. 1962 - A survey of the thymus and its relation to lymphocytes and immune reactions. *Blood* 20:617.
- Auerbach, R. 1960 - Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymusgland. *Develop. Biol.* 2:271.
- Auerbach, R. 1961 - Experimental analysis of the origin of cell types in the development of the mouse thymus. *Develop. Biol.* 3:336.
- Auerbach, R., 1966 - Embryogenesis of immune systems. In: *The Thymus: experimental and clinical studies.* Ciba symposium, bl. 39. Ed: G. E. W. Wolstenholme and R. Porter; J & A Churchill Ltd., London.
- Ball, W. D. and Auerbach, R. 1960 - In vitro formation of lymphocytes from embryonic thymus. *Exp. Research* 20:245.
- Benjamin, E. and Sluka, E. 1908 - Antikörperbildung nach experimenteller Schädigung des hämatopoetischen Systems durch Röntgenstrahlen. *Wien. Klin. Wschr.* 21:311.
- Bierring, F. 1960 - Quantitative investigations on the lymphomyeloid system in thymectomised rats; In: *Haemopoiesis: cell production and its regulation.* Ciba Found. Symp. bl. 185. Ed: G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, Churchill, London.
- Bjørneboe, M. and Gormsen, H. 1943 - Experimental studies in the role of plasma cells as antibody producers. *Acta path. et microbiol. Scandinav.* 20:649.
- Braams, W. 1961 - Electron microscopy of plasma cell development. *Acta morph. Neerl. Scandinav.* 4:289 (abstract).
- Brachet, J. 1953 - The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. *Quart. J. Micr. Sc.* 94:1.
- Bruyn, P. P. H. de; 1948 - The effect of X rays on the lymphatic nodule with reference to the dose and relative sensitivities of different species. *Anat. Rec.* 101:373.
- Buchem, F. L. van; 1962 - Histologisch onderzoek van de plasmacellulaire reactie en zijn plaats in de histofysiologie van de lymphklier. *Acad. Proefschr. Groningen.*
- Bunting, C. H. and Huston, J. 1921 - Fate of the lymphocyte. *J. Exp. Med.* 33:593.

- Bunting, W. L., Kiely, J. M. and Owe, C. A. 1963 - Radiochromium labelled lymphocytes in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113:370.
- Caffrey, R. W., Rieke, W. O. Everett, N. B. 1962 - Radiographic studies of small lymphocytes in the thoracic duct of the rat. *Acta Haematol.* 28:145.
- Clark, S. L. Jr. 1966 - Cytological evidences of secretion in the thymus. In: *The thymus, Experimental and clinical studies.* CIBA Foundation Symp. bl. 3. Ed: G. E. W. Wolstenholme and R. Porter, J & A Churchill, Ltd. London.
- Congdon, C. C. 1964 - The early effects of antigenic stimulation. *Arch. Path.* 78:83.
- Congdon, C. C. and Makinodan, T. 1961 - Splenic white pulp alteration after antigen injection: relation to time of serum antibody production. *Am. J. Path.* 39: 697.
- Conway, E. A. 1937 - Cyclic changes in lymphatic nodules. *Anat. Rec.* 69:487.
- Cooper, M. D., Peterson, R. D. A. and Good, R. A. 1965 - Delineation of the thymic and bursal lymphoid system in the chicken. *Nature* 205:143.
- Cooper, M. D., Peterson, R. D. A., South, M. A. and Good, R. A. 1966 - The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J. Exp. Med.* 123:75.
- Cooper, M. D., Perey, D. Y., McKneally, M. F., Gabrielsen, A. E., Sutherland, D. E. R., and Good, R. A. 1966 - A mammalian equivalent of the avian bursa of fabricius. *Lancet* 1:1388.
- Dalmaso, A. P., Martinez, C., Sjodin, K. and Good, R. A. 1963 - Studies on the role of the thymus in immunobiology. Reconstitution of immunologic capacity in mice thymectomized at birth. *J. Exp. Med.* 118:1089.
- Davies, A., Leuchars, E., Wallis, V. and Koller, P. 1966 - The mitotic response of thymus-derived cells to antigenic stimulus. *Transplantation* 4:438.
- Dixon, F. J., Talmage, D. W. and Maurer, P. H. 1952 - Radiosensitive and radioresistant phases in the antibody response. *J. of Imm.* 68:693.
