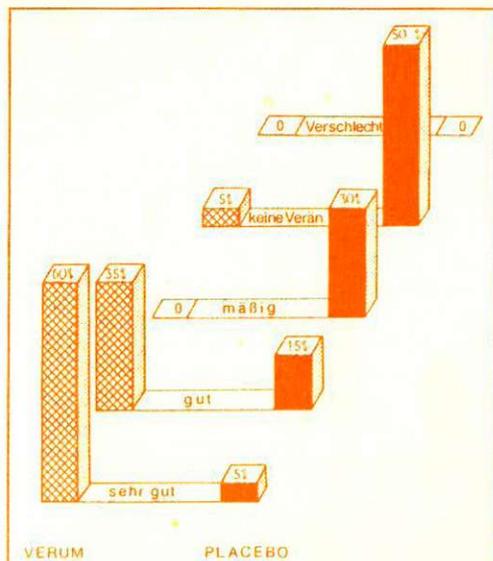


# Organo- und Immunotherapie, eine rational begründete, wissenschaftlich fundierte Ganzheitsmedizin

Forschung und Praxis im Dialog

Herausgegeben von Karl E. Theurer,  
Götz F. Domagk und Helmut Kraft

Wissenschaftliche Organisation: Harald Porcher



Organo- und Immunotherapie,  
eine rational begründete,  
wissenschaftlich fundierte  
Ganzheitsmedizin

# Organo- und Immunotherapie eine rational begründete, wissenschaftlich fundierte Ganzheitsmedizin

## Forschung und Praxis im Dialog

Kongreßberichte der Jahrestagung 1982 der Gesellschaft  
zur Erforschung der makromolekularen Organo- und  
Immunotherapie e.V. (Gemoi)

Herausgegeben von Karl E. Theurer,  
Götz F.Domagk und Helmut Kraft

Wissenschaftliche Organisation: Harald Porcher

83 Abbildungen, 33 Tabellen



Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1983

Prof. Dr. med. Karl E. Theurer  
Brunnwiesenstraße 23  
7302 Ostfildern 1

Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. G. F. Domagk  
Abt. f. Enzymchemie  
Institut für Biochemie  
Humboldtallee 7  
3400 Göttingen

Prof. Dr. med. vet. Helmut Kraft  
I. Medizinische Tierklinik der Univ. München  
Veterinärstraße 13  
8000 München 22

Dr. rer. nat. Harald Porcher  
Wissenschaftlicher Direktor  
Brunnwiesenstraße 23  
7302 Ostfildern 1

CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek  
Organo- und Immuntherapie, eine rational begründete,  
wissenschaftlich fundierte Ganzheitsmedizin :  
Forschung u. Praxis im Dialog / hrsg. von Karl E. Theurer ...  
- Stuttgart : Enke, 1983.

(Kongreßberichte der Jahrestagung ... der  
Gesellschaft zur Erforschung der Makro-  
molekularen Organo- und Immunotherapie e.V.,  
Gemoi ; 1982)

ISBN 3-432-93951-5

NE: Theurer, Karl E. (Hrsg.); Gesellschaft zur  
Erforschung der Makromolekularen Organo- und  
Immunotherapie: Kongreßberichte der  
Jahrestagung ...

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Ver-  
breitung sowie der Übersetzung, vorbehalten. Kein Teil des Werkes  
darf in irgendeiner Form (durch Fotokopie, Mikrofilm oder ein  
anderes Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages re-  
produziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbei-  
tet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

© 1983 Ferdinand Enke Verlag, POB 1304, 7000 Stuttgart 1  
Printed in Germany

I.	Einleitung (K.E. THEURER)	1 - 3
II.	<u>Organo- und Immunotherapie aus der Perspektive der Grundlagenforschung, Klinik und Praxis</u>	
IIa.	<u>Onkologie</u>	
	G. KAHL, Botanisches Institut der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt Struktur und Funktion der Tumor-DNA in Bakterien-induzierten Pflanzentumoren	4 - 32
	M. SCHARTL, ANGELIKA SCHARTL und HELGA WAHN, Genetisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen Beeinflussung der Melanomentwicklung durch Steroidhormone bei Xiphophorus	33 - 46
	H.R. MAURER, Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin Mikro-kolonie-Teste zur Prüfung zytostatischer und zytotoxischer Stoffe in vitro	47 - 62
	T.S. LIE, Institut für Transplantationsforschung der Universität Bonn Zellproliferationshemmende und immunsuppressive Leberfaktoren	63 - 78
	K. LETNANSKY, Institut für Krebsforschung der Universität Wien Die Rolle der Zellmembran bei der Erkennung, Entstehung und Behandlung von bösartigen Tumoren	79 - 85
	U.P. KETELSEN, Kinderklinik der Universität Freiburg Pilotstudie zum Einfluß eines biologischen "response modifiers" (NEYTUMORIN) auf die Plasmamembran menschlicher Tumorzellen (Wish) in vitro im Vergleich mit einem Chemozytostatikum (6-Mercaptopurin)	86 - 96

## VI

<p>P. G. MUNDER, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg Experimentelle Untersuchungen über den antitumoralen Wirkungsmechanismus von NEYTUMORIN</p>	97 - 102
<p>F. DOUWES, Sonnenbergklinik, Bad Sooden-Allendorf Zur Problematik von "Dose-Finding-Studies" bei biologischen "response modifiers" in der Onkotherapie</p>	103 - 122
<p>R. WALTER, Frankfurt und W. KÖSTLER, Wien (Übersichtsreferat zusammengestellt von H. KRAFT, München) Anwendung zytoplasmatischer Substanzen bei Tumorpatienten in der Praxis</p>	123 - 126
<p>K. E. THEURER, Firma vitOrgan, Ostfildern Multifaktorielle Krebstherapie mit hochmolekularen Organextrakten und tumortropen Antikörperfragmenten</p>	127 - 139
<p>WORKSHOP (Leitung T. STIEFEL, Firma vitOrgan, Stuttgart- Ostfildern) Onkologie - praktische Konsequenzen für die Praxis</p>	140 - 155
<p>T. STIEFEL, Firma vitOrgan, Stuttgart-Ostfildern i.V.-gängiges NEY-TUMORIN-SOL: ein entscheidender Fortschritt in der Onkotherapie</p>	156 - 165
<p>I Ib. <u>Orthopädie und Rheumatologie</u></p>	
<p>A. KEITEL, Lüdenscheid Was leistet die Therapie mit REVITORGAN-Präparaten und der Gegensensibilisierung bei rheumatischen Krankheitsbildern?</p>	166
<p>Z. HOFFMANN, Stuhr-Brinkum Therapie der chronischen Polyarthritits nach immunologischen Gesichtspunkten</p>	167 - 173

VII

K.S. LACHNIT, Wien - Lainz Behandlung von Arthrosen mit zytoplasma- tischen Substanzen in der Geriatrie, - eine klinische Doppelblindstudie	174 - 182
A. KLÜMPER, Sporttraumatologische Spezialambulanz der Universität Freiburg Über die Bedeutung von NEYCHONDRIN und NEYARTHROS in der Sportmedizin bei Chon- dropathia patellae und posttraumatischen Gelenkknorpelschäden	183 - 188
WORKSHOP (Leitung K.G. THEURER, Stuttgart) Orthopädie und Rheumatologie: Biologische Alternativen	189 - 195
III. <u>Kasuistik und Optimierung der Therapie</u>	
Nach Vorträgen von H. BUCHHEIT, Blieskastel, G. Pollmächer, Freiburg, H. WIRSAM, Bad Harzburg, und G. REINELT, München, zusammengestelltes Übersichtsreferat von H. KRAFT, München	200 - 207
K.G. THEURER, Stuttgart-Ostfildern Akute und chronische Organerkrankungen: eine Domäne der zytoplasmatischen Therapie mit Organantigenen und den modifizierten Methoden der Eigenblutbehandlung (Gegensensibilisierung und Hydrolysat nach Prof. THEURER)	200 - 207
H. PORCHER, Stuttgart-Ostfildern Biomimetik als Chance: Die zytoplasmatische Therapie und die Gegensensibilisierung im Spiegel der naturwissenschaftlichen und klinischen Forschung	202 - 203
IV. <u>Genetik und Membranforschung</u>	
H. RAHMANN, Institut für Zoologie Universität Stuttgart-Hohenheim Genetik und Membranforschung	204 - 206

VIII

	D. JACHERTZ, Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität Bern Pseudogene, Transposons und Retroviren (Vortragsreferat erstellt von H. PORCHER, Ostfildern)	207 - 209
	R.T.C. HUANG, Institut für Virologie der Universität Gießen Rekonstituierte Virusmembranen als biologische Vehikel	210 - 214
	W. PROBST, M. MÜHLEISEN, B. HEPPELMANN und H. RAHMANN, Institut für Zoologie, Universität Stuttgart-Hohenheim Untersuchungen zur Pharmakokinetik Gangliosid-haltiger Liposomen	215 - 218
V.	<u>Immunologie und immunbedingte Erkrankungen</u> U.P. KETELSEN, Kinderklinik der Universität Freiburg Myasthenia gravis: Die Pathogenese einer Autoimmunerkrankung	219 - 238
	J. SEIFERT, Experimentelle Chirurgie der Universität Kiel, und K.G. THEURER, Firma vitOrgan, Ostfildern Verbesserung der Transplantatüberlebenszeit durch tolerogene Verabreichung xenogener Gewebepräparationen	239 - 246
	WORKSHOP (Leitung H. PORCHER, Ostfildern, und B. SCHNELLEN, Stuttgart) Allergien und Autoimmunkrankheiten - Biologische Alternativen in der Therapie	247 - 261
VI.	<u>Biologische Restitution von Gewebs- und Strahlenschäden</u> H. WANDERKA, Institut für experimentelle Zellforschung, Viernheim Reparative und regenerierende Therapie des vorderen Augenbereiches mit CONJUNCTISAN B nach Dauerbelastung durch Kontaktlinsenpflegemittel	262 - 268

IX

P. SCHICK, Institut für Radiobiologie, München- Neubiberg Strahlenschutzsubstanzen auf zytoplasmatischer Basis im Test mit letalen Strahlendosen	269 - 275
H. BUSCHMANN, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchen- medizin, Universität München Untersuchung an Schweinen über die Beeinflus- sung eines Strahlenschadens auf das Immunsystem durch die Behandlung mit REVITORGAN-Präparaten aus foetalem Thymus und Plazenta	276 - 291
VII. <u>Pädiatrie und Neurologie</u>	
R. BECKMANN, Kinderklinik der Universität Freiburg Neuere klinische Erkenntnisse mit zytoplasma- tischen Substanzen bei myogenen und neuromus- kulären Erkrankungen, insbesondere bei der Muskeldystrophie, Typ Duchenne	292 - 300
E. BONNET, Reutlingen Zytoplasmatische Behandlung und Gegensen- sibilisierung bei atopischen Erkrankungen (Pollinose, Asthma, endogenes Ekzem)	301 - 304
INGEBORG BRANDT, Kinderklinik der Universi- tät Bonn Dynamik der Hirnentwicklung	305 - 321
VIII. <u>Biologische Alternativen in der Veterinär- medizin</u>	
Nach Vorträgen von H. KRAFT, München, D. MARHOLDT, Leverkusen, H. BURGHARD, St. Ingbert/Saar, und G. KNECHT, München- Grünwald, zusammengestelltes Übersichtsreferat von H. KRAFT, München	322 - 330

IX.	<u>BehandlungsvorSchläge</u>	
	T. STIEFEL, Stuttgart-Ostfildern	
	Optimierung von Behandlungsvorschlägen	
	durch EDV	331 - 333
X.	<u>Sachregister</u>	334 - 339

## Einleitung

K. E. THEURER  
Ostfildern

Verschiedene Anzeichen lassen erkennen, daß sich die orthodoxe Medizin in Richtung einer fundierten, biologischen "Ganzheitsmedizin" zu orientieren beginnt. Die unkalkulierbare Komplexität der Lebensvorgänge macht neue Konzepte notwendig, als deren Endprodukt eine anders orientierte Medizin stehen muß. Zu ihrem Basiswissen werden alle die Maßnahmen gehören, mit deren Hilfe es gelingt, das äußerst feine, sich den wechselnden Situationen präzise, anpassende Gefüge der Lebensvorgänge zu unterstützen und so die Lebenskräfte des Kranken zu mobilisieren. Der Organismus verfügt über regenerative Kräfte zur Erhaltung und Wiederherstellung der Gesundheit. Die ärztliche Kunst sollte mit geeigneten Methoden diese "hygienetischen Regulationen" des Organismus aktivieren. Nichts liegt näher, als die dabei zur Wirkung gelangenden Faktoren aus gesunden, phylogenetisch ähnlichen, Individuen zur Unterstützung der körpereigenen Wiederherstellungsbestrebungen zu nutzen.

Der Hämatologe Prof. Herbert BEGEMANN bezeichnet das Leben als einen nie zur Ruhe kommenden Prozess sich ständig verändernder Gleichgewichte. Jedes Lebewesen sei nur als eine in sich selbst ruhende Ganzheit zu verstehen; dies sei maßgeblich für unsere therapeutischen Bestrebungen(1).

Ich möchte annehmen, daß wir mit unseren Therapiearten diesen Forderungen genügen. Die Arbeiten von SPEMANN und meinem Lehrer, dem Zoologen MANGOLD, haben hier zu wichtigen Erkenntnissen geführt. Heilung bedeutet Übergang von Krankheit in den Zustand von Gesundheit durch natürliche Vorgänge. Der Organismus verfügt über regenerative Kräfte zur Erhaltung und Wiederherstellung der Gesundheit. Jede Schädigung trägt in sich den Grund zu ihrem eigenen Ausgleich. Die ärztliche Kunst sollte mit geeigneten Mitteln diese hygienetischen Regulationen des Organismus aktivieren.

Das Wort "Hygiogenese" leitet sich von Hygiene ab; man versteht darunter die Gesamtheit der bei der Genesung wirkenden objektivierbaren Vorgänge auf dem Weg von der Krankheit zur Gesundheit. Nichts liegt näher als die dabei zur Wirkung gelangenden stofflichen Faktoren aus gesunden, phylogenetisch ähnlichen Individuen zur Unterstützung der körpereigenen Wiederherstellungsbestrebungen zu nutzen. Dieser Denkansatz unterscheidet unsere Behandlungsmethoden von anderen organo- und zelltherapeutischen Methoden, die verlorengegangene Funktionen vorwiegend über Substitution und Prothesen wiederherstellen wollen.

Eine Wiederherstellung der natürlichen morphologischen Strukturen über zelleigene Synthesemechanismen wäre das Ideal. Diese Restitutio ad integrum wird leider nur im Tierreich auf einer sehr niedrigen Organisationsstufe erreicht, und zwar bei Schwämmen, die noch keine definierte Form haben, bei Würmern, die schon relativ kompliziert aufgebaut sind, und z.T. auch noch bei Reptilien. Bei höher differenzierten Tieren kommt es jedoch morphologisch nur noch zu einer unvollkommenen Reparatur. Stoffwechseldefekte der Gewebezellen können allerdings weitgehender normalisiert werden. Diese Unterschiede habe ich in meinem Gastvortrag im Mai dieses Jahres an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover zugrunde gelegt (2). Das Vorhandensein von Selbstheilungsvorgängen und die Möglichkeit, diese medikamentös zu beeinflussen, bilden unsere therapeutische Basis.

Während unphysiologische Arzneimittel Regulationsmechanismen und bestimmte Stoffwechselfvorgänge hemmen oder blockieren, die für die Selbstheilungsvorgänge benötigt werden und so die eigentliche Heilung verhindern, können biomimetische Arzneistoffe, die in den Stoffwechsel integriert werden und etwaige Stoffwechseldefekte überbrücken, die Selbstheilungsbestrebungen des Organismus unterstützen (3).

Auch ist der Ansicht zu widersprechen, daß die Naturheilkunde lediglich der gläubigen Unterwerfung des Patienten bedürfe, um überhaupt etwas bewirken zu können und der Glaube an die Magie der selbstheilenden Kräfte die stärkste Arznei sei. Dem ist entgegenzuhalten, daß die gezielte therapeutische Nutzung von biophysikalischen und biochemischen Mechanismen, die an Placeboeffekten beteiligt sind, keine Suggestionenwirkung mehr sein können. Nach dem

Stand des heutigen Wissens ist es zweckmäßig, Behandlungsmethoden nach ihrem Wirkungsmechanismus zu definieren; erzielen sie eine Heilung durch Selbstregulation, sind sie der Naturheilkunde zuzuschreiben (4).

Unsere Tagungen zeigen, wie meine wissenschaftlichen Freunde und ich von Anfang an bemüht waren, die biologischen Grundmechanismen zu erkennen und zu erforschen, um unsere Behandlungsmethoden nach dem Wirkungsmechanismus zu optimieren. Dadurch haben unsere Tagungen für die Gesamtmedizin zunehmend an Bedeutung gewonnen, weil wir immer bestrebt waren, eine Brücke zwischen Naturheilkunde und Naturwissenschaft zu bauen.

Ich möchte nun dieser Tagung einen recht erfolgreichen Verlauf wünschen, nicht zuletzt zum Wohle unserer Patienten.

#### Literatur

1. BEOEMANN, H.: Therapie der Gegenwart }2\_0, 307-322 (1981)
2. THEURER, K.: "Aktivierung von Selbstheilungsvorgängen - Hygiene durch Organo- und Immunotherapie"; Der praktische Tierarzt, 543 ff. und 691 ff. (1982)
3. THEURER, K.: "Heilung durch Glauben"; Ärztliche Praxis 52 (1979)
4. THEURER, K.: "Naturheilkunde - quo vadis"; Leserbrief, Selecta 22, Heft 19 (1980)

Struktur und Funktion der Tumor-DNA in Bakterien-  
induzierten Pflanzentumoren

G. KAHL  
Botanisches Institut  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Pflanzen reagieren auf Verletzungen, seien sie durch physikalische, chemische oder biologische Ursachen bedingt, mit einer schnellen Aktivierung der wundnahen Zellen. Je nach ihrer genetischen Konstitution, dem Ausmaß der Verwundung und der an der Wunde herrschenden physiko-chemischen Verhältnisse vermögen die verschiedenen Pflanzen auf unterschiedliche Weise diese Aktivierung zu einer regelrechten Wundheilung auszunutzen. Bestimmte Pflanzen schließen ihre Wunden durch Sekretion von Verschlussubstanzen (Latex, Harz, Wundgummi) oder benutzen die Reste der durch die Verletzung abgestorbenen Zellen als Barriere gegen eindringende Phytopathogene und den für die Zelle tödlichen Wasserreflux. Auch relativ hoch entwickelte Pflanzen machen sich diese recht archaische Art des Wundverschlusses zunutze.

Bei vielen Pflanzen führt die Verwundung zu einer ausgedehnten chemischen Modifikation wundnaher Zellwände (Kieselsäureeinlagerung, Phenolimprägierung, Verholzung, Verkorkung) und damit einem baktericid und fungicid wirkenden Wundverschluß. Oft proliferieren die wundexponierten Zellen auch in die Wunde hinein (Wundkallus) oder bilden ein kompliziertes Abschlußgewebe unter der Wundoberfläche, an dessen Zustandekommen mehrere Zelltypen mit unterschiedlicher Funktion beteiligt sind (Wundperiderm). Gleichgültig, welche Art der Wundheilung auch immer durchgeführt wird, sie ist stets transient. Nach dem Abklingen des Wundreizes geht die aktivierte Wundzelle wieder in eine ruhende Zelle über, der Wundheilungsprozess ist abgeschlossen.

Zu einer abnorm gesteigerten, permanenten Wundheilung kann es aber kommen, wenn sich ein ubiquitär verbreitetes Bodenbakterium,

Agrobacterium tumefaciens, an die durch die Verwundung exponierten Zellwände der Pflanze fixiert ("attachment"). Diesem Attachment unterliegen noch nicht näher bekannte Wechselwirkungen zwischen Lipopolysacchariden des Bakterien-Sacculus und Polygalacturonsäure der Mittellamelle pflanzlicher Zellwände. Nach dem Attachment überträgt die Bakterienzelle in einem konjugationsähnlichen Vorgang einen Teil eines Plasmides ("tumor-inducing plasmid"; Ti-Plasmid; pTi) in die pflanzliche Wundzelle, wo es in das nukleäre Genom kovalent integriert wird und auf bislang noch nicht ganz geklärte Weise die Wundzelle zu permanenter mitotischer Aktivität umsteuert. Die übertragene DNA ("transferred DNA", T-DNA) codiert für eine Reihe von Funktionen, die zum einen für den transformierten Zustand der Wundzelle ohne Bedeutung, zum anderen dafür aber essentiell sind ("oncogenes").

Für unser Verständnis tumorösen Wachstums von Pflanzen ist die genaue Kenntnis der Struktur der T-DNA und all ihrer Funktionen von wesentlicher Bedeutung.

Die T-Region des Ti-Plasmids von Agrobacterium wird in die präsumptive Tumorzelle übertragen

Bakterien erobern sich oft eine ökologische Nische, einen Ort also, an dem sie Konkurrenten um gemeinsame Nahrungsmittel überlegen sind, indem sie die Fähigkeit zum Abbau bestimmter organischer Substanzen erwerben. Ihre Konkurrenten dagegen können diese potentiellen Nahrungsstoffe nicht verwerten. Die Gene für den Abbau solcher Stoffe liegen sehr oft auf sog. Plasmiden (katabolische Plasmide; CHAKRABARTY 1976), extrachromosomalen doppelsträngigen und kovalent cicular geschlossen DNA-Molekülen (cccDNA), die als Träger von Antibiotikaresistenzen bekannt geworden sind. Solche Plasmide enthalten stets Gene, die für die Replikation des Plasmides codieren (rep-Funktionen), oft auch Bereiche, die den Transfer des Plasmides von einer Bakterienzelle in die andere katalysieren (tra-Funktionen). Plasmide mit tra-Genen, (sog. konjugative Plasmide) werden daher nach ihrer Replikation in der Ursprungszelle rasch in einer plasmidfreien Bakterienpopulation verbreitet, die damit neue Eigenschaften erwirbt.

Agrobacterium tumefaciens besitzt im Ti-Plasmid ein solches konjugatives Plasmid ( VAN LAREBEKE et al., 1974; ZAENEN et al., 1974;

WATSON et al., 1975), dessen Molekulargewicht von etwa 95 bis zu 156 Megadaltonen variieren kann. Daneben können noch mehrere andere Plasmide in ein und derselben Bakterienzelle vorkommen, die aber nichts mit der Virulenz des Bakteriums zu tun haben. Dagegen ist der Besitz des Ti-Plasmides unabdingbare Voraussetzung für eine Tumorinduktion an Pflanzen. Verlust des Ti-Plasmids ("curing") bedingt unvermeidlich den Verlust der Onkogenität. Werden in plasmidfreie und daher nicht virulente Stämme Ti-Plasmide wieder eingeführt - also beispielsweise durch Konjugation - so werden diese Stämme wieder onkogen. Onkogenität ist also an die Anwesenheit des Ti-Plasmides gekoppelt, das Ti-Plasmid selbst repräsentiert das schon zu Anfang der pflanzlichen Tumorforschung postulierte "Tumor-induzierende Prinzip" (TiP). Damit ist erwiesen, daß Plasmid-DNA ursächlich in die Transformation pflanzlicher Zellen verwickelt ist (Abb.1).

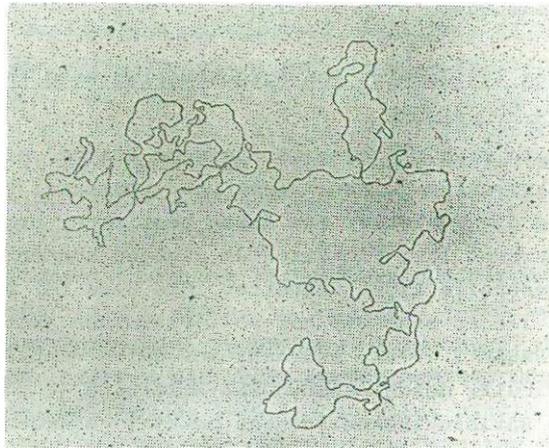


Abb. 1: Ti-Plasmid von Agrobacterium tumefaciens

Ti-Plasmide codieren für eine Reihe von Funktionen, die nur zum Teil für die Transformation von Wirtszellen verantwortlich sind. Solche Funktionen können sehr leicht durch einen Vergleich der Eigenschaften plasmidloser und plasmidhaltiger Agrobakterien festgestellt werden. Danach sind Ti-Plasmide für folgende Charakteri-

stika des Bakteriums verantwortlich: Tumorinduktion an Pflanzen, konjugativer Transfer der Ti-Plasmide von Bakterium zu Bakterium und Katabolismus von Arginin und Ornithin. Darüberhinaus codieren Gene des Ti-Plasmids noch für die Synthese bestimmter tumorspezifischer Aminosäurederivate (sog. Opine) in der Wirtszelle sowie deren Abbau durch das Bakterium (ZAENEN et al., 1974; VAN LAREBEKE et al 1974, 1975; SCHELL, 1975; WATSON et al., 1975; ENGLER et al., 1975; BOMHOFF et al., 1976; GENETELDO et al., 1977; KERR et al., 1977; FIRMIN et al., 1978; KLAFWIJK et al., 1978; PETIT et al., 1978 a,b; ELITS et al., 1979; GUYON et al 1980; HOISTERS et al., 1982; KERR et al., 1982; TEMPFi et al., 1982;).

Die Entdeckung dieser Opine in pflanzliche Tumorzellen, die durch *Agrobacterium tumefaciens* transformiert worden waren, war im Prinzip der erste Beweis dafür, daß bakterielle Gene bei der Tumorinduktion beteiligt sind. Ursprünglich war nur ein Lysinderivat analysiert worden (N-<1-(D-1-Carboxyäthyl)-L-Lysin oder "Lysopin"; LIORET, 1955; BIEMANN et al., 1960); später wurden andere Derivate basischer Aminosäuren entdeckt. Alle diese tumorspezifischen opine - sie sind nicht in normalen Pflanzenzellen vorhanden - lassen sich grob in drei Gruppen katalogisieren.

Die Octopingruppe besteht aus Octopin, Octopinsäure, Lysopin und Histopin, die Nopalingruppe aus Nopalin und Nopalinsäure (Ornalin) und die Agropingruppe (früher Nulltyp-Gurppe) aus Agropin (Abb.2).

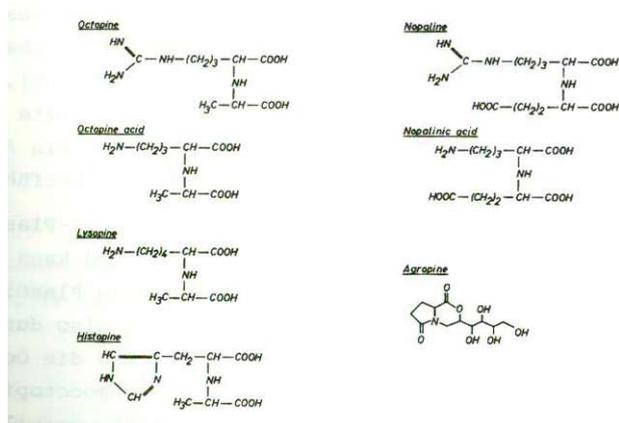


Abb. 2: Strukturformeln der Opine von *Agrobacterium tumefaciens*  
Links: Octopin-Familie. Rechts oben: Nopalin-Familie.  
Rechts unten: Agropin.

Die Klassifizierung der Ti-Plasmide verschiedener Agrobacterium-Stämme basiert auf der Art des Opins, das nach der Infektion mit dem jeweiligen Stamm im Tumorgewebe synthetisiert wird. Bakterien mit Octopinplasmiden induzieren Octopin-haltige Tumoren, Bakterien mit Nopalinplasmiden Nopalin-haltige Tumoren; Agropin-haltige Tumoren entstehen nach der Infektion pflanzlicher Zellen mit Agropinplasmiden. Octopinplasmide sind untereinander sehr ähnlich, wenn nicht gar identisch, wie DNA-Reassoziationsexperimente und Restriktionsmusteranalysen belegen (CURRIER et al., 1976; GENETELLO et al. 1977; DRUMMOND et al., 1978; SCIAKY et al., 1978;). Nopalinplasmide dagegen zeigen erhebliche Diversität untereinander und weniger als 30% Homologie mit den Octopinplasmiden (CURRIER et al., 1976). Einige Nopalinplasmide (pTiAT-181, pTiEU-6 und pTi-T10/73; PETIT et al., 1970; SCIAKY et al., 1978) kodieren zwar noch für die Fähigkeit des Bakteriums, Nopalin zu katabolisieren, aber nicht mehr für die Synthese dieses Opins in der Tumorzelle (sog. "defekte" Nopalinplasmide; GUYON et al., 1980). Agropin- und Octopinplasmide besitzen wahrscheinlich einen gemeinsamen Vorfahr, denn zum einen existiert ein Höchstmaß an Homologie zwischen beiden Plasmidtypen (DRUMMOND et al., 1978), zum anderen findet sich Agropin oft in Octopintumoren (FIRMIN et al., 1978).

Opinsynthese im Tumor und Opinabbau im Bakterium werden von verschiedenen Loci kodiert. Die Gene für die opinsynthetisierenden Enzyme werden in die Wirtszelle übertragen, sind also Bestandteil der T-DNA, die Gene für Opinabbau dagegen liegen ausserhalb der T-Region des Ti-Plasmides (d.h. des übertragenen Bereichs). Sie kodieren für mindestens zwei Enzyme, von denen das erste die Opine in eine •C-Ketosäure und Arginin zerlegt, das zweite ein Arginin-derivat in eine verwertbare Kohlenstoffverbindung überführt.

Die Information für den konjugativen Transfer von Ti-Plasmiden in vitro liegt ebenfalls auf dem Ti-Plasmid selbst und kann durch das Opin induziert werden, das durch das entsprechende Plasmid abgebaut werden kann. Octopinabbauende Stämme werden also durch Octopin, Octopinsäure oder Lysopin, nicht jedoch durch die Octopinanalogen Noroctopin, Homooctopin oder Desmethylhomooctopin zum Plasmidtransfer induziert (HOYKAAS et al., 1979). Detaillierte Studien erbrachten den Nachweis, daß die Gene für den Octopinkatabolismus (occ genes) und den Transfer (tra genes) in verschie-

denen Operonen organisiert sind, aber durch ein gemeinsames Regulatorgen kontrolliert werden (KLAPWIJK et al., 1978; TEMPF et al., 1978). Dies belegen vor allem Mutanten, die (1) konstitutiven Octopinabbau und Ti-Plasmidtransfer zeigen (also wahrscheinlich im gemeinsamen Regulatorgen mutiert sind, wodurch beide Funktionen betroffen sind, (2) konstitutiv für Octopinabbau sind, aber induzierbar für Transfer geworden sind und (3) induzierbar für Octopinkatabolismus, aber konstitutiv für Transfer sind (mithin wahrscheinlich mutierte Regulatorproteine besitzen, die eine konstitutive Aktivität in einem (occ/tra) und eine induzierbare Aktivität in einem anderen Gen erzeugen (tra/occ). Auch in Nopalinplasmiden existieren ähnliche Regulationsmechanismen für den Plasmidtransfer (TEMPF et al., 1978; 1982).

- |     |       |  |
|-----|-------|--|
| 1.  | Rep   | (Replikation)                          |
| 2.  | Tra   | (Transfer; konjugativ)                 |
| 3.  | Nos   | (Nopalinsynthese in Tumoren)           |
|     | Oes   | (Octopinsynthese in Tumoren)           |
| 4.  | Noc   | (Nopalinkatabolismus)                  |
|     | Occ   | (Octopinkatabolismus)                  |
|     | Are   | (Argininkatabolismus)                  |
|     | Agc   | (Agropinkatabolismus)                  |
|     | Psc   | (Katabolismus phosphorylierter Zucker) |
| 5.  | Ape   | (Ausschluß des Phagen AP1)             |
| 6.  | Inc   | (Inkompatibilität)                     |
| 7.  | One   | (Onkogenität)                          |
| 8.  | Shi   | (Sproßinduktion in Tumoren)            |
| 9.  | Ri    | (Wurzelinduktion in Tumoren)           |
|     | Roi   |  |
| 10. | Agr S | (Sensitivität gegen Agrocin 84)        |
| 11. |       | Wirtsspezifität                        |

Tab. 1s Funktionen des Ti-Plasmides von Agrobacterium tumefaciens

Die Wirtsspezifität von Agrobacterium tumefaciens ist ebenfalls auf dem Ti-Plasmid kodiert und bestimmt die Anzahl von Wirtspflanzen, bei denen nach Infektion Tumoren erzeugt werden können. Zu

ihrem Nachweis wurde ein plasmidfreier Bakterienstamm mit gereinigter Plasmid-DNA von Bakterienisolaten aus Tumoren der Weinrebe transformiert. Transkonjuganten vermochten dadurch wieder Tumoren zu induzieren, und zwar mit dem Wirtsspektrum des Donorstammes. Fingerprint-Analysen durch Restriktionsendonukleasen bestätigten die Identität der Plasmide in Donor- und Transkonjugantenstämmen (TOMASHOW et al., 1980).

Neben anderen Eigenschaften (z.B. dem Ausschluß des Phagen AP1 und der Sensitivität gegen ein von Agrobacterium radiobacter produziertes Bacteriocin, Agrocin 84) bestimmen Sequenzen des Ti-Plasmides auch die Tumormorphologie. Agrobakterien mit Octopinplasmiden induzieren gewöhnlich unorganisierte Tumoren, während Nopalinsplasmide sowohl unorganisierte als auch schwach oder aber hochorganisierte Tumoren aus Massen von undifferenzierten Zellen, zwischen denen aber differenzierte Zellen (z.B. Tracheiden, Phloemelemente) liegen können, wohingegen Teratomata organähnliche Strukturen entwickeln. Allerdings spielen hierbei auch Bakterium-Wirtsbeziehungen sowie die Position des Tumors an der Wirtspflanze eine Rolle (Abb. 3).

Bei der Erforschung all dieser Plasmidfunktionen haben mutierte Plasmide eine wesentliche Rolle gespielt, einmal Transposon-Insertionsmutanten (HERNALSTEENS et al., 1978; VAN MONTAGU et al., 1979; GARFINKEL et al., 1980; HÜLSTERS et al., 1980; 1982; OOMS et al., 1980; DE GREVE et al., 1981;), zum anderen Deletionsmutanten (KOEKMAN et al., 1979; HÜLSTERS et al., 1980; 1982;). Die genetische und molekularbiologische Analyse dieser Mutanten ergab darüber hinaus, daß es auch Sequenzen ausserhalb der T-DNA auf dem Ti-Plasmid gibt, die für die Tumorinduktion unerlässlich sind (Oncogenicity functions oder Onc-Regionen; Abb. 4).

Diese Onc-Regionen sind über eine Hälfte des Ti-Plasmides verteilt. Die andere Hälfte hat offenbar mit der Tumorinduktion nichts zu tun, sie kann ohne Verlust der Virulenz entfernt werden (KOEKMAN et al., 1979). Dies bedeutet, daß es Gene auf dem Ti-Plasmid gibt, die nicht in der Tumorzelle wiederzufinden sind, aber wichtige Funktionen bei der Tumorentstehung besitzen. Diese Onc-Regionen könnten bei der Excision der T-DNA aus dem Ti-Plasmid, dem Transfer der T-DNA, dem Anheften der Bakterien an die Wundzellwand ("attachment"), der Integration der T-DNA ins Wirtszellgenom oder

der Umsteuerung des Wirtsstoffwechsels eine Rolle spielen (HÜLSTERS et al., 1982). Neueste Forschungen haben ergeben, daß zumindest einige dieser Onc-Regionen wenigstens vorübergehend in der Pflanzenzelle zu finden sind (SCHELL, pers. Mitteilung).

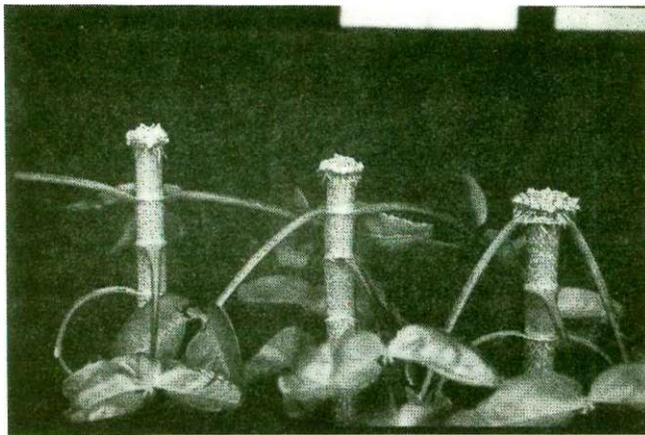


Abb. 3: Typischer Positionseffekt bei der Crown Gall-Tumorentstehung: die Intensität der Tumorbildung wird auch durch Einflüsse des Wirtsgewebes mitbestimmt. Wird Stengelgewebe von *Kalanchoe* proliferiert unmittelbar oberhalb eines Blattansatzes (also im unteren Teil eines sog. Internodiums) verwundet und infiziert, so entstehen stärkstens proliferierende und z.T. hochorganisierte Tumoren (links), während eine erfolgreiche Infektion in der Internodiumsmitte zu deutlich kleineren (Mitte), im oberen Teil des Internodiums nur zu kleinen, zumeist unorganisierten Proliferationen führt (rechts).

Allerdings sind die meisten Mutationen, die zu einer Beeinträchtigung der Tumorbildung führen, auf Ti-Plasmidsequenzen lokalisiert, die in allen Ti-Plasmiden vorkommen und damit homolog sind (sog. T-Region; ENGLER et al., 1981). Diese T-Region wird aus dem Ti-Plasmid herausgeschnitten und auf bislang unbekannte Weise in die Pflanzenzelle injiziert. Dazu wiederum muß das *Agrobacterium* Zugang zu bestimmten Stellen der pflanzlichen Zellwand erhalten. Normalerweise schützt sich nämlich die höhere Pflanze durch die Ablagerung von Fetten und Wachsen (Kutinisierung) vor Wasserverlust und Infektionen, die vor allem an allen umweltexponierten



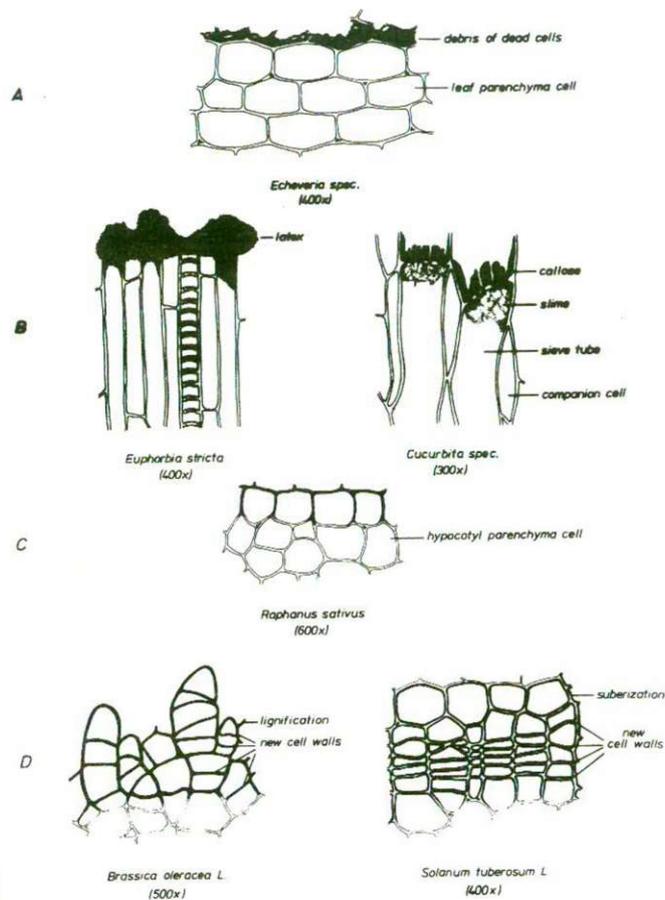


Abb. 5: Primitive und komplexe Wundreaktionen bei höheren Pflanzen.