- Dukor, P., Miller, J. F. A. P., House, W., Allman, V. 1965 - Regeneration of thymus grafts. I. Histological and cytological aspects. *Transpl.* 3:639.
- Ehrich, W. and Harris, T. N. 1942 - The formation of antibodies in the popliteal lymph node in rabbits. *J. Exp. Med.* 76:335.
- Ernström, U., Gyllensten, L. and Larsson, B. 1965 - Venous output of lymphocytes from the thymus. *Nature* 207:540.
- Everett, N. B., Caffrey, R. W. and Rieke, W. O. 1964 - Recirculation of lymphocytes. *Ann. New York Acad. Sc.* 113:887.
- Everett, N. B., Reinhardt, W. O. and Yoffey, J. M. 1960 - The appearance of labeled cells in the thoracic duct lymph of the guinea pig after the administration of tritiated thymidine. *Blood* 15:82.
- Fagraeus, A. 1948 - Antibody production in relation to the development of plasma cells. *Acta Med. Scand.* (Suppl. 204).
- Fichtelius, K. E. 1953 - On the fate of the lymphocyte. *Acta anat. Supplement* 19.
- Fishman, M. and Adler, F. L. 1963 - Antibody formation initiated in vitro. II. Antibody synthesis in x-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen. *J. Exp. Med.* 117:595.
- Fitch, F. W., Barker, P., Soules, K. H. and Wissler, R. W. 1953 - A study of antigen localization and degradation and the histologic reaction in the spleen of normal, x-radiated and spleenshielded rats. *J. Lab. Clin. Med.* 42:598.
- Flemming, W. 1885 - Studien über Regeneration der Gewebe. *Arch. f. mikr. Anat.* 24:50.
- Flemming, W. 1885 - Schlussbemerkungen über die Zellvermehrung in den lymphoiden Drüsen. *Arch. f. mikr. Anat.* 24:355.
- Fliedner, T. M. 1966 - Origin of tingible bodies in germinal centers, *Exper. Hematology.* 11:19 (abstract).



- Fliedner, T. M., Kesse, M., Cronkite, E. P. and Robertson, J. S. 1964 - Cell proliferation in germinal centers of the rat spleen. *Ann. New York Acad. Sci.* 113:578.
- Florey, H. W. and Gowans, J. L. 1962 - The reticulo- endothelial system. The omentum. The lymphatic system, the lymphocyte. In: *General Pathology*. Ed: H. W. Florey, Lloyd-Luke Ltd. London.
- Ford, C. E. 1966 - Traffic of lymphoid cells in the body. In: *The thymus. Experimental and clinical studies*. CIBA Foundation Symp. bl. 131. Ed: G. E. W. Wolstenholme and R. Porter; J & A Churchill, Ltd., London.
- Ford, C. E. and Micklem, H. S. 1963 - The thymus and lymph-nodes in radiation chimaeras. *Lancet* 1:359.
- Ford, W. L., Gowans, J. L. and McCullagh P. J. 1966 - The origin and function of lymphocytes. In: *The thymus. Experimental and clinical studies*. CIBA Foundation Symp. bl. 58. Ed: G. E. W. Wolstenholme and R. Porter; J & A Churchill, Ltd., London.
- Gallily, R. and Feldman, M. 1967 - The role of macrophages in the induction of antibody in X-irradiated animals. *Immunology* 12:197.
- Gengozian, N. and Makinodan, T. 1958 - Relation of primary antigen injection to time of irradiation on antibody production in mice. *J. Imm.* 80:189.
- Gengozian, N., Urso, J. S., Congdon, C. C., Conger, A. D. and Makinodan, T. 1957 - Thymus specificity in lethally irradiated mice, treated with rat-bone marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:714.
- Gessner, B. M. and Gowans, J. L. 1962 - The fate of lethally irradiated mice given isologous and heterologous thoracic duct lymphocytes. *Brit. J. Exp. path.* 43:424.
- Glimstedt, G. 1936 - *Bacterienfreie Meerschweinchen*. *Acta path. et microbiol. Scandinav.* Supplement 30.
- Good, R. A., Dalmaso, A. P., Martinez, C. Archer, O. K. and Papermaster, B. W. 1962 - Role of the thymus in development of immunological capacity in rabbits and mice. *J. Exp. Med.* 116:773.
- Gowans, J. L. 1957 - The effect of the continuous re-infusion of lymph and lymphocytes on the output of lymphocytes from the thoracic duct of unanaesthetized rats. *Brit. J. Exper. Path.* 38:67.
- Gowans, J. L. 1958 - The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J. Physiol. Lond.* 143:84.
- Gowans, J. L. 1959 - The life-history of lymphocytes. *Brit. Med. Bull.* 15:50.
- Gowans, J. L. 1959 - The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J. Physiol.* 146:54.
- Gowans, J. L. 1959 - The transfusion of lymphocytes in experimental animals. In: *The kinetics of cellular proliferation*. bl. 64. Ed: F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- Gowans, J. L. 1962 - The fate of parental strain small lymphocytes in F<sub>1</sub> hybrid rats. *Ann. New York Acad. Sci.* 99:432.
- Gowans, J. L. and Knight, E. J. 1964 - The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc. Roy. Soc. B.* 159:257.
- Gowans, J. L., Gesner, B. M. and McGregor, D. D. 1961 - The immunological activity of lymphocytes. In: *Ciba Foundation Study Group no. 10 on Biological Activity of the Leucocyte*. bl. 32. Ed: G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, London J & A Churchill, Ltd.
- Gowans, J. L., McGregor, D. D., Cowen, D. M. and Ford, C. E. 1962 - Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature* 196:651.
- Gowans, J. L., McGregor, D. P. and Cowen, D. M. 1963 - The role of small lymphocytes in the rejection of homografts of skin. In: *The immunologically competent cell: its nature and origin*. Ciba Found. Study Group No. 16 bl. 20. Ed: G. E. W. Wolstenholme and J. Knight, Churchill, London.

- Hall, J. G., Morris, B. 1964 - Effect of x-irradiation of the popliteal lymph node on its output of lymphocytes and immunological responsiveness. *Lancet* ...:1077.
- Hamilton, L. D. 1958 - Control and function of the lymphocyte. *Ann. New York Acad. Sci.* 73:39.
- Hammar, J. A. 1939 - Experimentelle Untersuchungen über die Rolle der Thymus bei der Immunisierung. *Zeitschr. Mikrosk. anat. Forschung* 44:2425.
- Hanna, M. G. 1965 - Germinal center changes and plasmacell reaction during the primary immune response. *Int. Arch. Allergy* 26:230.
- Hanna, M. G. 1965 - Electron microscopy of the germinal center cells in the spleen. *J. of Cell Biology* 25:109.
- Harris, P. F. and Yoffey, J. M. 1958 - Changes in thymus and lymph node activity and alterations in bone marrow lymphocyte levels during recovery of the guinea-pig from whole body gamma irradiation. *Brit. J. Exp. Path.* 39/6:557.
- Heineke, H. 1904 - Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf innere Organe. *München Med. Wochenschrift* 51:785.
- Heineke, H. 1905 - Experimentelle Untersuchungen über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf innere Organe. *Mitt. Grenzgeb. Med. Chir.* 14:21.
- Hellman, T. 1921 - Studien über das lymphoide Gewebe. Die Bedeutung der Sekundärfollikel. *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path.* 68:333.
- Hoekstra, G., Mulder, N. en Keuning, F. J. 1967 - Cellenkinetiek van de "primary response" antistoffenvorming. *Ned. T. Geneesk.* 111:196.
- Hughes, R., May, A. J. and Widdicombe, J. G. 1956 - The output of lymphocytes from the lymphatic system of the rabbit. *J. Physiol.* 132:384.
- Jacobson, L. O., Robson, M. J. and Marks, E. K. 1950 - The effect of X-radiation on antibody formation. *Soc. Exper. Biol. Med.* 75:145.
- Jacobson, L. O. and Robson, M. J. 1952 - Factors effecting X-ray inhibition of antibody formation. *J. Lab. & Clin. Med.* 39:169.
- Jankovic, B. D., Waksman, B. H. and Arnason, B. G. 1962 - Role of the thymus in immune reactions in rats. I: The immunologic response to bovine serum albumine (antibody formation, Arthusreactivity, and delayed hypersensitivity) in rats or splenectomized at various times after birth. *J. Exp. Med.* 116:159.