- A. Verwendung der Reste abgetöteter Zellen als Wundbarriere.
- B. Sekretion von Stoffen, die zum einen die Wunde mechanisch verschließen, zum anderen bakterio- und fungistatische, in speziellen Fällen sogar bakteri- und fungicide Wirkung besitzen. Links im Bild: an der Wundfläche geronnener Milchsafte eines Wolfsmilchgewächses, rechts der Verschluss von Siebplatten des assimilatleitenden Phloems einer Kürbispflanze mit Kallose und Schleimen.
- C. Modifikation wundnaher Zellwände durch Verholzung (Lignifizierung).
- D. Wundabschlussgewebe. Links Kallusbildung an einer Wunde der Kohlrabiknolle mit anschließender Lignifizierung der Zellwände der am Wundverschluss beteiligten Zellen. Rechts Bildung eines regulären, sekundären Abschlussgewebes mit anschließender Verkorkung (Suberinsierung) der wundnahen Zellwände.

Wirkungen zwischen Lipopolysacchariden des Bakteriensacculums und Polygalacturonaten der pflanzlichen Mittellamelle eine Rolle. Nach dem Attachment verläßt fibrilläres Material die Bakterienzelle und tritt in die Pflanzenzelle über.

Integration der T-DNA in mittelrepetitive Sequenzen des nukleären Genoms der Wirtszelle

Eine Integration der T-DNA kann sowohl in plastidäre, mitochondriale oder auch nukleäre DNA erfolgen, wenn man von der Möglichkeit absieht, daß sie auch als selbstständiges Replikon existieren können. Entsprechende Experimente haben zweifelsfrei ergeben, daß die T-DNA im Kern der Wundzelle, nicht aber in Mitochondrien oder Chloroplasten enthalten ist (CHILTON et al., 1980; WILLMITZER et al., 1980; CHILTON, 1982). Ganz offenbar werden aber mehrere Kopien der T-DNA in verschiedene Stellen des nukleären Genoms eingebaut, gewöhnlich etwa 1-3. Die Insertionsstellen mit dem rechten oder linken Ende der T-Region konnten aus einem Nopalintumor des Tabaks isoliert, in einem  $\lambda$ -Phagenvektor kloniert und detailliert untersucht werden. Danach ist die T-DNA in Nopalintumoren tandemartig hintereinander angeordnet und in repetitiver Sequenz der Pflanzen-DNA integriert. Trotzdem ist eine Insertion auch in hochrepetitive oder Unique-Sequenzen möglich (ZAMBRYSKI et al., 1980). Die Pflanzen-DNA in der Nähe der Insertionsstelle enthält mehrerer direkt- oder indirekt-repetitive Sequenzen ("direct or inverted repeats"; LEMMERS et al., 1980; ZAMBRYSKI et al., 1980), die eine Rolle bei der Insertion spielen könnten, obwohl an den Enden der T-DNA keine ähnlich gestalteten, homologen Bereiche zu finden sind. Insofern unterscheidet sich die T-DNA von bakteriellen Transposons, DNA-Sequenzen, die autotransferabel sind und mithilfe von endständigen, invers-repetitiven Sequenzen integrieren (STARLINGER, 1982). Der mittlere Teil der T-DNA ("core-T-DNA") ist allen Ti-Plasmiden homolog und offensichtlich für die Tumorinduktion essentiell. Jede Mutation in diesem Bereich führt entweder zu einer Abschwächung der Tumorinduktion oder zu deren Verlust (KOEKMAN et al., 1979). Diese Sequenzen sind in allen Ti-Plasmiden vorhanden und homolog ("common sequences"). Obwohl die Funktionen dieser "Core-DNA" noch weitgehend unbekannt sind, müssen auf ihr doch Informa-

tionen codiert sein, die irgendwie die Tumorinduktion und die Aufrechterhaltung des tumorösen Zustandes der Pflanzenzelle garantieren.

Der rechte Teil der T-DNA enthält das Gen oder die Gene für die Opinsynthese. Tn1-Insertionen in diesem Bereich führen zum Verlust der Fähigkeit des Bakteriums, in Pflanzentumoren Opine zu synthetisieren. Die Onkogenität wird dagegen nicht beeinflusst, die Transposoninsertionsmutante  $Onc^+$  Nos beweist also, daß das Gen für die Opinsynthese für eine Tumorinduktion nicht notwendig ist (HOLSTERS et al., 1980). Tatsächlich ist der Nachweis gelungen, daß der rechte Bereich der T-DNA in Octopintumoren für das Enzym Lysopindehydrogenase (LpDH) codiert (SCHRÖDER et al., 1981). Der linke Bereich der T-DNA ist weniger weitgehend erforscht und zudem variabel in Octopin- und Nopalintumoren. Allerdings kann man durch Insertionsmutationen in bestimmten Bereichen der T-DNA auch die Tumormorphologie beeinflussen. Während die T-DNA des Wildtypplasmides nämlich für die Bildung eines unorganisierten Tumors codiert, gibt es Mutanten, die zur Bildung von Sprossen (Shi = shoot induction) oder auch Wurzeln (Ri = root-induction) führen (HOLSTERS et al., 1982; LEEMANS et al., 1982). Daraus läßt sich ableiten, daß es Sequenzen auf der T-DNA gibt, die direkt oder indirekt in den Wachstoffsstoffhaushalt der Pflanzenzelle eingreifen. Die Balance zwischen zellteilungsfördernden Hormonen (Cytokine) und zellstreckungsfördernden Hormonen (Auxinen) bestimmt nämlich die morphogenetische Potenz der jeweiligen Pflanzenzelle bzw. des Pflanzengewebes. Jeder Eingriff, der zu einer Veränderung des Gehaltes an aktiven Hormonen einer Sorte in einer Zelle führt, bedingt damit auch zwangsläufig eine veränderte Morphogenese (z.B. Sproßbildung).

Die Onkogenitätsfunktionen sind nicht exakt begrenzbar.

All diese Untersuchungen haben zu der Erkenntnis geführt, daß die aus dem Ti-Plasmid herausgeschnittene T-Region ohne größere Umstellungen kovalent in die Wirtszellen-DNA integriert wird und dort -colinear mit der T-Region- in einer oder wenigen Kopien vorhanden ist und in noch unbekannter Weise die Wundzelle zu permanenter Proliferation zwingt (Abb.6).

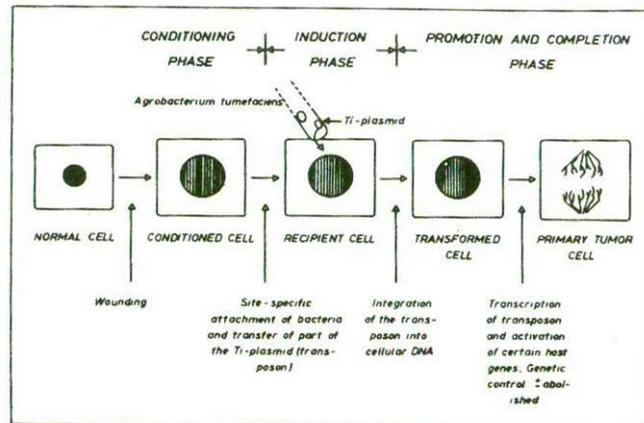


Abb. 6 : Schematischer Abriss der Tumorbildung durch *Agrobacterium tumefaciens*. Die normale Zelle muß verwundet und damit aktiviert werden, damit es zu einem Attachment des Agrobakteriums und einem Transfer der T-Region und möglicherweise anderer Regionen des Ti-Plasmides in die Wundzelle kommen kann. Die T-DNA wird kovalent an die Sequenz der Kern-DNA der Wirtszelle gebunden und steuert auf noch nicht exakt bekannte Weise den Wuchsstoffhaushalt der betreffenden Zelle um: es kommt zu einer permanenten Proliferation.

#### Transkription der T-DNA in Poly(A) -RNA durch RNA-Polymerase II der Wirtszelle

Nach ihrer Integration in mittelrepetitive Sequenzen des Zellkerns wird die T-DNA oder zumindest ein Teil davon transkribiert. Dabei ist noch ungeklärt, wann zum ersten Mal nach einer Infektion T-DNA-spezifische Transkripte auftreten, zumal es sehr schwer ist, zwischen den Transkripten der im Wundgewebe siedelnden Bakterien und den Transkripten der Pflanzenzelle zu unterscheiden. Die Agrobakterien lesen nämlich beständig Ti-Plasmidsequenzen ab, es entstehen bereits im Bakterium geringe Mengen an RNA, die vom Plasmid kodiert werden (GALVIN et al., 1981). In der Anfangsphase der Tumorentstehung werden daher zumindest auch Transkripte aus dem Bakterium in der gesamten RNA zu finden sein. Experimente, die diese Schwierigkeit zu umgehen versuchten, weisen darauf hin, daß Bakterien in pflanzlichen Wunden keine oder nur unmeßbar geringe Mengen an RNA synthetisieren, die Homologie zu Plasmidsequenzen aufweisen. Dagegen beginnen nach eigenen Untersuchungen transformierte

Wundzellen bereits 36 Stunden nach der Infektion mit der Produktion von T-DNA codierter RNA (KAHL, G., OTTEN, L., SCHELL, J., unveröffentlicht). Obwohl vieles darauf hindeutet, daß auch Bereiche außerhalb der T-Region des Ti-Plasmides übertragen werden und zumindest vorübergehend in der präsumptiven Tumorzelle erhalten bleiben, ist völlig unbekannt, ob diese "Onkogenitäts-Bereiche" auch transkribiert werden. Es wird der Anwendung wesentlich verfeinerter Methoden vorbehalten sein, die äußerst geringe Menge solcher Transkripte einwandfrei festzustellen.

Die Ablesung von bakteriellen Sequenzen in Crown Gall-Tumorzellen war im Prinzip schon lange bekannt. In den Opinen dieser Tumorzellen waren nämlich Substanzen gefunden worden, die nie in normalen, nicht infizierten Pflanzenzellen auftraten, also von Bakterien stammen mußten. Einen direkten Beweis brachten Experimente, in denen die gesamte RNA von Tumoren gegen ein spezifisches Fragment des Ti-Plasmides hybridisiert wurde (DRUMMON et al., 1977). Dabei zeigte sich, daß der rechte Teil der T-DNA am aktivsten transkribiert wurde. Der linke Teil wurde nur schwach abgelesen (GURLEY et al., 1979). Eine Reihe anderer Untersuchungen haben diese Ergebnisse im Prinzip bestätigt (WILLMITZER et al., 1981; LEEMANS et al., 1982; WILLMITZER et al., 1982).

Beide Stränge der T-DNA codieren für RNA. Die sog. T1-DNA in octopinhaltigen Crown-Gall-Geweben wird in sieben polyadenylierte RNAs transkribiert, deren Länge von 670 bis 2700 Basen variiert. Zumindest zwei, möglicherweise auch vier Transkripte sind sowohl in Octopin- als auch Nopalintumoren zu finden und werden vom mittleren Bereich der T-DNA ("core") codiert (WILLMITZER et al., 1982).

Es ist nunmehr gesichert, daß die wirtseigene Polymerase II die Ablesung der T-DNA-Gene übernimmt. Geringe Konzentrationen an  $\alpha$ -Amanitin (0.7  $\mu$ g/ml) verhindern das Erscheinen von Transkripten mit Homologie zur T-DNA in isolierten Tumorzellkernen völlig (WILLMITZER et al., 1982). Das aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) isolierte cyclische Octopeptid hemmt die DNA-abhängige RNA-Polymerase I (bei relativ hohen Konzentrationen) und zwei (bei niedrigen Konzentrationen) und dient somit dem Nachweis einer Transkription durch beide Polymerasen sowie zur Diskriminierung zwischen beiden Enzymen.

Damit ist auch der Nachweis erbracht, daß die wirtseigene Polymerase II Promotersequenzen auf der T-DNA erkennen muß. Möglicherweise werden alle Transkripte der T-DNA von eigenen Promotoren aus abgelesen. Die relativ häufigste mRNA, für die Octopin-Synthase (oder Lysopindehydrogenase) codierend, wird von einem Gen mit einer möglicherweise nicht kontrollierbaren Promotersequenz abgelesen, da sie in allen Geweben von Pflanzen gefunden werden kann, die von transformierten Tabakzellen regeneriert wurden. Wie schon von tierischen Genen her bekannt, sind etwa 140-300 Basenpaare vor dem Initiationscodon am 5'Ende ("upstream") wesentlicher Bestandteil des Opinsynthasegens. Octopintumoren enthalten entweder nur ein solches Gen oder deren zwei, wobei das eine am rechten Ende der sog. TL-DNA für die Octopinsynthase codiert, das andere am rechten Ende der sog. TR-DNA lokalisiert ist und für die Agropin- und Manopin-synthase codiert. Beide DNA-Bereiche sind durch Pflanzen-DNA voneinander getrennt. Daher produzieren Tumoren, die sowohl TL- und TR-DNA besitzen, sowohl Octopin als auch Agropin, wohingegen Tumoren, die nur TL-DNA enthalten, lediglich Octopin zu synthetisieren vermögen. In Nopalintumoren finden sich ebenfalls zwei Gene für Opinsynthetasen, wovon eines am rechten Ende der T-DNA lokalisiert ist und für die Nopalinsynthetase, das andere am linken Ende der T-DNA für Agrocinopinsynthetase codiert (ELLIS et al., 1981). Nopalintumoren produzieren also normalerweise beide Opine.

Von dem mittleren Teil der T-DNA ("common sequences") werden in Octopin- als auch Nopalintumoren insgesamt sechs verschiedene Transkripte abgelesen, die möglicherweise alle irgendwie die Entwicklung normaler Pflanzenorgane verhindern. Zwei dieser Transkripte (RNA 1 und 2) blockieren spezifisch eine Sproßbildung, ein weiteres Transkript (RNA 4) hemmt ebenso spezifisch die Wurzelbildung. Transkript 5 wiederum erlaubt keine Bildung von Blattknospen auf den Tumoren. Da die Bildung all dieser Organe vom endogenen Wuchsstoffgehalt und dem Verhältnis von Auxinen zu Cytokinin abhängt, fungieren die erwähnten Transkripte wahrscheinlich analog den Phytohormonen. Die Transkripte 1 und 2 hätten demnach Auxin- das Transkript 4 Cytokininwirkung. Dafür spricht auch die Tatsache, daß das Verhältnis von Cytokinin zu Auxinen in Wildtypumoren 0,22, in wurzelbildenden Tumoren (induziert durch Agrobakterien mit einer Mutation im Gen 4 nur 0,02, in sproßbildenden Tumoren (induziert durch Mutanten in Gen 1 oder 2) dagegen 14,4 ist.

Es ist daher die Spekulation erlaubt, daß im Laufe der Evolution durch völlig unbekannte Mechanismen pflanzeneigene Gene (Auxin- und Cytokiningene mitsamt ihren eukaryontischen Promotoren) in das Ti-Plasmid rekombiniert wurden. Damit waren die Agrobakterien als Besitzer des Ti-Plasmids in der Lage, pflanzliche Wachstumsstoffe zu bilden und pflanzliche Zellen und Gewebe zum Wachstum zu induzieren. Ganz offenbar aber erwies es sich als vorteilhafter für das Bakterium, diese Gene wieder zusammen mit anderen Genen in die Pflanzenzelle zu überführen und dort zur Expression zu bringen. Denn die Verwertbarkeit auch nur eines Produktes der manipulierten Pflanzenzelle durch das Agrobakterium, nicht aber seine Konkurrenten, garantierte diesem Bakterium bereits eine ökologische Nische.

#### Mögliche Funktionen einer Onc-Region des Ti-Plasmides

Außerhalb der T-Region des Ti-Plasmides liegende Sequenzen sind in bislang noch weitgehend ungeklärter Weise in den Prozess der Tumorbildung einbezogen. Werden diese sog. Onc-Regionen aus dem Plasmid entfernt oder mutiert, so verliert das Agrobakterium seine Virulenz. Obwohl nur die T-DNA selbst in Tumorzellen nachweisbar ist, wäre es doch denkbar, daß vorübergehend auch die Onc-Regionen in die verwundete Pflanzenzelle injiziert werden und dort wirksam werden. Ergebnisse einiger Experimente scheinen dies zu bestätigen. So ist ein Gen, das für die Auxinbiosynthese codiert, etwa 20.9 kb links von der T-DNA lokalisiert, einem Bereich also, der für die Onkogenität unerlässlich ist. Mutationen in diesem Gen führen daher zum Verlust der Virulenz des Agrobakteriums. Dieses sog. *iaaP*-Gen ("indole acetic acid production", d.h. Auxinbiosynthese) könnte in der präsumtiven Tumorzelle vorübergehend aktiv werden, große Mengen an Auxinen bilden und damit die Zelle gewissermaßen vorkonditionieren (LIU et al., 1982). Dies würde bedeuten, daß die Zelle durch das Auxin habituiert wird. Unter Habituiierung versteht man einen Vorgang, durch den eine normalerweise wuchsstoffabhängige Pflanzenzelle wuchsstoffautonom wird. Dieses Phänomen ist von der pflanzlichen Gewebekultur her bekannt. Nach einigen Passagen in ein neues Medium werden Pflanzenzellen plötzlich unabhängig von appliziertem Wuchsstoff: sie teilen sich auch ohne Zugabe von Auxinen oder Cytokinin, sie sind habituiert. Ganz offenbar werden in solchen Zellen auf noch unbekannt Weise die Gene

für Auxin- und Cytokininsynthese permanent aktiviert.

Das *iaaP*-Gen also, wenn auch nur in der Anfangsphase der Tumorentstehung in der Pflanze vorhanden, später aber eliminiert, könnte habituierend wirken. Dieser Zustand der Habituation würde dann / durch die integrierte T-DNA permanent aufrechterhalten ("tumor maintenance"). Es ist offensichtlich, daß die Funktion(en) der *Onc*-Regionen und auch der T-DNA selbst noch weitgehend unbekannt sind. Mit einer Aufklärung dieser Funktion ist aber angesichts der intensiven Bearbeitung bald zu rechnen.

"Genetische Kolonisierung": ein Beispiel von bakteriellem  
Parasitismus

Die Tatsache, daß Plasmidgene, die für die Synthese von Opinen kodieren, in der infizierten Pflanzenzelle aktiv werden, während die Pflanzenzelle die entstehenden Opine aber offenbar nicht nutzen kann, hat zur Formulierung des Konzeptes der "genetic colonization" geführt (SCHELL, 1978; HÜLSTERS et al., 1982). Danach überführt das virulente Agrobakterium einen Teil seiner Ti-Plasmidsequenzen in die verwundete Pflanzenzelle, ohne selbst in sie einzudringen. Tatsächlich belegen elektronenoptische Aufnahmen und auch biochemische Experimente, daß Agrobakterien zwar an den äußeren Zellwänden wundexponierter Zellen haften, nie aber ins Zellinnere vorstoßen. Nach dem Transfer dieser Sequenzen kommt es in der Wirtszelle u.a. zur Ablesung von Genen, die für Opinsynthetasen im weitesten Sinne codieren. Durch deren Aktivität wiederum werden Opine in der Wirtszelle akkumuliert, für die aber kein abbauendes System vorhanden ist. Daher werden die Opine an die Umgebung sezerniert und von den dort siedelnden Agrobakterien selektiv aufgenommen ("Opinpermease"). Da das Agrobakterium, nicht aber andere, nicht verwandte Bakterien, auf dem Ti-Plasmid die Information für den Opinabbau enthält, vermag es die Opine als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu nutzen. Gleichzeitig induziert das Opin den konjugativen Transfer des Ti-Plasmides, wodurch dieses Plasmid in der Agrobakterienpopulation rasch verbreitet wird. Damit hängt sich das Agrobakterium parasitierend an den Photosyntheseapparat der höheren Pflanze an und bezieht aus diesem System die lebensnotwendigen C- und N-Gerüste sowie Energie. Diese Unterwerfung des pflanzlichen Stoffwechsels erreicht das Agrobak-

terium durch den Transfer von Genen in die Pflanzenzelle, also eine genetische Manipulation des Wirtes ("genetic colonization"). Der dadurch entstehende Vorteil erlaubt eine präferentielle Besiedelung der ökologischen Nische "Pflanzentumor" und seiner unmittelbaren Umgebung durch Agrobacterium tumefaciens auf Kosten seiner Konkurrenten (Abb.7).

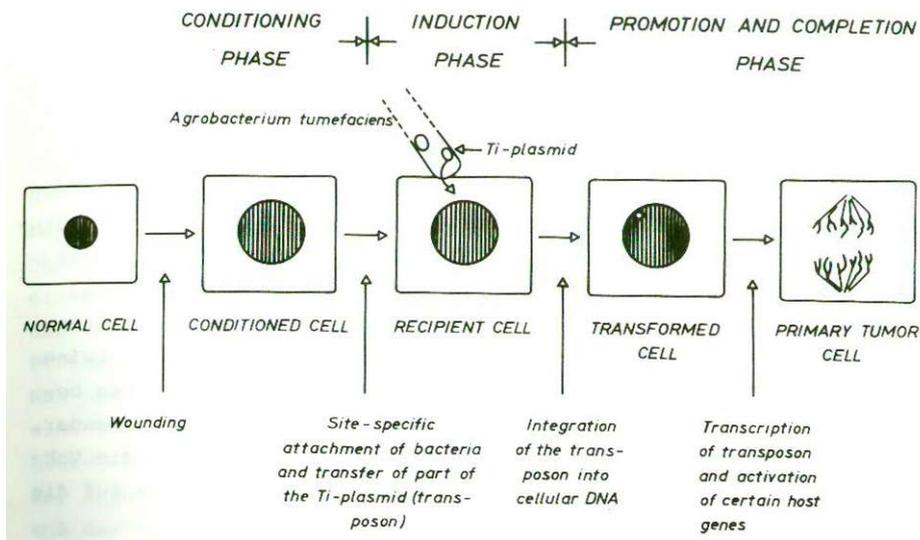


Abb. 7: Genetische Kolonisierung von Pflanzen durch Agrobacterium tumefaciens. Das Bakterium infiziert verwundete Pflanzen und induziert die Bildung von Crown Gall-Tumoren, vor allem im Bereich des Übergangs Wurzel-Sproß (engl.: "crown"). Die Tumorentstehung ist bereits eine Konsequenz der genetischen Manipulation der Pflanze durch das Bakterium. Die Tumoren produzieren Opine, die von der Tumorzelle nicht verwendet werden können und in den Wurzelbereich der Pflanze diffundieren oder auch sezerniert werden. Da nur Agrobakterien diese Opine abbauen können, genießen sie gegenüber Konkurrenten um gemeinsame Substrate einen selektiven Vorteil, haben sich also eine ökologische Nische erobert.

#### Transfer von in vitro rekombinierten Genen mit Hilfe der T-DNA: genetische Manipulation von Pflanzen

Agrobacterium tumefaciens überträgt nach seinem Attachment an die Zellwände wundexponierter pflanzlicher Zellen Plasmidgene in Empfängerzellen und transformiert sie dadurch in Tumorzellen. Diese Art der Übertragung von Erbmateriale hat nun für die moderne Pflanz-

zuzüchtung eine große Bedeutung. Wenn es nämlich gelänge, "nützliche" oder "wünschenswerte" Gene einer Pflanze zu isolieren, an die T-Region des Ti-Plasmides zu koppeln und in eine andere Pflanze zu übertragen, die diese Gene nicht besitzt, so wäre praktisch eine Neuschöpfung mit "besseren" oder "nützlicheren" Eigenschaften entstanden: sie besäße ja einzelne Gene einer anderen Pflanze und damit auch andere Eigenschaften. Es besteht überhaupt kein Zweifel, daß dieser Art der Pflanzenverbesserung die Zukunft gehört, denn sie vereint den Vorteil der schnelleren Durchführbarkeit mit dem der gezielten Veränderung des Erbgutes und ist damit den konventionellen Züchtungsmethoden überlegen.

Zur Praxis der genetischen Manipulation von Pflanzen ("genetic engineering") gehört also einmal ein "nützliches", d.h. für den Züchter interessantes Gen oder Gene, ein Vektor (d.h. ein Überträger des Gens/der Gene) und eine Empfängerpflanze. Darüberhinaus muß der manipulierte Empfänger das übertragene Gen auch exprimieren und - Vorbedingung für eine erfolgreiche Züchtung - auch an seine Nachkommen weitergeben, d.h. vererben. Hier nun aber beginnen bereits die Schwierigkeiten, klaffen Theorie und Praxis auseinander. Die "nützlichen" Gene sind nur sehr schwach zu isolieren, die Vektoren noch unvollkommen, die Reaktion der Empfängerpflanze auf die eingeführten Gene nicht einschätzbar.

Natürlich strebt eine Genübertragung in erster Linie den Ausgleich eines für den Menschen schädlichen oder ungewollten Defizits einer Kulturpflanze an. Daher wäre der Transfer von Genen nützlich, die für die Resistenz gegen Bakterien, Viren, Pilze oder Schadinsekten, Würmer oder auch höhere Tiere codieren. Leider ist nicht einmal in Ansätzen bekannt, welche Gene und wieviel Gene für eine solche Resistenz verantwortlich sind, zumal Resistenzmechanismen äußerst komplex sind. Darüberhinaus würde der Erwerb von Genen der Resistenz gegen Dürre, Salz, Kälte und Hitze viele Kulturpflanzen in ihrem Wert für die Sicherung der menschlichen Ernährung steigen lassen. Pflanzen mit höherem Nährwert (z.B. höherem Lysin-, Cystein- oder Proteingehalt in Blättern, Sprossen und Samen) oder höherer Produktivität (höherer Anzahl von Samen, Früchten, Blättern, insgesamt verwertbarer Biomasse) sind seit Beginn der Menschheit Ziel der Auslese und Züchtung. Leider sind aber hochgesteckte Erwartungen zunächst unbegründet: solche Eigenschaften sind das Resultat einer komplizierten, bislang noch unverstandenen Wechselwirkung **zwischen**

vielen verschiedenen Genen. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die genetische Manipulation von Pflanzen - zumindest an ihrem Beginn - zu einer Beeinflussung solcher komplexer Eigenschaften führt. Selbst die Übertragung einzelner Gene von Pflanze zu Pflanze - heute ohne größere Schwierigkeiten möglich geworden - führt nicht notwendigerweise zu einem Erfolg. Oft werden die eingeführten Gene nicht abgelesen oder wieder eliminiert. Trotzdem sind Pilotexperimente mit einem einzigen Gen leichter zu handhaben und von unschätzbarem Wert für unser Verständnis des Gentransfers *in vitro*. Das Auffinden eines solchen Gens setzt zunächst einmal die Reindarstellung seines Produktes voraus : ein Protein muß extrahiert und zur Homogenität gereinigt werden und Antikörper gegen dieses Protein müssen gewonnen werden, um die mRNA für dieses Protein aufzuspüren. Dazu werden alle mRNAs einer bestimmten Pflanze isoliert und in einem *in vitro*-Translationstest in viele verschiedene Proteine übersetzt. Mit Hilfe des Antikörpers wird daraus das gewünschte Protein und damit auch der Messenger für dieses Protein gewonnen. Nun wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RTase aus AMV) **eine** komplementäre DNA (cDNA) zu diesem Messenger hergestellt, **diese** cDNA durch Klonieren vermehrt und damit das Gen, zumindest **der** Exonteil des Gens, verfügbar. Eine notwendige Analyse des Gens **muß das** Vorhandensein von Promotoren und Regulationssequenzen (TATA-Box; "up-stream sequences") bestätigen, bevor man an eine Genübertragung denken kann. Solche Experimente sind aber nur **Ansatzweise** gemacht worden. Trotzdem sind bereits mehrere **Pflanzengene in** Bearbeitung (z.B. Chalconsynthasegen: KREUZALER et al., 1979) **und** ausserdem gelang der Transfer anderer Gene (z.B. Neomycinphosphotransferase II-Gen des Tn5, Phaseolin-Gen der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*, Alkoholdehydrogenasegen der Hefe, Nopalinsynthasegen von *Agrobacterium tumefaciens* und ein bakterielles **Transposon** Tn7 mit der Resistenz gegen Methotrexat). Allerdings **wurden lediglich** das Gen für Nopalindehydrogenase und das **Transposon auch abgelesen**. Hier erwarten also den Experimentator noch **viele Schwierigkeiten**.

Vektoren für den eigentlichen Übertragungsvorgang sind bekannt, jedoch nur wenige sind auch für diesen Prozess geeignet. Pflanzenpathogene Viren (Blumenkohlmosaikvirus, CaMV; Geminiviren wie z.B. CSMV und BGMV, d.h. "chlorosis striate mosaic virus" und "bean golden mosaic virus", aber auch RNA-Viren und Satelliten-RNA) sowie

Viroide (Proteinfreie, circuläre RNA-Moleküle von nur geringem Molekulargewicht werden als Vektoren ebenso diskutiert wie instabile d.h. ortsveränderliche und auch stabile Gene (z.B. Replikatorregionen). Allerdings sind diese potentiellen Vektoren entweder noch nicht genügend erforscht oder noch nicht in geeigneter Weise verändert, um allen Anforderungen an einen Vektor zu genügen (HOWELL 1982). Ein solcher Vektor sollte einen möglichst großen Wirtsbereich besitzen, d.h. möglichst viele Pflanzen befallen, leicht in die Wirtspflanze eindringen und die importierten Gene stabil in das Pflanzengenom einbauen können, so daß sowohl Replikation als auch Transkription möglich sind. Auch sollte das Genprodukt im neuen Milieu stabil sein. All diese Voraussetzungen erfüllt die T-Region des Ti-Plasmides von *Agrobacterium tumefaciens*. Daher ist das Ti-Plasmid zur Zeit der einzige Vektor, der bereits zum Gentransfer benutzt wird. Die hauptsächlichsten Nachteile sind dabei daß (1) nur zweikeimblättrige Pflanzen, also nicht wirtschaftlich bedeutende Monokotyledonen wie Reis, Mais, Gerste, Weizen, Roggen und Hirse als Wirtspflanzen in Frage kommen und (2) ein erfolgreicher Gentransfer lediglich durch die Wuchsstoffautomatie der Zielpflanze belegt werden kann.

Zukünftiger Forschung wird es vorbehalten sein, aus dem Ti-Plasmid einen idealen Vektor zu machen. Ein solcher Vektor sollte zum einen Gene enthalten, die für seinen Transfer in Pflanzenzellen codieren, zum anderen Sequenzen für die Integration in Pflanzen-DNA und Promotersequenzen, die auch eine Ablesung der mitimportierten Fremdgene enthält (z.B. die Promotersequenz von Opinsynthesen). Darüberhinaus darf der Vektor nach seinem Einbau in die Pflanzen-DNA nicht die Regeneration ganzer Pflanzen aus transformierten Einzelzellen verhindern (Abb.8) und sollte Gene enthalten, deren Aktivität leicht verfolgt werden kann (z.B. Resistenzen gegen Antibiotika). Die Insertion eines bakteriellen Transposons, Tn7, in die T-DNA und sein Transfer in die Pflanzenzellen sowie seine Expression zeigen bereits, daß ein Gentransfer auf diese Weise möglich ist. Die dadurch transformierten Zellen sind in der Lage, in geringen Konzentrationen von Methotrexat zu wachsen (Tn7 codiert für Resistenz gegen Methotrexat), während normale Zellen durch Methotrexat abgetötet werden.

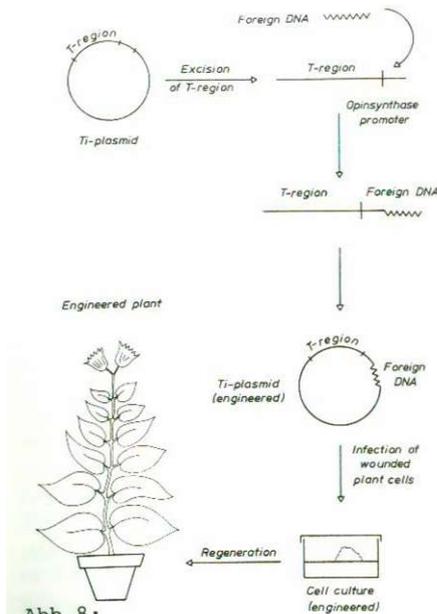


Abb 8:

Genetische Manipulation höherer Pflanzen mit Hilfe des Ti-Plasmides von *Agrobacterium tumefaciens*.

Nach der Isolation und Reinigung des Ti-Plasmides wird die T-Region mit Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, so daß der Opinsynthasepromoter intakt bleibt. In vitro Rekontinuationstechniken helfen dem Experimentator, das gewünschte Gen an das T-Regionsfragment zu ligieren. Die erweiterte T-Region wird daraufhin wieder in das Ti-Plasmid rekombiniert, dieses in *Agrobacterium tumefaciens* wieder eingeführt und an Pflanzen damit Tumoren erzeugt. Über die Anlage einer Zellkultur können aus einzelnen Tumorzellen wieder ganze Pflanzen regeneriert werden, die das neu eingeführte Gen in allen Zellen enthalten.

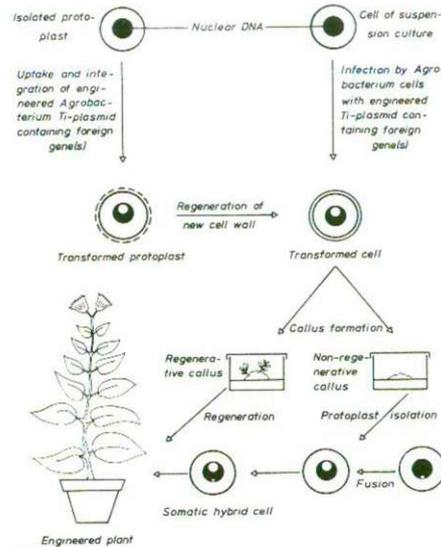


Abb 9:

Transformation pflanzlicher Protoplasten durch Ti-Plasmid-DNA.

Nackte Protoplasten (links) und Einzelzellen einer Suspensionskultur (rechts) können durch Transformation (links) oder Infektion (rechts) Plasmid-DNA aufnehmen und auch integrieren. Die transformierte Zelle kann daraufhin Kallus entwickeln. Kallusgewebe selbst kann ganze, nun genetisch veränderte Pflanzen bilden. Sollte der Kallus keinerlei Kapazität zur Regeneration besitzen, müssen Kalluszellen und Zellen mit regenerativer Potenz fusioniert werden. Aus der Hybridzelle lassen sich dann ganze Pflanzen regenerieren, die das neu eingeführte, an die T-DNA gekoppelte Gen mit samt der T-DNA in allen Zellen enthalten.

Daneben läßt sich die Fremd-DNA auch mit Hilfe von Liposomen verpacken und einschleusen. Auch mechanische Mikroinjektion von DNA in Zellkerne ist denkbar. Tatsächlich gelang die Transformation pflanzlicher Protoplasten von Tabak (KRENS et al., 1982) und Petunie (DRAPER et al., 1982) sowie die Transformation von Vinca-Protoplasten via Fusion mit *Agrobacterium*-Sphäroplasten (HASEZAWA et

al., 1982). Diese transformierten Protoplasten besitzen nun, wie alle pflanzlichen Protoplasten, die Fähigkeit, sich zu ganzen Pflanzen zu regenerieren. Durch eine solche Regeneration erhielt man transformierte Pflanzen, die zwar T-DNA enthielten und auch Opine synthetisierten, aber ansonsten normal wuchsen und fertil waren (OTTEN et al., 1981). Zu einer solchen Regeneration sind allerdings bislang nur Dikotyledonen gebracht worden, einkeimblättrige Pflanzen lassen sich noch nicht aus Protoplasten regenerieren. Es wird also auch ein Ziel der modernen Pflanzenzüchtung sein müssen, wichtige Kulturpflanzen aus Einzelzellen regenerieren zu können. Denn nur dann ist auch eine landwirtschaftliche Ausnutzung genetisch manipulierter Pflanze möglich.

Die Arbeiten des Autors wurden von der Fritz-Thyssen-Stiftung (Köln, BRD) unterstützt. Für die Hilfe bei der Zusammenstellung des Manuskripts danke ich Frau S. Kost.