- Jolly, J. 1924 - Sensibilité comparée des différents organes lymphoïdes aux rayons X. *C. R. hebdomadaire des Séances mém. Soc. Biol.* 91:354.
- Keuning, F. J. 1965 - Die Beantwortung eines homologen Gewebsstimulus (Homotransplantation) durch das lymphoretikuläre System. *Oncologica.* 19:180.
- Keuning, F. J. and Slikke, L. B. van der; 1950 - The role of immature plasma cells, lymphoblasts, and lymphocytes in the formation of antibodies, as established in tissue culture experiments. *J. Lab. & Clin. Med.* 36:167.
- Keuning, F. J., Meer, J., van der, Nieuwenhuis, P. and Oudendijk, P. 1963 - The histophysiology of the antibody response. II. Antibody responses and splenic plasma cell reactions in sublethally X-irradiated rabbits. *Lab. Invest.* 12:156.
- Keuning, F. J., Dijkhuis, A. en Dijkstra-v. d. Vliet, Th. A. 1964 - The effect of sublethal röntgen irradiation on the induction period of the antibody response in the rabbit. *Int. J. Rad. Biol.* 8:279.
- Keuning, F. J. and Bos, W. H. 1966 - Regeneration patterns of lymphoid follicles in the rabbit spleen after sublethal X-irradiation. *Exper. Hematology* 11:21 (abstract).
- Kindred, J. E. 1940 - A quantitative study of the haemopoietic organs of young albino rats. *Amer. J. Anat.* 67:99.
- Kindred, J. E. 1942 - A quantitative study of the production of lymphocytes by the lymph nodes of the adult albino rat. *Anat. Rec.* 82:471.
- Langevoort, H. L. 1961 - The role of lymphocytes in the development of plasma cells. *Acta morph. Neerl. Scandinav.* 4:288 (abstract).

- Langevoort, H. L. 1963 - The histophysiology of the antibody response. I. The histogenesis of the plasmacellular reaction in the rabbit spleen. *Lab. Invest.* 12:106.
- Langevoort, H. L., Keuning, F. J., Meer, J. v. d., Nieuwenhuis, P. and Oudendijk, P. 1961 - Histogenesis of the plasmacellular reaction in the spleen during primary antibody response in normal and sublethally X-irradiated rabbits. *Proc. Kon. Ned. Acad. v. Wetensch.* 64:397.
- Leblond, C. P. and Sainte-Marie, G. 1960 - Models for lymphocyte and plasmocyte formation. In: *Ciba symposium on Haemopoiesis*, bl. 152. Ed: G. E. W. Wolstenholme en M. O'Connor; J. & A. Churchill Ltd., London.
- Leduc, E. H., Coons, A. H. and Conolly, J. M. 1955 - The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit. *J. Exp. Med.* 102:61.
- Lennert, K., Caesar, R. and Müller, K. 1966 - Electron-microscopic studies of germinal centers in man. *Exper. Hematology*. 11:6 (abstract).
- Leuchars, E., Cross, A. M. and Dukor, P. 1965 - The restoration of immunological function by thymus grafting in thymectomized irradiated mice. *Transplantation* 3:28.
- Little, J. R., Brecher, G., Bradley, T. R. and Rose, S. 1962 - Determination of lymphocyte turnover by continuous infusion of H3 thymidine. *Blood* 19:236.
- McGregor, D. D. and Gowans, J. L. 1963 - The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct. *J. Exp. Med.* 117:303.
- MacLean, L. D., Zak, S. J., Varco, R. L. and Good, R. A. 1957 - The role of the thymus in antibody production: an experimental study of the immune response in thymectomized rabbits. *Transpl. Bull.* 4:21.
- McMaster, P. D. and Hudack, S. S. 1935 - The formation of agglutinins within lymph nodes. *J. Exp. Med.* 61:783.
- Makinodan, T. and Albright, J. F. 1963 - Cytokinetics of antibody response; in *Grabar and Miescher's Immunopathology*, bl. 99 (Schwabe, Basel).
- Makinodan, T. and Albright, J. F. 1966 - Proliferative and differentiative manifestations of cellular immune potential. *Progr. Allergy*, vol. 10, bl. 1 (Karger, Basel/New York).
- Mann, J. D. and Higgins, G. M. 1950 - Lymphocytes in thoracic duct, intestinal and hepatic lymph. *Blood* 5:177.
- Marchesi, V. T. and Gowans, J. L. 1964 - The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc. Roy. Soc. B.* 159:283.
- Marshall, A. H. E. and White, R. G. 1950 - Reactions of the reticular tissues to antigens. *Brit. J. Exper. Path.* 31:157.
- Marshall, A. H. E. and White, R. G. 1961 - The immunological reactivity of the thymus. *Brit. J. Exper. Path.* 42:379.
- Mellors, R. C. and Korngold, L. 1963 - The cellular origin of human immunoglobulins. *J. Exp. Med.* 118:387.
- Metcalf, D. - 1956 - The thymic origin of the plasma lymphocytosis stimulating factor. *Brit. J. of Cancer.* 10:442.
- Metcalf, D. 1958 - The thymic lymphocytosis stimulating factor. *Ann. New York Acad. Sc.* 73:113.
- Metcalf, D. 1960 - The effect of thymectomy on the lymphoid tissues of the mouse. *Brit. J. Hematology* 6:324.
- Metcalf, D. 1965 - Delayed effect of thymectomy in adult life on immunological competence. *Nature*, London 208:1336.
- Metcalf, D. 1966 - The nature and regulation of lymphopoiesis in the normal and neoplastic thymus. In: *The thymus. experimental and clinical studies*, Ciba Found. Symp. bl. 242. Ed: G. E. W. Wolstenholme and R. Porter; J. & A. Churchill, Ltd. London.

- Metcalf, D. and Ishidate, M. 1961 - Periodic-Acid-Schiff-positive giant cells in the mouse thymus cortex. *Nature, London.* 191:305.
- Micklem, H. S. 1966 - Germinal centers and isoantibody formation in skin-allografted mice. *Exper. Hematology* 11:24. (abstract).
- Micklem, H. S. and Brown, J. A. H. 1961 - Rejection of skin grafts and production of specific iso-haemagglutinins by normal and X-irradiated mice. *Immunology* 4:318.
- Micklem, H. S. and Ford, C. E. 1960 - Proliferation of injected lymph. node and thymus cells in lethally irradiated mice. *Transpl. Bull.* 26:436.
- Miller, J. F. A. P. 1961 - Immunological function of the thymus. *Lancet* 748.
- Miller, J. F. A. P. 1962 - Role of the thymus in transplantation immunity. *Ann. New York Acad. Sci.* 99:340.
- Miller, J. F. A. P. 1962 - Immunological significance of the thymus of the adult mouse. *Nature, Lond.* 195:1318.
- Miller, J. F. A. P. 1962 - Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 156:415.
- Miller, J. F. A. P. 1963 - Immunity and the thymus. *Lancet* 43.
- Miller, J. F. A. P. 1964 - The thymus and the development of immunologic responsiveness. *Science* 144:1544.
- Miller, J. F. A. P. 1965 - The role of the thymus in immune processes. *Int. Arch. Allergy* 28:61.
- Miller, J. F. A. P. 1965 - Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature, London* 208:1337.
- Miller, J. F. A. P. 1966 - The thymus in relation to the development of immunological capacity. In: *The thymus. Experimental and clinical studies.* Ciba Found. Symp. bl. 153. Ed: G. E. W. Wolstenholme and R. Porter; J. & A. Churchill, Ltd. London.
- Miller, J. F. A. P., Doak, S. M. A. and Cross, A. M. 1963 - Role of the thymus in recovery of the immune mechanism in the irradiated adult mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 112:785.
- Miller, J. F. A. P., Marshall, A. H. E. and White, R. G. 1962 - The immunological significance of the thymus. *Advances of Imm.* 2:111.
- Movat, H. Z., Fernando, N. V. P. 1965 - The fine structure of the lymphoid tissue during antibody formation. *Exp. Molec. Pathol.* 4:155.
- Mowbray, J. F. 1963 - Ability of large doses of  $\alpha_2$  plasma proteine fraction to inhibit antibody production. *Immunology* 6:217.
- Murray, R. G. 1948 - The spleen. In: *Histopathology of irradiation from external and internal sources.* bl. 243. Ed: Bloom, W. New York, McGraw-Hill Book Co., Inc.