#### Literatur

- BIEMANN, K., LIORET, C., ASSELINEAU, J., LEDERER, E., POLONSKI, J.: On the structure of lysopine, a new amino acid isolated from crow gall tissue. *Biochimica Biophysica Acta* 40, 369-370 (1960)
- BOMHOFF, G., KLAPWIJK, P.M., KESTER, H.C.M., SCHILPERCOORT, R.A., HERNALSTEENS J.P., SCHELL, J.: Octopine and Nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of Agrobacterium tumefaciens. *Molec. Gen. Genet.* 145, 177-181 (1976)
- CHAKRABARTY, A.M.: Plasmids in Pseudomonas. *Ann. Rev. Genet.* 10, 7-30 (1976)

- CHILTON, M.D., SAIKI, R.K., YADAV, N., GORDON, M.P., QUETIER, F.: T-DNA from *Agrobacterium* Ti-plasmids is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4060-4064 (1980)
- CHILTON, M.D.: Integration and transcription of Ti-plasmid fragments. In: *Molecular Biology of Plant Tumors* (KAHL, G., SCHELL, J.S.; Ed.), 299-319, Academic Press, New York (1982)
- CURRIER, I.C., NESTER, E.W.: Evidence for diverse types of large plasmids in tumor inducing strains of *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 126, 157-165 (1976)
- DE GREVE, H., DECRAEMER, H., SEURINCK, J., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J.: The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTi 86 S3. *Plasmid* 6, 235-248 (1981)
- DRAPER, J., DAYEY, M.R., FREEMAN, J.P., COCKING, E.C., OOX, B.J.: Ti-plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 23, 451-458 (1982)
- DRUMMON, M.H., GORDON, M.P., NESTER, E.W., CHILTON, M-D.: Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall tumors. *Nature* 269, 535-536 (1977)
- DRUMMON, M.H., CHILTON, M-D.: *Agrobacterium* Ti-plasmids share extensive regions of DNA homology. *J. Bacteriol.* 116, 1178-1183 (1978)
- FRITSCH, J., KERR, A., TEMPE, J., PETIT, A.: Arginine catabolism: A new function of both Octopine and Nopaline Ti-plasmids of *Agrobacterium*. *Molec. Gen. Genet.* 173, 263-269 (1979)
- FRITSCH, J.D., MURPHY, P.J.: Four new opines from crown gall tumors - their detection and properties. *Molec. Gen. Genet.* 181, 36-43 (1981)
- ENGLER, G., HOLSTERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., HERNANDEZ, J.P., SCHILPERCOORT, R.A.: Agrocin 84 sensitivity: a plasmid determined property in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molec. Gen. Genet.* 138, 345-349 (1975)
- ENGLER, D., DEPICKER, A., MAENHAUT, R., VILLARROEL, R., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J.: Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Mol. Biol.* 152, 183-208 (1981)
- FIRMIN, J.M., FENWICK, G.R.: Agropine - a major new plasmid-determined metabolite in crown gall tumors. *Nature* 276, 842-844 (1978)
- GARFINKEL, D.J., NESTER, E.W.: *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J. Bacteriol.* 144, 732-743 (1980)
- GELVIN, S.B., GORDON, M.P., NESTER, E.W., ARONSON, A.I.: Transcription of the *Agrobacterium* Ti plasmid in the bacterium and in crown gall tumors. *Plasmid* 6, 17-29 (1981)
- GENETELLO, C., VAN LAREBEKE, N., HOLSTERS, M., DEPICKER, A., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J.: Ti plasmids of *Agrobacterium* as conjugative plasmids. *Nature* 265, 561-563 (1977)
- GURLEY, W.B., KEMP, J.D., ALBER, M.J., SUTTON, D.W., GALLIS, J.: Transcription of Ti-plasmid derived sequences in three octopine-type crown gall tumor lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2828-2832 (1979)
- GURLEY, W.B., CHILTON, M-D., PETIT, A., TEMPE, J.: Agropine in "null-type" crown gall tumors: evidence for the generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2693-2697 (1980)
- HASEZAWA, S., NAGATA, T., SYONA, K.: Transformation of *Vinca* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Molec. Gen. Genet.* 182, 206-210 (1981)

- HERNALSTEENS, J.P., DE GREVE, H., VAN MDNTAGU, M., SCHELL, J.: Matagenesis by insertion of the drug resistance transposon Tn7 applied to the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 218-225 (1978)
- HÜLSTERS, M., SILV<sup>^</sup>, B., VAN VLIET, F., GENETELLO, C., DE BLOCK, M., DHAESE, P., DEPICKER, A., INZE, D., ENGLER, G., VILLARROEL, R., VAN MDNTAGU, M., SCHELL, J.: The functional Organization of the nopaline *A. turrefaciens* plasmid pTi C 58. *Plasmid* 3, 212-230 (1980)
- HÜLSTERS, M., HERNALSTEENS, J.P., VAN MDNTAGU, M., SCHELL, J.: Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*: The nature of the TIP. In: *Molecular Biology of Plant Tumors* (KAHL, G., SCHELL, J.S.; Ed.), 269-298, Academic Press, New York (1982)
- HOOYKAAS, P.J.J., ROOBOL, C., SCHILPERÜORT, R.a.: Regulation of the transfer of Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 110, 99-109 (1979b)
- HCWELL, S.A.: Plant Molecular Vehicles: Potential Vectors for Introducing foreign DNA into Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 609-650 (1982)
- KAHL, G.: Molecular Biology of Wound Healing: The Conditioning Phenomenon. In: *Molecular Biology of Plant Tumors* (KAHL, G., SCHELL, J.S.; Ed.), 211-267, Academic Press, New York (1982)
- KERR, A., MANIGAULT, P., TEMPÖ, J.: Transfer of virulence in vivo and in vitro in *Agrobacterium*. *Nature* 265, 560-561 (1977)
- KERR, A., K.T.t.s. J.G.: Conjugation and Transfer of Ti Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Molecular Biology of Plant Tumors* (KAHL, G., SCHELL, J.S.; Ed.), 321-344, Academic Press, New York (1982)
- KLAPWIJK, P.M., SCHEULDERMAN, T., SCHILPEROORT, R.A.: Coordinate regulation of octopine degradation and conjugative transfer of Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for a common regulatory gene and separate operons. *J. Bacteriol.* J36, 775-785 (1978)
- KOEKMAN, B.P., OOM3,G., KLAPWIJK, P.M., SCHILPERDORT, R.A.: Genetic map of an octopine Ti plasmid. *Plasmid* 2, 347-357 (1979)
- KRENS, F.A., MOLENDIJK, L., WUTJEMS, G.A., SCHILPEROORT, R.A.: In vitro transforation of plants protoplasts with Ti plasmid DNA. *Nature* 296, 72-74 (1982)
- KREUZALER, F., RAGG, H., HELLER, W., TESCH, R., WITT, J., HAMMER, D., HAHLBROCK, K.: Flavanone Synthase from *Petroselinum hortense*. Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA and absence of pantetheinyl residue. *Eur. J. Bioch.* 99, 89-96 (1979)
- LEEMANS, J., DEBLAERE, J., WILLMITZER, L., DE GREVE, H., HERNALSTEENS, J.P., VAN MDNTAGU, M., SCHEU., J.: Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown-galls. *EMBO Journal* 147-152 (1982)
- LEMMERS, M., DE BEUCKELEER, M., HÜLSTERS, M., ZAMBRYSKI, P., DEPICKER, A., HERNALSTEENS, J.P., VAN MDNTAGU, M., SCHELL, J.: Internal Organization, boundaries and Integration of Ti-plasmid DNA in Nopaline crown gall tumors. *J. Mol. Biol.* J 44, 355-378 (1980)
- LIORRET, C.: Recherches sur le metabolisme de culture de tissus normaux et pathologiques. *Annee Biol.* 59, 185-194 (1955)
- LIU, S.T., PERRY, K.L., SCHARDL, C.L., KADO, C.I.: *Agrobacterium* Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sei.* 79, 2812-2816 (1982)
- OOMS, G., KLAPWIJK, P.M., POULIS, J.A., SCHILPERDORT, R.A.: Characterization i of Tn 904 insertion in octopine Ti plasmid nutants of *Agrobacterium tumefaciens*<sup>^</sup> *J. Bacteriol.* J44, 82-91 (1980)

- OTTEN, L., DE GREVE, H., HERNALSTEENS, J.P., VAN MONTAGU, M., SCHIEDER, O., STRAUB, J., SCHELL, J.: Mendelian transmission of genes introduced in plants by the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **183**, 209-213 (1981)
- PETIT, A., DELHAYE, S., TEMPLÜ, J., MOREL, G.: Recherches sur le guanidines des tissus de crown gall. Mise en evidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium* et les tumeurs: qu'elles induisent. *Physiol. Veg.* **8**, 205-213 (1970)
- PETIT, A., TEMPF, J., KERR, A., HOLSTERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J.: Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **271**, 570-572 (1978a)
- PETIT, A., DESSAUX, Y., TEMPE, J.: The biological significance of opines I. A study of opine catabolism by *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Int. Conf. Plant Pathog. Bact.*, 4th 1978, 143-152 (1978b)
- SCHELL, J.: The role of plasmids in crown gall formation by *A. tumefaciens*. In: "Genetic manipulation with plant materials" (LEDoux, L.; Ed.), Plenum Press, New York, 163-181 (1975)
- SCHELL, J.: The use of the Ti plasmid as a vector for the introduction of foreign DNA into plants. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact.*, Angers, 115-126 (1978)
- SCHRÖDER, J., SCHRÖDER, G., HUISMAN, H., SCHILPEROORT, R.A., SCHELL, J.: The *mirA* for lysopine dehydrogenase in plant tumor cells is complementary to a Ti plasmid fragment. *FEBS Lett.* **129**, 166-168 (1981)
- SCHAKY, D., MONTOYA, A.L., CHILTON, M.-D.: Fingerprints of *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Plasmid* **1**, 238-253 (1978)
- STARLINGER, P.: Transposable Genetic Elements in Bacteria and in Maize. In: *Molecular Biology of Plant Tumors* (KAHL, G., SCHELL, J.S.; Ed.), 345-371. Academic Press, New York (1982)
- TEMPE, J., ESTRADE, C., PETIT, A.: The biological significance of opines. II. The conjugative activity of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Int. Conf. Plant Pathog. Bact.* 4th, 1978, 153-160 (1978)
- TEMPÖ, J., GOLDMANN, A.: Occurrence and Biosynthesis of Opines. In: *Molecular Biology of Plant Tumors* (KAHL, G., SCHELL, J.S.; Ed.), 428-449, Academic Press, New York (1982)
- TOMASHOW, M.F., NUTTER, R., MONTOYA, A., GORDON, M.P., NESTER, E.W.: Integration and Organization of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* **19**, 729-739 (1980)
- VAN LAREBEKE, N., ENGLER, G., HOLSTERS, M., VAN DEN ELSACKER, S., ZAENEN, I., SCHILPEROORT, R.A., SCHELL, J.: Large plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**, 169-170 (1974)
- VAN LAREBEKE, N., GENETELLO, Ch., SCHELL, J., SCHILPEROORT, R.A., HERMANS, A.K., HERNALSTEENS, J.P., VAN MONTAGU, M.: Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* **255**, 742-743 (1975)
- VAN MONTAGU, M., SCHELL, J.: The plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance* (TIMMIS, K., FÜHLER, A.; Ed.), 71-96, Elsevier, Amsterdam (1979)
- WATSON, B., CURRIER, T.C., GORDON, M.P., CHILTON, M.-D., NESTER, E.W.: Plasmid requires for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**, 255-264 (1975)

- WILLMITZER, L., DE BEUCKELEER, M., LEMMERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J.: DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells. *Nature* 287, 359-361 (1980)
- WILLMITZER, L., OTTEN, L., SIMONS, G., SCHMALENBACH, W., SQLRÖDER, J., SCHRÖDER, G., VAN MONTAGU, M., DE WS, G., SCHELL, J.: Nuclear and polysomal transcripts of T-DNA in octopine crown gall suspension and callus cultures. *Mol. Gen. Genet.* 182, 255-262 (1981)
- WILLMITZER, L., SIMONS, G., SCHELL, J.: The TL-DNA in octopine crown gall tumors codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO Journal* 139-146 (1982)
- ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J.: Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86, 109-127 (1974)
- ZAMBRYSKI, P., HÜLSTERS, M., KRUGER, K., DEPICKER, A., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., GOODMAN, H.: Tumor inducing DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: Structure and Organization in transformed plant cells. *Science* 209, 1385-1391 (1980)

#### Diskussion

Herr PORCHER: Ist eine Rückbildung möglich, auch wenn es der Tumor-DNA einmal gelungen ist, in die Pflanzenzelle einzudringen? Die Tumorgenese wäre in diesem Falle keine Einbahnstraße, also heute Normalzelle, morgen Tumorzelle, sondern ein offenes System, das durchaus auch zur Rückbildung fähig ist. Sofern dies möglich ist, welche Mechanismen spielen hier eine Rolle? Sind es nun Differenzierungsreize, so wie wir es beispielsweise mit NEYTUMORIN an Säugetierzellen sehen, wirft die Pflanzenzelle die Tumor-DNA einfach wieder heraus oder unterdrücken Repressoren die Tumor-DNA-Information?

Herr KAHL: Eine Rückbildung von Tumoren hat nicht zwangsläufig zur Folge, daß die Tumor-DNA verschwindet. Nach noch völlig unbekanntem Mechanismus wird die Tumor-DNA ganz oder teilweise unterdrückt, so daß die Tumorzelle nur noch in der Lage ist, "Normalprogramme" zu realisieren. Es ist aber auch möglich, daß die Tumor-DNA herausgeworfen wird. Bezeichnenderweise geschieht dies während der Meiose, also während der Reduktionsteilung.

Vom züchterischen Standpunkt aus ist dies natürlich unerwünscht, wenn neue Gene zur Ertragsverbesserung in die Pflanze eingeführt

werden sollen. Bei einigen Pflanzen, und übrigens auch bei einigen Mammalier-Zellen, die mit Viren infiziert worden sind, kommt es aber zu einer derartigen Eliminierung der Tumor-DNA. Welche Mechanismen dieser Eliminierung zugrunde liegen, ist unbekannt. Möglicherweise werden Teile der DNA beim Crossing-over, bei der natürlichen Rekombination der DNA, erkannt und herausgeschnitten. In der Regel bleibt jedoch die Tumor-DNA in der Pflanzenzelle drin auch über die Meiose hinaus.

AUDITORIUM: Kann man den Unterschied der pflanzliche Tumoren zu den menschlichen Tumoren so beschreiben, daß diese Tumoren eigentlich nur Exophyten sind, die nicht metastasieren und im Gegensatz zum menschlichen Tumor die Pflanze nicht bedrohen?

Herr KAHL: Wir haben bei Pflanzen kein invasives System. Es existieren zwar Leitbahnen, die im Zellkern fixierte Tumor-DNA kann jedoch nicht wegtransportiert werden; sie bleibt im Zellkern fixiert. Die Zelle kann sich - anders als bei Säugetieren - auch nicht aus dem Zellverband lösen und absiedeln. Wir haben also bei Pflanzen keinerlei Metastasenbildung, obgleich in Form der sog. Sekundärtumoren metastasenähnliche Gebilde auftreten können. Obwohl diese Tumoren u.U. auf einem Ast aufgereiht sind wie Perlen auf einer Perlenkette, handelt es sich nicht um eine Metastasierung, sondern um jeweils neue Infektionsvorgänge.

Diese Tumoren können durchaus einen wirtschaftlich bedeutenden Faktor in Monokulturen darstellen. Es gibt in Australien Untersuchungen, wonach ein Drittel der Weinernte durch derartige Agrobakterien-induzierte Tumoren vernichtet wird. Im Colorado-Delta ist in den Jahren 1978/79 etwa ein Drittel der gesamten Zitrusenernte vernichtet worden. Gerade Monokulturen sind durch diesen Tumor gefährdet, der allerdings nur schadet, wenn er eine besonders empfindliche Entwicklungsphase der Pflanze trifft. Junge Pflanzen können durch den Tumor praktisch ausgesaugt und durch das Gewicht des "Schmarotzers" heruntergedrückt werden. Ältere, stärkere Pflanzen widerstehen den Tumoren ohne Schwierigkeiten.

Herr DOLD: Wie vermehrt sich Ihr Agrobakterium im Boden? Handelt es sich **nur um** einen Wirtswechsel, könnte man sich also vorstellen daß diese **übertragene** DNA später wieder ein Bakterium wird? Wir kennen **diesen** Vorgang ja von Parasiten. Oder meinen Sie, daß hier eine **Einbahnstraße** eines besonderen Entwicklungsweges vorliegt?

Herr KAHL: Weder - noch: Das Bakterium selbst kopiert sein Ti-Plasmid, ehe es dieses weitergibt (normalerweise in ein anderes Bakterium). Es behält also immer eine Kopie zurück. Bekannt ist dieses Phänomen u.a. bei der Dissemination von Plasmiden. Diese Plasmide codieren nun für die Resistenzen gegen Antibiotika. Bakterien, die diese sog. Resistenz-Plasmide besitzen, werden damit resistent gegen Antibiotika, können aber auch derartige Plasmide an andere Bakterien weitergeben. Auch hier wird zunächst eine Kopie angelegt die im Bakterium verbleibt. Ein Wirtswechsel findet -um auf ihre Frage einzugehen - nicht statt, denn das Bakterium bleibt ausserhalb des Wirts. Es schleust nur einen Teil seiner Erbsubstanz ein. Diese Erbsubstanz bleibt dann für immer in der Pflanzenzelle.

Über die '(genetische Kolonisierung)' hat das Bakterium enorme Vorteile. Durch diese genetische Manipulation zwingt es die befallene Pflanzenzelle, Produkte herzustellen, die nur das Agrobakterium selbst, aber weder die Pflanzenzelle noch andere Bakterien nutzen kann. Mit Hilfe dieser Produkte kann es wachsen und schafft sich gewissermaßen eine ökologische Nische im Daseinskampf. Es handelt sich also hier um einen Sonderfall von Parasitismus.

Herr DOLD: Wächst das Bakterium in diesem Tumorbereich?

Herr KAHL: Ja. Es wächst, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen, sowohl auf dem gebildeten Tumor als auch in der Umgebung der tumortragenden Pflanze. Agrobakterien sind ja Bodenbakterien, bevorzugen also den bodennahen Bereich von Pflanzen, sehr oft den Übergang zwischen Wurzel und Sproß (engl.:crown) zur Infektion. Da der Tumor oft wie eine Galle aussieht, wird er als Crown-Gall-Tumor bezeichnet.

Beeinflussung der Melanomentwicklung durch  
Steroidhormone bei Xiphophorus\*

M. SCHARTL, ANGELIKA SCHARTL u. HELGA WAHN  
Genetisches Institut der Justus-Liebig-Universität  
Gießen

Schon in den Schriften von HIPPOKRATES (um 450 v. Chr.) findet man Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Verlauf bestimmter Krebserkrankungen des weiblichen Organismus und dem Hormonstatus der Erkrankten. Seit dem 19. Jahrhundert ist die Hormonabhängigkeit verschiedener Mammakarzinome bekannt; es wurde gezeigt, daß es sich bei diesen Hormonen um Steroide handelt (12). Auch für das maligne Melanom beim Menschen wurde eine Beeinflussung durch Sexualhormone nachgewiesen (6,10). Diese Befunde erlangten Bedeutung für die Tumorthherapie. Die Erfolge einer solchen Therapie waren jedoch widersprüchlich (11). Auch Tierexperimente stellten den therapeutischen Wert einer Steroidbehandlung in Frage. Zum einen führt die Behandlung mit Sexualhormonen zur Entstehung von Tumoren und zu einer Beschleunigung des Tumorwachstums (8), zum anderen kann die Behandlung mit der gleichen Substanz das Wachstum von Tumoren hemmen bzw. deren Malignitätsgrad verringern (13). Experimentelle Untersuchungen, die diesen dualen Effekt einer Erklärung auf zellbiologischer Ebene zuführen könnten und damit auch zu einer Revalidisierung bestimmter Therapeutika führen würden, liegen bislang nicht vor.

Ziel unserer Untersuchungen war es, die am Melanomsystem des mittelamerikanischen Fisches Xiphophorus sporadisch gefundenen Hinweise auf den Einfluß von Hormonen auf die Tumorbildung (3,17) experimentell zu prüfen und den Wirkungsmechanismus der Hormone auf die Tumorbildung auf zellbiologischer Ebene zu untersuchen.

Wir danken Prof. Dr. F. ANDERS für Diskussionen und Anregungen.  
**ie Arbeit wurde unterstützt** durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, **Sonderforschungsbereich 103 "Zellenenergetik und Zell-**  
**airferenzierung"**.

Zell- und molekularbiologische Grundlage der Melanomentstehung bei Xiphophorus

Wie bei allen Vertebraten stammen die Melanin-synthetisierenden Pigmentzellen von Xiphophorus aus der Neuralleiste. Ab dem 3. Embryonaltag wandern von dort ca. 1000 Zellen aus und besiedeln das Chorium der Haut, die Meninx von Gehirn und Rückenmark, das Peritoneum und das perivaskuläre Bindegewebe der Hauptblutgefäße. Diese Vorläuferzellen teilen sich nun und differenzieren sich über die Stadien der Chromatoblasten, der Stamm (S)-Melanoblasten, der Intermediären (I)-Melanoblasten, der Avancierten (A)-Melanoblasten und der Melanozyten zu Melanophoren. Im Melanophorenstadium verlieren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit und werden bei Erreichen eines bestimmten Alters durch Makrophagen abgebaut (4) (Abb.1).

Für die neoplastische Transformation ist nur das Stadium des I-Melanoblasten kompetent (4). Die neoplastische Transformation bei Xiphophorus wird, unabhängig von der Ätiologie des Tumors, von einem chromosomalen Gen vermittelt, das als Tumorgen (Tu) bezeichnet wird (1). Dieses formalgenetisch erfaßte Gen steht zu mindestens einem von neun bisher bei Xiphophorus identifizierten Onkogenen (16), die homolog zu den Onkogenen der RNA-Tumorviren sind, in Beziehung (15). - Zur Tumorbildung kommt es, wenn bestimmte, Tu-spezifische Regulationsgene durch Kreuzung oder durch Mutation eliminiert werden. Tu kann dann exprimiert werden und transformiert I-Melanoblasten zu TI (T=transformiert)-Melanoblasten. Diese differenzieren sich weiter zu TA-Melanoblasten, T-Melanozyten und den teilungsfähigen T-Melanophoren (Abb.1) (4).

Teilung und Differenzierung der transformierten Zellen führt zur Bildung von Melanomen. Das Verhältnis des Anteils von teilungsfähigen, unvollständig differenzierten Zellen zu dem der teilungsfähigen, terminal differenzierten T-Melanophoren bestimmt den Malignitätsgrad des Melanoms. Je größer der Anteil unvollständig differenzierter Zellen ist, um so höher ist der Malignitätsgrad. Melanome, die vorwiegend aus terminal differenzierten Zellen bestehen, sind benigne (18).

Bei bestimmten Genotypen kommt es trotz dereprimiertem Tu nicht zur Tumorbildung, weil die Differenzierung der Pigmentzellen in einem präkompetenten Stadium arretiert ist (4).

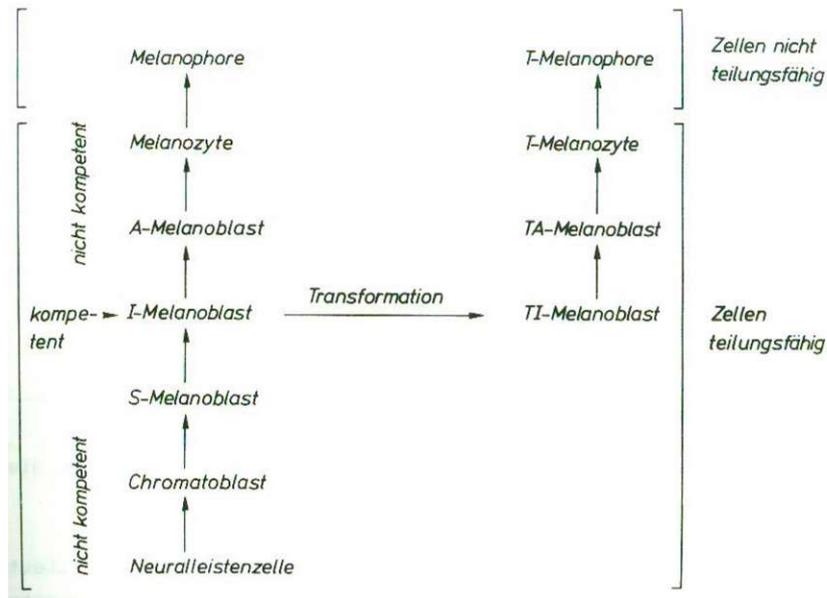


Abb. 1: Schematische Darstellung der Differenzierung von normalen und neoplastisch transformierten Pigmentzellen bei Xiphophorus (nach Ref. 4 verändert).

#### Effekte von Steroidhormonen auf die Melanomentwicklung

Im Rahmen der im folgenden beschriebenen Experimente wurden 11 Steroide und analoge Substanzen getestet: das männliche Sexualsteroid Testosteron; 5-Dihydrotestosteron, die wirksame Form des Testosterons; 17-Methyltestosteron, ein synthetisches Androgen; das Anabolikum Methylandrostanolon; das Antiandrogen Cyproteronacetat; das weibliche Sexualsteroid Östron; Diäthylstilböstrol, ein synthetisches Östrogen; das Gestagen Progesteron, Vorstufe aller Sexualsteroiden; 17-Hydroxyprogesteron, eine Testosteronvorstufe; das Glucocorticoid Cortison; sowie das Immunsuppressivum Prednisolon. Während einige der Substanzen multiple Effekte auf die Melanomentwicklung zeigten, hatten andere einen singulären oder auch keinen Effekt. Die Ergebnisse dieser Behandlung sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

	<u>Induktion</u>	<u>Verstärkung</u>	<u>Regression</u>
Testosteron	X	X	X
17-Methyltestosteron	X	X	X
5-Dihydrotestosteron	X	X	n.t.
Methylandrostanolon	X	X	n.t.
Cyproteronacetat	0	n.t.	X
Östron	0	0	X
Diäthylstilböstrol	0	0	X
Progesteron	0	0	0
17-Hydroxyprogesteron	0	0	0
Cortison	0	0	n.t.
Prednisolon	0	0	n.t.

X: Effekt; 0: kein Effekt; n.t.: nicht getestet;

Tab. 1: Effekte von Steroiden und analogen Substanzen auf die Tumorentwicklung bei Xiphophorus.

Im folgenden werden die Behandlungsexperimente mit 17-Methyltestosteron ausführlicher dargestellt, da hierbei die detailliertesten Befunde vorliegen, die eine analytische Auswertung erlauben. Die Hormone wurden in einer äthanolischen Lösung in einer Konzentration

-8

von 2-20  $\mu\text{l/l-d}$  (entsprechend einer 10 molaren Lösung) dem Aquarienwasser zugegeben. Die Hormonkonzentrationen liegen in einem physiologischen Bereich; auch die Testosteronkonzentration im Blut eines 25-30jährigen Mannes beträgt ca. 10 Mol/l.

Die folgenden Befunde lassen sich in drei Gruppen einteilen:

a) Tumorinduktion

Bei Fischen, bei denen die Pigmentzelldifferenzierung in einem präkompetenten Stadium arretiert ist, und die deshalb trotz dereprimiertem Tu keine Melanome ausbilden, kommt es nach Behandlung mit 17-Methyltestosteron zur Induktion von Melanomen (Abb. 2). Diese Tumoren bestehen vorwiegend aus Zellen eines niedrigen Differenzierungsgrades. Das elektronenmikroskopische Bild zeigt unverzweigte Zellen, die entweder unpigmentiert sind oder fast ausschließlich Prämelanosomen enthalten (Abb. 3b). Dabei handelt es sich offensichtlich um späte T-Melanoblasten und frühe T-Melanocyten. Die Melanome zeigen dreidimensionales, invasives Wachstum, sie sind hochgradig maligne (Abb.3a)

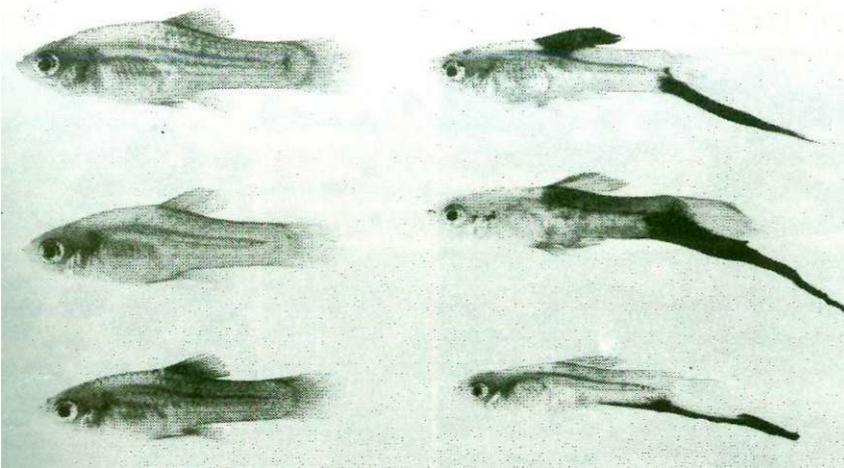


Abb. 2: Induktion von Melanomen nach Behandlung mit 17-Methyltestosteron. Links: Kontrolltiere; rechts: behandelte Tiere (20*µ*g/l; Behandlungsdauer: 4 Monate) .

Die Induktion von Melanomen bei diesen Fischen kann durch die differenzierungsfördernde Wirkung von Testosteron auf die Pigmentzellen erklärt werden (14): Die in einem präkompetenten Stadium arretierten Zellen werden in das kompetente Stadium angehoben und können neoplastisch transformiert werden.

In **diesem** Experiment wirkt Testosteron als Tumorpromoter im Sinne **der** Zweischnitt-Hypothese der Tumorgenese (5). Der erste Schritt, **die** Initiation, die eine Veränderung auf der Ebene der DNA beinhaltet, ist in diesem Fall die Dereprimierung des Tumorgens **entweder** durch kreuzungsbedingte Elimination oder durch Mutation von **Regulationsgenen**. Der zweite Schritt, die Promotion, die eine **epigenetische** Beeinflussung der Zelle darstellt, ist die Testosteronvermittelte Förderung der Zelldifferenzierung.

#### b) **Steigerung** des Malignitätsgrades

**Bei Jungfischen** bestimmter Genotypen, die benigne Melanome tragen **kommt es nach** Hormonbehandlung zu einer Erhöhung des Malignitätsgrades **des** Tumors. Bei den unbehandelten Tieren treten zwar neo-

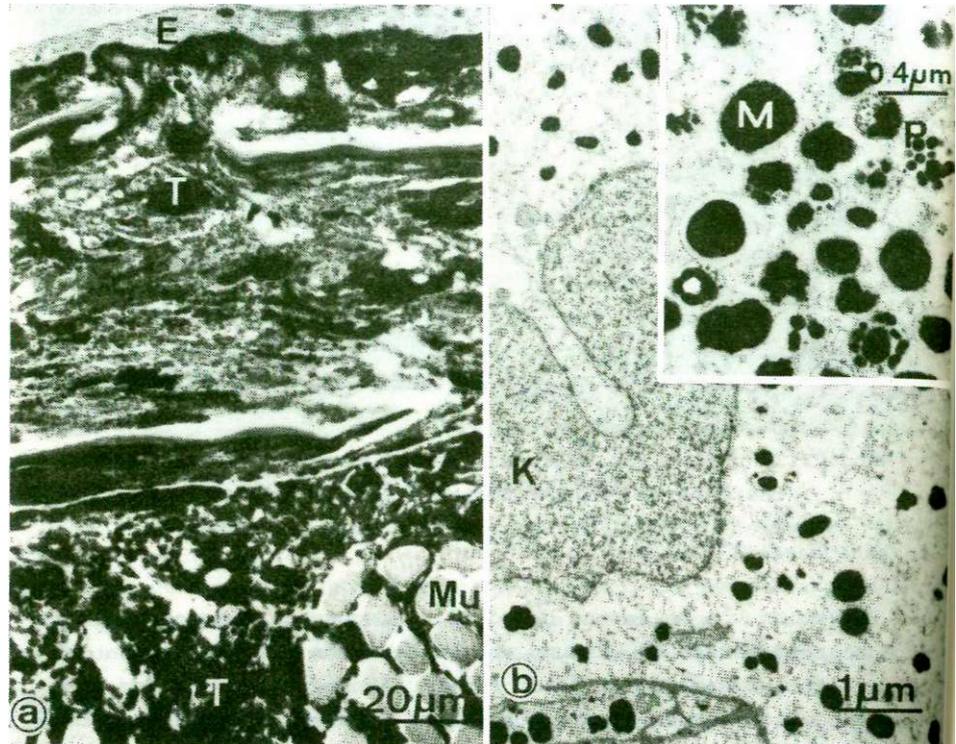


Abb. 3: Histologie und Ultrastruktur des malignen Melanoms

- a) Transversalschnitt (Färbung: Säurealizarinblau/Anilinblau-Orange G) durch ein Testosteron-induziertes Melanom. Unter einer hyperplastischen Epidermis (E) befindet sich das dreidimensional, invasiv wachsende Tumorgewebe (T). Im proximalen Bereich kommt es zur Verdrängung und Zerstörung des Muskelgewebes (Mu).
- b) Ultrastruktur einer typischen Zelle eines Testosteron-induzierten Melanoms mit gelapptem Zellkern (K) und wenigen, Melanin-haltigen Pigmentgranula im Zytoplasma. Neben reifen Melanosomen (M) treten sehr viele unreife Melanosomen (Prämelanosomen, P) auf.

plastisch transformierte Pigmentzellen auf, aber die Anzahl der Zellen, die durch Neutransformation nachgeliefert wird, steht im Gleichgewicht mit der Anzahl der Zellen, die terminal differenziert werden, und dann durch Makrophagen abgebaut werden. Nach Testosteronbehandlung zeigen die Melanome das gleiche histologische und ultrastrukturelle Erscheinungsbild wie die unter a) beschriebenen. Die aus transformierten Zellen niedrigen Differenzierungsgrades bestehenden Melanome sind hochgradig maligne. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren ist das Tumorstadium der behandelten Tiere beschleunigt und die Sterblichkeitsrate der Fische erhöht. Abb.4 zeigt die Dosisabhängigkeit dieser Effekte.

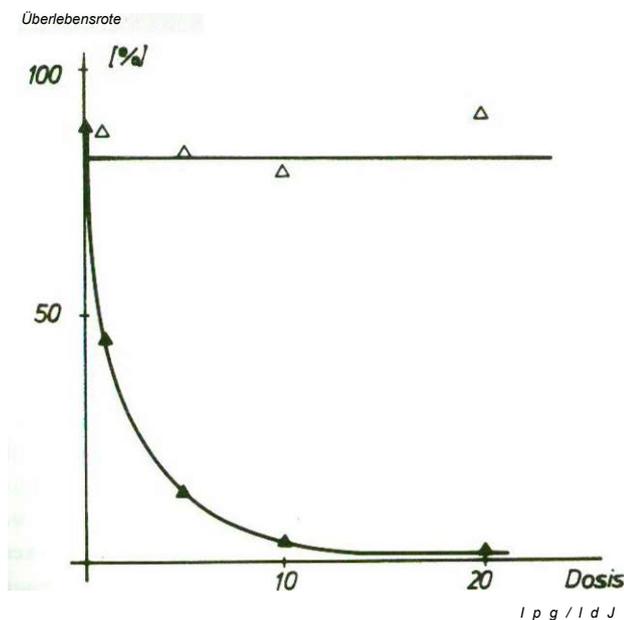


Abb. 4: Dosis-Effekt-Kurve der Behandlung mit 17-Methyltestosteron von Jungfischen mit beginnender Melanombildung.

A, Melanom-tragende Tiere; A, tumorfreie Geschwister-tiere; Überlebensrate 14 Tage nach Beginn der Behandlung.

Die Erhöhung des Malignitätsgrades dieser Melanome läßt sich ebenfalls durch eine Förderung der Zelldifferenzierung erklären. Diese bewirkt, daß mehr Stammzellen in das kompetente Stadium angehoben und neoplastisch transformiert werden. Die dadurch bedingte Zunahme <sup>n</sup> Proliferierenden Melanomzellen stört die Homöostase des benignen

Melanoms, da mehr Zellen nachgeliefert werden als terminal differenzierte Zellen abgebaut werden.

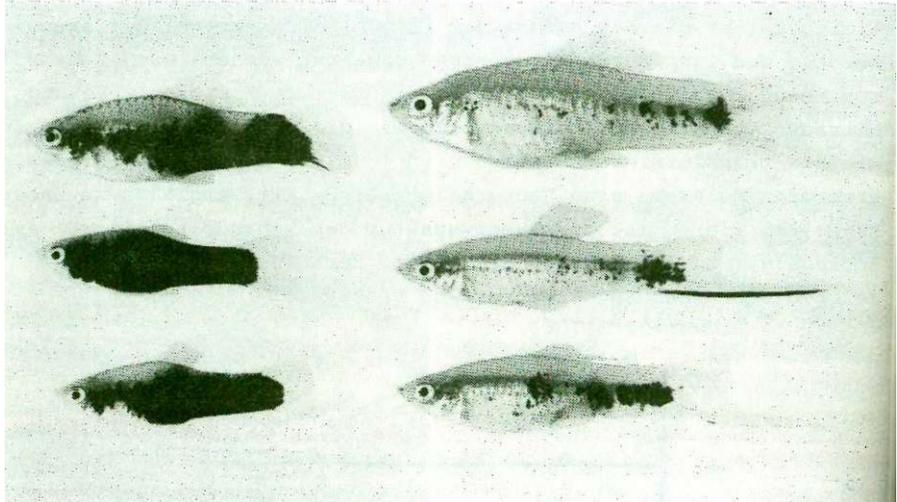


Abb. 5: Regression von Melanomen nach Behandlung mit 17-Methyltestosteron. Links: Kontrolltiere; rechts: behandelte Tiere (4 ug/1'd; Behandlungsdauer: 5 Monate).

c) Verringerung des Malignitätsgrades und Tumorregression ]

Nach Testosteronbehandlung von Fischen, die maligne Melanome tragen, kommt es zu einer Benignisierung der Melanome (Abb.5). Während die unbehandelten Melanome in ihrem histologischen und ultrastrukturellen Erscheinungsbild Abb.3a,b entsprechen, wandelt sich die Morphologie nach der Behandlung. Die Melanome bestehen dann vorwiegend aus dendritischen Zellen, deren Zytoplasma dann vollständig mit reifen Melanosomen angefüllt ist (Abb.6e). Diese Zellen können morphologisch als terminal differenzierte T-Melanophoren identifiziert werden. Zwischen die Melanomzellen wird Kollagen eingelagert (Abb.6f), ein Prozess, der zur Abkapselung des Tumors führt. Die terminal differenzierten Zellen werden nun von Makrophagen abgebaut, ein Prozess, der besonders auffällig im Randbereich des Melanoms ist (Abb. 6d). Die verbleibenden Melanomreste sind hochgradig benigne, sie sind nicht invasiv und zeigen eine ausschließlich zweidimensionale Ausbreitung (Abb.6c).

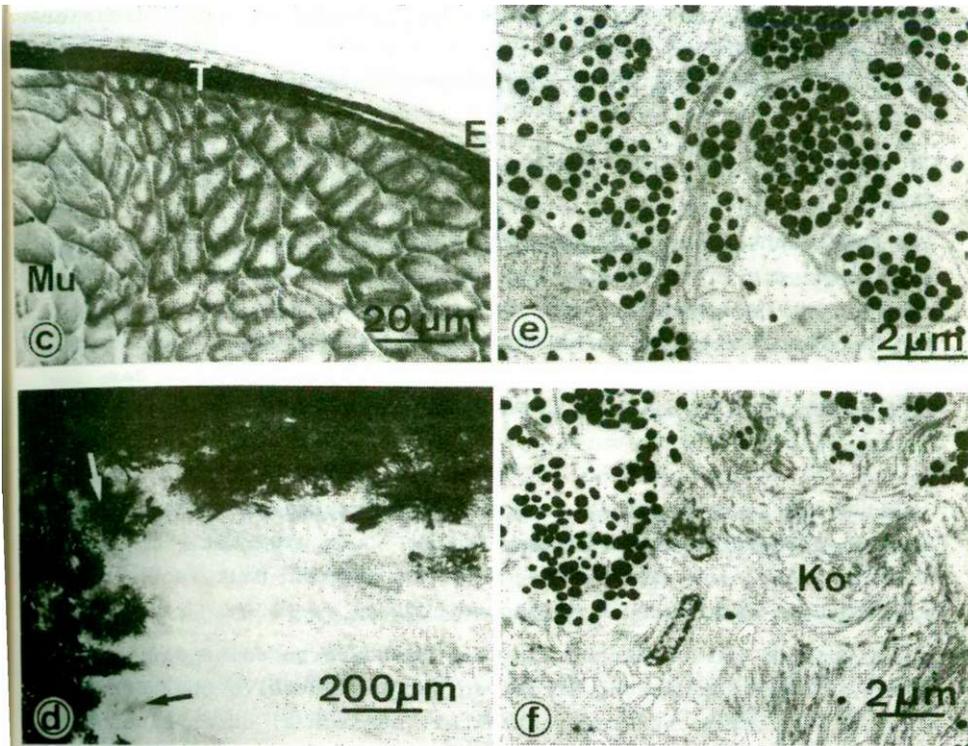


Abb. 6: Histologie und Ultrastruktur des benignen Melanoms

- c) Transversalschnitt (Färbung: Säurealizarinblau/Anilinblau-orange G) durch ein Melanom nach Behandlung mit Testosteron. Der Tumor (T) zeigt zweidimensionales Wachstum ohne Infiltration des Muskelgewebes (Mu). E = Epidermis.
- d) Makroskopische Aufsicht auf den Randbereich eines Melanoms nach Behandlung mit Testosteron. Durch Makrophagen (ca. 10 µm große schwarze Zellen, schwarzer Pfeil) werden T-Melanophoren (Durchmesser ca. 150 µm) phagozytiert (weißer Pfeil).
- e) Ultrastruktur von Zellen eines Melanoms nach Behandlung mit Testosteron. Das Zytoplasma ist dicht gepackt mit reifen Melanosomen; die dendritischen Ausläufer der Zellen bilden ein dichtes Netzwerk.
- f) Ultradünnschnitt durch den Randbereich eines Melanoms nach Behandlung mit Testosteron. Einlagerung von Kollagen (Ko) .

Auch dieses Phänomen läßt sich durch die differenzierungsfördernde Wirkung des Testosterons erklären: Die unvollständig differenzierten, teilungsfähigen T-Zellen im malignen Melanom werden zu terminal differenzierten, teilungsfähigen T-Melanophoren.

Untersuchungen über den molekularen Wirkungsmechanismus des Testosterons

Zur Aufklärung eines möglichen Wirkungsmechanismus des Testosterons wurde die Frage untersucht, ob das Hormon seine Wirkung direkt an der Pigmentzelle entfaltet oder ob es über einen unspezifischen Eingriff (z.B. durch Konzentrationserhöhung infolge der Behandlung) in die Regelkreise des gesamten Hormonsystems der Fische wirkt, wobei im letzten Fall der eigentliche Effektor noch unerkannt bliebe. Dazu wurde mit Hilfe des "Dextran-coated charcoal assay" (9) eine Bestimmung des Testosteronrezeptors in verschiedenen Normalgeweben und im Melanomgewebe durchgeführt. Ein cytosolischer Rezeptor für Testosteron wurde - wie erwartet - im Hoden gefunden, darüberhinaus aber auch in der gesunden Haut, sowie in erheblichem Maße auch im Melanomgewebe.

Diese Befunde weisen darauf hin, daß Testosteron seine differenzierungsfördernde Wirkung direkt an der Pigmentzelle über den bekannten Wirkungsmechanismus entfaltet, nämlich a) durch Bindung an einen cytosolischen Rezeptor, b) Transport des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern, c) Bindung an die DNA und d) Aktivierung von bestimmten Genen.

Diskussion

Während andere Steroide und Anabolika multiple Effekte auf die Melanomentwicklung der Fische zeigten, bewirkten Antiandrogene und Östrogene nur eine Regression von Melanomen. Andere Steroide zeigten keine Effekte (Tab.1). Dies besagt jedoch nicht, daß solche Substanzen nicht als Cokarzinogene und/oder Antikarzinogene auf die Entwicklung von Tumoren anderer Histogenese wirken können. So ist z.B. von Östrogen bekannt, daß es zu einer Regression von Prostatakarzinomen bewirkt (7), zum anderen aber auch als Cokarzinogen in der Hepatokarzinogenese wirkt (19). Inwieweit hierbei die diffe-

ferentielle Expression von Rezeptoren für diese Hormone während der verschiedenen Differenzierungsstadien der Zelle eine Rolle spielt, ist bislang ungeklärt.

Im Rahmen der hier beschriebenen Experimente konnte am Beispiel des Testosterons ein möglicher Wirkungsmechanismus auf zellbiologischer Ebene für den dualen Effekt von tumorbeeinflussenden Substanzen aufgezeigt werden. Eine Förderung der Zelldifferenzierung kann sowohl den kokarzinogenen als auch den antikarzinogenen Effekt des Testosterons erklären. Welche Wirkung eine Behandlung auf die Tumorentwicklung hat, ist somit nicht allein von der chemischen Struktur einer Substanz, sondern in entscheidendem Maße auch von dem Differenzierungsstadium der Zielzellen abhängig. Die Induktion von Tumoren durch Differenzierung präkompetenter Zellen in ein kompetentes Stadium gibt Hinweise auf die Ätiologie der Vielzahl "promoter-getriggert" bzw. "endokrin-abhängiger" Tumoren bei Tier und Mensch (1). Der Induktion, die endogen (genetisch) oder exogen (durch Mutation) erfolgen kann, folgt - oftmals nach sehr langer Latenzzeit - die Promotion, die ebenfalls endogen (z.B. durch Hormone) oder exogene Ursachen (z.B. Umwelttoxine) haben kann. Entsprechend konstruierte Teststämme von Xiphophorus, bei denen die Initiation bereits erfolgt ist, können Analog zu dem in Abschnitt lila beschriebenen Experiment zum Aufspüren solcher endogener und exogener Promotoren verwendet werden (2). Andere Genotypen können in Analogie zu den oben angeführten Experimenten der Prüfung von therapeutisch wirksamen Substanzen und dem Nachweis eventueller, kokarzinogener Nebenwirkungen dienen. Eine Überprüfung der am Melanomsystem von Xiphophorus gewonnenen Erkenntnisse an anderen Systemen müßte sich im Einzelfall natürlich anschließen.

#### Literatur

1. ANDERS, A., ANDERS, F.: Etiology of cancer as studied in the platyfish-swordtail system. *Biochim. Biophys. Acta-Reviews on Cancer* 516, 61-95, (1978)
2. ANDERS, A., SCHMIDT, C.R., SCHARTL, A., HERBERT, A., SCHOLL, E., ANDERS, F.: Züchtung von Xiphophorus-Stämmen für die Unterscheidung von Mutations- und Promotionskarzinogenen. *Arbeits- und Ergebnisbericht der GSF, CMT 43*, 1982
3. ANDERS, F.: Tumor formation in platyfish-swordtail hybrids as a problem of gene regulation. *Experientia* 23, 1-10 (1967)

4. ANDERS, F., DIEHL, H., SCHWAB, M., ANDERS, A.: Contributions to an understanding of the cellular origin of melanoma in the Gordon-Kosswig Xiphophore fish tumor system. In: KLAUS, S.N., (Ed.): *Pigment Cell*, Vol. 4, 142-149. Karger, Basel 1979
5. BERENBLUM, I.: *Carcinogenesis as a biological problem*. North Holland Publishing Company, Amsterdam 1974.
6. BORK, K., BRÄDNINGER, W.: Endokrine Beeinflussung des malignen Melanoms. *Dtsch. M-d. Wschr.* 106, 1329-1333, (1981)
7. HUGGINS, C.B.: The effect of Steroids on prostatic cancer. In: GORDON, M. (Ed.): *A Symposium on Steroid Hormones*. Madison 1950.
8. JULL, J.W.: Endocrine aspects of carcinogenesis. In: SEARLE, E., (Ed.): *Chemical carcinogens*, 87-96, American Chemical Society Monographs, Washington 1976.
9. KORENMAN, S.G., TULCHINSKY, D., EATON, L.W.jr.: Steroid assay by protein binding. 2nd Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 291, (1970)
10. LERNER, A.B., NORDLUND, J.J., KIRKWOOD, J.M.: Effects of oral contraceptives and pregnancy on melanoma. *New Engl. J. Med.* 301, 47 (1979)
11. MARTZ, G.: *Die hormonale Therapie maligner Tumoren*. Springer Verlag, Berlin 1968
12. McMAHON, B., COLE, P., BROWN, J.E.: Etiology of human breast cancer - a review. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 21-42 (1973) I
13. SALTER, T.S., NATHANSON, I.T., WILSON, H.: Experimentally induced benignancy of neoplasm: V. The influence of hormones on the host's resistance to implanted neoplasm. *Cancer Res.* 60-64, (1941)
14. SCHARTL, A., SCHARTL, M., ANDERS, F.: Promotion and regression of neoplasia by testosterone-promoted cell differentiation in Xiphophorus and Girardinus. In: HECKER, E., (Ed.): *Carcinogenesis*, Vol. 1, 427-434, Raven Press, New York 1982
15. SCHARTL, M., BARNEKOW, A., BAUER, H., ANDERS, F.: Correlations of inheritance and expression between a tumor gene and the cellular homolog of the Rous sarcoma virus-transforming gene in Xiphophorus. *Cancer Res.* 42, 4222-4225, (1982)
16. SCHARTL, M., FRANCHINI, G.: unveröffentlichte Daten
17. SICILIANO, M.J., PERMUTTER, A., CLARK, E.: Effect of sex on the development of melanoma in hybrid fish of the genus Xiphophorus. *Cancer Res.* 31, 729-735, (1971)
18. VIELKIND, U.: Genetic control of cell differentiation in platyfish-swordtail melanomas. *J. exp. Zool.* 196, 197-205 (1976) I
19. YAGER, J.D., YAGER, R.: Oral contraceptive steroids as promoters of hepatocarcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Res.* 40, 3680-3685 (1980)

## Diskussion

Herr BECKMANN: Ich bin Humanmediziner und habe eine grundsätzliche Frage: Wie steht es mit der Erhöhung des Malignitätsgrades von Melanomen nach Testosteron, wenn wir vor der Notwendigkeit stehen, Testosteron zu applizieren, beispielsweise beim Panhypopituitarismus. Ich habe einen solchen Patienten schon länger in Behandlung; er bekommt bei mir monatlich u.a 250 mg Testosteron. Gott sei Dank hat dieser Patient kein Melanom. Gelegentlich sehen wir aber Kinder mit Melanomen. Sind diese nun minderwüchsig und wäre eventuell Testosteron indiziert oder andere anabole Steroide, müßte ich jetzt doch wohl Bedenken haben. Sehen Sie Gefahren, derartige Präparate vorbehaltlos weiter einzusetzen? Müssen wir nach Ihren Ergebnissen nicht eine gewisse Zurückhaltung üben? Was sollen wir tun?

Herr SCHARTL: Ich bin kein Humanmediziner und mit dieser speziellen Problematik auch nicht so vertraut. Unsere Befunde zeigen allerdings relativ eindeutig, daß ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von Testosteron und der Erhöhung des Malignitätsgrades besteht, auch im Fall von Anabolika. Selbst die von uns getesteten Anabolika zeigen alle im Experiment - wir haben da sehr empfindliche Testsysteme - androgene Nebenwirkungen. Ich weiß nicht, inwieweit die Humanmedizin schon darauf eingegangen ist. Soweit ich aber Einblick habe, gibt es zumindest in der Dermatologie durchaus Bedenken. Man weiß, daß z.B. die Prognose von Melanomen an männlichen Individuen oft schlechter ist als an weiblichen. Man müßte eben hier weiter forschen, ob derartige Melanome einen Testosteron-Rezeptor aufweisen, wie wir ihn bei den Fischen gefunden haben. Die Versuche dürften relativ einfach sein und geben sicher auch weitere Aufschlüsse, wie wir uns in der Humanmedizin zu verhalten haben.

Herr BECKMANN: Wir lassen die Melanome natürlich in Ruhe! Sonst besteht nämlich die Gefahr der Metastasierung. Wie sollen wir dann derartige Rezeptoren feststellen können? Diese Frage muß einfach offen bleiben.

Herr SCHARTL: Man könnte eventuell auf Biopsiematerial zurückgreifen.

Herr JACHERTZ: Ich glaube, der Vortrag von Herrn SCHARTL zeigt ein-

deutig, daß das Problem der Tumorgenese nicht nur ein Problem von Strukturgenen ist, sondern daß es vor allem ein Problem der Regulation ist. In einer solchen Situation wird besonders deutlich, daß wir noch recht wenig über die Regulation wissen.

In Differenzierungsabläufen eröffnen sich - wie wir hier gesehen haben - mehr oder weniger vorübergehend Wechselkreise, die dann auf irgendwelche Substanzen ansprechen und natürlich auch zu Tumoren führen können. Wir können eine wunderschöne Phänomenologie beschreiben, wir können Dosiswirkungskurven beschreiben, aber wir können nicht - was dringend notwendig wäre - Wirkungsmechanismen von Stufe zu Stufe analysieren. Solche Probleme, wie sie eben angesprochen wurden von Herrn BECKMANN, sind zweifellos von grundlegender Wichtigkeit, können aber im Moment wahrscheinlich nur auf statistischer Ebene beantwortet werden. Nun sind, solange wir die Hormone kennen, sicher schon unzählige Fälle damit behandelt worden. Die Informationen liegen also im Grunde genommen schon vor, wieweit man durch solche Behandlung Tumoren induzieren kann. Diese Erfahrungen wurden nur bisher noch nicht systematisch ausgewertet.

Herr SEIFERT: Ich möchte diese Therapieangst, die möglicherweise durch Ihren Vortrag, Herr SCHARTL, entstanden ist, doch etwas abmildern. Zwar haben Sie ganz bestimmte Arten von Fischen herausgegriffen. Dieser Wirkungsmechanismus ist aber nur bei diesen Fischen nachweisbar. Man kann sicher Ihre Ergebnisse, daß eine Testosteronbehandlung letztendlich Tumoren oder Melanome induziert, nicht verallgemeinern.

Mikro-Kolonie-Teste zur Prüfung  
zytostatischer und zytotoxischer Stoffe in vitro

H. MAURER

Fachbereich Pharmazie  
Freie Universität Berlin

Wegen des hohen Kosten- und Zeitaufwands, der mit großen Tierzahlen verknüpft ist, bemühen sich mehrere Arbeitsgruppen seit Jahren in verstärktem Maße, Zellkultursysteme, sog in-vitro-Teste, zum Screening potentieller Zytostatika heranzuziehen und weiterzuentwickeln. Gerade in den letzten Jahren sind verschiedene methodische Verbesserungen der Zell- und Gewebekultur-Methoden erzielt worden, welche diese Bemühungen unterstützen und rechtfertigen. Obgleich die in-vitro-Teste mit Versuchstieren der klinischen Prüfung näherstehen als die in-vitro-Teste mit Zellkulturen, weil sie pharmakokinetische, pharmakodynamische und systemtoxische Phänomene berücksichtigen, gibt es gewichtige Argumente für die Anwendung der in-vitro-Teste:

Geringer Testsubstanz-Bedarf, geringer Zeitaufwand, vergleichsweise geringer Kostenaufwand, minimaler Tierbedarf; damit Möglichkeit, sehr viel mehr Substanzen testen zu können.

In vitro-Screening-Methoden

Es gibt verschiedene Methoden zum in vitro-Screening, welche alle mit Vor- und Nachteilen beladen sind. Meist wird das Wachstumsverhalten von normalen Säugetier- oder Tumorzellen in Kultur unter dem Einfluß zugesetzter Testsubstanzen geprüft, d.h. getestet wird die Zellteilungsaktivität. Die Methoden lassen sich einteilen in

- a) zellbiologische, bei denen die Zellzahl und Eigenschaften der Morphologie, Histologie, Karyologie, Kolonie-Bildungsfähigkeit u.a.m. erfaßt werden, sowie
- b) biochemische, bei denen der Einbau meist von Nukleosid-Vorstufen ( $^3\text{H}$ -Thymidin oder  $^3\text{H}$ -Uridin) in Nukleinsäuren bestimmt wird.

Unter den biochemischen Methoden birgt das beliebte, weil rasch ausführbare  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbauverfahren verschiedene Artefakt-Möglichkeiten, die zur Fehlinterpretation von Ergebnissen führen können. Darauf hat MAURER in einer umfassenden Übersicht hingewiesen (1).

Zellbiologische Methoden sind demgegenüber aufwendiger und zeitraubender. Die Prüfung der Zellzahl, Morphologie und Karyologie setzt voraus, daß diese Zellen überhaupt in Kultur zur Zellteilung angeregt werden und daß es nur diese Zellen (und keine anderen Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen) sind, die proliferieren. Solche Langzeit-Zellkulturen brauchen meist mehrere Passagen, um andere Zellen zu eliminieren.

#### Hämatopoetische Stammzellen

Es gilt heute als gesichert, daß sich die verschiedenen, im Blut identifizierbaren Blutzellen von sog. Stammzellen ableiten (2). Diese Stammzellen bilden Nachkommen, die verschiedene Differenzierungswege passieren (Abb.1).

Stammzellen aus dem gesunden, Blutzell-bildenden (hämatopoetischen) Knochenmark von Menschen und Mäusen lassen sich in der Zellkultur in Agargel zu Kolonien heranzüchten, an denen man den Einfluß zytostatischer und zytotoxischer Arzneistoffe erfolgreich studieren kann.

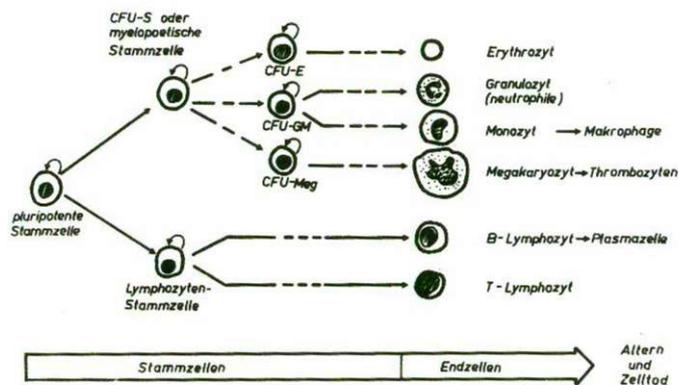


Abb. 1: Der hämatopoetische Stammbaum

Solche hämatopoetischen Stammzell-Teste sind heutzutage für die in-vitro-Toxizitätsprüfung nicht nur von Zytostatika, sondern auch vieler anderer Arzneistoffe von Interesse. In zunehmenden Maße werden nämlich Schädigungen der Blutzell-bildenden Organe als ernstzunehmende, in bestimmten Fällen sogar als bedenkliche Nebenwirkung vieler Arzneistoffe angesehen. Die Rote Liste 1982, in der die meisten in der Bundesrepublik Deutschland produzierten Arzneimittel verzeichnet sind, zählt allein 34 verschiedene Arzneistoff-Gruppen auf, bei denen als Nebenwirkungen Störungen der Hämatopoese, Leuko- und Thrombopenien, Agranulozytosen, Knochenmark-Depressionen, Blutbild-Veränderungen u.a. bekannt geworden sind. Darunter fallen so bekannte Arzneistoffe wie

Anthranilsäure-Derivate, Biguanide, Dihydralazin, Hydantoine, Carbamazepin, Meproamat, nicht steroidale Antiphlogistika/Antirheumatika, Oxazolidinon-Derivate, PAS, Penicillamin, Phenothiazine, Pyrazolone, Rifampizin, Sulfonamid-Derivate, Thiazide.

Wie aus vielen Arbeiten hervorgeht, wissen wir sehr wenig über die akute, verzögerte und kumulative Toxizität verschiedener Pharmaka auf Knochenmarkszellen, die zu aplastischen Anämien, Agranulozytosen, Thrombopenien und hämolytischen Anämien führen können. Wir wissen meist nicht, auf welcher Stammzell-Ebene die Noxen eingreifen und welche Regulationsprozesse betroffen sind. Kenntnisse über die Mechanismen erscheinen notwendig, um gezielte therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können.

#### Hämatopoetische Agar-Kolonie-Teste mit Glaskapillaren:

Eine Entwicklung der Arbeitsgruppe MAURER, (Berlin)

Die bedeutenden methodischen Fortschritte hämatologischer in-vitro-Methoden der letzten Jahre legten es nahe, diese Methoden für Untersuchungen über Arzneistoff-bedingte Intoxikationen der hämatopoetischen Stammzellen und ihrer Regenerationsphänomene heranzuziehen. Mehrere Arbeitsgruppen haben für die verschiedenen Blutzellen (Erythrozyten, Lymphozyten, Granulozyten Monozyten und Megakaryozyten) seit 1966 hämatopoetische Stammzell-Teste mit Agar-gel-haltigen Petri-Schalen entwickelt. Die in-vitro-Kolonie-Teste der meisten Arbeitsgruppen benutzen Petri-Schälchen, deren Boden

mit einer Agargel-haltigen Nährschicht bedeckt wird, auf welche die Stammzellen in einer weiteren Agargel-Schicht ausgesät werden. Da diese Methode aufwendig ist, haben MAURER und Mitarbeiter ein Mikroverfahren entwickelt: Anstelle von Petri-Schälchen werden Glaskapillaren verwendet, die folgende Vorteile bieten:

1. Bis zu 10 mal weniger Materialien (Zellen, Kulturmedien Testsubstanzen), weniger Zeitaufwand, geringere Kosten.
2. Keine Agar-Doppelschicht.
3. Geringere (0,18%) Agar-Konzentration (gegenüber 3% in der Petri-Schale), dadurch bessere Färbbarkeit der Koloniezellen.
4. Die lineare Anordnung der Kolonien in der Kapillare erlaubt einfacheres, schnelleres Zählen der Kolonien.
5. Die relativ einfache, optische Auswertbarkeit mittels Lichtstreu-Densitometrie in geringfügig umgebauten, handelsüblichen Geräten macht komplizierte Instrumente überflüssig.
6. Geringere Kontaminationsgefahr durch Bakterien und Pilze.

Seit 1976 hat nun die Arbeitsgruppe MAURER (Berlin) systematisch die Vorteile der Agarkapillar-Methode für die einzelnen hämatopoetischen Stammzell-Teste eruiert und die in-vitro-Kulturbedingungen hierfür optimiert. So wurden Tests für Granulozyten/Makrophagen (3), T- (4) und B-Lymphozyten (5) sowie ein optisches Verfahren zur Verfolgung der Wachstumskinetik der Kolonien (6) entwickelt. Mittels dieser Methoden wurden Granulozyten- und Lymphozyten-Chalon-Aktivitäten in vitro nachgewiesen (7,8). Mittlerweile wurde die Agarkapillartechnik von anderen Arbeitsgruppen in Berlin (Ost), Münster, Borstel, Budapest, Poitiers, Mailand u.a. Orten übernommen und erfolgreich angewandt. Für methodische Übersicht siehe (9,10).

Abb.2 zeigt schematisch die Arbeitsgänge des T-Lymphozyten und des Granulozyten-Testes. Für den ersteren Test werden etwa 20 ml menschliches Venenblut, für den letzteren das Knochenmark einer einzigen Maus benötigt. Durch Wahl des entsprechenden Hormons (Colony stimulating Factor) können die Knochenmark-Stammzellen zur Bildung von Makrophagen-Kolonien angeregt werden, m.a.W. aus dem Granulozyten-Test wird ein Makrophagen-Test. Für den Erythropoese-Test benötigt man Erythropoetin; dieser Test läßt sich bislang nicht mit Glaskapillaren durchführen. Die Empfindlichkeiten der Assays gegenüber zytotoxischer Substanzen nehmen wie folgt zu: T-Lymphozyten-Test <sup>^</sup> Granulozyten-Test Erythrozyten-Test.

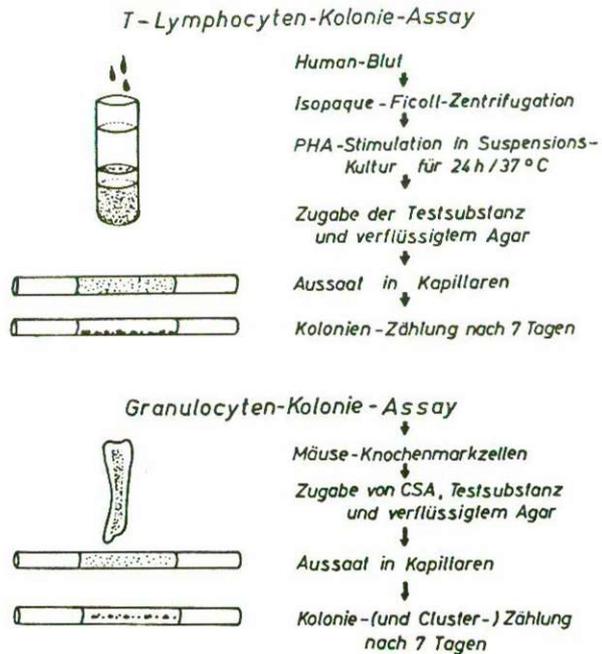


Abb. 2: Der Lymphozyten- und Granulozyten-Kapillartest

#### Anwendung der Agar-Kapillar-Methode mit hämatopoetischen Stammzellen

Mit dem Granulozyten- und Lymphozyten-Test haben MAURER et al. den Einfluß zytostatischer und immunsuppressiver Methylhydrazone in vitro untersucht u.a. gefunden, daß die Kolonie-Methoden weit empfindlicher als die viel benutzte biochemische  $^3\text{H}$ -Thymidin-Methode sind (11) .

In jüngster Zeit konnten die Arbeitsgruppen MAURER und BRAUN (Berlin) ein besonders instruktives Beispiel für die Anwendung von in-vitro- und in-vivo-Testverfahren liefern, um notwendigen Informationen über die Zytotoxizität bestimmter Arzneistoffe und die da-

von betroffenen Organe zu gewinnen. Sie untersuchten die Epoxidhaltigen Baldrian-Inhaltsstoffe Valtrat und Dihydrovaltrat, die vielfach als sedative Arzneimittel benutzt werden, mit den Agar-Kapillar-Methoden, nachdem zuvor diese Stoffe auf Tumorzellen eine alkylierende und zytostatische Potenz gezeigt hatten. Sie fanden eine beachtliche zytotoxische Wirkung in allen Testen, wobei Valtrat stärker toxisch war als das bekannte Alkylans und Mutagen Epichlorhydrin. Das vergleichsweise untersuchte, nicht alkylierende Epoxid L-Scopolamin war kaum zytotoxisch. Die Valtrat- und Dihydrovaltrat-Effekte waren beim Auswaschen nicht reversibel. Daraus konnte geschlossen werden, daß diese Baldrian-Inhaltsstoffe bei direktem Kontakt mit gut proliferierenden Säugerzellen beachtlich zytotoxisch wirken (12).

Doch wie steht es mit der Toxizität dieser Stoffe in vivo? Die Substanzen schädigen selbst in hohen Dosen weder nach peroraler noch nach intraperitonealer Gabe das sonst sehr empfindliche Knochenmark von Mäusen. Auch die Leber wird nach peroraler Gabe nicht geschädigt; nach intraperitonealer Gabe hingegen zeigt sie eine deutliche Schädigung (13). Diese Befunde legen die Hypothese nahe, daß diese Stoffe hauptsächlich mit den Zellen reagieren, mit denen sie zuerst in Kontakt kommen: Im Magen-Darm-Trakt mit den Schleimhautzellen, bei intraperitonealer Gabe mit den Leberzellen. Die reagierenden Zellen adsorbieren und/oder metabolisieren die Stoffe enzymatisch zu nicht-reaktiven Verbindungen. In reaktiver Form werden sie offenbar nicht resorbiert und gelangen auch nicht in die Blutbahn. Berücksichtigt man die o.g. Beobachtung einer direkten, zytotoxischen Wirkung auf proliferierende Zellen, muß man annehmen, daß die teilungsfähigen Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes geschädigt werden. Die Folgerung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß Patienten nach längerer peroraler Einnahme von Valtrat-Präparaten auffallend häufig über Magenbeschwerden klagen, j

Das geschilderte Beispiel der Aufklärung eines wahrscheinlichen Arzneistoff-Wirkungsmechanismus zeigt, daß

1. die Kombination verschiedener Teste das wichtigste Zielorgan bestimmen und andere, nicht betroffene Organe ausschließen läßt;
2. hämatopoetische in-vitro-Stammzell-Teste sehr empfindliche Methoden zur Erfassung zytotoxischer Effekte darstellen;

3. Ergebnisse mit unseren Agar-Kapillar-Methoden relativ rasch und ohne großen Aufwand zu erzielen sind;
4. Ergebnisse aufgrund kombinierter Methoden wichtige Aussagen zur Arzneimittelsicherheit erlauben;
5. die Kombination verschiedener in-vitro- und in-vivo-Teste weitere Versuche mit Tieren als entbehrlich erscheinen läßt.

#### Tumorstammzell-Teste für das in-vitro-Screening

Ähnlich wie bei der Hämatopoese gibt es heute Hinweise für die Existenz sog. Tumorstammzellen. So ist in letzter Zeit eine besondere, biologische Eigenschaft der Tumorzellen für die in-vitro-Testung bedeutsam geworden: Die Fähigkeit zum klonalen Wachstum, d.h. in vitro kann aus einer einzigen Tumorstammzelle eine Kolonie von mehreren hundert Tumorzellen entstehen. Die Kolonie-Bildungsfähigkeit der Tumoren kann am besten mit der heute immer mehr anerkannten Theorie der klonalen Evolution der Tumoren erklärt werden (Abb.3). Danach transformiert ein cancerogener Stoff durch einen somatischen Mutationsprozess eine normale Zelle, die forthin einen Wachstumsvorteil gewinnt und als Tumorstammzelle proliferiert. Durch genetische Selektion kommt es zu einer klonalen Expansion und Progression des Tumors mit Subpopulationen von Zellen, die sich durch Karyotyp, Zellkinetik, Oberflächen-Antigene, Zytostatika-Empfindlichkeit u.a.m. unterscheiden. Schließlich entstehen aus Tumorstammzellen Mikroklone und Metastasen mit autonomen, invasiven Wachstumseigenschaften, die das Immunabwehrsystem des Wirts unterlaufen können.

Eine erfolgreiche Behandlung von Tumoren muß daher auf die radikale Ausrottung der vermehrungsfähigen Tumorstammzellen abzielen, die aber -leider- nur einen kleinen Bruchteil der gesamten Zellpopulation eines Tumors darstellen. In logischer Konsequenz dieser Theorie der klonalen Evolution der Tumoren sollte ein in-vitro-System zum Nachweis der Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Zytostatika die in-vitro-Klonierfähigkeit dieser Zellen ausnutzen. Effekte von Zytostatika sollten bei wachsenden Tumorkolonien besonders gut meßbar sein.. So haben in den letzten Jahren einige wenige Arbeitsgruppen entsprechende in-vitro-Kolonie-Teste entwickelt und die Brauchbarkeit der Teste für die in-vitro-Prüfung von Zytostatika an menschlichen und tierischen Tumoren nach-

gewiesen. Insbesondere die Gruppe um S.E.SALMON (Tucson, USA) hat überzeugend dargelegt, daß sich solche Assays nicht nur zur Prüfung der individuellen Zytostatika-Empfindlichkeit menschlicher Tumoren gegenüber bekannten Zytostatika, sondern auch zum Screening noch nicht eingeführter, potentieller Zytostatika an Tumoren desselben histologischen Typs eignen.

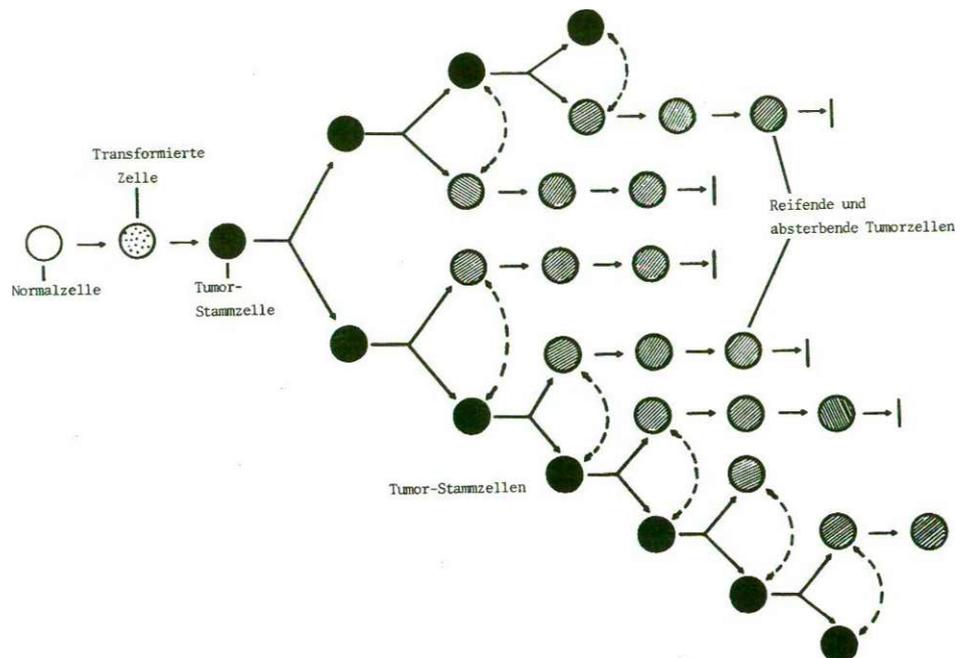


Abb. 3: Theorie der klonalen Evolution der Tumoren

#### Anwendung der Agarkapillar-Methode für Tumorstammzell-Teste

MAURER und OSMAN haben in zahlreichen systematischen Versuchen die Bedingungen für das Kolonie-Wachstum verschiedener tierischer Zelllinien und primärer, menschlicher Tumoren in den Agargel-haltigen Glaskapillaren optimiert (14) und gezeigt, daß die Agarkultur-Methode im Vergleich mit anderen Assays zur Prüfung der

Zellproliferation (Zellzählung und  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme) doppelt bzw. bis zu 8fach empfindlicher gegenüber bestimmten Zytostatika ist (15). Die wichtigsten Arbeitsgänge der Zytostatika-Testung faßt Abb.4 schematisch zusammen.

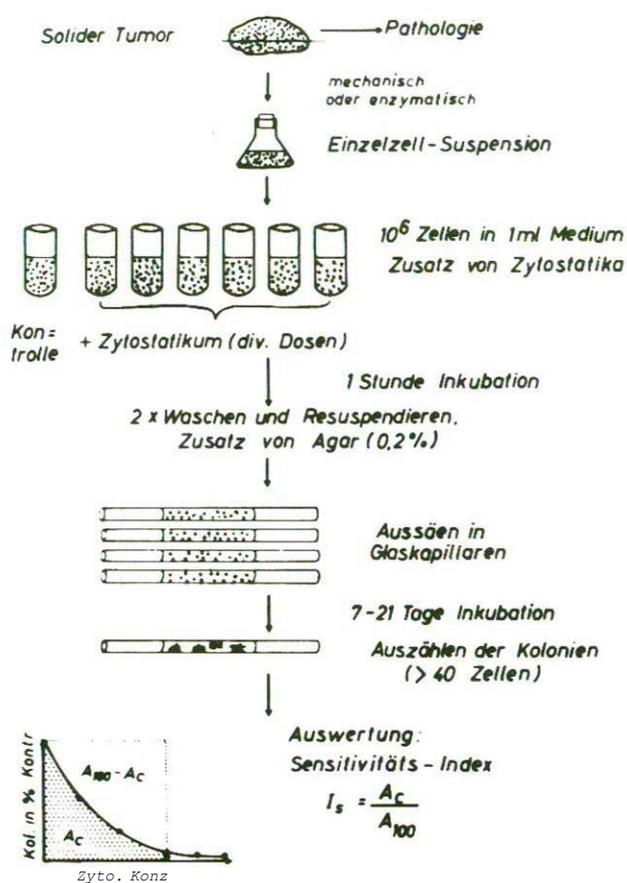


Abb. 4: Tumorstammzell-Assay als Onkobiogramm (Zytostatika-Empfindlichkeitsprüfung in vitro)

An Hepatom-Zellen eines Meerschweinchen-Stamms wurde die Empfindlichkeit gegenüber 7 verschiedenen Zytostatika mit der Mikro-Methode in vitro und nach intratumoraler Chemotherapie in vivo geprüft (16). Die Korrelation der in vivo-/in vitro-Resistenz lag bei 100%, die der in vivo-/in vitro-Empfindlichkeit bei 80%.

Zur Bestimmung der individuellen in vitro-Empfindlichkeit menschlicher Tumoren gegenüber Zytostatika wurde ein neues Verfahren und ein neuer "Sensitivitäts-Index" entwickelt, der dimensionslos und unabhängig ist von großen, pharmakokinetischen Unterschieden der Pharmaka (17). An 3 verschiedenen menschlichen Primärtumoren wurden die Vorteile der neuen Auswertungsmethode gegenüber anderen Verfahren dargelegt. Ein Beispiel zeigt Abb. 5.

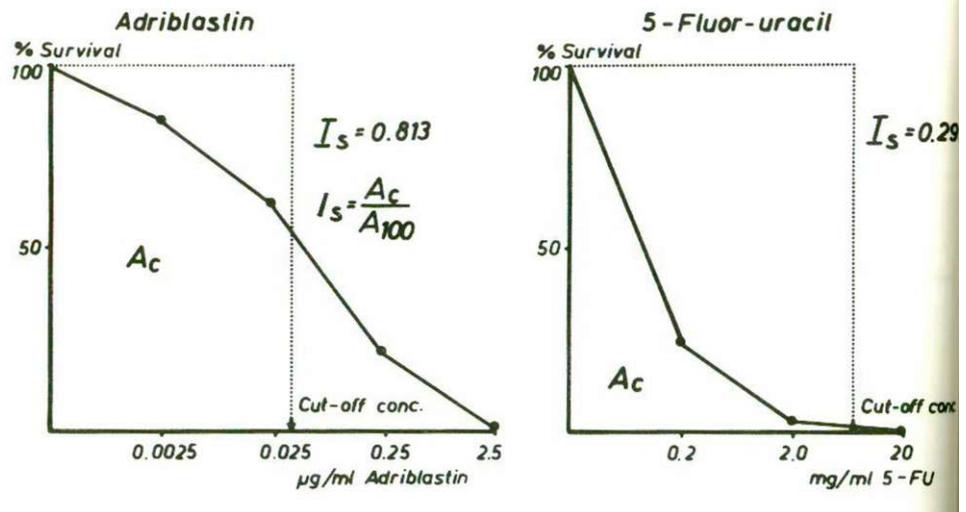


Abb. 5: Bestimmung des Sensibilitätsindex eines Portiokarzinoms

Ferner leistete die Mikro-Kloniermethode einen Beitrag zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von 2 zytostatisch wirksamen Methylhydrazonen (B1 und B2) bei L 1210- und Ehrlich-Ascites-Tumor (EAC)-Zellen (18). Unterschiedliche in vitro- und in vivo-Effekte der beiden Stoffe konnten durch unterschiedliche Membran-Affinitäten erklärt werden:

Nach Inkubation der Zellen mit den Stoffen über verschiedene Zeiten konnten EAC-Zellen von der B2- nicht aber von der B1-Hemmung "frei" gewaschen werden, während die Hemmung der L 1210-Zellen durch B1 und B2 im selben Maße durch Auswaschen aufzuheben war. Aufgrund dieser in vitro-Befunde konnten wertvolle Rückschlüsse auf die weitere Entwicklung von Methylhydrazonen mit lipophilerem Charakter gezogen werden. Befunde, die sonst nur mit zusätzlichen, weit aufwendigeren Tierversuchen hätten erzielt werden können.

#### Arzneistoff-Prüfung an Zellkulturen oder Tieren?

##### Bemerkungen angesichts neuerer methodischer Fortschritte

Von den Gegnern der in vitro-Teste mit Zellkulturen, also Befürwortern von Tierversuchen, werden als Argumente gern vorgebracht,

- daß in vitro-Teste die Biotransformation und Bioverfügbarkeit, generell die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Arzneistoffs außer Acht lassen,
- daß das mehrfache Passagieren von Testzellen zur Selektion von Zelllinien führt, die für das Ursprungsgewebe nicht mehr typisch sind und
- daß schließlich die Korrelation der in vitro-/in vivo-Ergebnisse oft wenig befriedigend sei: Eine Tendenz zu falsch positiven Ergebnissen sei feststellbar, d.h. die Wirksamkeit wird angezeigt, obgleich sie sich im Tier nicht finden läßt.

Die jüngsten Fortschritte der Zellkulturmethoden schwächen diese Argumente nicht unerheblich: Es gelingt heute, die Testsubstanzen vor dem Screening durch Inkubation mit mikrosomalen Leberenzymen (entsprechend dem Ames-Test zur Mutagenitätsprüfung) zu bioaktivieren, die Testzellen durch schonende Einfrierprozesse zu kryokonservieren und durch sog. Auswaschversuche die Reversibilität zu bestimmen, d.h. Hinweise für die Bioverfügbarkeit zu gewinnen.

**In vitro**-Teste eignen sich auch zur Kontrolle der Stabilität ge-

löster Pharmaka sowie zur Aufklärung möglicher Wirkungsmechanismen, die dem Chemiker wertvolle Hinweise zur Wirkstoff-Optimierung liefern können.

Zweifellos bringt ein einziger Test nicht genügend verlässliche Daten; der Einsatz einer Test-Batterie und der Vergleich der in verschiedenen Testen erhaltenen Resultate ist unerlässlich. Auch sei nicht verschwiegen, daß Zellkultur-Arbeit manuelles Geschick, Umgang mit Steril-Methoden und nicht unerhebliche Erfahrung mit speziellen Techniken erfordern. Schließlich sind viele Tests zu optimieren, was oft technische Probleme aufwirft.

Es gibt auch einige wichtige Argumente gegen das übliche in vivo-Screening mit Tieren. Pro Jahr werden etwa 15 000 synthetische Stoffe und 400 Naturprodukte im Standard-Screen der Division of Cancer Treatment des National Cancer Institute der USA mit gewaltigen Tierzahlen auf antitumorale Wirkung untersucht. Als Prä-Screen dient in vivo die P 388-Mäuse-Leukämie, die naturgemäß solche Stoffe ausschließt, die nicht myelodepressiv wirken, obgleich sie vielleicht auf einen anderen Tumortyp durchaus zytostatisch wirken können (falsch negatives Ergebnis).

Die Wahl des Tumortyps für das Screening ist also entscheidend. Konsequenterweise müssen sehr verschiedene Tumortypen gleichzeitig eingesetzt werden, was letztlich riesige Tierzahlen bedeutet. Hinzu kommt, daß die Empfindlichkeit von Tumoren desselben histologischen Typs gegen Zytostatika sehr heterogen ist und daß die Resistenz-Entwicklung in Tier-Modellen kaum befriedigend verfolgt werden kann. Diese Erkenntnisse erzwingen geradezu Versuche mit menschlichem Testmaterial (Biopsien, Punktaten, Zellen) unter teilweisem Verzicht auf Tierversuche. Solche und andere Argumente haben das National Cancer Institute der USA 1979 bewogen, in sein aufwendiges Screening-Programm (im Seitenzweig) den Human Tumor Stem Cell Assay als in vitro-Screening-Test aufzunehmen und die Verlässlichkeit des Tests in mehrjährigen Untersuchungen zu überprüfen. Wachsendes Interesse und Bedeutung hat dieser Test als Onkobiogramm in den USA auch für prätherapeutische Sensibilitätstestungen bei Krebserkrankungen erlangt, nachdem die Arbeitsgruppen um SALMON (Tucson) und v.HOFF (San Antonio) eine über 95%ige Treffsicherheit für die richtig-negative in vitro-/in vivo-Korrelation der Ergebnisse festgestellt haben. Mit anderen Worten: Die

hohe Sicherheit der Resistenz-Ermittlung ist für Krebs-Patienten von großer praktischer Bedeutung, weil unwirksame Zytostatika mit ihren gravierenden Nebenwirkungen von vornherein ausgeschlossen werden können.

#### Zusammenfassung

Die vorstehenden Ausführungen und Argumente lassen zusammenfassend erkennen, daß klonale Stammzell-Teste (mit hämatopoetischen und neoplastischen Zellen) zum in vitro-Screening zytostatischer und zytotoxischer Arzneistoffe hervorragend geeignet sind. Sie spielen unter den heutigen Zellkultur-Methoden eine wachsende Rolle. Doch kann auf Tierversuche zum in vivo-Screening nicht vollständig verzichtet werden, um eine optimale Verlässlichkeit der Wirkstoff-Prüfung zu erreichen. Aber die Zahl der Tierversuche kann durch eine sinnvoll zusammengesetzte "Batterie" von in vitro-Testen beträchtlich eingeschränkt werden.