- Murray, R. G. 1948 - The thymus. In: *Histopathology of irradiation from external and internal sources.* bl. 446. Ed: Bloom, W. New York, McGraw-Hill Book Co., Inc.
- Nieuwenhuis, P., Keuning, F. J. 1967 - Effecten van lymfadenectomie c.q. splenectomie op de antistoffenvorming na subcutane resp. intraveneuze anti-geen-toediening bij konijnen. *Ned. T. Geneesk.* 111:195.
- Nossal, G. J. V. 1964 - Studies on the rate of seeding of lymphocytes from the intact guinea pig thymus. *Ann. New York Acad. Sc.* 120:171.
- Nossal, G. J. V., Ada, G. L. Austin, C. M. and Pye, J. 1965 - Antigens in immunity. VIII. Localization of  $^{125}\text{I}$ -labelled antigens in the secondary response. *Immunology* 9:349.
- Nossal, G. J. V., Austin, C. M., Pye, J. and Mitchell, J. 1966 - Antigens in immunity. XII. Antigen trapping in the spleen. *Int. Arch. Allergy.* 29:368.
- Nossal, G. J. V. and Mitchell, J. 1966 - The thymus in relation to immunological tolerance. In: *The Thymus. Experimental and clinical studies.* Ciba Found. Symp. bl. 242. Ed: G. E. W. Wolstenholme and R. Porter; J. & A. Churchill, Ltd. London.

- Oort, J. and Turk, J. L. 1965 - A histological study of lymph nodes during the development of contact sensitivity in the guinea pig. *Brit. J. Exp. Path.* 46:147.
- Ortega, L. G. and Mellors, R. L. 1957 - Cellular sites of formation of gamma-globulines. *J. Exp. Med.* 106:627.
- Osoba, D. and Miller, J. F. A. P. 1963 - Evidence for a humoral thymus factor responsible for the maturation of immunological faculty. *Nature, Lond.* 199:653.
- Osoba, D. and Miller, J. F. A. P. 1964 - The lymphoid tissues and immune responses of neonatally thymectomized mice bearing thymus tissue in millipore diffusion chambers. *J. Exp. Med.* 119:177.
- Ottesen, J. 1954 - On the age of human white cells in peripheral blood. *Acta physiol. Scandinav.* 32:75.
- Parrott, D. M. V., Sousa, M. A. B. de and East, J. 1966 - Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.* 123:191.
- Pernis, B. 1966 - Immunoglobulins present in the germinal centers. *Exper. Hematology* 11:6. (abstract).
- Pernis, B., Chiappino, G., Kelus, A. S. and Gell, P. G. H. 1965 - Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 122:853.
- Petris, S. de, Karlsbad, G., Pernis, B. and Turk, J. L. 1966 - Ultrastructure of cells present in lymph nodes during the development of contact sensitivity. *Int. Arch. Allergy* 29:112.
- Pohle, E. A. and Bunting, C. H. 1936 - Histologische Untersuchungen an der Rattenmilz nach abgestuften Röntgenstrahlendosen. *Strahlentherapie* 57:121.
- Porter, K. A. and Cooper, E. H. 1962 - Transformation of adult allogenic small lymphocytes after transfusion into newborn rats. *J. Exp. Med.* 15:997.
- Sainte-Marie, G. 1965 - Plasmocytes in the thymus of the normal rat. *J. of Imm.* 94:175.
- Sanders, A. G., Florey, H. W. and Barnes, I. M. 1940 - The output of lymphocytes from the thoracic duct in cats and rabbits. *Brit. J. Exper. Path.* 21:254.
- Scholten, J. H., Broek, A. A. van de, Mandema, E. en Keuning, F. J. 1965 - De betekenis van de marginal zone-cellen in de pathogenese van experimentele amyloidose. *Ned. T. Geneesk.* 1174.
- Schooley, J. C., Bryant, B. J. and Kelly, L. S. 1959 - Preliminary autoradiographic observations of cellular proliferation in lymphoid tissues, using tritiated thymidine. In: *The kinetics of cellular proliferation* bl. 208. Ed: F. Stohlman Jr., Grune & Stratton, New York.