**Mikromethoden** zur Kolonie-Züchtung in Agargel-haltigen Glaskapillaren stellen aufgrund verschiedener Vorteile eine wichtige Verbesserung der Stammzell-Teste dar. Sie stärken damit die Rolle der in vitro-Screening-Teste und tragen zur allgemeinen Verbreiterung der Verfahren mit schmerzfreier Materie bei.

#### Literaturverzeichnis

1. MAURER, H.R.: Potential Pitfalls of  $^3\text{H}$ -Thymidin-Techniques to measure Cell Proliferation. Cell & Tissue Kinet. J\_4, 111-120, (1981)
2. NEUMEIER, R., MAURER, H.R.: Regulation der Zelldifferentierung bei Leukozyten. Biologie in unserer Zeit 11, 78-85 (1981)
3. MAURER, H.R., HENRY, R.: Colony Growth of Mouse Bone Marrow Cells in Agar Contained in Glass Capillaries. Blut 33, 11-22 (1976)
4. MAURER, H.R., MASCHLER, R., DIETRICH, R., GOEBEL, B.: In Vitro Culture of Lymphocyte Colonies in Agar Capillary Tubes after PHA-Stimulation. J. Immunol. Methods, V8. 353-364 (1977)
5. ULMER, A., MAURER, H.R.: The Formation of B-Lymphocyte Colonies in Agar Contained in Glass Capillaries. Immunology, 34, 919-925 (1978)

6. MAURER, H.R., HENRY, R.: Automated Scanning of Bone Marrow Cell Colonies Growing in Agar Containing Glass Capillaries. *Exptl. Cell Res.* J\_03, 271-277 (1976)
7. MASCHLER, R., MAURER, H.R.: Screening for Granulopoiesis Inhibitors (Chalones) by Different Assay. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 259/ 825-834 (1978)
8. MASCHLER, R., MAURER, H.R.: Screening for Specific Calf Thymus Inhibitors (Chalones) of T-Lymphocyte Proliferation. *Hoppe Seyler's Physiol. Chem.* 360, 735-745 (1979)
9. MAURER, H.R., HENRY, R.: Drug Evaluation on Haematopoietic Cells in Vitro, I: A Micro Agar Colony Assay of Haemopoietic Cells with Semi-Automatic Optical Monitoring. *Arzneimittelforschung (Drug Res.)*, 28, 601-605 (1978)
10. MAURER, H.R.: In Vitro Colony Growth of Granulocytes, Macrophages, T- and B-Lymphocytes in Agar Capillaries. *Acta Haematologica*, 62, 322-325 (1979)
11. MAURER, H.R., MASCHLER, R., BRAUN, R., DITTMAR, W.: Einfluß von zytostatischen und immunsuppressiven Methylhydrazonen auf die Myelo- und Lymphopoese in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 95, 129-139 (1979)
12. TORTAROLO, M., BRAUN, R., HÜBNER, G.E., MAURER, H.R.: In Vitro Effects of Epoxide-Bearing Valepotriates on Mouse Early Haematopoietic Progenitor Cells and Human T-Lymphocytes. *Arch. Toxicol.* 5J, 37-42 (1982)
13. HÜBNER, G.E., DITTMAR, W., MAURER, H.R., BRAUN, R.: Toxicity of Valtrate/Isovaltrate in Mice: Evidence of Restriction to Tissues of Drug uptake. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (eingereicht 1982)
14. MAURER, H.R., ALI-OSMAN, F.: Tumor Stem Cell Cloning in Agar-Containing Capillaries. *Naturwissenschaften* (57, 381 (1981)
15. OSMAN, F.A., MAURER, H.R.: Comparison of Cytostatic Sensitivities of L 1210 Cells and Human Stimulated Lymphocytes in Three Cell Proliferation Assays. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 98, 221-231 (1980)
16. ALI-OSMAN, F., BIER, J., SIEGEL, T., MAURER, H.R., OHANIAN, S.: Correlation of Intralesional in Vivo Chemotherapy of Line 10 Hepatoma with in Vitro Drug Sensitivity. *Stem Cells* (in press, 1982)

17. ALI- OSMAN, F., MAURER, H.R., BIER, J.: In Vitro Cytostatic Drug Sensitivity Testing in the Human Tumor Stern Cell Assay: A modified method for the Determination of the Sensitivity Index. Tumor Diagnostk & Therapie (im Druck, 1982)
18. DITTMAR, W., BRAUN, R., ALI-OSMAN, F., MAURER, H.R.: Combined in Vitro-in Vivo Investigations as Guidelines for the Development of Cytostatic Methylhydrazones. J. Cancer Res. Clin. Oncol. (eingereicht 1982)

#### Diskussion

Herr PORCHER: Gibt Ihr Testsystem auch Aufschluß über indirekt wirkende Faktoren, also Faktoren beispielsweise, die auf das Immunsystem wirken, z.B. über eine Stimulierung der T-Lymphozyten oder Natural-Killer-Zellen?

Herr MAURER: Indirekt ist es sehr schwer, Effekte festzustellen, weil ja meist andere Zellen mitbeteiligt sind. Was wir hier prüfen, ist eine direkte Wirkung auf sich teilende Zellen. Bei den T-Lymphozyten müssen wir natürlich ein Mutagen zusetzen, etwa PHA, um überhaupt eine Proliferation zu erreichen. Wahrscheinlich sind auch noch ein paar Makrophagen daran beteiligt, ohne die ja nichts läuft bei der Lymphozytenstimulation, und sicherlich werden dabei auch Interleukin I und II produziert. Was wir letztlich prüfen, ist eine direkte Wirkung auf proliferierende Zellen.

Herr BIRR: Sie verglichen in einer Tabelle Inhaltsstoffe des Baldrian im Vergleich zu Epichlorhydrin. Nun ist Epichlorhydrin eines der reaktivsten Epoxide, trotzdem schienen die anderen Substanzen in Ihrem Assay wirksamere Zytostatika zu sein als das Epichlorhydrin. Ist das nicht eine gefährliche Schlußfolgerung?

Diese Epoxide unterscheiden sich von Epichlorhydrin nicht durch die Epoxidgruppierung, sondern durch die enorm gesteigerte Lyophilie. Ich erinnere mich an eine Verzweigung mit einer Reihe von Methylgruppen. Das könnte bedeuten, daß solche Verbindungen die Membranfunktion stören und dadurch ihre Kolonie einfach abstirbt. Was Sie dann in Ihrem Zytostatika-Assay messen, ist gar nicht der zytostatische Effekt einer Epoxid-Verbindung an sich, sondern eigentlich nur ein Membranoberflächen-Effekt. Diese Kritik ist, glau-

be ich, generalisierbar. Sie schalten bei diesem in vitro-Assay in der Kapillare jede Art von Metabolisierung des beobachteten, des studierten Zytostatikums oder, allgemein gesprochen, des Medikamentes aus.

Herr MAURER: Diese Kritik ist uns natürlich bekannt. Diese Assays an hämatopoetischen Zellen sind, wenn man so will, in vitro-Toxizitäts-Assays. Es gibt durchaus Epoxide, die mutagen wirken, und andere, die nicht mutagen sind. Das hängt u.a. auch von der sterischen Konfiguration der Substanzen ab. Scopolamin ist eben nicht wirksam, was sich auch in anderen Assays zeigt,

Man darf diese Assays nicht isoliert betrachten. Man muß sie zusammen mit anderen Testverfahren bewerten. Dabei zeigt sich, daß Valtrat und Dihydrovaltrat auch in echten Mutagenitäts-Assays mutagen sind.

Nun zur Frage der Metabolisierung: Es ist klar, daß man auch die Metabolisierung berücksichtigen sollte. Wir erreichen die metabolische Aktivität nach AMES dadurch, daß wir Lebermikrosomen verwenden und die Substanzen vorher aktivieren, ehe sie eingesetzt werden.

Zellproliferationshemmende und  
immunsuppressive Leberfaktoren

T.S. LIE

Abteilung für Transplantation  
Chirurgische Universitätsklinik  
Bonn-Venusberg

In den letzten Jahren wurden durch einige Autoren immunsuppressive Faktoren im Extrakt der normalen Leber festgestellt (1, 2, 4). Die Komponente mit immunsuppressiver Wirkung wurde als Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 000 bzw. mit elektrophoretischer Mobilität ähnlich wie Beta- und Gammaglobulin bei Menschen identifiziert (2).

Es ist bekannt, daß Lebertransplantate immunologisch günstiger sind als andere Organtransplantate. Wird bei Schweinen und Ratten eine Leber transplantiert, kann der Empfänger ohne immunsuppressive Therapie überleben, während die Niere und das Herz nach Transplantation regelrecht akut abgestoßen werden. Wenn man Leber und Niere zusammen verpflanzt, überleben beide Organe verlängert. Dies weist darauf hin, daß die Lebertransplantate gewisse immunsuppressive Faktoren freisetzen.

Bei der Transplantation wird die Spenderleber in einem gewissen Grade ischämisch geschädigt. Das Empfängerblut spült nach der Operation das geschädigte Transplantat durch. Dabei könnte das Organ immunsuppressive Leberfaktoren in die Blutbahn des Empfängers abgeben. Diese könnten dann eine Abstoßungsreaktion unterdrücken.

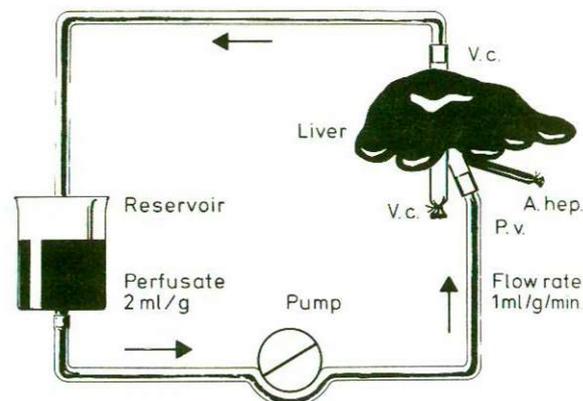
Wir haben diesen Faktor durch in vivo- und in vitro-Tests nachgewiesen und gleichzeitig deren Verhalten bei akutem und chronischem Leberschaden untersucht.

Material und Methodik

**Als** Versuchstiere verwenden wir männliche Lewis (LEW)- und BDE-Ratten mit **einem** Körpergewicht von 220 - 250 g von der Zentraltierzucht in Hannover.

### Herstellung der Leberperfusate (LP)

Die Leber wurde entnommen und bei warmer Ischämie 6 h lang liegengelassen, um eine Leberschädigung zu erzeugen. Danach erfolgte die transportale Perfusion der Leber mit 2 ml/g Lebergewebe Ringerlösung bei einer Flußrate von 1 ml/g Lebergewebe/min und zwar einmal oder fünfmal mit gleichem Perfusat bei einem Intervall von 30 min. Die einmal perfundierten Perfusate (LPw1) enthalten einen Proteingehalt um 1 mg/ml, die fünfmal perfundierten (LPw5) um 3-4 mg/ml.



Bei einigen Ratten wurde die Leber in situ mit gekühlter Ringerlösung perfundiert und nach Entnahme in einer Kühlkammer von 2-4° C mit gekühlter Ringerlösung fünfmal wie oben perfundiert (LPc5).

### Herstellung der Leberextrakte (LE)

Alle Arbeiten wurden im Kühlraum von 2-4° C vorgenommen. Die Leber wurde in situ mit gekühlter Lösung perfundiert. Nach der Organentnahme wurde mit einem Ultra-Turxax-Homogenisator zerkleinert. Nach dem Zentrifugieren (zunächst 30 min bei 1000 g, dann 30 min bei 26 000 g) benutzten wir den Überstand (LEc) .

### Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)-Inhibitions-Tests

Als Responding Cells verwendeten wir Lymphknotenzellen von LEW oder BDE und als Stimulating Cells Milzzellen von BDE oder LEW, welche mittels Ficoll-Mstrizoate-Lösung gewonnen wurden.  $1 \times 10^6$  Stimulationszellen behandelten wir 30 min bei 37° C mit 40 µg Mitomycin in 2 ml RPMI-1640-Medium. Danach wurde eine Zellsuspension von  $2 \times 10^6$  /ml mit Kulturmedium für Responding- und Stimulating Cells hergestellt. Das Kulturmedium setzte sich bei 100 ml aus einer Lösung aus 88 ml RPMI-1640-Medium mit 0,5 ml Penicillin (20 000 U/ml) , 0,5 ml Streptomycin (20 mg/ml) , 1 ml L-Glutamin (200 mM/ml) und 10 ml hitzeinaktiviertes Fötal-Kälber-Serum zusammen. Für jede Kultur werden von jeder Responding- und Stimulating-Zellsuspension 0,1 ml auf eine Vertiefung der Mikroplatte der Fa. Falcon (Nr. 3040) pipettiert. Für die Kontrolle wurden dazu 0,01 ml Ringerlösung, für die Testgruppe 0,01 ml LPw5, LPc5 und LEc hinzugegeben. Nach drei Tagen Inkubation wurden 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin (2 Ci/mmol, NEN) jeder Vertiefung zugegeben,

die Zellen nach 18 - 20 h gewaschen und die Radioaktivität gemessen.

#### Test zur Prüfung der Inhibition bei PHA-Stimulation

Entsprechend dem MCL-Kulturmedium wurde eine LEW-Lymphknoten-Zellsuspension von  $2 \times 10^6$  /ml hergestellt. Pro Kultur wurden 0,2 ml Zellsuspension und 0,02 ml einer 10%igen PHA-M (Difco) Lösung in eine Vertiefung der Falcon-Mikroplatte pipettiert. Für die Kontrolle folgten 0,01 ml Ringerlösung, für die Testgruppe 0,01 ml LPw5, LPc5 und LEC. Nach zwei Tagen wurden 1 pCi  $^3\text{H}$ -Thymidin zu jeder Vertiefung gegeben, 18 - 20 h später die Zellen gewaschen und die Radioaktivität gemessen.

#### Test zur Prüfung der Fibroblastenproliferationsinhibition

Die Fibroblasten wurden aus LEW-Embryos nach der Methode von TAKASUGI und KLEIN (1970) isoliert. Erneut wurde eine Zellsuspension von  $1 \times 10^6$  /ml mit dem gleichen Kulturmedium wie beim MLC hergestellt. In die Vertiefung der Terasaki-Platten (Fa. Falcon) wurden 0,01 ml Zellsuspension sowie 30  $\mu\text{l}$  LPw5, LPc5 und LEC für die Testgruppe, bzw. 30  $\mu\text{l}$  Ringerlösung für die Kontrolle gegeben. Auf die dreitägige Inkubation folgte die Fixierung der Zellen mit Aceton-Äthanol, die Färbung mit Giemsa und das Auszählen.

Die Versuche wurden in 6 Gruppen vorgenommen:

- Gruppe 1: BDE-Nieren wurden in LEW verpflanzt und die Empfänger mit BDE-LPw1 5 Tage lang, mit BDE-LPw5 5 Tage, 7 Tage und 10 Tage lang behandelt und zwar täglich 2 ml intravenös.
- Gruppe 2: Mit Lebern von unbehandelten LEW wurden LPw5, LPc5 und LEC hergestellt. Es erfolgten damit folgende Tests: PHA-Stimulationinhibitionstest, MLC-Inhibitionstest und Fibroblastenproliferationsinhibitionstest.
- Gruppe 3: Um einen akuten Leberschaden zu erzeugen, wurden bei 10 LEW 35 mg/kg Körpergewicht Dimethylnitrosamin (DMNA) intravenös gegeben und 48 h später getötet; LPw5 und LEC wurden mit je 5 Lebern hergestellt und Serum entnommen. Damit erfolgten PHA-Stimulationinhibitionstest, MLC-Inhibitionstest und Fibroblastenproliferations-Hemmtest.
- Gruppe 4: Um einen chronischen Leberschaden zu erzeugen, wurden 30 LEW (0,1 ml/100 g Körpergewicht) intramuskulär 2 x wöchentlich Tetrachlor-Kohlenstoff gegeben. Nach 2, 4, 5, 6, 8 und 10 Wochen wurden je 5 Ratten getötet und die Lebern histologisch untersucht.
- Gruppe 5: Wir behandelten 20 LEW zweimal wöchentlich mit  $\text{CCl}_4$  (0,1 ml/100 g Körpergewicht) intramuskulär. Nach 2 und 4 Wochen wurden je 10 Ratten getötet und je 5 Lebern für die Herstellung von LPw5 und LEC verwendet. Wie in Gruppe 3 wurden damit immunologische Tests durchgeführt. Dafür haben wir auch inaktivierte Sera der Ratten verwendet.
- Gruppe 6: Eine Leberzirrhose wurde bei 20 Ratten durch eine  $\text{CCl}_4$ -Behandlung wie bei Gruppe 5 über 8 und 10 Wochen induziert. Nach 8 und 10 Wochen wurden je 10 Ratten getötet und für die Herstellung von LPw5 und LEC sowie des inaktivierten Serums verwendet. Die immunologischen Untersuchungen wurden wieder wie in Gruppe 3 durchgeführt.

Ergebnisse und DiskussionA. Die Überlebensdauer der Nierenempfänger

Die Überlebensdauer der Nierenempfänger ist in Tabelle 1 dargestellt. BDE-Nieren überlebten in LEW-Empfängern ohne Behandlung 6 - 7 Tage (durchschnittlich 6,5 - 0,5 Tage). Durch eine fünftägige Behandlung mit BDE-LPw1 überlebten die Nierenempfänger verlängert und zwar 8,9 - 1,8 Tage ( $p < 0,05$ ), jedoch war die fünftägige Behandlung mit BDE-LPw5 noch effektiver (10,2 - 1,3 Tage). Wenn man mit BDE-LPw5 10 Tage lang behandelt, wurde die Überlebensdauer weiter verlängert (15,3 - 7,3 Tage). Die Nierenextrakte (BDE-KE) hatten derartige Effekte nicht.

Tabelle 1: Überlebensdauer der Nierenempfänger

(LEW = Empfänger; BDE = Spender)

nach einer LP-Behandlung (zweimal täglich intravenös)

Behandlungsart/ Dauer	Zahl	Überlebensdauer in Tagen
Kontrolle	8	6,5 + 0,5
BDE-LPw1 (5 Tage)	10	8,9 + 1,8
BDE-LPw5 (5 Tage)	7	10,2 + 1,3
BDE-LPw5 (10 Tage)	9	15,3 + 7,3
BDE-KE (täglich)	9	7,4 + 1,2

Diese Resultate weisen darauf hin, daß LP immunosuppressive Faktoren besitzt. Je länger der Empfänger mit LP behandelt wird, desto länger überlebt er. LPw1, d.h. LP mit niedrigem Proteingehalt, zeigt weniger immunosuppressive Wirkung als LP mit hohem Proteingehalt (LPw5). Nierenextrakte zeigen keine ausreichende immunosuppressive Wirkung, d.h. Nieren besitzen wahrscheinlich kaum einen derartigen Organfaktor.

B. LP und LE von unbehandelten LEWPHA-Stimulationinhibition:

Tabelle 2: LEW-LPw5 konnte die Stimulation der LEW-Lymphknoten-zellen durch PHA fast vollkommen inhibieren, jedoch LEW-LPc5 über-

haupt nicht, sondern eher mehr stimulieren. LEW-LEc dagegen zeigte die gleichen Effekte wie LEW-LPw5.

Tabelle 2: PHA-Stimulation-Inhibition durch LEW-LPw5, LEW-LPc5 und LEW-LEc. ( x 1000 cpm)

ohne PHA	mit PHA	mit PHA und LPw5	Inhibition in %
2,6	73,7	1,8	97,5
4,1	73,4	1,1	98,5
3,8	100,3	1,2	99,1
1,9	66,1	0,5	99,2

ohne PHA	mit PHA	mit PHA und LPc5	keine Inhibition
2,6	73,7	126,0	
4,1	73,4	77,8	
3,8	100,3	124,5	

ohne PHA	mit PHA	mit PHA und LEc	Inhibition in %
7,5	147,5	0,1	99,9
16,5	142,9	0,1	99,9
0,9	104,9	0,1	99,9

Diese Resultate weisen darauf hin, daß geschädigte Leberzellen die immunsuppressiven Faktoren in die Blutbahn freisetzen, intakte Lebern jedoch nicht. Eine Leber, die in kalter Ischämie konserviert wurde, kann diesen Faktor nicht in das Perfusat abgeben. Dieser Faktor ist kein Leberzellzerfallprodukt, sondern normaler Bestandteil der Leberzellen. Die LEc zeigten die gleichen Effekte wie LPw5. Dieser PHA-Stimulationinhibitionseffekt von LP bzw. LE ist durch Immunsuppression bedingt, nicht aber durch Cytotoxizität der LP. Wie Tabelle 1 zeigt, besitzt LP die immunsuppressive Wirkung in vivo.

MLC-Inhibition:

Die Resultate der MLC-Inhibition werden in Tabelle 3 dargestellt. Das LEW-LPw5 konnte die Stimulation der Blastogenese der LEW-Zellen durch BDE-Zellen vollkommen inhibieren. Außerdem konnte es auch die BDE-Zellenstimulation durch LEW-Zellen inhibieren. Der Inhibitionseffekt ist daher nicht spezifisch.

Tabelle 3; MLC-Index nach Zugabe von Lew-LPw5 und LEW-LEc

LEW-BDEm ohne LPw5	LEW-BDEm mit LPw5	Inhibition in %
22,0	0,1	99
22,7	0,1	99

BDE-LEWm ohne LPw5	BDE-LEWm mit LPw5	Inhibition in %
9,4	0,1	99
8,0	0,2	97

LEW-BDEm ohne LEc	LEW-BDEm mit LEc	Inhibition in %
3,7	0,1	97,3
2,1	0,4	80,9
23,2	0,2	99,1
16,3	0,1	99,3

m = Stimulationszellen

$$\text{MLC-Index} = \frac{c_{pm} - p_{xxx}}{c_{pm}} \text{ (Kontrölle)}$$

Den gleichen Effekt zeigten auch Leberextrakte, die in kalter Ischämie hergestellt wurden, d.h. diese unspezifischen immunsuppressiven Faktoren sind normale Bestandteile der Leberzellen.

Fibroblastenproliferation;

Dieser Faktor konnte nicht allein die mitogen Stimulation der Lymphoidzellen unterdrücken, sondern auch die Proliferaten der Fibroblasten inhibieren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Inhibitionseffekte von LEW-LPw5 und LEW-LEc aus LEW-Fibroblastenproliferation

Kontrolle	LPw5	LEc	Inhibition in %
119	37		
120	47		
125	34		71,9
125	31		
125	24		
98		24	
99		19	
107		24	78,2
125		18	

Die LEW-LPw5 konnte 72% von Fibroblastenproliferaten inhibieren, den gleichen Effekt zeigte auch LEW-LEc.

Dieser Befund kann auf folgendes hinweisen:

1. Die Leber besitzt immunsuppressive Faktoren, die bei in vivo-Applikation die Überlebensdauer der Organempfänger verlängern und bei in vitro nicht allein PHA-Stimulation und MLC-Reaktion, sondern auch Fibroblastenproliferation inhibieren.
2. Dieser Faktor wird bei Leberzellschädigung im Organismus in die Blutbahn freigesetzt, ist aber kein Zerfallprodukt der Leberzellen, sondern deren normaler Bestandteil. Von intakten Zellen kann man eine Freisetzung solcher Faktoren nicht erwarten.

C. Histologische Untersuchung der Rattenlebern nach  
Tetrachlorkohlenstoff-Schädigung

2 - 4 Wochen

Bereits zwei Wochen nach der Gabe von  $CCl_4$  zeigte sich schon eine geringgradige Fibrosierung der Portalfelder und eine mäßiggradige Leberparenchymverfettung. Es wurde dabei auch eine geringe Menge von Siderinpigment im aktivierten RES beobachtet. Bei einigen Lebern fand man vermehrte mitotische Aktivität im Lebergewebe als Ausdruck einer gesteigerten Parenchymreaktion. Vereinzelt Zellnekrosen waren um die Zentralvenen zu beobachten.

5 - 6 Wochen

Die multiplen Einzelzellnekrosen, besonders nahe der Zentralvenen sowie die Leberverfettung waren deutlicher ausgeprägt. Teilweise mäßiggradige, teilweise starke portale Fibrose und intralobuläre Ausbildung von kollagenfaserigen Kollapsstraßen wurden beobachtet, auch eine deutliche Sternzellproliferation. Bei den meisten Fällen konnte man den beginnenden zirrhotischen Umbau sehen, bei einigen dagegen gab es keinen Hinweis dafür.

8 Wochen

Die Leber zeigt einen teilweise beginnenden, herdförmig abgeschlossenen bzw. teilweise kompletten zirrhotischen Umbau mit starker portaler Fibrose. Ausgeprägte Zeichen der Regeneration am Leberparenchym mit starker Verfettung und Mesenchymaktivierung.

10 Wochen

Der Befund gleicht dem nach 8 Wochen, ist jedoch viel stärker ausgeprägt. Teilweise wird Ascitesbildung beobachtet.

Da die Leber nach 5 - 6 Wochen Behandlung mit  $CCl_4$  in den meisten Fällen bereits zirrhotischen Umbau aufweist, haben wir in Gruppe 4 als chronisches Leberschadenmodell diejenigen Lebern genommen, die mit  $CCl_4$  2 - 4 Wochen behandelt wurden. Außerdem zeigte die Leber nach einer 8-wöchigen Behandlung eine komplette Leberzirrhose und nach 10 Wochen in den meisten Fällen Ascitesbildung, so daß wir für das Zirrhosemodell 8 und 10 Wochen lang behandelte Lebern verwendet haben.

p. Akuter Leberschaden

Nach einer einmaligen DMNA-Injektion stiegen im Serum von Ratten die Leberenzym- und Bilirubinwerte sehr stark an: GOT auf 2000 + 380 mü/ml, GPT auf 1220 + 80 mü/ml und Bilirubin auf 2,2 - 9,9 mg/100 ml. Diese Befunde weisen auf eine fulminante Leberzellnekrose durch die Medikamente hin.

Die Resultate von PHA-Stimulationinhibition, MLC-Inhibition und Fibroblastenproliferationinhibition durch LE und LP von mit DMNA behandelten Ratten zeigen Tabellen 5, 6 und 7.

Tabelle 5: Beeinflussung von LEC, LPw5 und Sera auf Lymphoidzellenstimulation durch PHA (Suppression in %)

Behandlung	LEC *)	LPw5	Sera
keine	94 ± 2	97 ± 3	48 ± 3
DMNA	31 ± 7	98 ± 1	73 ± 0,5
CCl <sub>4</sub> 2 Wo	33 ± 8	82 ± 12	48 ± 3
CCl <sub>4</sub> 4 Wo	43 ± 14	80 ± 2	61 ± 3
CCl <sub>4</sub> 8 Wo	22 ± 5	58 ± 3	80 ± 0,5
CCl <sub>4</sub> 10 Wo	11 ± 6	N	73 ± 6

\*) LEC wurde vierfach mit Ringerlösung verdünnt, da deren Inhibitionseffekte zu stark waren.

N = keine Inhibition

Sowohl die Effekte der PHA-Stimulationinhibition als auch die der MLC-Inhibition von LEC waren bei den Lebern mit akuter Zellnekrose im Vergleich zu LEC von unbehandelten Ratten leicht vermindert. Dies läßt die Vermutung zu, daß eine akut geschädigte Leber die immunosuppressiven Faktoren durch ihre geschädigte Zellmembran in die Blutbahn verliert. Die Sera von Ratten mit akutem Leberschaden zeigten eine enorm gesteigerte Fähigkeit der Suppression; die Sera von unbehandelten Ratten konnten 58 % - 3 % der PHA-Stimulation von LEW-Zellen inhibieren, die Sera von Ratten mit akutem Leberschaden aber 73 - 0,5 % ( $p < 0,05$ ). Weit auffallender ist der Unterschied bei der Inhibition von Blastogenese in der MLC,

5 % - 0,4 % bei Sera von unbehandelten Ratten gegenüber 58 % - 2 % bei Sera von Ratten mit akutem Leberschaden.

Tabelle 6: Beeinflussung von LEC, LPw5 und Sera auf die MLC-Reaktion (Suppression in %)

Behandlung	LEC *)	LPw5	Sera	
LEWxBDEm	keine	98 ± 1	99 ± 1	5 ± 0,4
	DMNA	89 ± 2	97 ± 2	58 ± 2
	CCl <sub>4</sub> 2 Wo	92 ± 1	98 ± 2	20 ± 1
	CCl <sub>4</sub> 4 Wo	81 ± 3	10 ± 3	15 ± 3
	CCl <sub>4</sub> 8 Wo	13 ± 4	N	22 ± 2
	CCl <sub>4</sub> 10 Wo	N	N	22 ± 1
	BDExLEWm	keine	97 ± 1	99 ± 2
DMNA		73 ± 3	97 ± 1	58 ± 2
CCl <sub>4</sub> 2 Wo		70 ± 4	93 ± 2	27 ± 3
CCl <sub>4</sub> 4 Wo		38 ± 3	N	17 ± 2
CCl <sub>4</sub> 8 Wo		N	N	23 ± 2
CCl <sub>4</sub> 10 Wo		N	N	33 ± 3

\*) LEC wurde vierfach mit Ringerlösung verdünnt.

N = keine Inhibition

m = Zellen wurden mit Mitomycin behandelt

Tabelle 7: Fibroblastenstimulationinhibition in % durch LPw5 und Sera

Behandlung	LPw5	Sera
keine	66	N
DMNA	66	45
CCl <sub>4</sub> 2 Wo	40	N
CCl <sub>4</sub> 4 Wo	43	N
CCl <sub>4</sub> 8 Wo	19	N
CCl <sub>4</sub> 10 Wo	3	N

N = keine Inhibition

Trotz der Verminderung des immunsuppressiven Potentials besitzt LEC eine stärkere Inhibitionsfähigkeit als LPw5 bei Ratten mit einer DMNA-Behandlung, wobei berücksichtigt werden muß, daß die LEC vierfach verdünnt beim Test angewandt wurde. LPw5 von unbehandelten und mit DMNA behandelten Ratten zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Die Faktoren, die Fibroblastenproliferation inhibieren, waren aber durch akuten Leberschaden bei LEC und LPw5 im Vergleich zu unbehandelten Ratten nicht vermindert. Bei LPc5 waren sie - wie erwartet - sehr stark vermindert. Dies bedeutet, daß Fibroblastenproliferations-Hemmstoffe bei einer Leberschädigung durch DMNA in der Leber noch reichlich vorhanden sind und in gewissen Mengen in die **Blutbahn** freigesetzt werden. Sera von Ratten mit akuter Leberzellekrose besitzen eine sehr starke Hemmfähigkeit (45 %), während die Sera von unbehandelten Ratten diese nicht aufweisen.

#### E. Chronischer Leberschaden und Leberzirrhose

Durch eine 2 - 4 wöchige Behandlung mit  $CCl_4$  kann man das histologische Bild eines chronischen Leberschadens erzeugen. Dieser Leberschaden durch chronisch exogene Hepatotoxin-Wirkung ist mit dem Krankheitsbild einer chronisch aggressiven Hepatitis nicht vergleichbar, welche hauptsächlich durch Viren bedingt wird. Da kein anderes Modell zur Verfügung steht, ist man gezwungen, eine durch  $CCl_4$ -Behandlung erzeugte chronische Hepatitis für die experimentelle Forschung zu verwenden.

Durch Behandlung mit  $CCl_4$  wurde die immunsuppressive Fähigkeit von LEC und LPw bei einer PHA-Stimulation langsam vermindert. Bei chronischem Leberschaden existiert die immunsuppressive Fähigkeit noch relativ stark, mit dem zirrhotischen Umbau war sie jedoch drastisch vermindert.

Nach 8 - 10 wöchiger Behandlung konnten LEC und LPw5 bei einer MLC-Reaktion die Zellstimulation nicht inhibieren, bei einer 2 - 4 wöchigen Behandlung war die Inhibition bei LEC ausreichend, bei LPw5 dagegen nur noch sehr vermindert vorhanden. Sera von Ratten mit chronischem Leberschaden zeigten unabhängig von der Behandlungsdauer mit  $CCl_4$  eine etwa 20 %ige Inhibition von Blastogenese in MLC, d.h. immunsuppressive Faktoren gingen durch eine chronische Zellmembranschädigung von der Leber in das Serum über,

nicht aber, wie bei einem akuten Leberschaden, in massiv erhöhten Mengen.

Bei einem chronischen Leberschaden konnte LPw5 die Fibroblastenproliferation weniger inhibieren als LPw5 von unbehandelten Ratten; bei einer 2 - 4 wöchigen CCl<sup>4</sup>-Behandlung lag die Inhibition bei etwa 40 %, nach einer 8 - 10 wöchigen Behandlung unter 20 %. Das Serum der Ratten mit chronischem Leberschaden zeigte keinen Inhibitionseffekt.

Der Inhibitionseffekt von LEC bzw. LPw wird bei einer Leberzirrhose in starken Maßen, bei einer chronischen Leberschädigung mit der Zeit allmählich vermindert. Im Serum der Ratten mit chronischem Leberschaden befand sich dieser Faktor noch in bestimmten Mengen, jedoch viel niedriger als in dem Serum von Ratten mit akutem Leberschaden. Die Fibroblastenproliferationshemmung zeigten weder Sera von mit CCl<sub>4</sub> behandelten Ratten noch Sera von unbehandelten Ratten.

#### Schlußfolgerung

Wie der Leberextrakt zeigt, besitzt die Leber als physiologische Bestandteile immunosuppressive und fibroblastenproliferationshemmende Faktoren. Diese Faktoren werden bei einer Leberzellschädigung in die Blutbahn freigesetzt, wie LPw5 es in unserem Experiment zeigte. Die Tests mit LPC5 zeigten, daß die intakten Leberzellmembranen diese Faktoren nicht extrazellulär abgeben können. Die Freisetzung in die Blutbahn erfolgt nicht durch aktiven, sondern durch passiven Transport (LPw).

Bei fulminantem Leberschaden sollten diese immunosuppressiven Komponenten der Leberzellen reichlich in die extrazellulären Räume bzw. in den Blutkreislauf abgegeben werden. Wenn dieser Organfaktor für die Aufrechterhaltung des Lebens notwendig sein sollte und nur die Leber ihn besitzt, könnte man folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Leber besitzt zahlreiche biochemische Funktionen; ein gewisser Leistungsgrad dieser Funktionen ist lebensnotwendig. Da sich die Leber primär mit den Stoffen, die vom Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, auseinandersetzt, wird sie häufig gefährdet. Bei akuter Schädigung der Leber könnten daher die fibroblastenproliferationshemmenden Faktoren die Vernarbung einer geschädigten Leber im Gegensatz zu anderen Or-

ganen verhindern. Tatsächlich fanden wir bei Patienten mit fulminantem Leberversagen, die nach einer Behandlung mit temporären Leberersatz in der Form einer Pavianleberhämoperfusion die Erkrankung überlebten, nach Jahren eine fast normale histologische Leberstruktur.

2. Die Leber enthält zahlreiche Proteine, von denen die meisten als Enzyme aktiv sind. Falls nun die Leber geschädigt wird, könnten Proteine, auch intermediäre Produkte der Proteinsynthese, in die Blutbahn übertreten. Diese können als Antigene eine Autoimmunreaktion auslösen. Meines Erachtens wirken die immunosuppressiven Faktoren hemmend auf die Autoimmunreaktionen, um den Organismus vor dieser Gefahr zu schützen. Daher können die Faktoren neben den Zellen des RES-Systems (Kupfersche Sternzellen) eine wichtige Rolle bei einer Leberschädigung spielen.
3. Wir beobachteten einen stark erhöhten Serumspiegel der untersuchten Faktoren bei mit DMNA injizierten Ratten, die sich jedoch bei einem chronischen Leberschaden im Organ allmählich verminderten. Im Serum von Ratten mit chronischem Leberschaden fanden wir aber in relativ niedriger Konzentration solche Faktoren. Meines Erachtens verliert die Leber einerseits durch eine chronische Zellschädigung diese Faktoren, andererseits käme deren Synthese in der Leber nicht ausreichend zustande. Als Folge könnten eine Leberfibrose (Leberzirrhose) oder eine fortschreitende Autoimmunerkrankung (chronisch-aggressive Hepatitis) entstehen.

Bei der Transplantation werden nach der Operation immunosuppressive Faktoren aus dem ischämisch-geschädigten Lebertransplantat freigesetzt. Dadurch wird der Empfänger im Vergleich zu anderen Organverpflanzungen verlängert überleben (LIE et al., 1983). Je mehr die Spenderleber ischämisch geschädigt ist, desto mehr könnte das Transplantat postoperativ sich immunologisch günstig auswirken.

### Zusammenfassung

Von den LEW-Rattenlebern wurden durch Homogenisierung Extrakte, durch Perfusion in warmer und kalter Ischämie Perfusate hergestellt und deren immunsuppressiven sowie fibroblastenproliferationshemmende Eigenschaften durch Tests von PHA-Stimulationinhibition, MLC-Reaktioninhibition und Fibroblastenproliferationinhibition geprüft. Wir stellten fest, daß die Leber als normale Bestandteile immunsuppressive und fibroblastenproliferationshemmende Faktoren besitzt, deren Wirkungen unspezifisch waren. Durch eine Zellschädigung wurde diese in das Perfusat freigesetzt; bei intaktkonservierten Zellen war dies nicht der Fall. Durch die Behandlung mit Leberperfusaten überlebten auch die Nierenempfänger verlängert.

Die Leberzellenschädigung wurde zunächst bei LEW-Ratten durch die Injektion von Diniethylnitrosamin erzeugt und dann mit der Leber die Extrakte und Perfusate hergestellt. Die geschädigte Leber besitzt leicht verminderte Mengen der von uns untersuchten Faktoren, setzte diese aber noch reichlich in das Perfusat frei. Sera von Ratten mit akutem Leberschaden zeigten starke Inhibitionseigenschaften.

Durch eine Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung bei LEW-Ratten wurden chronischer Leberschaden und Leberzirrhose hervorgerufen. Bei der chronischen Leberschädigung waren die Faktoren in der Leber vermindert, bei einem zirrhotischen Umbau der Leber nur noch wenig vorhanden. Sera von Ratten mit chronischem Leberschaden zeigten einen niedrigen Grad der immunsuppressiven Wirkung, unabhängig von der Behandlungsdauer mit  $\text{CCl}_4$ , jedoch keine Hemmeffekte auf Fibroblastenproliferation.

### Literatur

1. BURLESON, R.L. et al.: Demonstration of dog liver immunosuppressive factor active in vitro. Transplantation 28, 318 (1979)
2. CHISARI, F.V.: Regulation of human lymphocyte function by a soluble extract from normal human liver. J. Immunol. 121, 1279 (1978)

3. LIE, T.S. et al.: Immunmechanismus bei der Rattenlebertransplantation. Langenbecks Arch. Chir. 1983 (im Druck)
4. VOGELFÄNGER, I.J. et al.: Naturally occurring immunosuppressive agents. I. The presence in normal pig liver of a factor possessing immunosuppressive properties with respect to pig lymphoid cells in vitro. Transplantation 21, 130 (1975)

#### Diskussion

STIEFEL: Sie haben festgestellt, daß Ihr Faktor bei Leberzirrhose nicht mehr gebildet wird. Ist es denkbar, daß durch Zuführung von Leberextrakten aus gesundem Lebergewebe die Zirrhose behandelt werden kann?

T.S. LIE: So kann ich das nicht bestätigen. Meine Fragestellung ging dahin, warum die Leber, die normale Leber, über diese zwei Faktoren verfügt. Ich gehe davon aus, daß der Organismus jene Faktoren synthetisiert, die er benötigt. Dies als Basis, wäre es doch möglich, daß jener Fibroblasten inhibierende Faktor gewissermaßen für die Vermeidung der Leberzirrhose eine Rolle spielen könnte. Wir behandeln beispielsweise Leberkoma-Patienten mit Pavianleber-Perfusionen. Damit haben wir sechs Patienten durchbekommen, obwohl deren Leber total geschädigt war. Erwachen diese Patienten einmal aus dem Koma, so zeigt sich ihre Leber nach zwei bis drei Jahren als völlig intakt, ohne irgendwelche zirrhotischen Veränderungen.

C. BIRR: Ihren Dias habe ich entnommen, daß Sie Ihre gesamte inhibitorische Aktivität über eine gemischte Lymphozytenkultur bestimmt haben. Im Prinzip möchte ich dazu zunächst wissen: Was beobachten Sie in der gemischten Lymphozytenkultur? Eine Überschuß-Stimulation oder eine Suppression dieses Assays?

T.S. LIE: Wir bestimmen die Inhibitionsquote im Vergleich zur Kontrolle.

C. BIRR: Sie haben eine normale Antwort, die Sie zu 100 % setzen. Nun fügen Sie Ihr Leberperfusat in einer bestimmten Konzentration zu und finden eine Zahl <100 %. Ist diese Interpretation richtig?

T.S. LIE: Ja .

C. BIRR: Nun muß dieses Ergebnis ja nicht unbedingt Suppression bedeuten. Das kann auch bedeuten, daß durch einen Faktor z.B. eine zytotoxische Zelle stimuliert wird, diese wiederum die Lymphozytenkultur stört, so daß die Totalantwort kleiner ausfällt.

T.S. LIE: Ich habe es in dieser Arbeit nicht vorgetragen, aber wir haben 24-stündige oder 3-tägige Kulturen mit diesem Leberextrakt behandelt. Es wurden kaum zytotoxische Effekte erzielt, Größenordnung etwa 10 %.

C. BIRR: Eine unmittelbar damit zusammenhängende Frage ist die nach den Inhaltsstoffen dieses Perfusates. Haben Sie die Konstanz dieses Perfusates in irgendeiner Form charakterisiert?

T.S. LIE: Die Standardisierung erfolgte nach dem Proteingehalt.

C. BIRR: Sie sagten, nach längerer Zeit sei dieser inhibitorische Faktor nicht mehr vorhanden. Das kann doch genauso gut bedeuten, daß innerhalb dieses Proteingehaltes, den Sie als in der Summe konstant beobachten, eine Komponente freigesetzt wird, z.B. durch enzymatischen Abbau, die den Effekt dieses inhibierenden Faktors aufhebt. Der Faktor ist also nach wie vor da, aber es findet beispielsweise durch ein freigewordenes Spaltstück aus diesem Proteingemisch eine Gegenreaktion statt.

T.S. LIE: Ich habe aus diesen Gründen hier Leberextrakt in kalter Ischämie erzeugt. Das bedeutet: Wir haben in vivo kühl perfundiert, danach die Leber entnommen und im Kühlraum aufbewahrt. Die Vitalität des Organs ist dadurch gegeben. Anschließend haben wir die Leber mit gekühlter Ringerlösung durchströmt und mit Perfusat aus geschädigter Leber verglichen. Qualitativ gab es keine Unterschiede. Wir sind deshalb überzeugt, daß es sich bei diesen Faktoren nicht um irgendwie enzymatisch erzeugte Zerfallprodukte handelt, sondern um in der Leber als normale Bestandteile vorhandene Faktoren.

A. MAYR: Das, was wir eben diskutiert haben, ist außerordentlich wichtig. Denn in der Leber spielen sich so viele Vorgänge ab. Wir haben Aktivitäten bei Leberperfusionen, die oft nur einige Stunden nachweisbar sind und dann wieder verschwinden. Ich finde diesen Beitrag auch besonders deshalb so wichtig, weil wir in der Leber auch Natural-Killer-Zellen haben, die Fibroblasten inhibieren. Leider müssen wir diese interessante Diskussion unterbrechen, da wir die Zeit schon überschritten haben.

Die Rolle der Zellmembran bei der Entstehung, Erkennung  
und Behandlung von bösartigen Tumoren.  
(Entdeckung zellulärer Rezeptoren für antitumorale pla-  
zentare Faktoren in NEY-TUMORIN)

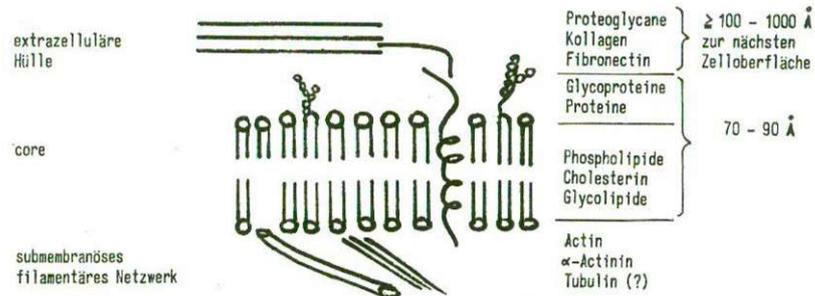
K. LETNANSKY

Institut für Krebsforschung  
Universität Wien

Während der letzten Jahrzehnte war einer der Hauptschwerpunkte in der Tumor-Grundlagenforschung die Veränderung, die sich im Zuge einer Transformation im Zellkern abspielt. Dies ist ja der Ort, wo alle Eigenschaften einer Zelle festgelegt sind und auf die Tochterzellen weitergegeben werden. Mit der Entdeckung des genetischen Codes vor etwa 20 Jahren wurde die Grundlage für diese Forschungen geschaffen.

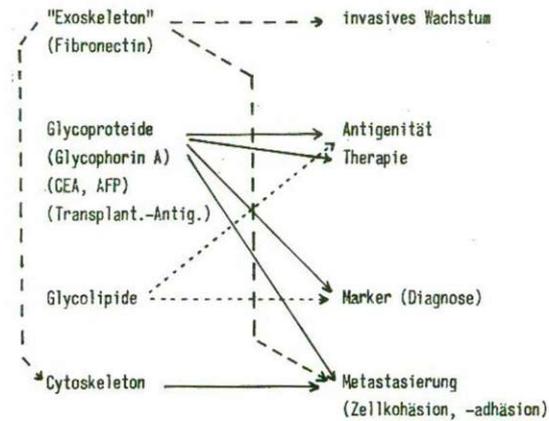
Bei all diesen Arbeiten, in die auch die Stoffwechseleigenheiten von Tumorzellen einbezogen werden, konzentrierte man sich also überwiegend auf die Vorgänge im Zellinnern. Die Rolle, die von der die Zelle nach außen abschließenden Zellmembran gespielt wird, wurde erst in zweiter Linie berücksichtigt. Dies ist wohl z.T. auch darauf zurückzuführen, daß man über Aufbau und Funktion dieses Zellbestandteils nur sehr wenig wußte. Die wesentliche Erkenntnis, daß das Kernstück der Zellmembran aus einer Lipid-Doppelschicht besteht, war zwar seit langem bekannt, doch Untersuchungen über die Feinstruktur und die Bedeutung der unmittelbar daran angrenzenden Regionen wurden im wesentlichen erst während der letzten Jahre gemacht. Dabei stellte sich heraus, daß gerade die Plasmamembran eine sehr wichtige Rolle bei Fragen der Tumordiagnose, -therapie und Metastasierung spielt.

Abbildung 1 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Plasmamembran (Übersicht Lit.Ref. 1a).



**Abbildung 1: Aufbau der Plasmamembran**

Im Zuge der malignen Transformation kann eine Fülle von Veränderungen an den Membranen eintreten, was natürlich mit zahlreichen Konsequenzen verbunden ist (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Veränderungen an der Plasmamembran während der malignen Transformation und deren Bedeutung im Rahmen des Krebsproblems**

So findet man etwa in transformierten Zellen meist einen verminderten Gehalt an Kollagen und Fibronectin (Fibronectin wird durch spezifische Rezeptoren an die Zelloberfläche gebunden; dadurch auch Kontakt mit dem intrazellulären Cytoskelett; andererseits bindet aber Fibronectin an das Kollagen der intrazellulären Matrix). Dadurch kommt es zu einem "Abkugeln" der Zellen - in weiterer Folge wird das invasive Wachstum und die Metastasenbildung begünstigt (11, 12).

Die Metastasierung wird aber auch dadurch begünstigt, daß Veränderungen an den Glycoproteiden eintreten, z.B. dahingehend, daß Kohlenhydratreste (Sialinsäure) aufgepfropft werden, wodurch sich die Oberflächenladung ändert (10, 2, 3). Andererseits treten im Verlauf der Transformation neue Glycoproteide auf (Transplantationsantigene, Transferrin-Rezeptor, Glycophorin A etc.), was bedeutsame Folgerungen für Klassifizierung und Diagnose, aber auch für die Therapie hat (Makrophagen-Bindung, Antikörper) (2, 4, 5, 6, 7, 8).

Unser Hauptinteresse gilt z.Zt. der spezifischen Bindung und Einschleusung von Substanzen, die das Wachstum von Tumoren hemmen. Solche Substanzen sind offenbar im Präparat NEY-TUMORIN enthalten. Unsere Versuche über die Hemmung des Einbaues von Thymidin in die DNA von Yoshida-Ascitestumorzellen (als Maß für die DNS-Synthese) legen diesen Schluß nahe. Man sieht, daß dieses Präparat die Thymidinsynthese auf annähernd die Hälfte senkt, während in Normalzellen, etwa Knochenmarkzellen, keine Hemmung eintritt.

Wenn man den Inhibitor anreichert (wir führten dies durch, indem wir Extrakte aus Rinder-Deziduen, die im NEY-TUMORIN enthalten sind, an Sephadex G-100-Säulen trennten) beobachtet man einen noch deutlicheren Effekt. Ebenso wird der Einbau hochsignifikant in die DNA von Mäuse-Ehrlich-Ascitestumorzellen gehemmt sowie in jene von Kulturen des humanen Bronchus-Carcinom-Stammes E 14 und des Osteosarcoms 2T. Im Gegensatz dazu ist der Inhibitor unwirksam beim Fibroblasten-Stamm Wi38.

Tabelle 1: Hemmung des Einbaus von H-Thymidin in die DNA von Normal- und Tumorzellen

Zelltyp	Thymidin-Einbau (cpm)		% Einbau	Art des Inhibitors
	bei Inhibitor- Abwesenheit	Gegenwart		
Yo	62.000	34.000	54,8	NEY-TUMORIN
Yo	19.000	5.000	26,3	Plazenta-Fraktion
EAC	25.000	4.000	16,0	- " -
2T	346.000	204.000	59,0	- " -
E14	137.000	45.000	32,8	- " -
KM	12.700	14.100	111,0	NEY-TUMORIN
KM	11.200	10.600	94,6	Plazenta-Fraktion
Wi38	218.000	204.000	93,6	- " -

Offenbar wird ein großer Prozentsatz der inkubierten Tumorzellen letal geschädigt, denn beim Überimpfen von EAC-Zellen an Mäuse beobachtet man eine deutlich vergrößerte Überlebensrate. Während neun Kontrollmäuse, die unbehandelte Tumorzellen i.p. injiziert bekommen hatten, nach 20 Tagen verstorben waren, waren von der gleich großen Gruppe, welche die mit dem Inhibitor inkubierten Zellen erhalten hatten, zum gleichen Zeitpunkt noch vier Tiere am Leben. Am 23., 32. und 63. Tag verstarb je ein Tier, das letzte am 90. Tag nach der Inoculation.

Da wir zunächst keinen Anhaltspunkt dafür fanden, daß der in die Zelle eingeschleuste Inhibitor bestimmte intrazelluläre Reaktionen in Tumorzellen stärker hemmt als in normalen, vermuteten wir Unterschiede in der Bindung bzw. der Einschleusung in die Zelle. In der Tat konnten wir zeigen, daß die Hemmwirkung, etwa beim EAC, schon bei ganz geringen Konzentrationen einsetzt und mit steigender Inhibitorkonzentration zunimmt. Sie nähert sich sehr rasch asymptotisch einem Grenzwert, der bei etwa 20 % des Kontrollwertes liegt. Diese Sättigungskurve schien uns ein Hinweis darauf zu sein, daß eine gewisse Bindungskapazität nicht überschritten werden kann und legte den Gedanken nahe, daß durch Unterschiede in den Membranrezeptoren ein leichteres Einschleusen in die Tumorzellen erfolgen könnte als in Normalzellen.

Da anzunehmen war, daß der Aufnahme in die Zellen eine spezifische Bindung der inhibierenden Komponente(n) an die Zelloberfläche vorangeht, führten wir vergleichende Studien über die Bindung des radioaktiv markierten Inhibitors an isolierte Plasmamembranen aus Leber- bzw. Yoshida-Tumorzellen durch. Wenn man das Mengenverhältnis zwischen Inhibitor und Membranen variiert und jeweils den Quotienten aus gebundenem/nicht gebundenem Inhibitor als Funktion vom gebundenen Inhibitor aufträgt, bekommt man sogenannte "Scatchard plots". Hierbei ist die Neigung dieser Geraden ein Maß für die Affinität der Membranen zu einer bestimmten Substanz, während ihr Schnittpunkt mit der Abszisse die Bindungskapazität ergibt.

Interessanterweise ist nun zu erkennen, daß die Lebermembranen eine eher geringe Bindungskapazität gegenüber diesem Inhibitor aufweisen. Bei den Tumormembranen ist bei etwa vergleichbarer Affinität eine deutlich größere Kapazität festzustellen. Darüber hinaus aber, und dies scheint mir besonders wichtig, wird die Gerade von einer zweiten überlagert, d.h. also, daß bei den vergleichsweise untersuchten Tumorzellen noch ein zweiter Rezeptor-Typus für den Inhibitor vorliegen muß. Dieser hat zwar eine geringere Affinität zum Inhibitor, weist aber eine wesentlich größere Bindungskapazität auf.

In weiterer Folge schien es nun notwendig, die einzelnen Membranpräparationen weiter in ihre Komponenten aufzutrennen und diese hinsichtlich ihres Musters sowie ihrer Fähigkeit, den Inhibitor zu binden, miteinander zu vergleichen. Über den ersten Teil dieses Projekts liegen bereits konkrete Ergebnisse vor (Abbildung 3).

Bei Untersuchungen mit der SDS-Gelelektrophorese zeigt sich, daß die Plasmamembranen von Tumorzellen (sowohl Yo als auch das besonders gut vergleichbare DENA-induzierte Hepatom) an einigen Komponenten verarmt sind, daß aber andererseits einige neue Komponenten auftreten. Es wäre sehr wohl möglich, daß darunter auch der neue Rezeptor-Typ zu finden ist. Um die einzelnen Fraktionen nun auf ihre Fähigkeit der Inhibitor-Bindung zu prüfen, haben wir Versuche laufen, deren Ausgang noch offen ist. Es scheint sich aber immer mehr abzuzeichnen, daß die Bindung der aus dem NEY-TUMORIN bzw. aus Plazentapräparationen stammenden Inhibitoren an die Zelloberfläche eine entscheidende Bedeutung beim tumorspezifischen

Wirkungsmechanismus unter in vitro-Bedingungen hat. Es ist durchaus denkbar, daß analoge Mechanismen auch in vivo vorliegen. Andererseits müssen wir aber natürlich auch mit Stimulierungen von Immunreaktionen rechnen.

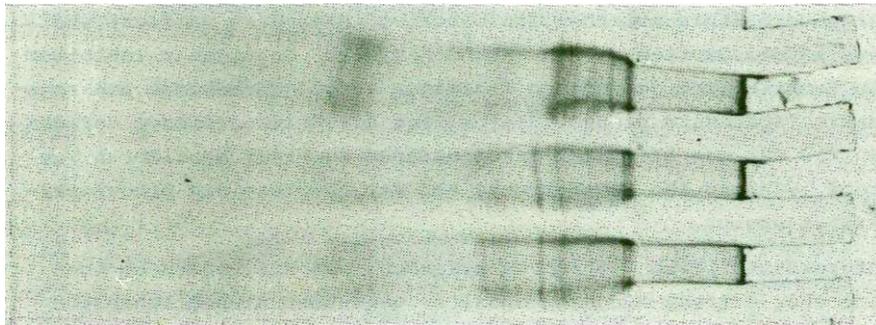


Abb. 3 : Trennung der Plasmamembran-Komponenten aus Leber, DENA-induzierten Hepatom und Ascites-Tumor (von oben nach unten) durch SDS-Gelelektrophorese.  
Proteinfärbung mit Coomassie-blue.

#### Literatur

- 1a. BURGER, M.M., The Cell Surface and Metastasis, in: Biology of the Cancer Cell, K. LETNANSKY ed., Kugler Publications, Amsterdam, pp. 193-208 (1980)
1. HAKOMORI, S., Structures and Organization of Cell Surface Glycolipids Dependency on Cell Growth and Malignant Transformation, *Biochim.Biophys.Acta* 417, 55-89 (1975)
2. GAHMBERG, C.G, L.C. ANDERSSON, Surface Glycoproteins of Malignant Human Leukocytes, *Biochim.Biophys.Acta* 651, 65-83 (1982)

3. SMETS, L.A., Cell Transformation as a Model for Tumor Induction and Neoplastic Growth, *Biochim.Biophys.Acta* 605, 93-111 (1980)
4. GAHMBERG, C.G., L.C. ANDERSSON, Cell Surface Glycoproteins in Normal and Malignant Human Leukocytes, in: *Biology of the Cancer Cell*, K. LETNANSKY, ed., Kugler Publications, Amsterdam, 209-225 (1980)
5. ADAMS, D.O., W.J. JOHNSON, P.A. MARINO, Mechanism of Target Recognition and Destruction in Macrophage-Mediated Tumor Cytotoxicity, *Federation Proceedings* 4J[, 2212-2221 (1982)
6. MILLER, R.A., D.C. MALONEY, R. WARNKE, R. LEVY, Treatment of B-Cell Lymphoma with Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody, *New Engl. J. Med.* 3J36 , 517-522 (1982)
- 7- BEVERLY, P.C.L., Antibodies and Cancer Therapy, *Nature* 297, 358-359 (1982)
8. OLSNES, S., Directing Toxins to Cancer Cells, *Nature* 290, 84 (1981)
9. DAVIS, B.D., Frontiers of the Biological Sciences, *Science* 209, 78-89 (1980)
10. FIDLER, I.J., D.M. GERSTEN, I.R. HART, The Biology of Cancer Invasion and Metastasis, in: *Advances in Cancer Research* 28, G. KLEIN and S. WEINHOUSE eds., Academic Press Inc., New York, 149-250 (1978)
11. KLEINMAN, H.K., R.J. KLEBE, G.R. MARTIN, Role of Collagenous Matrices in the Adhesion and Growth of Cells, *J. Cell Biol.* 88, 473-485 (1981)
12. SEFTON, B.M., T. HUNTER, E.H. BALL, S.J. SINGER, Vinculin: A Cytoskeletal Target of the Transforming Protein of Rous Sarcoma Virus, *Cell* 24, 165-174 (1981)

Pilotstudie zum Einfluß eines biologischen "response modifiers" (I.ETUMDRIN ) auf die Plasmamembran menschlicher Tumorzellen (Wish) in vitro im Vergleich mit einem Chemozytostatikum (6-Mercaptopurin).

U.-P. KETELSEN  
Universitätskinderklinik  
und Max-Planck-Institut für Immunbiologie  
Freiburg

Umfangreiche konventionelle ultrastrukturelle Untersuchungen am Ultradünnschnitt von Tumorzellen in vitro sind bis heute hinsichtlich der Tumorspezifität einzelner Zellstrukturveränderungen unbefriedigend, d.h., es konnte keine morphologische Abnormalität nur einer einzelnen zytoplasmatischen Zellstruktur konstant mit der Malignität der Tumorzelle assoziiert werden. Konventionelle und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Tumorzellen aus der Zellkultur zeigten jedoch häufig eine außergewöhnliche Zelloberflächenaktivität, die sich in der vermehrten Bildung von Zellfortsätzen, Mikrovilli oder bläschenförmigen Auftreibungen der Zellmembran äußert.

Die Zellmembran hat nicht nur eine Struktur- und Stoffaustauschfunktion, sondern wirkt, wie wir heute wissen, als regulatives Zentrum, welches Signale aus der Mikroumgebung der Zelle transformiert und damit bestimmte Folgereaktionen in der Zelle auslöst. Die äußere Zellmembran kann heute im weitesten Sinne als echter Gegenspieler des Genoms definiert werden, indem sie die Funktionen des Informationsaustausches mit der Umgebung übernimmt, das Genom dagegen die der Informationsspeicherung.

In der äußeren Zellmembran sind Phospholipide als planare Doppelschicht angeordnet, in der mosaikartig und asymmetrisch periphere oder integrale Struktur- und Transportproteine eingebettet sind, die sich in der Lipidmatrix bewegen können. Das von SINGER und NICOLSON (1) postulierte Modell der "fluid-mosaic-membrane" ist sehr vereinfacht, da Zellen eine weitaus höhere Stabilität aufweisen, als sich dies durch eine Lipiddoppelschicht, in der Proteine völlig frei beweglich sind, alleine erzielen ließe. Diese Stabiii-

tät wird teilweise durch periphere Proteine erreicht, die sich nur im hydrophilen Bereich der Membran finden und die mit mehreren integralen Membranproteinen assoziiert sind und mit diesen ein Stützgerüst bilden. Ein Beispiel hierfür ist das Spektrin an der Innenseite der Erythrozytenmembran. Darüberhinaus sind der Membran in Form des sog. Zytoskeletts Filamentstrukturen assoziiert, die ebenfalls die Beweglichkeit eines Teils integraler Membranproteine zu kontrollieren scheinen. Das durch morphologische, biochemische und biophysikalische Erkenntnisse entwickelte Membranmodell wird durch ultrastrukturelle Untersuchungen mit Hilfe der Gefrierbruchmethode bestätigt (Methode siehe 2). Beim Gefrierbruch brechen die Objekte entlang bevorzugter Schwächezonen. Bei Membranen ist dies die hydrophobe Mittelzone (3). Der Gefrierbruch zeigt also Membraninnenansichten. Jede Präparation ergibt äußere mit EF und innere mit PF bezeichnete Membranspalthälften. Auf diesen Spalthälften stellen sich die integralen Membranproteine in der glatten Lipidgrundmatrix als Partikel dar, die auf den inneren Spalthälften zahlreicher sind als auf den äußeren, wodurch die Asymmetrie der Membran auch morphologisch charakterisiert wird.

Die invasiven Eigenschaften von Tumorzellen werden durch zahlreiche Faktoren bestimmt, unter denen die Modifikation der Zelloberfläche eine sehr wichtige Rolle zu spielen scheint, über die hier kurz skizzierten Informations- und Stoffaustauschfunktionen hinaus ermöglicht die Zellmembran im Zellverband, wie z.B. Epithel oder Endothel über spezialisierte Kontaktstellen (gap junctions, Desmosomen) den Zusammenhalt der einzelnen Zellen. In den letzten Jahren konnte in vivo nachgewiesen werden, daß der Entwicklung invasiver Karzinome Veränderungen dieser Kontaktstellen vorausgehen (4). Offensichtlich sind aber die Membranveränderungen im präneoplastischen und neoplastischen Zustand nicht nur auf die Kontaktstellen alleine bezogen, sondern mit Veränderungen der gesamten molekularen Architektur des Plasmalemmas korreliert (5).

Wir haben in einer Pilotstudie normale humane Amnionzellkulturen mit humanen Wish-Amnion-Tumorzellen nach 19 Kulturtagen im Ultradünnschnitt und mit Hilfe der Gefrierbruchmethode untersucht. Darüberhinaus wurden mit den gleichen Methoden Wishzellkulturen analysiert, die mit 6-Mercaptopurin und parallel mit NEYTUMORIN behandelt wurden. Die Gefrierätzung der mit 6-Mercaptopurin behandelten

Zellkulturen wurden nach 6 Behandlungstagen durchgeführt, da nach diesem Zeitraum aufgrund fortschreitender Zelldegeneration nicht mehr genügend Zellmaterial für diese spezielle Untersuchung zur Verfügung stand. 10 Tage mit 6-Mercaptopurin behandelte Kulturen wurden lediglich im Ultradünnschnitt untersucht. Die mit NEYTUMORIN behandelten Zellkulturen wurden nach 10 und 17 Tagen Behandlungsdauer im Gefrierbruch und Ultradünnschnitt analysiert.

Die Untersuchung der Zellmembranen im Gefrierbruch konzentrierte sich (1.) auf die Anzahl der intramembranösen Partikel und (2.) auf ihre zweidimensionale Topographie oder Verteilung innerhalb der Membran.

Pro Zellansatz wurden 7-15 P- und E-Flächen der Membranspalthälften durch eine technische Assistentin ausgewertet, welcher der Code bezüglich der verschiedenen Zellkulturen unbekannt war. Die Auswertung wurde an elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einer Endvergrößerung von 60.000 ausgeführt.

Die Anzahl der intramembranösen Partikel und ihre topographische Verteilung wurde in Membranareale von  $1 \mu\text{m}^2$  mit Hilfe eines Testgitters (Abb.1) mit 6 cm Kantenlänge bestimmt, welches die Größe des Testfeldes abgrenzte. Dieses Testgitter ist in 100 je  $6 \text{ mm}^2$  große Quadrate unterteilt. Die quantitative Analyse wurde mit einem halbautomatischen Morphometer der Firma Leitz durchgeführt und über einen angeschlossenen programmierbaren Computer ausgewertet. Hierbei wurden alle Partikel innerhalb des Testareals auf der Zeichenplatte des Leitzgerätes mit einem Zeichenstift markiert. Der Computer registrierte nun die Anzahl sowie die topographische Verteilung der Partikel innerhalb des gesamten Testfeldes. Die topographische Verteilung wurde dabei in Form sog. Dispersionskoeffizienten ausgedrückt. Werte über 1,4 weisen dabei auf eine statistisch signifikante Aggregation, Werte unter 0,67 dagegen auf eine hochgeordnete Organisation und Werte zwischen 0,67 und 1,4 auf eine zufällige Verteilung der intramembranösen Partikel hin (6).

Im Ultradünnschnitt hat die normale Amnionzelle in vitro epitheloiden Charakter mit einzelnen Mikrovilli, einem gut ausgebildeten rauhen endoplasmatischen Retikulum, regelrecht strukturierten Mitochondrien sowie einen Kern mit fein verteiltem Chromatin und z. T. prominente Nukleoli. In Plasamembrannähe werden häufig feine Filamentbündel nachgewiesen, die den Tonofilamenten der Epithel-

zellen in vivo entsprechen. Darüberhinaus konnten wir Zell zu Zellkontakte analog sog. "gap junctions" beobachten. Im Gefrierbruch weisen die Membranspalthälften in der Lipidgrundmatrix diffus verteilte Partikel auf, deren Anzahl auf den P-Flächen im Mittelwert 693 pro  $\mu\text{m}^2$ , auf den E-Flächen 284 Partikel pro  $\mu\text{m}^2$  beträgt. Der Dispersionskoeffizient zeigt eine zufällsmäßige Verteilung ohne signifikante Aggregationstendenz der Partikel (Tab.1).

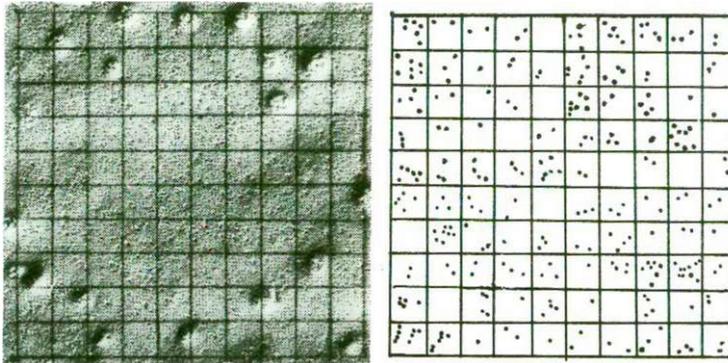


Abb. 1 : Quantitative Analyse einer Zellmembranbruchfläche am Beispiel einer Skelettmuskelzellmembran (siehe KETELSEN 1980). Testgitter (Klar-sichtfolie) mit 100 Quadraten über der elektronenmüroskopischen Aufnahme einer Bruchfläche des Plasmalemm (P-Fläche). Daneben ein Beispiel der als Punkte auf dem Testgitter markierten (nicht mit nebenstehender Aufnahme identisch) intramembranösen Partikel (Registrierung der Anzahl dieser Markierungspunkte durch Morphometer und Kalkulation ihrer topographischen Verteilung durch angeschlossenen Computer).

Während sich im Ultradünnschnitt die unbehandelte Wish-Zelle bis auf eine gehäufte Bildung von Mikrovilli nur wenig in ihrer Ultrastruktur von der normalen Amnionzelle unterscheidet (Abb. 2a,b) sind deutliche Unterschiede in der molekularen Architektur des Plasmalemm mit Hilfe der Gefrierbruchmethode nachzuweisen. Im Gefrierbruch des Plasmalemm unbehandelter Wish-Zellen ergibt sich eine signifikante Vermehrung integraler Membranpartikel insbesondere auf den P-Flächen (Abb.2c) mit einem Mittelwert von 1414 Partikeln pro  $\mu\text{m}^2$ . Der Dispersionskoeffizient weist im Vergleich zur normalen Kontrolle auf eine Aggregationstendenz der Partikel in der Membran hin (Tab.11).

Wish-Zellen weisen nach 6-tägiger Behandlung mit 6-Mercaptopurin im Ultradünnschnitt eine ausgeprägte Bildung von Mikrovilli, ein

Tab. 1: Dichte und topographische Verteilung intramembranöser Partikel von Wish-Zellen in vitro (unbehandelt, cytotostatische Kultur, Kultur mit NEYTUMORIN) im Vergleich zu Befunden normaler Amnionzellen in vitro.

	Amnionzellkultur		Wish unbehandelt		Wish + 6-Mer-captopurin		Wish + NEYTUMORIN		Wish + NEYTUMORIN	
	19 Tage		19 Tage		6 Tage		10 Tage		17 Tage	
	PF	EF	PF	EF	PF	EF	PF	EF	PF	EF
Anzahl der intramembranösen Partikel (IMP) pro $\mu\text{m}^2 \pm \text{StA}$	693,14	284,5	1414,72	407,25	1518,66	366,50	975,42	-	1020,0	162,57
	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
	102,41	7,77	297,86	138,58	249,80	166,10	319,60		317,76	39,55
Dispersionskoeffizient (C.D.) der intramembranösen Partikel $\pm \text{StA}$	0,755	1,019	1,044	1,422	1,148	1,452	0,75	-	0,616	1,235
	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
	0,124	0,46	0,49	0,54	0,51	0,28	0,25		0,05	0,198

StA = Standardabweichung

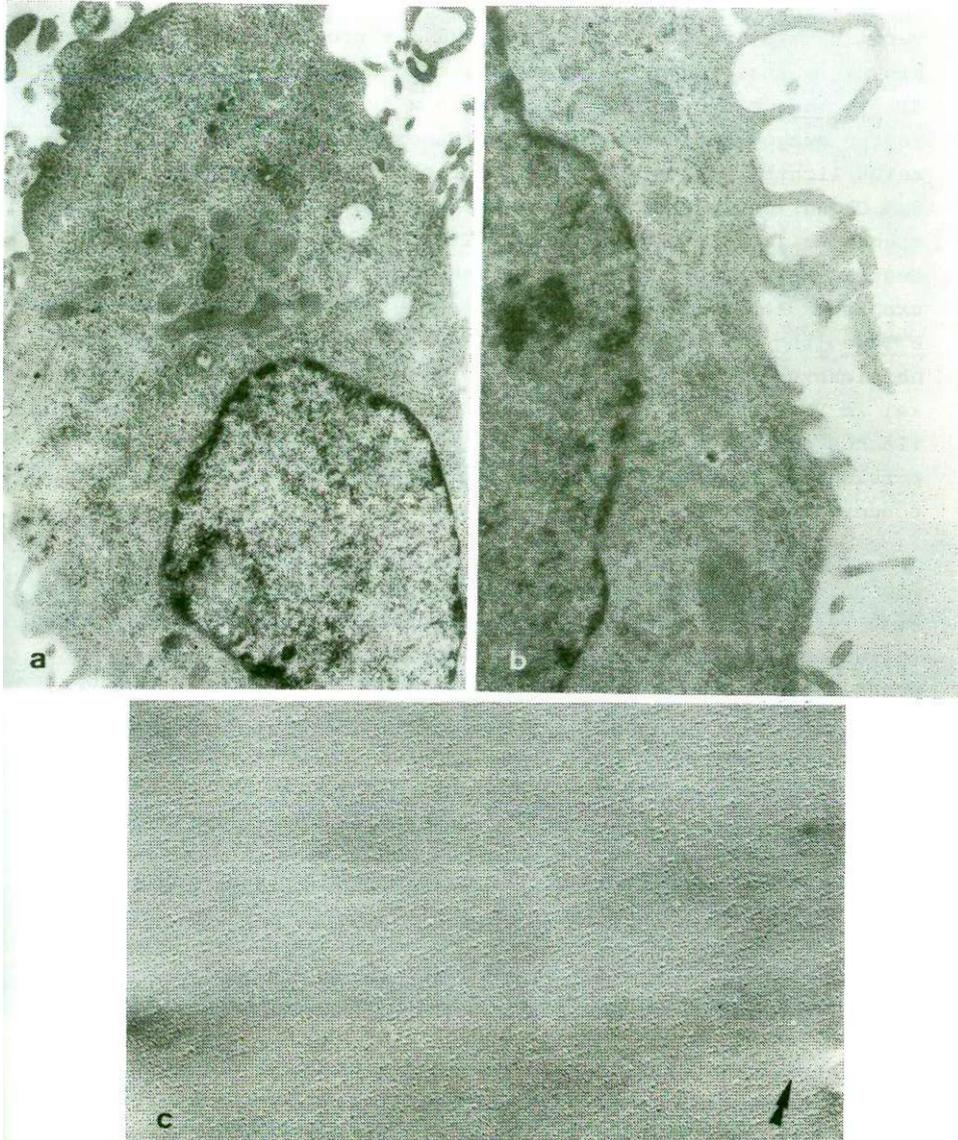


Abb. 2: Humane Tumorzellen *Wish in vitro* (unbehandelt, 19 Kulturtage).

a+b) Im Ultradünnschnitt Nachweis verstärkter Zelloberflächenaktivität mit Vermehrung von Zellfortsätzen und Mikrovilli.

c) Im Gefrierbruch der äußeren Zellmembran (P-Fläche) deutliche Vermehrung der Membranpartikel im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2d) . Bedampfungsrichtung: - ^ ^

verdichtetes Zytoplasma, große Kerne mit prominenten Nukleoli und ein vermehrtes rauhes endoplasmatisches Retikulum auf. Wish-Zellen, die 10 Tage mit 6-Mercaptopurin ( $1,5 \times 10^{-5}$  g) behandelt wurden, zeigen ausgeprägt degenerative Veränderungen. Ihre Kerne sind bereits lichtmikroskopisch blasig aufgetrieben. Ultrastrukturell ist das Chondriom degeneriert, insbesondere ist aber das endoplasmatische Retikulum vakuolig ausgeweitet. Es finden sich Aufbrüche des Plasmalemmas sowie der Zelle anhängende, meist elektronenmikroskopisch dichte Zellmembrantrümmer. Die Analyse des Plasmalemmas der 6 Tage lang mit Mercaptopurin behandelten Wish-Zellen ergibt im Gefrierbruch eine weitere Vermehrung der integralen Membranpartikel im Vergleich der unbehandelten Wish-Zellen auf den P-Bruchflächen mit einem Mittelwert von 1518 Partikeln pro  $\mu\text{m}^2$ . Der Dispersionskoeffizient signalisiert mit einem Wert von 1,45 insbesondere auf den E-Flächen eine statistisch signifikante Aggregation der Partikel (Tab.1).

Die unter gleichen Kulturbedingungen mit NEYTUMORIN behandelten Wish-Zellen zeigen nach 10 Tagen im Ultradünnschnitt weniger Auf-faltungen der Zelloberfläche als unbehandelte Zellen, große, vereinzelt leicht vakuolig degenerierte Mitochondrien sowie große Kerne mit fein verteiltem Chromatin. Die Zellen sind häufig zu Aggregaten zusammengelagert, ohne daß sich mehr charakteristische Zellkontaktstellen wie gap junctions, nachweisen lassen als sie vergleichsweise in unbehandelten Wish-Zellkulturen gefunden wurden. Im Gefrierbruch weisen die Plasmamembranen im Vergleich zu unbehandelten Wish-Zellen eine Verminderung der Partikelzahl auf den P-Flächen mit einem Mittelwert von 975 pro  $\mu\text{m}^2$  und mit einer zufallsmäßigen Verteilung auf (Tab.1).

In Kulturen, die 17 Tage mit NEYTUMORIN behandelt wurden, ist die Zelloberfläche wieder stärker aufgefaltet und die Kerne weisen ein grob verteiltes Chromatin und prominente Nukleoli auf (Abb.3a,b). Degenerative Zellstrukturveränderungen fehlen. Im Gefrierbruch ist die Partikelzahl auf den P-Flächen des Plasmalemmas im Vergleich zur 10 Tage lang behandelten Kultur wieder leicht angestiegen (Abb.3d), erreicht jedoch im Mittelwert nicht den Wert der unbehandelten Kultur (Tab.1).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Pilotstudie generell die Möglichkeiten auf in der Beurteilung von molekularen Struktur-

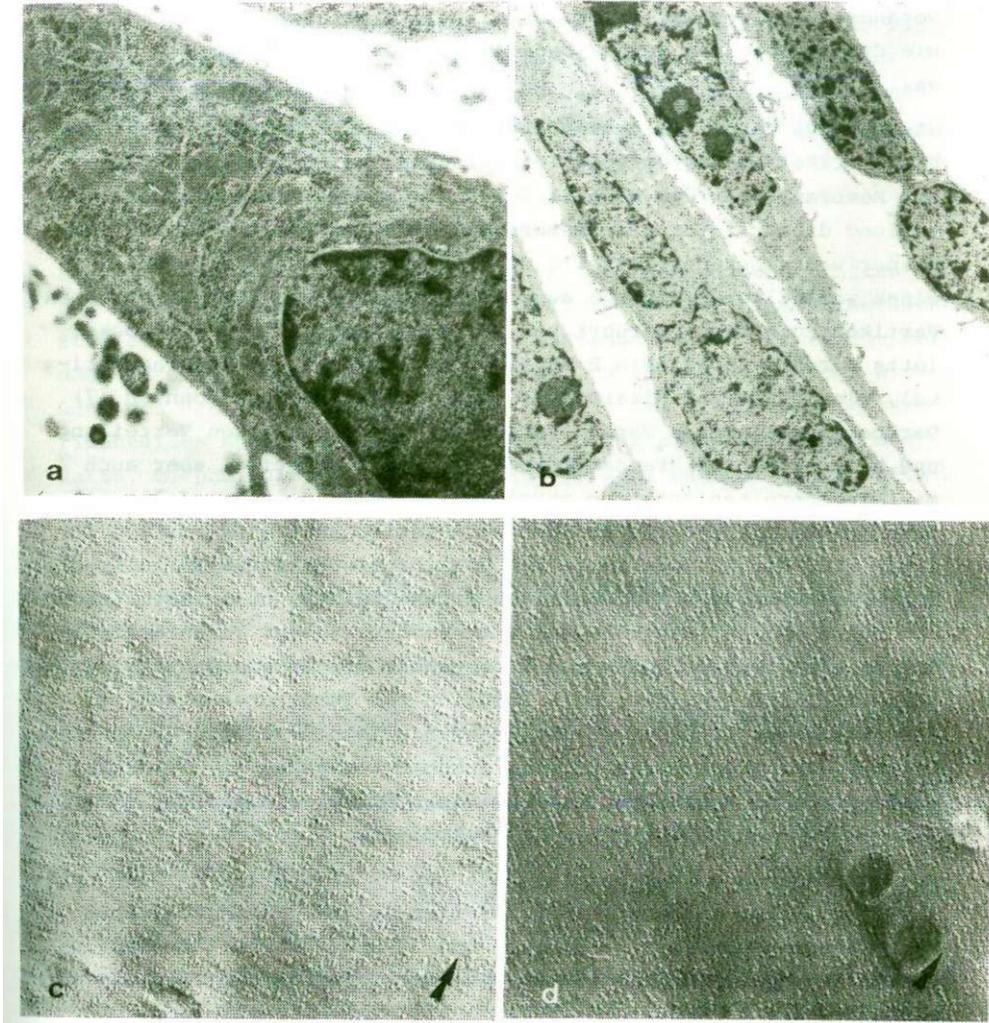


Abb.3: Wish-Zellen nach Behandlung mit NEYTUMDRIN (tägl.  $5 \times 10^6$ g Protein/  
 $2 \times 10^7$  Zellen).