- Schooley, J. C. and Kelly, L. S. 1961 - The thymus in lymphocyte production. *Fed. Proc.* 20:71.
- Schreck, R. 1960 - Radiation effects on lymphocytes. In: *The lymphocyte and lymphocytic tissue*. bl. 125. Ed: J. W. Rebeck; P. B. Hoeber, Inc., New York.
- Schulze, W. 1925 - Untersuchungen über die Capillären und postcapillären Vene lymphatischer Organe. *Zeit. f. Anat. u. Entw. Gesch.* 76:421.
- Scothorne, R. J. and McGregor, I. A. 1955 - Cellular changes in lymph nodes and spleen following skin homografting in the rabbit. *J. Anat. London.* 89:283.
- Simic, M. M., Sljivic, V. S., Petrovic, M. Z. and Cirkovic, D. M. 1965 - Antibody formation in irradiated rats. Ed: *The Boris Kidric Institute of Nuclear Sciences*. Beograd.
- Sjövall, H. 1936 - Experimentelle Untersuchungen über das Blut und die blutbildende Organe - besonders das lymphatische Gewebe - des Kaninches bei wiederholten Aderlässen. *Acta path. et microbiol. Scandinav. Supplement* 27.



- Slikke, L. B. van der, Keuning, F. J. 1964 - Influence of sub-lethal X-irradiation on the survival-time of skin homografts and the reaction of the lymphoid system. *Int. J. Rad. Biol.* 8:279.
- Smith, C. 1955 - Studies on the thymus of the mammal. VIII. Intrathymic lymphatic vessels. *Anat. Rec.* 122:173.
- Smith, C. and Kieffer, D. A. 1957 - Studies on thymus of the mammal. Regeneration of irradiated mouse thymus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94:601.
- Snook, Th. 1946 - Deep lymphatics of the spleen. *Anat. Rec.* 94:43.
- Stoner, R. D. and Hale, W. M. 1955 - Antibodyproduction by thymus and Peyer's patches intraocular transplants. *J. of Imm.* 75:203.
- Strober, S. and Gowans, J. L. 1965 - The role of lymphocytes in the sensitization of rats to renal homografts. *J. Exp. Med.* 122:347.
- Süssdorf, D. H. 1959 - Quantitative changes in the white and red pulp of the spleen during hemolysin formation in X-irradiated and nonirradiated rabbits. *J. Infect. Dis.* 105:238.
- Süssdorf, D. H. and Draper, L. R. 1956 - The primary hemolysin response in rabbits following shielding from X-rays or X-irradiation of the spleen, appendix, liver or hind legs. *J. Infect. Dis.* 99:129.
- Taliaferro, W. H. 1957 - Modification of the immune response by radiation and cortisone. *Ann. New York Acad. Sci.* 69:745.
- Taliaferro, W. H. and Taliaferro, L. G. 1950 - The dynamics of hemolysin formation in intact and splenectomized rabbits. *J. Infect. Dis.* 87:37.
- Taliaferro, W. H. and Taliaferro, L. G. 1951 - Effects of X-rays on immunity; a review. *J. of Imm.* 66:181.
- Taliaferro, W. H. and Taliaferro, L. G. 1956 - X-ray effects on hemolysin formation in rabbits with the spleen shielded or irradiated. *J. Infect. Dis.* 99:109.
- Taylor, R. B. 1965 - Decay of immunological responsiveness after thymectomy in adult life. *Nature, London* 208:1334.
- Thorbecke, G. J. and Keuning, F. J. 1956 - Antibody and globulin formation in vitro in hemopoietic organs. *J. Infect. Dis.* 98:157.
- Thorbecke, G. J., Gordon, H. A., Wostman, B., Wagner, M. and Reyniers, J. A. 1957 - Lymphoid tissue and serum gamma globulin in germ free chickens. *J. Infect Dis.* 101:237.
- Thorbecke, G. J., Jacobson, E. B. and Asofsky, R. 1964 -  $\gamma$ -Globulin and antibody formation in vitro. IV. The effect on the secondary response of X-irradiation given at varying intervals after a primary injection of bovine  $\gamma$ -globuline. *J. of Imm.* 92:734.
- Thorbecke, G. J., Cohen, M. W., Jacobson, E. B. and Wakefield, J. D. 1966 - Production of "Memory"-cells by the white pulp of the spleen. *Exp. Hematology* 11:22.