- a+b) Wish-Zellen nach 17-tägiger Behandlung mit gut ausgebildetem rauhen endoplasmatischen Retikulum (a), meist in ihrer Grundmatrix verdichteten Mitochondrien und leicht vermehrter Oberflächenaktivität (b). Die Kerne weisen ein grob verteiltes Chromatin und meist prominente Nukleoli auf (b) .
- c) P-Bruchfläche einer Wish-Zelle nach 10-tägiger Behandlung. Verminderung der integralen Membranpartikel im Vergleich zur unbehandelten Wish-Zellkultur.
- d) P-Bruchfläche einer Wish-Zelle nach 17-tägiger Behandlung. Erneuter Anstieg der Partikelzahl im Vergleich zur 10 Tage lang behandelten Kultur. Bedampfungsrichtung:

Veränderungen von Zellmembranen mit Hilfe der Gefrierbruchmethode, wie dies bisher mit keiner anderen morphologischen Methode möglich war.

Wie anfangs dargestellt, repräsentieren die intramembranösen Membranpartikel im Gefrierbruch Proteine in der Lipiddoppelschicht der Membran. **Über** den Mechanismus, mit dem die topographische Verteilung dieser integralen Membranproteine kontrolliert wird, ist bisher wenig bekannt. Anteile des Zytoskeletts der Zelle scheinen einen wesentlichen Einfluß auf die Verteilung der intramembranösen Partikel zu haben. So führt z.B. eine Beeinflussung des Zytoskeletts durch Cytochalasin B zu einer Aggregation der Membranpartikel, wie SPETH und Mitarbeiter 1981 in vitro zeigen konnten (7). Darüberhinaus können Veränderungen der topographischen Verteilung und numerischen Dichte der integralen Membranpartikel aber auch mit einem breiten Spektrum physiologisch-metabolischer Zellzustände assoziiert sein (8). Bei der neoplastischen Transformation der Zelle sind die Zellmembranen und die ihr assoziierten Zellelemente offensichtlich verschiedenartigen strukturellen, organisatorischen und funktionellen Alterationen unterworfen, so daß Veränderungen in der numerischen Dichte und Topographie der Membranpartikel als morphologische Indikatoren in Relation zur Tumorgenese gesetzt werden können. In unserer vorliegenden Pilotstudie wird diese Arbeitshypothese durch den signifikanten Unterschied in der Anzahl der integralen Membranpartikel zwischen normalen Amnionzellen und Wish-Tumor-Amnionzellen in vitro bestätigt.

Analoge Befunde wurden bereits 1976 von WEINSTEIN (5) an noch nicht invasiven, aber maligne transformierten Zellen des menschlichen Harnblasenepithels in vivo erhoben und 1978 durch PAULI und Mitarbeiter in experimentellen Studien an der Ratte am gleichen Organ bestätigt (6).

In unserer Pilotstudie ist die Vermehrung der integralen Membranpartikel im Vergleich mit den konventionellen ultrastrukturellen Befunden am Ultradünnschnitt mit einer zunehmenden Modifikation der Zelloberfläche in Form einer vermehrten Bildung von Mikrovilli korreliert. Unter der Behandlung mit 6-Mercaptopurin wird diese Korrelation ebenfalls deutlich: Es nimmt sowohl die Anzahl der intramembranösen Membranpartikel als auch die Bildung der Mikrovilli zu. Dagegen kommt es unter dem Einfluß von NEYTUMORIN nach 10 Tagen

bei Abnahme der Proliferationsrate zu einer Verminderung der Partikelzahl und es werden vergleichsweise weniger Mikrovilli und Zelloberflächenveränderungen nachgewiesen, als in den unbehandelten Wish-Zellkulturen. Nach 17 Tagen Behandlung mit NEYTUMORIN nimmt die Anzahl der intramembranösen Partikel und Mikrovilli im Vergleich zum 10. Tag wieder leicht zu. Die Proliferationsrate war zu diesem Zeitpunkt erneut angestiegen.

Der zum 6-Mercaptopurin morphologisch unterschiedliche Einfluß des NEYTUMORIN auf die Wish-Zelle sollte deshalb in zeitkinetischen Studien auch im Hinblick auf die Dosisfrage weiter untersucht werden. Darüberhinaus wäre zu überprüfen, ob sich eine analoge Wirkung des Präparates auch in vivo, z.B. in dem erwähnten tierexperimentellen Modell des chemisch induziertes Blasenkarzinoms der Ratte, morphologisch in Analogie zu der vorliegenden in vitro-Pilotstudie belegen läßt.

#### Literatur

1. SINGER, S.J., NICOLSON, G.L.: The fluid mosaic model of cell membranes. *Science* 175, 720-731 (1972)
2. KETELSEN, U.-P.: Quantitative freeze fracture studies of human skeletal muscle cell membranes under normal and pathological conditions. In: *Muscular Dystrophy Research. Advances and new Trends.* (ANGELINI, C., DANIELI, G.A., FONTANARI, D., Ed.) Excerpta Medica, Amsterdam - Oxford - Princeton
3. BRANTON, D., DEAMER, D.: Membrane structure. *Protoplasmatologia* II/E/1, 1-70 (1972)
4. KOCHER, O., AMAUDRUZ, M., SCHINDLER, A.M., GABBIANI, G.: Desmosomes and gap junctions in precarcinomatous and carcinomatous conditions of squamous epithelia. An electron microscopic and morphometrical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 13, 267-281 (1981)
5. WEINSTEIN, R.S.: Changes in plasma membrane structure associated with malignant transformation in human urinary bladder carcinomas in Fischer rats. *Lab. Invest.* 33, 565-573 (1978)

7. SPETH, V., BAUER, H.C., BRUNNER, G.: Changes of the internal Organization of the plasma membrane correlated to the regeneration potency of the cell. *Biochim. Biophys. Acta* 649, 113-120 (1981)
8. BENEDETTI, E.L., DUNIA, I., OLIVE, J., CARTAUD, J.: Modulation of plasma membrane architecture in animal cells. In: *Structural and Kinetic Approach to Plasma Membrane Functions*, pp 6076. (NICOLAU, C., PARAF, A.; Ed.) Springer Vlg., Berlin - Heidelberg - New York 1977

Experimentelle Untersuchungen über den anti-  
tumoralen Wirkungsmechanismus von NEYTUMORIN

P. G. MUNDER

Max-Planck-Institut für Immunbiologie,  
Freiburg

Ehe ich die neueren Ergebnisse unserer experimentellen Untersuchungen über den Mechanismus der antitumoralen Wirkung von NEYTUMORIN darstelle, will ich zunächst zusammenfassen, was in den vergangenen drei Jahren, während wir dieses Projekt bearbeiten, gefunden worden ist.

Begonnen haben die Untersuchungen mit dem überraschenden Befund, daß NEYTUMORIN (REVITORGAN Nr. 66) im Tier das Tumorwachstum deutlich hemmt und bestehende Tumoren von einer Größe bis zu etwa 1 cm Durchmesser zur Regression bringen kann. Dieser Effekt ist weder Mausstamm- noch Tumor-spezifisch, d.h. eine antitumorale Wirkung dieser Präparationen in vivo war in verschiedenen Mäusestämmen, in Ratten und bei verschiedenen Tumoren nachweisbar. Für den Eintritt des Effektes ist es unerheblich, ob der Tumor antigen ist oder nicht. Syngene Tumoren, die von normalem Gewebe nicht unterschieden werden können, werden genauso zur Regression gebracht wie Tumoren, bei denen eine gewisse Immunogenität nachzuweisen ist.

In den letzten 3 Jahren haben wir etwa 20 Versuche mit einem durch Methylcholanthren chemisch induzierten Tumor durchgeführt. Dieser Tumor ist syngon für den Balb/c-Mäusestamm und kann daher transplantiert werden. Für die Versuche mit NEYTUMORIN wurden immer 100.000 Tumorzellen überimpft. Bei dieser Zellzahl wachsen in unbehandelten Tierkollektiven die implantierten Tumorzellen bei allen Tieren weiter. Werden nach der Tumortransplantation die Tiere mit 1 mg NEYTUMORIN oder anderen für die Tiere xenogenen Präparationen behandelt, kommt es zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums. Mehr als 60 % der behandelten Tiere haben nach 3 Wochen keinen Tumor mehr. In den nicht vollständig geheilten Tieren kommt es

zwar zu einem verzögerten Tumorwachstum, aber nicht zur Heilung. Interessant ist dabei, daß der Tumor während der ersten Woche trotz Applikation von NEYTUMORIN oder anderen für Mäuse xenogenen Proteinen gleichmäßig, wie in der Kontrolle, wächst. Es gibt in den ersten Wochen keinen Unterschied und erst ab der zweiten Woche eine deutliche Hemmung, bzw. Regression. Die Tumoren werden vom Rande her weiß, bekommen eine zentrale Nekrose und stellen ihr Wachstum ein oder schrumpfen innerhalb von 14 Tagen bis zur völligen Regression. Der Tumor, der nur zum Stillstand, aber nicht zur vollständigen Regression gekommen ist, beginnt allerdings nach etwa 20-25 Tagen wieder mit seinem normalen Wachstum, das letztendlich zum Tod der Tiere führt. Diese durchbrechenden Tumoren werden durch erneute Applikation von xenogenen Präparationen, NEYTUMORIN oder andere Präparationen, nicht mehr signifikant gehemmt. Diese Methylcholanthren-induzierten Tumoren sind jeder Therapie gegenüber zu diesem Zeitpunkt resistent.

Dieselben Beobachtungen kann man, und das wissen wir aus parallelen Untersuchungen, auch bei anderen antitumoralen Substanzen machen, d.h. das Resistenz-Phänomen ist nicht etwa auf NEYTUMORIN beschränkt, oder auf verwandte xenogene Präparationen (XP) beschränkt sondern gilt auch für Cyclophosphamid.

Welche Minimalbedingungen muß nun eine Präparation erfüllen, damit ein solcher antitumoraler Effekt am Tier nachweisbar wird? Wir haben in einer ganzen Reihe von Versuchsserien nach einem Wirkprinzip in dieser Mischung verschiedener Gewebepräparationen gefahndet.

Zusammenfassend können folgende Feststellungen getroffen werden:

NEYTUMORIN oder xenogene Präparationen verlieren ihre antitumorale Wirkung, wenn

1. das Material bei 300.000 G für 18 Stunden zentrifugiert wird,
2. die Substanzen entweder chemisch hydrolysiert oder mit Pronase behandelt werden. Sie behalten ihre Wirkung nach einer Inkubation mit Nukleotid-spaltenden Enzymen. Daraus läßt sich folgern: Nukleotide sind nicht für die Wirkung verantwortlich.

Diese enzymatischen Untersuchungen sprechen also für ein Protein oder Polypeptid als wirksames Prinzip. Aus Gründen der Standardisierung der Versuche, und natürlich auch aus Gründen der Inter-

pretierbarkeit, haben wir in den letzten 2 Jahren, vor allem mit lyophilisiertem, zentrifugiertem (100.000 g) juvenilem Leberpräparat vom Kalb gearbeitet. Analysiert man diese Ergebnisse, so kann man im Vergleich mit NEYTUMORIN einige Eigenschaften festhalten, die für den antitumoralen Effekt wesentlich sind. Das Präparat muß nicht foetal sein. Juvenile Gewebepräparationen haben denselben Effekt. Es muß kein bestimmtes Organ sein, wie etwa Thymusgewebe, das das Tumorwachstum hemmt. Wir haben gefunden, daß selbst Hirn und Plazenta wirksam sind. Die Präparation muß aber für die Mäuse xenogen sein. Syngene Präparationen, also Präparationen vom selben Tier oder vom selben Mäusestamm sind unwirksam. Allogene, also Präparate von verwandten Mäusestämmen sind deutlich schwächer wirksam. Eine Mischung aus xenogenem Material, wie in NEYTUMORIN, steigert dagegen deutlich den antitumoralen Effekt.

Soweit es das Material betrifft, sind wir in den letzten beiden oder letzten drei Monaten einen Schritt weiter gegangen. STIEFEL von den Forschungslaboratorien der vitOrgan Arzneimittel GmbH hat uns drei Fraktionen zur Verfügung gestellt, die er aus lyophilisiertem Lebergewebe über G 200-Säule getrennt hat und die aus zwei hochmolekularen und einer niedermolekularen Fraktion besteht.

Wir haben, wie auch in den früheren Versuchen, 100.000 Tumorzellen implantiert und am Tage 3,5 und 7 die Tiere mit diesen Fraktionen behandelt. Der Tumor wurde ebenfalls i.e. implantiert. Die niedermolekulare Fraktion hat denselben Effekt wie das Ausgangsmaterial, während die hochmolekulare Fraktion keinen Effekt oder einen sogar leicht stimulierenden Effekt hatte. Wichtig ist, daß die niedermolekulare Fraktion, die wahrscheinlich weniger immunogen ist als die hochmolekulare Fraktion, die antitumorale Aktivität besitzt, und daß man bei einem geeignetem Trennverfahren auf erhebliche unwirksame Anteile möglicherweise verzichten kann, wenn man nur die niedermolekularen Fraktionen verwendet, wie dies bei NEYTUMORIN geschieht.

Welche Voraussetzungen müssen andererseits im tumortragenden Tier erfüllt sein, damit eine antitumorale Wirkung nachweisbar wird? Wenn, wie einige in vitro-Untersuchungen wahrscheinlich machen, NEYTUMORIN bzw. XP eine direkte zytotoxische oder zumindest zytostatische Wirkung auf Tumorzellen hat, müßte eine solche Wirkung im Prinzip auch in Tieren nachweisbar sein, die ein geschädigtes

oder fehlendes Immunsystem haben. Wenn der Effekt jedoch durch das Immunsystem vermittelt wird, eine Annahme, die ich aufgrund unserer Untersuchungen favorisiere, dann müßte in solchen Tieren der antitumorale Effekt ausbleiben oder deutlich schwächer sein.

Die Frage kann untersucht werden, wenn man Nacktmäuse, die ein fehlerhaftes Immunsystem haben, für die Tumorversuche benützt. Diese Nu/Nu-Mäuse heißen Nacktmäuse, weil sie keine Haare besitzen. Damit verbunden ist das Fehlen des Thymus und damit auch der thymusabhängigen T-Lymphozyten.

Auf diese Nu/Nu-Mäuse, die ein fehlerhaftes Immunsystem haben, weil sie keinen Thymus besitzen, wurde ebenfalls der Meth-A-Tumor und ein weiterer Tumor, BP 8, überimpft. Beide Tumoren wuchsen innerhalb von 14 Tagen zu Tumoren heran, die wesentlich größer als in normalen Tieren sind. Die Tiere haben keine Abwehr. Werden diese Tiere nun mit NEYTUMORIN oder mit XP behandelt, kann keine Tumorchemmung beobachtet werden.

Die Tumoren werden durch Behandlung mit NEYTUMORIN oder XP in ihrem Wachstum überhaupt nicht beeinflußt. Natürlich beweisen diese Versuche nicht, daß der Effekt von NEYTUMORIN oder XP durch das Immunsystem ausschließlich vermittelt wird. In diesen genetisch defekten Tieren können auch noch andere Bedingungen vorliegen, die das Wachstum des Tumors so begünstigen, daß eine direkte antitumorale Wirkung nicht nachweisbar wird. Trotzdem kann man sagen, daß mit fehlenden Thymuslymphozyten oder bei fehlendem Thymus auch ein Verlust der antitumoralen Wirkung von NEYTUMORIN einhergeht. Eine Vermittlung des Effektes durch zytotoxische T-Lymphozyten ist somit wahrscheinlich, aber noch nicht bewiesen. Zu diskutieren wäre auch nach THEURER der Verlust einer "adaptativen Anpassung von Synthesemechanismen" bei thymuslosen Individuen.

Ein weiterer Versuch in dieser Richtung bestand darin, daß Tiere subletal bestrahlt wurden, d.h. mit einer Dosierung von 400 R. Diese Dosierung schädigte für Wochen das gesamte Immunsystem. Auch in diesem Fall kein antitumoraler Effekt. Während in der Kontrolle durch Behandlung mit NEYTUMORIN 6 von 10 Tieren überlebten, kam es nach Bestrahlung mit 400 R zu einem normalen Tumorwachstum und kein Tier überlebte.

Auch dies deutet zumindest darauf hin, daß der NEYTUMORIN-Effekt

durch das Immunsystem mit vermittelt wird.

Wenn es so ist, dann müßte es möglich sein, diesen antitumoralen Effekt auch *in vitro* nachzuweisen, indem man z.B. Milzzellen *in vitro* kultiviert und mit XP inkubiert. Tiere wurden mit NEYTUMORIN oder XP (1 mg, 3mal) vorinjiziert, dann wurden die Milzzellen aus dem Tier gewonnen. Diese wurden *in vitro* für 6 Tage kultiviert und mit NEYTUMORIN inkubiert. Nach 6 Tagen wurden Tumorzellen hinzugesetzt. Wichtig ist, streng darauf zu achten, daß nicht gegen den Tumor immunisiert wurde, sondern daß Präparationen verwendet wurden, die prinzipiell nichts mit der Tumorzelle zu tun haben. Wir haben NEYTUMORIN/XP *in vitro* hinzugesetzt und als Indikatorsystem für eine antitumorale Wirkung mit einem völlig fremden, den Zellen nicht "bekanntem" Tumor *in vitro* konfrontiert.

Innerhalb von 72 Stunden kommt es zu einem vollständigen Proliferationsstop der syngenen Tumorzellen.

Da eine Veränderung des Thymidin-Einbaus nicht unbedingt heißen muß, daß die Tumorzellen zerstört sind, wurde auch die absolute Tumorzellzahl bestimmt. Die absolute Zellzahl in Prozent sinkt auf weniger als 3 %, verglichen mit der Proliferation der Tumorzellen allein, ohne Inkubation mit NEYTUMORIN oder XP, und nur mit normalen Milzzellen.

Um die Kinetik der Entwicklung des antitumoralen Effektes *in vitro* zu bestimmen, wurde zunächst das XP/NEYTUMORIN mit 2mal  $10^6$  Milzzellen inkubiert und am Tag 0,2,3,4,5 und 6 die Tumorzellen hinzugesetzt. Dann wurde der Thymidin-Einbau in die Tumorzelle in Gegenwart von NEYTUMORIN/XP und in Gegenwart von Milzzellen gemessen. Die Tumorzellen allein proliferieren normal. Tumorzellen und NEYTUMORIN allein führen zu einem leichten Abfall des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus, der in der Tat signifikant ist. Normale Milzzellen allein haben ebenfalls einen leichten tumorhemmenden Effekt. Den größten Effekt auf die Tumorzelle haben wieder NEYTUMORIN/XP +Milzzellen. Dieser antitumorale Effekt entwickelt sich *in vitro* nach etwa 3 Tagen.

Werden dagegen die Tiere mit NEYTUMORIN oder XP *in vivo* "vorimmunisiert" und dann die Tumorzellen am Tag 1,2,3,4,5 und 6 zu den Milzzellen bei gleichzeitiger Inkubation mit 1 mg NEYTUMORIN/XP zugesetzt, so kommt es im Ansatz mit NEYTUMORIN/XP +Milzzellen + Tumorzellen schon nach einem Tag zu einem leichten Abfall des

<sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus in die Tumorzellen. Am zweiten Tag sinkt der Einbau bereits auf unter 50% des Kontrollwertes und nach 6 Tagen ist er vollständig gehemmt. Die morphologische Kontrolle der Kulturen zeigt, daß alle Tumorzellen zu diesem Zeitpunkt zerstört sind.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß diese in vitro-Versuche zumindest die Möglichkeit eröffnen, daß einerseits die aktive Fraktion im NEYTUMORIN/XP möglicherweise viel besser getestet werden kann und daß andererseits aber auch diese Versuche mit Zellen des Organismus Hinweise geben können, den antitumoralen Effektormechanismus im Organismus besser zu charakterisieren. Dies dürfte sicher für therapeutische Bemühungen entscheidend sein.

Zur Problematik von "Dose-Finding-Studies"  
bei biologischen "Response-Modifiern" in der Onkotherapie

F.R. DOUWES

Sonnenberg-Klinik  
Bad Sooden-Allendorf

Nach dem anfänglichen Enthusiasmus, den die Möglichkeiten der immunologischen Krebstherapie zu eröffnen schienen, ist alles viel nüchterner geworden. Vieles wurde desillusioniert. Die Krankheit Krebs hat gezeigt, daß sie komplexer und schwieriger ist, als daß wir den Sieg über die letzte Seuche der Menschheit schon in der Tasche hätten.

Der Krebs ist eigentlich das falsche Symboltier für die bösartigen Erkrankungen. Passender, weil drohender und das komplex Heterogene besser treffende, ist die Chimäre, jenes Ungeheuer aus der griechischen Mythologie mit dem feuerspeienden Kopf eines Löwen, dem Körper einer Ziege und dem Schwanz einer Schlange. Die Chimäre verdeutlicht einmal die Gefahr für Leib und Seele und zum anderen die Schwierigkeit für den Arzt und Wissenschaftler, diese unheimlichste aller Krankheiten zu fassen.

Die Bemühungen, den Krebs mit Hilfe immunologischer Mechanismen zu bekämpfen, sind älter als unser Jahrhundert. Seit 80 Jahren blüht die Hoffnung, daß der Durchbruch unmittelbar bevorsteht. Heute sind solche Hoffnungen zwar berechtigter als je zuvor, weil in den letzten 10 Jahren wenigstens die wissenschaftlichen Grundlagen für eine therapeutische Immunstimulierung und Immunpotenzierung erforscht sind. Mit dem Wissen wuchs aber auch die Erkenntnis, daß spektakuläre Erkenntnisse so schnell nicht zu erwarten sind und noch ein weiter mühseliger Weg zurückgelegt werden muß, bis Krebskranken eine heilungsversprechende Immuntherapie angeboten werden kann.

Die heutigen Möglichkeiten der Immuntherapie können bestenfalls andere Therapiemaßnahmen ergänzen. Wie wichtig es ist, jede neue therapeutische Chance zu nutzen, kann man auch aus einigen anderen Faktoren ableiten. Wenn sich heute rund ein Drittel aller

Krebspatienten im Laufe ihrer Erkrankung sog. unkonventionellen Behandlungsverfahren bzw. nicht-ärztlichen Helfern zuwenden, dann muß dies zweifellos als Ausdruck einer Enttäuschung über die Ergebnisse der praktizierten Medizin gedeutet werden. Weiterhin muß man berücksichtigen, daß die Gesamtheilungsraten seit 2 1/2 Jahrzehnten stagnieren. Dies mag zwar auf der Unkenntnis der eigentlichen Krebsursachen beruhen, bei der Bevölkerung herrscht aber die Meinung vor, daß mit der Beseitigung und der Vernichtung des Krebsherdes durch Stahl, Strahl oder Zytostatika nicht immer den Problemen genügend Rechnung getragen wird, zumal ein sog. therapeutischer Erfolg häufig genug nur durch Amputation, Organentfernung, Impotenz, Harninkontinenz, Extremitätenverlust sowie anderen schweren Folgeerscheinungen mit erheblichen somatischen und psychischen Belastungen erkauft werden muß.

Man muß sich die Frage daher vorlegen, ob es noch vertretbar ist, eine Geschwulstentfernung weit im Gesunden wirklich als Heilung anzusehen. Wer wollte denn heute noch ernsthaft den allgemeinen Krankheitscharakter einer Krebskrankheit, bei der die Geschwulst nur Symptom der Krankheit und nicht die Krankheit selbst ist, anzweifeln? In unserer Medizin spielt nach wie vor die Zellulärpathologie eine fundamentale Rolle. Sie stellt quasi die Basis aller Betrachtungen dar. Sie hat ohne Zweifel wichtige Impulse gegeben, dadurch, daß mit ihr bzw. durch sie die Erkennung, Klassifizierung und Katalogisierung der einzelnen Krankheitsgruppen erst ermöglicht wurde. Sie erlaubt, Krankhaftes von Gesundem zu unterscheiden, aber der stetige Wandel, der das Biologische kennzeichnet, wird von der Zellulärpathologie bzw. Histomorphologie nicht erfaßt. Funktionelle Vorgänge wie Informationsübertragungen, quantenbiologisch definierbare Leitfähigkeitsänderungen oder Regulationsphänomene, aber auch immunologische Probleme, finden keinen rechten Platz in der zwar durch Biochemie erweiterten, aber im wesentlichen doch statischen Zellulärpathologie.

In dieser Situation werden Krebspatienten leicht durch Meldungen über neue Wunderdrogen und sensationelle Therapieerfolge verführt, beunruhigt und enttäuscht. Dies müssen wir mit allem Nachdruck ändern, indem wir behutsam mit aller Kritik neue Wege beschreiten.

Einen solchen Weg bot schon immer die Immunologie. Was vor 100 Jahren noch vermutet wurde, weiß man heute als ziemlich sicher. Normalerweise kann der Organismus Krebszellen selbst eliminieren und ein maligner Tumor kann nur entstehen, wenn das körpereigene Überwachungssystem die Krebszellen nicht als solche erkennt oder die erkannten Krebszellen nicht erfolgreich aus dem Körper eliminieren kann. Mit anderen Worten, nur ein geschwächter immuninkompetenter Körper kann krebskrank werden. Die Immuntherapie muß also dieses natürliche Überwachungssystem unterstützen und entsprechend ausgleichen, was eine genaue Kenntnis der für die Tumorzellen verantwortlichen Mechanismen voraussetzt. Vor allem die zelluläre Immunität ist dabei gefordert, Antikörper spielen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle wie die Ergebnisse der Immunkomplexforschung gezeigt haben.

In der ersten Abwehrlinie stehen Makrophagen und die sog. Natural-Killer-Zellen, die im günstigsten Fall Tumorzellen als fremd erkennen und eliminieren. Danach oder daneben tritt das phylogenetisch jüngere und an spezifische Antigene gekoppelte System der T- und B-Lymphozyten ein. Dieses System kann erst dann aktiv werden, wenn eine Tumorzelle den Organismus immunisiert hat. Dazu muß sie tumorspezifische, an der Zelloberfläche liegende Antigene besitzen.

Jedes Antigen besteht aus zwei funktionell verschiedenen Teilen: einer oder mehreren antigenen Determinanten, welche durch Antikörper erkannt werden. Der immunogene Anteil erlaubt eine erfolgreiche Immunisierung. Die Zahl der antigenen Determinanten ist praktisch unbegrenzt, die der Immunogene relativ klein.

Ehe es zur Immunisierung kommt, muß das Antigen durch Makrophagen verarbeitet werden und den T-Lymphozyten angeboten werden. Sind diese voll funktionstüchtig und es besteht das richtige Gleichgewicht zwischen T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen, ist alles in Ordnung. Beim Krebspatienten kann die T-Zellfunktion jedoch infolge einer Involution der Thymusdrüse, durch zirkulierende Immunkomplexe oder durch Antikörper so beeinträchtigt werden, daß die für die Tumorabwehr unerläßliche T-Zell-Immunität fehlt bzw. gestört ist. Aber nicht nur die Störung der vom Thymus gesteuerten T-Zellfunktionen spielt eine Rolle, auch Stahl, Strahl und Zytostatika wirken immunsuppressiv. Die uralte Erkenntnis, daß nur ein

geschwächter Körper krank werden kann, ist schon 1909 von PAUL EHRLICH auf das Krebsproblem übertragen worden, als er sagte: "Abwehrkräfte des Organismus können verhindern, daß einzelne maligne Zellen sich zu einem Tumor entwickeln."

Die Immunpharmakologie, eine relativ junge Forschungseinrichtung, beschäftigt sich seit Jahren mit Substanzen, die aus den unterschiedlichsten Ressourcen gewonnen werden, die an den unterschiedlichsten Stellen des Immunsystems angreifen bzw. eingreifen und den komplexen Vorgang der Tumorabwehr beeinflussen. Die meisten dieser Substanzen werden noch experimentell oder klinisch geprüft. Erst in wenigen Jahren wird mit den ersten "Response-Modifiern in der Onkotherapie" zu rechnen sein.

Eine gewisse Zurückhaltung gegen solche Medikamente, die im weitesten Sinne als Immuntherapeutika gelten, ist angezeigt, damit nicht wie bei Interferon ein großer Enthusiasmus entsteht über ein ungeprüftes Präparat und auch bei Patienten falsche Hoffnungen geweckt werden. Die Prüfungsvoraussetzungen bei einem Immuntherapeutikum sind ähnlich wie für andere Substanzen in der Onkotherapie, z.B. für die Zytostatika. Sie sind aber viel schwieriger, da weder klinisch eine zuverlässige Messung des Immunstatus möglich noch bekannt ist, ob durch Korrektur einiger immunologischer Parameter wirklich das Krebsgeschehen beeinflußt werden kann. Wichtig für die Immuntherapeutika ist neben der exakten Dosierung auch die richtige Applikationsweise und Applikationsfolge.

Als ältestes Verfahren und in vielen Studien geprüft, wenn auch häufig genug lieblos und mangelhaft, ist die BCG-Immunisierung (Bacille-Calmette-Guerin) oder die Applikation des *Corynebacterium parvum*. Sowohl BCG als auch *Corynebacterium parvum* bzw. auch die daraus gewonnenen immunologischen Substanzen bewirken eine Beeinflussung der T-Lymphozyten und Makrophagen. Die Immuntherapie mit BCG schiebt Rezidive hinaus und verlängert eine qualitativ hochwertige Überlebenszeit wie zahllose Studien zeigen konnten (1, 2, 3). Auch akute Leukämien sind von einer positiven Wirkung des BCG nicht ausgenommen. So konnte HARRIS (4) in einer randomisierten Therapiestudie zeigen, daß bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie das rezidivfreie Intervall und die Überlebenszeit der mit BCG und allogenen Leukämiezellen Behandelten doppelt so lange wie in der Gruppe ohne Erhaltungstherapie war.

Der große Durchbruch immunologischer Tumortherapien scheint nach jahrzehntelangen Bemühungen mit dem Interferon gelungen zu sein. Die anfängliche Euphorie fand im klinischen Alltag jedoch schnell ein Ende, als die erwarteten Erfolge in der Krebstherapie ausblieben und die Nebenwirkungsrate des Interferons doch größer als vorhergesehen war. Interferon aktiviert die NK-Zellen, wirkt darüber hinaus aber noch an weiteren Stellen.

In der Virologie ist seit über 30 Jahren bekannt, daß ein Virus in einer Zellkultur, die zuvor mit einer anderen Virusart infiziert wurde, sich nur beschränkt vermehren kann. Dies ist, wie ISAACS und LINDEMANN (8) zeigen konnten, auf das lösliche Protein Interferon zurückzuführen (Abb. 2). Es gibt eine große Anzahl verschiedener Interferontypen, die je nach Herkunftszellen eingeteilt werden in:

Alpha-Interferon, von Leukozyten und hier speziell den O-Lymphozyten unter Virusstimulation gebildet (5).

Beta-Interferon, hauptsächlich von Fibroblasten unter Stimulation mit Viren und Polyribonukleotiden gebildet.

Gamma-Interferon, durch Stimulation von Lymphozyten und Mitogenen oder Antigenen gebildetes Interferon, das früher Immuninterferon genannt wurde.

Neuerdings wird Alpha-Interferon gentechnisch aus *E. coli* gewonnen. Neben der antiviralen Wirkung besitzt Interferon eine wachstumshemmende (= zytostatische) Wirkung, was *in vivo* auch an normalen Zellen der Leber und des lymphatischen Systems nachweisbar war. Der eigentliche Angriffsort der antiproliferativen Wirkung ist bis jetzt nicht im Detail geklärt. Neben der direkten zytostatischen Wirkung besitzt Interferon auch noch eine Reihe anderer immunregulatorischer Wirkungen, die immunsuppressiv und immunstimulatorisch mit spezifischer Aktivierung der NK-Zellen sein können. Die Wirkung auf die immunologisch aktiven Zellen, speziell die Lymphozyten, sind derart komplex und ausgeprägt, daß man Interferon auch als ein Lymphokin bezeichnen könnte.

Tabelle 1: Interferoneinfluß auf Stoffwechselfvorgänge

Interferon wirkt:

Antiviral: hemmt Vermehrung aller Virustypen durch Enzyminduktion in noch nicht infizierten Zellen.

Antiparasitär: hemmt Wachstum von Bakterien (Shigella flexneri), Chlamydien (C. psittacosis, C. trachoma), Rickettsien (R. akari), Protozoen (Plasmodium berghei, Toxoplasma gondii).

Wachstumshemmend: hemmt Zellwachstum, indem es alle Phasen des Zellzyklus verzögert, verlängert besonders G 1 und reduziert den Eintritt von Zellen in die S-Phase. IFN hemmt Histon-m DNA- und Proteinsynthese und die mitogen- und antikörperstimulierte Proliferation von B- und T-Lymphozyten.

Reifungshemmend: verzögert Monozytendifferenzierung zu Makrophagen.

Antiproliferativ: hemmt Tumorzellkoloniebildung in vitro.

Selbstregulierend: durch "priming" und "blocking": erleichtert oder hemmt konzentrationsabhängig weitere IFN-Bildung: autoregulative physiologische Steuerung der Produktion.

Immunsuppressiv: hemmt Antikörperbildung durch unmittelbare Einwirkung auf B-Lymphozyten, hemmt Allergie vom Spättyp, verzögert in hohen Dosen die Abstoßung von Xenotransplantaten. Geringe IFN-Gaben beschleunigen diese jedoch!

Immunstimulierend: steigert Bildung zytotoxischer Effektorzellen (geringe Dosen, Behandlungsdauer: drei bis vier Stunden), aktiviert Makrophagen, steigert Phagozytose, steigert Synthese von Prostaglandin E<sup>^</sup> und IgE-vermittelte Histaminfreisetzung aus Basophilen.

Membranaktivierend: verstärkt die Expression von Histokompatibilitätsantigenen an der Oberfläche von Tumorzellen, T-Lymphozyten und Makrophagen (höhere Dosen, 12 bis 14 Stunden), steigert Bindungsvermögen für Concanavalin A, TSH (Thyreoidea-stimulierendes Hormon) und Cholera-toxin, vermehrt negative Oberflächenladungen der Membran, aktiviert Phospholipasen, verringert den Anteil ungesättigter Fettsäuren in Phospholipiden.

So gut wie alle Tiertumoren werden sowohl in ihrer lokalen Entstehung als auch in ihrer Metastasierung dosisabhängig durch Interferon gehemmt. Es besteht somit eine antitumorale Wirkung durch Interferon. Die antitumorale Wirkung rekrutiert sich direkt aus der antiproliferativen Wirkung, indirekt über die Aktivierung der NK-Zellen des Immunsystems.

Alpha-Interferon hält nach intramuskulärer und intravenöser Applikation lange Serumspiegel mit einem Gipfel nach zwei bis vier Stunden von vier bis sechs Stunden. Es erfolgt nur eine geringe Urin- und Darmausscheidung. Beta-Interferon erreicht demgegenüber nach intramuskulärer Applikation nur geringe Serumspiegel und ist auch durch eine Reihe von Faktoren leicht inaktivierbar. Es ist also für die Interferontherapie ganz entscheidend, um welches Interferon es sich handelt. Alle Interferontypen sind prinzipiell liquorgängig, erreichen hier aber nur 1/10 des Serumspiegels. Generell scheint eine Dosis-Wirk-Beziehung speziell hinsichtlich der antitumorösen Wirkung zu bestehen.

Die wenigen, bisher bei Malignomen mit Interferon durchgeführten Studien erfolgen überwiegend mit dem Alpha-Interferon. Der Interferongehalt der eingesetzten Präparationen lag z.T. weit unter 1 ‰. Die Weltproduktion an Interferon bewegt sich momentan

im Grammbereich. Weltweit sind bisher vielleicht 200 bis 300 Tumorpapienten und vielleicht ebenso viele mit anderen Erkrankungen unter mehr oder weniger kontrollierbaren Bedingungen konsequent mit mehr oder minder verunreinigtem Interferon behandelt worden. Hier zeigt sich bereits die Problematik des zu frühen Einsatzes dieses Immunmodulators in der Klinik.

Eine knappe Übersicht der aussichtsreichen Indikationen für eine Interferontherapie ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Therapieergebnisse einiger Studien bei Malignomen

Tumortyp	Interferon Typ	Remissionen CR	PR	Applikationsform	Autor
Mamma-Carcinom	$\alpha$		7/17	syst.	GUTTERMAN et al.
	$\alpha$		11/26	syst.	BORDEN
Ovarial-Carcinom	$\alpha$	2/4		lokal	IKIC
	$\alpha$		4/7		GUTTERMAN et al.
Zervix-Carcinom	$\alpha$	3/15	3/15	lokal	IKIC
HNO-Plattenepitel-Ca	$\alpha$	10/30		lokal	IKIC
Melanom	$\beta$	3/3		lokal	HOROSZEWICZ et al.
Plasmozytom	$\alpha$	2/4	2/4	syst.	MELLSTEDT et al.
	$\alpha$		3/3		AARE
	$\alpha$	4/8			STRANDER et al.

Eine Interferonkombinationstherapie hat in klinischen Studien gute Ergebnisse bei der Behandlung einiger chronischer Viruserkrankungen gezeigt. Bei malignen Erkrankungen hat Interferon, allein appliziert, bisher keine besseren Ergebnisse gebracht als die heute übliche Chemotherapie. Interferon ist daher weder eine Wunderdroge noch frei von Nebenwirkungen.

STRANDER (6) vom Karolinska-Hospital in Stockholm wählte für die ersten klinischen Versuche mit Interferon 28 Patienten mit noch

nicht metastasiertem Osteosarkom aus und applizierte Alpha-Interferon als adjuvante Therapie nach operativer Behandlung der Patienten. Er errechnete für ein 2,5 Jahresintervall bei 64 % der mit Interferon behandelten Patienten eine Metastasenfreiheit, während sie in einer gleichzeitigen Kontrollgruppe nur 30 % betrug. Nach fünf Jahren Interferontherapie ergab sich ein realer Unterschied von 46 % der behandelten Gruppe gegenüber 30 % in der nicht-behandelten Gruppe.

Beim Mamma-Karzinom wurde in verschiedenen Gruppen bei etwa der Hälfte der Patienten eine partielle Remission erzielt.

Die Ergebnisse der übrigen Malignome stellen nur orientierende Ergebnisse dar und sind wegen niedriger Fallzahlen relativ wenig aussagekräftig. Bemerkenswert sind allerdings die Ergebnisse der lokalen Applikation. IKlC et al. (7) applizierten per lokaler Infiltration konzentriertes, aber wenig gereinigtes Adpha-Interferon lokal und erreichten z.B. für ein gemischtes Kollektiv von HNO-Tumoren 33 % komplette Remissionen (10/30). Ähnlich gut waren die Ergebnisse für das Zervix-Karzinom und das Mamma-Karzinom. HOROSZEWICZ (9) erreichte bei drei behandelten Melanomen drei Remissionen.

Unsere eigenen Erfahrungen mit Alpha-Interferon aus Leukozyten sind begrenzt. Wir behandeln Weichteilsarkome, Melanome, therapieresistente Mamma-Karzinome sowie Zervix-Karzinome. Wir haben eine kombinierte Therapieform gewählt, d.h. Interferon wird sowohl lokal als auch systemisch appliziert. Die durchschnittliche Dosis beträgt 100.000 E /kg. Die bisher von uns registrierten Nebenwirkungen sind Fieberreaktionen, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen und Myalgien, selten Leuko- und Thrombopenien. Die therapeutischen Wirkungen können wir noch nicht abschätzen; daß sie vorhanden sind, läßt sich jedoch auch von uns zeigen.

Interferon hat zweifellos Fortschritte in die Immuntherapie gebracht. Seither ist man verstärkt auf der Suche nach Substanzen, die die körpereigene Interferonsynthese stimulieren, das Abwehrsystem stärken und dabei keine toxischen Nebenwirkungen besitzen. Der Thymus ist das zentrale lymphatische Gewebe, welches die Zellen des Immunsystems kontrolliert. Es ist das entscheidende Organ bei der Etablierung der zellulären Immunität.

Zunächst möchte ich die sog. Thymomimetika vorstellen. Diese Gruppe beinhaltet vor allem das LEVAMISOL (Solaskil und Cital). Es hat neben dem thymomimetischen Effekt auch einen Makrophagen- und NK-Zellen stimulierenden Effekt.