- Trowell, O. A. 1958 - The lymphocyte. In: *International review of cytology*. VII:235. Ed: Bourne, G. H. en Danielli, J. F.; Academic Press Inc., New York.
- Turk, J. L. and Stone, S. H. 1963 - Implications of the cellular changes in lymph nodes during the development and inhibition of delayed-type hypersensitivity. In: B. Amos and H. Koprowski, eds., *Cell-bound antibodies*, bl. 51. (Wistar Institute Press, Philadelphia).
- Virchow, R. 1940 - *Cellular pathology*, translated from 2<sup>nd</sup> German Edition by F. Change. Edwards Bros Inc. Ann. Harbor Mich.
- Volkman, A. 1966 - The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exsudates in rats. *J. Exp. Med.* 124:241.
- Volkman, A. and Gowans, J. L. 1965 - The production of macrophages in the rat. *Br. J. Exp. Path.* 46:50.
- Volkman, A. and Gowans, J. L. 1965 - The origin of macrophages from bone marrow in the rat. *Br. J. Exp. Path.* 46:62.

- Vries, M. J. de, Putten, L. M. van, Balner, H., Bekkum, D. W. van. 1964. Lésions suggérant une réactivité auto-immune chez des souris atteintes de la "runt-disease" après thymectomie neonatale. *Revue franc. Et. Clin, Biol.* 9:381.
- Wakefield, J. D., Cohen, M. W., McCluskey, J., and Thorbecke, G. J. 1966. Fate of lymphoid cells from the white pulp at the peak of germinal center formation. *Exper. Hematology*: 11:15 (abstract).
- Waksman, B. H., Arnason, B. G. and Jankovic, B. O. 1962 - Role of the thymus in immune reactions in rats. III. Changes in the lymphoid organs of thymectomized rats *J. Exp. Med.* 116:187.
- Weidenreich, F. 1901 - Das Gefässsystem der menschlichen Milz. *Arch. f. mikr. Anat.* 58:247.
- Weiss, L. 1963 - Electron microscopic observations of the vascular barrier in the cortex of the thymus of the mouse. *Anat. Rec.* 145:413.
- Weiss, L. 1964 - The white pulp of the spleen. The relationships of arterial vessels, reticulum and free cells in the periarterial lymphatic sheaths. *Bull. John Hopkins Hospital* 115:99.
- White, R. G. 1960 - The relation of the cellular responses in germinal or lymphocytopoietic centres of lymph nodes to the production of antibody. In: *Mechanisms of antibody formation* bl. 25. (Czechoslovak Acad. of Sciences, Prague).
- Williams, G. M. 1966 - Antigen localization in lymphopenic states. II. Further studies on whole body X-irradiation. *Immunology* 11:467.
- Williams, W. L., Hale, W. M. and Stoner, R. D. 1958 - The histogenesis of antibody-producing intraocular transplants of thymus in mice. *Arch. Path.* 66:225.
- Wissler, R. W., Robson, M. J., Fitch, F., Nelson, W. and Jacobson, L. O. 1953. The effects of spleen shielding and subsequent splenectomy upon antibody formation in rats receiving total-body X-irradiation. *J. of Imm.* 70:379.
- Yoffey, J. M. and Drinker, C. K. 1939 - The cell content of the peripheral lymph and its bearing on the problem of the circulation of the lymphocyte. *Anat. Rec.* 73:417.
- Yoffey, J. M. and Courtice, F. C. 1956 - *Lymphatics, lymph and lymphoid tissue.* Edward Arnold Ltd., London.
- Yoffey, J. M., Hanks, G. A. and Kelly, L. S. 1958 - Some problems of lymphocyte production. *Ann. New York Acad. Sc.* 73:47.
- Yoffey, J. M., Everett, N. B. and Reinhardt, W. O. 1959 - Cellular migration streams in the hemopoietic system. In: *The kinetics of cellular proliferation.* bl. 69. Ed: F. Stohlman Jr., Grune & Stratton, New York.
- Yunis, E. J., Hilgard, H., Sjodin, K., Martinez, C. and Good, R. A. 1964. Immunological reconstitution of thymectomised mice by injections of isolated thymocytes. *Nature, Lond.* 201:784.