Obwohl LEVAMISOL vielleicht der am besten untersuchte Immunmodulator ist, ist auch hier eine exakte Dosierung und eine exakte Applikationsweise nicht bekannt. Es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, wollte man versuchen, eine komplexe Darstellung dieses Immunmodulators zu geben. Es scheint mir aber gerechtfertigt, auch anhand einer chemisch exakt definierten Substanz aufzuzeigen, was sie in vivo und in vitro bewirkt und wie schwierig es ist, dies in die Klinik umzusetzen.

Tabelle 3: Der Effekt von LEVAMISOL auf die Funktion von Lymphozyten und Phagozyten

Phagozyten		Lymphozyten	
Migrationshemmung	↑	E-Rosetten	↑
Chemotaxis	↑	INS-Proteinsynthese	↑
Phagozytose	↑	Lymphokinproduktion	↑
Zytotoxizität	↑	Suppressoraktivität	↑
		Killer-Aktivität	↑
		Lysosomale Aktivität	↑

Wie Tabelle 3 zu entnehmen, beeinflusst LEVAMISOL praktisch alle Zellfunktionen, die an der zellulären Immunität beteiligt sind. Es ist in der Lage, die Immunfunktion im gestörten Organismus anzuheben, hebt sie aber nicht über die physiologischen Grenzen hinaus, im Gegensatz zu BCG oder Corynebacterium parvum beispielsweise, die eine Steigerung der Immunität bewirken können. LEVAMISOL hat wohl keinen Einfluß auf die B-Lymphozyten und damit auf die Antikörperbildung.

Im Tierexperiment zeigt LEVAMISOL remissionsverlängernde Effekte. Klinische Ergebnisse zeigen eine Verbesserung der Immunreaktion vom verzögerten Typ bei Krebspatienten (10). Darüber hinaus verlängert es die Remissionsdauer und die Überlebenszeit nach Be-

**Strahlung** bei Patienten mit Brustkrebs (11). In einer Kombinationsbehandlung der sog. Chemo-Immun-Therapie beim metastasierenden Mamma-Karzinom konnte gezeigt werden, daß LEVAMISOL genauso aktiv ist wie BCG und sowohl die Remissionsdauer als auch die Überlebenszeit **verlängert** wird (12). Auch beim operablen Bronchus-Karzinom konnte postoperativ ein vorteilhafter Einfluß auf die krankheitsfreie Zeit sowie auf die Fernmetastasen gezeigt werden (13).

Eine jüngste Studie von DAVIS et al. (14) zeigte aber das Gegenteil: eine Verkürzung der mittleren Überlebenszeit bei inoperablen Bronchus-Karzinomen und eine Zunahme der Toxizität. Dies ist ein strenger Hinweis, daß die Immuntherapie erst dann in Betracht zu ziehen ist, wenn die Tumormasse relativ klein ist.

Unsere Erfahrungen mit LEVAMISOL sind gut, da es vor allem die Infektneigung bei Krebspatienten herabsetzt. Dies kann besonders wichtig sein für Patienten mit lympho-proliferativen Systemerkrankungen. Die von uns verwendete Dosis ist 2,5 mg/kg an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in der Woche. Im Gegenteil zu vielen Zytostatika fehlen für LEVAMISOL Phase-I- und Phase-II-Studien, die eine optimale Dosierung sowie Applikationsweise herausgearbeitet hätten und somit legen, daß die vielfältig gemessene Änderung im immunologischen Verhalten von Patienten tatsächlich etwas mit der Krankheitsbeeinflussung zu tun hat und nicht nur eine Immun-Kosmetik darstellt.

Die Thymusdrüse steuert und überwacht die gesamte Immunabwehr. Unter Thymuseinfluß reifen Lymphozyten zu immunkompetenten T-Lymphozyten, Suppressor-Lymphozyten und Killer-Zellen. Sämtliche Lymphozyten Subpopulationen spielen eine wichtige Rolle nicht nur bei der Immunabwehr, sondern auch bei der Regulation überschießen der Immunreaktionen (Allergien, Autoaggressionskrankheiten etc.) und möglicherweise auch bei genetisch-adaptiven Regulationsvorgängen in der Onkologie und Gerontologie (19).

Der Thymus sezerniert verschiedene Polypeptide. Bisher wurden biochemisch charakterisiert alpha-1-Thymosin, Thymopoietin, FTS (Serum-Thymus-Faktor). Bis auf FTS lassen sich alle Hormone in dem standardisierten Extrakt Thymosin-Faktor Nr. 5 nachweisen. Isoelektrisch fokussiert enthält Thymosin-Faktor 5 mehr als 30 Poly-

peptid-Banden.

Die Applikation von Thymushormonen kann Defekte der Thymusfunktion korrigieren. Thymosin verbessert einige Parameter zellulärer Immunität. Es erhöht die Anzahl der T-Lymphozyten und verbessert die Hauttests vom verzögerten Typ.

In einer Phase-I-Studie haben wir mit einem standardisierten Thymus-Extrakt (NEY-THYMUN Nr. 29 K), welches u.a. alpha-1-Thymosin enthält, das Verhalten von Haut-Test-Ergebnissen bei Krebspatienten geprüft.

Wir benutzten dazu einen käuflichen Haut-Test mit sieben Antigenen (Multi-Test IMC). Das Ergebnis wurde nach 24 und 48 Stunden abgelesen. Als positives Testergebnis wurde gewertet, wenn die Hautrötung bzw. Induration, 5 x 5 mm betrug.

Tabelle 4: Entwicklung neuer positiver Hauttests

Antigen	Tage			
	0	7	14	21
Proteus	1			
Trichophylin	1		1	1
Tuberkulin	5			
Streptokokken	3		2	1
Candida	3		1	2
Diphtherie	6		1	1
Tetanus	5			2
=	24		5	7

12 "neue" positive Hauttests (> 5 x 5 mm) wurden registriert.

Vor der Behandlung mit dem Thymusextrakt (Phase-I) hatten 12 Patienten 24 positive Testergebnisse mit dem sog. Recall-Antigen (Tab. 4). Nach einer Applikation von 15 Injektionen mit 15 mg standardisiertem Thymusextrakt (NEY-TUMORIN K) entwickelten sich nach 14 Tagen 5, nach 21 Tagen 7 neue positive Tests.

Hieraus ergibt sich, daß wir in einer Phase-I-Studie zeigen kann-

ten, daß ein standardisierter Thymus-Extrakt zu einer Verbesserung der Zell-Irnmunität bei Krebskranken führt, ablesbar an der Zunahme positiver Hauttests.

Hinsichtlich der Krankheitsbeeinflussung können wir derzeit noch keine Aussage machen. Wesentliche toxische Nebenwirkungen konnten wir nicht beobachten.

Alpha-1-Thymosin kann synthetisch hergestellt werden, steht aber noch nicht allgemein zur Verfügung. Man ist somit vorläufig auf standardisierte Gesamtextrakte angewiesen. Die bisher vorliegenden klinischen Ergebnisse sind noch nicht ausreichend, um eine endgültige Beurteilung der Thymustherapie vornehmen zu können. Es fehlen vor allem Studien zur Dosis-Findung. Dies ist ganz besonders wichtig, da ja je nach Herstellung bzw. Gewinnung durchaus unterschiedliche Effekte zu erwarten sind.

So konnte beispielsweise von PATT et al. (1) gezeigt werden, daß Thymosin in niedriger Dosierung von 4 mg/qm einen günstigeren Effekt auf den Tumorverlauf aufweist, als in der Dosierung von 40 mg/qm. Hieraus darf man vorsichtig schließen, daß es in der Immuntherapie entscheidend wichtig ist, die optimale Dosis zu finden, denn in der Immuntherapie gilt wie nirgends anders: "Auf die Dosis kommt es an".

Durch intensive Forschungsarbeit der letzten Jahre konnte eine tumorwachstumshemmende Wirkung verschiedener xenogener Organpräparationen auf breiter Basis von den verschiedensten Arbeitsgruppen in vivo und in vitro experimentell bestätigt und reproduziert werden (20). Das in dieser Hinsicht meist verwendete Präparat ist das NEY-TUMORIN Nr. 66, ein Mischpräparat aus Thymus, Leber, Plazenta und anderen Organfaktoren. MUNDER et al. (20) konnten zeigen, daß hiermit in vivo und in vitro Tumorzellen gehemmt werden, normale Zellen jedoch nicht. Bei der Verwendung xenogener Organlysate muß also davon ausgegangen werden, daß sie auf zweifache Weise wirken, einmal direkt zytostatisch auf Tumorzellen und indirekt über eine Immunmodulation. Der genaue Mechanismus und die jüngsten Forschungsergebnisse wurden bzw. werden an anderer Stelle mitgeteilt.

Wir haben mit NEY-TUMORIN seit ca. zwei Jahren Erfahrungen gesammelt. Der Einsatz erfolgte jedoch nur im Rahmen klinischer Studien.

Unsere Bemühungen galten dabei von Anfang an zunächst erst einmal, die richtige Dosierung und dann die richtige Applikationsweise zu wählen. Wir haben NEY-TUMORIN verwendet in der systemischen Applikationsweise, i.v. oder i.m., aber wir haben es auch in Körperhöhlen eingebracht und direkt intratumoral appliziert oder auch rektal gegeben. Wesentliche toxische Nebenwirkungen konnten wir nicht sehen. Weder Blutbildveränderungen noch Organveränderungen noch allergische Reaktionen konnten festgestellt werden. Behandelt haben wir verschiedene solide Tumoren und Systemerkrankungen.

Tabelle 5: Bisher mit NEY-TUMORIN N behandelte Tumoren

Typ	Anzahl
Colon-Carcinom	21
Magen-Carcinom	6
Bronchus-Carcinom	11
Hypernephrom	4
HNO-Tumoren	4
Non-Hodgkin-Lymphome	5
Plasmozytom	8
Mamma-Carcinom	21

Als Dosierung haben wir das in Tabelle 6 angegebene Schema zugrunde gelegt. Neben fehlenden toxischen Nebenwirkungen wurde von den Patienten häufig eine subjektive Besserung angegeben, die sich vor allem in der Verbesserung vegetativer Funktionen äußerte.

Tabelle 6: NEY-TUMORIN in der ambulanten Behandlung

1. Tag	2 Amp. NEY-TUMORIN Dil. St. I s.c., i.m. oder i.v. (nach Vortestung mit 1 Amp. i.c./s.c.)
2. Tag	3 Amp. NEY-TUMORIN Dil. St. I s.c., i.m. oder i.v.
3. Tag	3 Amp. NEY-TUMORIN Dil. St.II s.c., i.m. oder i.v.
4. Tag	3 Amp. NEY-TUMORIN Dil. St.II s.c., i.m. oder i.v.
5. Tag	3 Amp. NEY-TUMORIN Dil. St.III s.c., i.m. oder i.v.
8. Tag	1 Amp. NEY-TUMORIN T i.m.
11. Tag	2 Amp. NEY-TUMORIN T i.m.
15. Tag	2 Amp. NEY-TUMORIN T i.m.
19. Tag	2 Amp. NEY-TUMORIN T i.m.

Objektiv angesprochen haben vor allem Hypernephrome, Non-Hodgkin-Lymphome und Plasmozytome. Viele dieser Patienten waren bereits ausgiebigst vorbehandelt, z.T. bis zur Erschöpfung der Knochenmarksreserve. Sie lebten z.T. mit minderer Lebensqualität. Unter der Therapie mit Organlysaten besserte sich diese auffällig. Nach den ermutigenden Therapieergebnissen ist jetzt der Augenblick gekommen, eine systematische klinische Prüfung vorzunehmen, die folgende Fragen klärt:

1. Was ist die optimale Dosis?
2. Welche Malignome sprechen an?
3. Mit welcher Toxizität ist zu rechnen?
4. Mit welcher Chemotherapie lassen sich die Organlysate kombinieren und welche Wirkung zeigen sie dabei?
5. Ist die Chemoimmuntherapie oder die Immunchemotherapie der Monotherapie überlegen?

#### Literatur

1. SOKLA, J.E. et al., Cancer 24, 128 (1969)
2. GUTTERMAN, J.U. et al., Lancet 2, 1208 (1973)
3. MORTON, D.L. et al., Amm. Aurg. 180, 635 (1974)
4. HARRIS, R., Oncology
5. PETER, H.H. et al., Europ. J. Immunol. 10, 547 (1980)
6. STRANDER, H. et al., Blut 25, 277 (1977)
7. IKIC, D. et al., Lancet 1025 (1981)
8. ISAACS, A. et al., Proc. Roy. Soc. London B 147, 258 (1957)
9. HOROSZEWICZ, J.S. et al., Cancer Treatm. Rep. 62, 1899 (1978)
10. SYMOCUS, J. et al., J. Reticuloendothel. Soc. 2A, 178 (1977)
11. ROJAS, A.F. et al., Lancet 2 211 (1977)
12. HORTOBAHYI, J.U. et al., Am. Soc. Clin. Oncol. V7, 275 # C-155 (Abstr.), (1976)
13. AMERY, W.K. et al., Cancer Treat. Rep. 4, 167 (1977)
14. DAVIS, St. et al., Cancer 50, 646 (1980)
15. TALLBERG, Th. et al.,
16. GOLDSTEIN, A.L. et al., Ed. M.A. Chirigos, Raven Press, New York (1978)

17. THEURER, K. et al., Krebsgeschehen 4
18. MUNDER, P.G. et al., Onkologie

#### Diskussion

Frau KAUB: Einige unserer mit Interferon behandelten Patienten bekamen allergische Reaktionen, die sich in Form von Fieber und kurzem Schüttelfrost äußerten, aber durch Gaben von Antihistaminika beherrscht werden konnten. Wir haben deshalb wieder weiterspritzt.

F.R. DOUWES: Unsere Erfahrungen mit dem Interferon sind noch nicht sehr alt, da es ja zunächst schwierig war, Interferon zu bekommen. Wir haben aber nun ausreichende Mengen zur Verfügung. Wir behandeln derzeit ca. zehn Patienten in einer Pilotstudie. Nebenwirkungen, wie Sie sie beschrieben haben, wurden von uns bisher nicht beobachtet. Bei lokaler Applikation haben wir deutliche Tumorrückgänge registrieren können. Beispielsweise haben wir ein Fibromyxosarkom, das schon riesige Ausmaße am Oberschenkel hatte, durch lokale Applikation vollständig einschmelzen können, während die Lungenmetastasen bei dem Patienten gewachsen sind. Wir schließen daraus, daß die systemische Wirkung des Interferons bei diesem Tumortyp nicht ausreichend ist. Bei anderen Tumoren, die wir systemisch behandelt haben, haben wir bisher keine Tumorbeeinflussung gesehen.

Frau KAUB: Durch die Presse ging kürzlich die Mitteilung, Interferon führt zu Knochenkrebsen. Es gibt in Amerika einige Hinweise, daß Knochenkrebs als Spätfolge einer Interferontherapie auftreten. Wie sind Ihre Erfahrungen? Die Patienten wurden durch die Pressemeldung natürlich verunsichert. Ich mußte beispielsweise die Behandlung von Patienten, die unter Interferon standen, abbrechen. Auch die Tumorklinik in Köln, die begonnen hatte, einen Melanompatienten mit Interferon zu behandeln, hat alles wieder ad acta gelegt.

F.R. DOUWES: Nahezu jede Therapie kann Nebenwirkungen haben, das sind wir von der Zytostatikatherapie längst gewöhnt.

Frau KAUB: Wie steht es mit der möglichen Allergisierung durch NEY-TUMORIN?

K.E. THEURER: Das ist eine Frage der Dosierung. Ich hatte schon im letzten Jahr auf die immunologisch tolerogene Dosierung hingewiesen. Diese Ausführungen sind im Tagungsbericht <sup>1)</sup> als auch im neu gedruckten Kongreßband <sup>2)</sup> vom Enke-Verlag veröffentlicht.

Jeder biologische Stoff, den man in den Organismus einbringt, kann sich mit Eiweiß oder einem anderen Antigen oder Hapten konjugieren. Wenn Sie diesen Stoff nicht tolerogen dosieren, ist es durchaus möglich, daß immunologische Gegenreaktionen ausgelöst werden. Man kann dies etwa mit einer immunopathogenen Autoaggression vergleichen, die durch einen Toleranzbruch gegen körpereigenes Gewebe zustande kommt, infolge von Konjugation zwischen Arzneimitteln und körpereigenen Faktoren. Abhängig von der Dosierung kann ein Stoff - und das sagen auch die Homöopathen - stimulieren oder hemmen. Das ARNDT-SCHULZsche Gesetz der Dosierung könnte auch hier eine Rolle spielen, obwohl man das natürlich nicht verallgemeinern darf.

Nun zur Frage der Allergie: Verlängert man die Zeitintervalle zwischen größeren Antigendosen, dann kann die Immuntoleranz beeinträchtigt werden. Die von uns empfohlene immunologisch tolerogene Dosierung gewährleistet die volle Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit von NEY-TUMORIN. Zur Aufrechterhaltung der einmal erworbenen Toleranz müssen die Trockensubstanzen in Intervallen von nicht länger als drei Tagen fortlaufend appliziert werden. Bei einer Verlängerung der Intervalle oder einer Wiederholung der Therapie ist eine erneute immunologisch-tolerogene Vorbehandlung mit NEY-TUMORIN-Dilutionen erforderlich. Reaktionen sind bei allen immunologisch wirksamen Substanzen möglich, sofern die Dosis und die Zeitintervalle nicht beachtet werden. Wir verweisen deshalb

3)

auch im Leitfaden darauf, daß die Gesichtspunkte der Allergologie und Immunologie berücksichtigt werden müssen.

Bei Krebspatienten kommt allerdings noch eine andere Komponente hinzu. Krebspatienten lassen sich oft polypragmatisch mit den verschiedensten Methoden behandeln. Beispielsweise konnte es bei gleichzeitiger Enzymtherapie, Zellulärtherapie oder anderen Faktoren durchaus zu Interferenzen kommen. Es sollte deshalb immer die jeweils vorliegende Situation analysiert werden.

- 1) "Die Zytoplasmatische Therapie und die Methoden der Serum-Desensibilisierung: Überwindung einseitiger Denkkategorien", Tagungsbericht; Acta medica empirica 31, 318 (1982)
- 2) THEURER, K.E. u. THEURER, K.G.: "Immunologisch tolerogene, intravenöse Anwendung von xenogenen makromolekularen Organextrakten bei chronischen Erkrankungen und Leiden", in: Organo- und Immunotherapie als neue Denkweise in der Medizin, S. 56-64, Enke-Verlag Stuttgart (1982).
- 3) Leitfaden "25 Jahre Zytoplasmatische Therapie", Hrsg. vitOrgan Arzneimittel GmbH, 7302 Ostfildern 1 (1981).

Nun wird heute die Immunabwehr in der Onkologie - und das ist meine ganz persönliche Meinung - etwas überbewertet. Immunstimulation kann nur ganz wenig die Immunreaktion verstärken. Noch wichtiger ist wohl die molekulare Beeinflussung. Man sollte deshalb einen übergeordneten Begriff schaffen. Dieser müßte zusätzlich die Normalisierung der Synthesevorgänge wie die der Zellproliferation einschließen und dürfte am besten durch die Stimulierung der "adaptiven Anpassungsvorgänge" charakterisiert sein. Störungen auf dieser Ebene sind möglicherweise die Basis für eine Tumorentwicklung, wenn der Organismus und die Zellen nicht mehr in der Lage sind, mutagene Veränderungen der genetischen Regulation zu korrigieren.

Voraussetzung für eine Antikörperbildung ist zunächst die Vermehrung der Plasmazellen. Die Immunreaktion besteht eben nicht nur in der Antikörpersynthese, sondern primär in der Zellproliferation. Nicht anders verhält es sich bei Regulationsfaktoren des Wachstums von Normalzellen zu Tumorzellen. Auch hier wäre dieser Oberbegriff von Vorteil, weil er sowohl zellproliferative als auch molekulare Regulationsmechanismen in sich einschließen würde.

Herr SCHULTE: Mitte Oktober findet in Lenggrieß der Internationale Thymuskongreß statt. Ich habe angeregt, daß dort auch über die NEYTHYMUN-Therapie im Vergleich zur Thymus-Gesamtextrakt-Therapie gesprochen und diskutiert werden soll. Ist nun Ihre Thymustherapie eine Verbesserung oder ein Ersatz für die THX- bzw. Thymus-Gesamtextrakt-Therapie? Gibt es eine Kombinationsmöglichkeit?

K.E. THEURER: Unsere Therapie unterscheidet sich durch drei Dinge von anderen Thymuspräparaten:

1. durch das besondere patentierte Herstellungsverfahren. Unsere Präparate sind sulfatiert und verfügen über eine bessere Löslichkeit.
2. Unsere Thymus-Präparate sind immunologisch dosierbar. Kein anderes organotherapeutisches und schon gar nicht zellulartherapeutisches Präparat kann immunologisch dosiert und zur Desensibilisierung verwendet werden.
3. Wir haben drei verschiedene Thymusspezialitäten: den foetalen Thymus, den jugendlichen Thymus und eine Kombination beider Wirkprinzipien. Innerhalb der handelsüblichen Thymuspräparate gibt es sonst nur den jugendlichen Thymus. Dadurch haben wir eine wesentlich höhere, auf die jeweilige Krankheits-Symptomatik abstimmbare Differenzierungsmöglichkeit, als bei anderen Thymustherapien.

Thymus steht übrigens bereits seit fast 30 Jahren auf unserem Herstellungsprogramm. Es ist also nicht so, daß wir auf dem Gebiet der Thymus-Forschung jetzt auf Erfahrungen von anderer Seite zurückgreifen müssen. In NEYTHYMUN Nr. 29k

ließen sich erstmals wirksame Faktoren wie Thymosin-alpha-1, Thymopoietin u.a.  
 1)

nachweisen .

Die besondere Herstellung, die Sulfatierung, führt auch zu einer Sterilisation gegen Viren. Diesem "Nebeneffekt" unseres Herstellungsverfahrens kommt entscheidende Bedeutung zu. Bei jeder Organotherapie besteht nämlich die Gefahr einer Übertragung von Viren. A. MAYR hat schon vor Jahren auf diese Gefahr hingewiesen. Wir haben in ausgedehnten Untersuchungen überprüfen lassen, daß das Herstellungsverfahren der Firma vitOrgan verschiedene Virusarten inaktiviert. Diese Inaktivierung wird nun nicht durch einen denaturierenden Einfluß erkauft. Die Organsubstanzen bleiben biologisch voll wirksam, was sich an der Beeinflussung von Zellkulturen zeigen läßt.

Herr MANFREDA: Herr DOUWES, Sie haben bislang weit über 50 Patienten mit NEY-TUMORIN intramuskulär behandelt. Welche Remissionsraten haben Sie erzielt?

F.R. DOUWES: Wir haben NEY-TUMORIN zunächst einmal in einer klassischen Phase-I-Studie eingesetzt, um uns einen Eindruck über die Toxizität, die Nebenwirkungen und die Verträglichkeit zu verschaffen. Daneben haben wir natürlich auch registriert, welche Tumoren auf NEY-TUMORIN ansprechen. Besonders bei den Plasmozytomen hatten wir erstaunlich gute Ergebnisse. Beispielsweise haben wir bei einem Patienten mit einem Plasmozytom, der mit den derzeit gängigsten Polychemotherapieschemata völlig austherapiert war und bei dem ausgedehnte osteolytische Prozesse im gesamten Skelettsystem nachweisbar waren, bei dem eine Knochenmarksinsuffizienz aufgrund der starken Plasmazellinfiltration aber auch durch die stattgehabte Chemotherapie auftrat, mit NEY-TUMORIN behandelt. Hierunter hat sich das Knochenmark erholt. Die Blutwerte befinden sich im Normbereich. Das Skelettsystem hat sich vollständig rekalzifiziert. Die Gesamteiweißwerte sind in den Normbereich gekehrt. Das pathologisch erhöhte IGG zeigt eine deutlich abfallende Tendenz. Insgesamt haben wir bisher acht Plasmozytompatienten behandelt. Alle haben unter NEY-TUMORIN eine deutliche Besserung erfahren. Es ist jedoch noch zu früh, eine endgültige Beurteilung vorzunehmen, da insbesondere die Knochenmarksuntersuchungen in den meisten Fällen noch ausstehen. Weiterhin haben wir bei einem Patienten mit Hypernephrom, der ebenfalls nicht mehr mit Zytostatika und Hormonen zu behandeln war, mit NEY-TUMORIN behandelt. Eine Metastase im Bereich des linken Lungenoberlappens hat sich hierunter voll-

1) BIRR, C.: "Die Bedeutung von Thymushormonen in der immunologischen Regulation", in: "Organo- und Immunotherapie als neue Denkweise in der Medizin" S. 47-55, Enke-Verlag Stuttgart (1982)

ständig zurückgebildet. Hinweise für Tumoraktivitäten bestehen nicht mehr. Auch Patienten mit Colon-Karzinom haben wir mit NEY-TUMORIN behandelt. Auch hier ist es zu einer Verbesserung der Befindlichkeit der Patienten gekommen. Eine sichere Tumorbeeinflussung haben wir aber bisher noch nicht gesehen.

Herr MANFREDA: Warum haben Sie vorwiegend chemotherapeutisch austerapierte Patienten behandelt?

F.R. DOUWES: Im wesentlichen ging es uns darum, praktisch eine Phase-I-Studie durchzuführen. Die Phase-II-Studie, die Sie ansprechen, führen wir als nächstes durch.

AUDITORIUM: Kann man das NEY-TUMORIN bei Peritonealkarzinose intraabdominell geben? Liegen hier schon Erfahrungen vor?

F.R. DOUWES: Wir haben NEY-TUMORIN zwar schon in Körperhöhlen eingebracht, aber für diesen speziellen Fall haben wir noch keine Erfahrungen sammeln können.

K.E. THEURER: In anderen Kliniken, beispielsweise an dem Kreiskrankenhaus in Böblingen, werden derartige Anwendungen durchgeführt.

Anwendung zytoplasmatischer Substanzen bei Tumorpatienten  
in der Praxis.

R. WALTER, Frankfurt und W. KÖSTLER, Wien

Übersichtsreferat, zusammengestellt von:

H. KRAFT, München

WALTER berichtet über Verlaufsbeobachtungen bei 50 Patienten, bei denen NEYTUMORIN und NEYTHYMUN sowie andere Naturheilverfahren (Naturextrakt von Schöbe; ISCADOR, Arlesheim; Ozon; Ultrakurzwelle) und Diät eingesetzt wurden. Es handelte sich durchweg um inoperable metastasierende Tumorfälle. Eine hohe Eosinophilie im peripheren Blut wird als positive Reaktion des Patienten bewertet. Eine ganze Reihe schwerer Tumorfälle wird demonstriert. Vor allem sind es Magen- und Dickdarmkarzinome und Lebermetastasen. NEYTUMORIN wird nach bekanntem Schema 40-60 mal verabreicht und in das sog. Vierfachschemata (Thymus, ISCADOR, NEYTUMORIN und Ozon) eingereicht. Den Patienten wird Erleichterung verschafft und in vielen Fällen verbessern sich die Laborwerte und Endoskopiebefunde wesentlich.

KÖSTLER meint, wenn man die Unzahl karzinogener Substanzen und ihre vielfältigen Möglichkeiten betrachtet, wie sie unseren Organismus beeinflussen können, dann erkennt man, daß es keinesfalls möglich sein dürfte, ohne eine umfassende vielschichtige Tumorthherapie erfolgreich zu sein. Das oberste Prinzip einer (menschbezogenen) biologischen Therapie liegt im "PRIMUM NIL NOCERE", sie stellt sich umfangreicher und ganzheitlicher dar, als die konventionelle Therapie

Unterschied zwischen konventioneller und biologischer Therapie:

Konventionelle Therapie beruht auf lokalistischem Denken, ist allgemein zytotoxisch, destruktiv und immunsuppressiv.

Biologische Therapie erfolgt aus ganzheitsmedizinischen Gesichtspunkten, selektiv zytotoxisch, reparativ und immunstimulierend.

Es wird zweischichtig vorgegangen, da nur nach exakter Milieukorrektur eine erfolgreiche und dauerhafte Geschwulstzerstörung als möglich erachtet werden kann.

Milieukorrektur durch: Herdsanierung - Darmsanierung - Symbioselenkung - Kostumstellung - Substitution - Kreislauftraining.  
 Geschwulstzerstörung durch: Immunstimulierung - Korrektur der DNS-Expression - zytostatisch selektive Wirkung - Ausbreitungshemmung - Enzymtherapie.

Stufenplan der Therapie:

1. Eingangsgespräch
2. Befundsichtung - Befunderhebung
3. Herdsuche - Herdsanierung
4. Darmsanierung
5. Symbioselenkung
6. Präoperative Maßnahmen
7. Geschwulsttherapie
8. Operation
9. Postoperative Immunstimulierung
10. Verlaufskontrolle
11. Wiederholungstherapie
12. Erhaltungstherapie

Multifaktorielle Krebstherapie:

	Revitorgan-Präparate
1. Inhibition von Tumorzellen, Stimulierung der körpereigenen Interferonsynthese	Leber Thymus J Placenta M
2. Stimulierung der Immunabwehr	Knochenmark Nabelstrang Milz
3. Harmonisierung des Stoffwechsels	Pankreas Ren Pulmo Magenschleimhaut
4. Normalisierung endokriner und vegetativer Dysregulation	Schilddrüse Epiphyse Zwischenhirn

Begonnen wird bei der Geschwulsttherapie mit der einwöchigen täglichen Verabreichung von NEYTUMORIN (s.k. in steigender Dosis). Dann folgt eine Injektion von Trockensubstanz Dil.Nr. 1 (Leber) mit einer Ampulle SYNACTON Depot intragluteal. Meist bessert sich danach rapide der Allgemeinzustand des Patienten. In der zweiten Behandlungswoche wird Dil. Nr. 70 (Plazenta matern.) Stärke II, jeweils insgesamt 5 mal i.m. verabreicht. Ab der dritten Behandlungswoche erfolgt die Behandlung mit NEYTUMORIN nach folgendem Schema:

1. Tag 2 Amp. Dil. St. I s.k. oder i.m. oder i.V. (nach Vortestung i.k./s.k.)
2. Tag 3 "
3. Tag 3 " " II
4. Tag wie 3. Tag
5. Tag wie 3. Tag III "
8. Tag 1 Amp. Trockensubstanz i.m., dann im Abstand von 3 bzw. 4 Tagen  
je 2 Amp. Trockensubstanz i.m.

Zusätzlich NEYTUMORIN-Lingual 3 mal täglich 8-10 Tropfen.

Zur Aufrechterhaltung der erworbenen Toleranz müssen die Trockensubstanzen in Intervallen von nicht länger als 3-4 Tagen fortlaufend appliziert werden, anderenfalls ist eine erneute Vorbehandlung mit Dilutionen notwendig.

Zur Dauerbehandlung wird nun auch jeweils 1 Amp. NEYTUMORIN T-löslich i.v. oder zur Infusion 2 mal wöchentlich verwendet. Wiederholung des Behandlungsschemas bei Bedarf oder mit Pausen von 1-6 Monaten. Nebenwirkungen treten bei Beachtung der Dosierungsrichtlinien nur in Einzelfällen bei allergisch disponierten Patienten ganz selten als Übelkeit, Pulsbeschleunigung und Oppressionsgefühle auf. Die Dosierung sollte dann um ein oder zwei Konzentrationsstufen zurückgenommen und nach Verschwinden der Symptome erneut gesteigert werden.

Daneben läuft die Basistherapie nach LINDENMANN ("Die Stellung der makromolekularen Organotherapie in der Onkologie", Kassenarzt 12/1980). Auf einige Schwerpunkte der Therapie ist besonders hinzuweisen. Ein besonderer Stellenwert muß den präoperativen Maßnahmen zugeordnet werden. Dazu gehört auch eine Anregung der Entgiftungsmechanismen (Leber, Niere) durch Verabreichung von Thymus, eine kontrollierte Symbioselenkung, Vitaminszufuhr und eine Korrektur des Ernährungszustandes. Weiter hat sich die mehrmalige Injektion von Carbonylgruppen SSR-Ampullen, welche in vielfacher Weise regulierend in den Zellstoffwechsel eingreifen, als sehr wichtig und wirkungsvoll erwiesen.

Für die genannte Therapie kommen folgende Patientengruppen in Frage:

1. Menschen, die von Haus aus eine biologische Tumorthherapie wünschen.
2. Menschen, die aus der konventionellen Tumorthherapie ausgestiegen sind.
3. Menschen, die von Tumorzentren als ausbehandelt, aber nicht geheilt entlassen wurden.

Eine resümierende Kasuistik zeigt auf, daß diese Therapie bei allen Tumorerkrankungen wirksam wird. Der Patient beginnt, sich bald nach Therapiebeginn wohler zu fühlen und gewinnt wiederum an Lebensqualität. Des weiteren kommt es zu einer sichtbaren Verbesserung der Laborwerte und der Tumorparameter (Tumormarker), in einigen Fällen tritt für längere Zeit der Zustand des "no change" ein, das heißt, es kommt zu keiner weiteren Tumorvergrößerung und in anderen Fällen war das Verschwinden der Tumorkrankheit und des Tumors festzustellen. In den Fällen, wo bereits zu Therapiebeginn der "Point of no return" überschritten war, das ist der Zeitpunkt, wo der Patient an einer Tumorkachexie litt oder eine generalisierte Metastasierung vorlag, kam es zu einer kurzfristigen Schmerzlinderung und Lebensverlängerung.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß die auf diese Weise durchgeführte Behandlung in den Ergebnissen der konventionellen Therapie gleichwertig, wenn nicht in vielen Fällen sogar überlegen zu sein scheint. Sie stellt für den Patienten keine Belastung dar und ist auch bei bereits aussichtslosen Fällen noch sinnvoll, da sie erfahrungsgemäß ein schmerzloseres und besseres Ende anzubieten hat, und der Zustand körperlichen Wohlbefindens möglichst lange aufrecht erhalten werden kann.

Multifaktorielle Krebstherapie mit hochmolekularen  
Organextrakten und tumortropen  
Antikörperfragmenten\*

K. E. THEURER  
Firma vitOrgan  
Ostfildern

Die moderne Medizin ist gekennzeichnet durch Rationalismus und Pragmatismus. Von einer Therapie möchte man nicht nur wissen, daß sie wirkt, sondern auch, wie sie wirkt. Erst dann ist es möglich, optimal zu behandeln und gegebenenfalls die Therapie systematisch weiterzuentwickeln und zu verbessern. Eine rationale Therapie wird erst möglich, wenn man die Mechanismen der Krankheitsentstehung kennt. Es wurde behauptet, daß wenigstens 90% unseres Wissens auf diesem Gebiet noch keine 20 Jahre alt sind. Die klassischen Denkweisen der Humoral-, Zellular- und Neuraipathologie lassen sich nun in einer Molekularpathologie und einer daraus resultierenden Therapie vereinen.

Auch die Therapie mit hochmolekularen Organextrakten muß unter diesen Gesichtspunkten betrachtet werden. Dazu ist eine Faktorenanalyse der Krankheitsentstehung ebenso notwendig wie eine Analyse der möglichen Wirkungsmechanismen der Therapie. Ich möchte hier beide einander gegenüberstellen und nur auf wenige Details näher eingehen.

Möglichkeiten für die Krebsentstehung

- A. Ontogenetische, angeborene Defekte und Disposition zum Krebs:
- a) genetische und chromosomale Abweichungen - Defekte am Regulations- und Synthesemechanismus der Krebszelle;
  - b) vegetative, neurale und endokrine Fehlsteuerungen.

\* Die programmatische und richtungsweisende Bedeutung dieser Arbeit für die Onkologie veranlaßt den Nachdruck. Erstabdruck: Physikalische Medizin und Rehabilitation 12/6, 127-130 (1971)

- B. Altersveränderungen an den Synthesemechanismen durch fehlerhafte Mitosen und Fehler bei der Informationsübertragung.
- C. Erworbene Defekte am Syntheseapparat oder Derepression von Strukturgenen, deren Funktionen autonom sind, und nicht **adäquat** der jeweiligen Lebensphase oder Verlust von Funktionen infolge kanzerogener Noxen:
  - a) chemisch
  - b) physikalisch
  - c) durch Atmungs-, Ernährungs und Elektrolytschäden.
- D. Erworbene Transformation am genetischen Apparat durch Virusinfektion.

In einem Aufsatz über "Krebstherapie mit Deziduaextrakten auf der Basis der Erkenntnisse der experimentellen Genetik" hatte ich 1965 in "Medizinische Klinik" Nr. 47 die Vermutung geäußert, daß beim Krebs ein Defekt an übergeordneten genetischen Regulationsmechanismen vorliegen könnte. Unterscheidungsmerkmale des Krebses gegen Normalzellen, wie unregelmäßige, amitotische Zellteilungen, Veränderungen der Kern-Plasma-Relation, Verlust der Kontakthemmung bei der Zellvermehrung und Unregelmäßigkeiten im korrelativen Wachstum, die aerobe Glycolyse, eine ektopische Hormonbildung, z.B. in Lungentumoren, Synthese von Hypophysen- und anderen Hormonen, und das Wiederauftreten fetaler Proteine aus Darmschleimhaut und Leber, können Anzeichen dafür sein, daß Strukturgene wieder aktiv werden, die in früheren Entwicklungsstadien des Individuums in Funktion waren und dann genetisch unterdrückt wurden. Nobelpreisträger WALDENSTRÖM vertrat 1969 bei einem Symposium der Behringwerke ebenfalls diese Ansicht. Er meint: Die Möglichkeit, daß in der karzinomatös entarteten Zelle schlummernde Matrizen durch 'Derepression' geweckt werden, sei nicht von der Hand zu weisen.

Ein Versuch von GURDON in Oxford beleuchtet die Omnipotenz jedes Zellkerns und die Wahrscheinlichkeit, daß Faktoren des Zytoplasmas des Eies das Genom einer somatischen Zelle 'erwecken' können. Aus der Eizelle des Frosches *Xenopus* wurde der Zellkern entfernt und durch einen anderen Kern aus differenzierten Intestinalzellen ersetzt. Einige der so manipulierten Eizellen entwickelten sich dann normal zu geschlechtsreifen Fröschen.

Für die Krebsentstehung bietet sich nun die Hypothese an, daß ein

kanzerisierendes Agens ebenfalls Faktoren des Zellkerns in Funktion setzen kann, die zu der gegebenen Zeit unterdrückt sein mußten. Diesen Mechanismus einer 'Derepression' hält WALDENSTRÖM bei der Antikörpersynthese für zweckmäßig. Er vermutet, daß die Antikörpersynthese durch die Einwirkung eines Antigens auf das Genom in Gang gesetzt wird, wobei die Information zur Antikörperbildung im Genom festgelegt ist. Die Krebsentstehung wäre also, teleologisch betrachtet, eine Fehlfunktion eines an sich lebenswichtigen Mechanismus.

Auch die 'Krebsentstehung durch Viren' läßt sich mit dieser Hypothese in Einklang bringen. Durch onkogene Viren, die in gesunde Zellen eindringen, kann etwas ähnliches geschehen wie bei Bakterien, die von Bakteriophagen befallen werden. Entweder geht die Zelle durch die pathogene Virussyntese zugrunde, oder sie wird transformiert. Dabei koppeln sich die DNS aus den Viren an die DNS der Zellkerne an und vermehren sich mit diesen bzw. werden bei der Zellteilung auf Tochterzellen übertragen. Der integrierte zellfremde DNS-Bestandteil funktioniert die Zelle um, indem er seine Syntheseinformationen realisiert und wichtige Zellbestandteile, insbesondere von Membranen der Zelloberfläche, verändert. Dadurch wird die exogene regulative Beeinflussung solcher transformierter Zellen durch Hormone und Stoffwechselreize verhindert. Die Information der Virus-DNS oder auch -RNS führt zur Synthese von zellfremden Proteinen, die als Tumorantigene imponieren. Andererseits könnten solche Syntheseprodukte als Regulationsstoffe wirken und die Synthesevorgänge, die vom Zellgenom gesteuert werden, ein- oder ausschalten.

Lange bestand das Vorurteil, daß die 'zellulären Synthesevorgänge' qualitativ nicht beeinflußt werden könnten. Die übliche Therapie bemüht sich auch heute noch vorwiegend um quantitative Änderungen. Solange ein kranker Organismus über die qualitativen stofflichen Möglichkeiten zu seiner Gesundheit verfügt, bedarf es oft nur eines energischen Anstoßes, um Zellfunktionen zu normalisieren. Die therapeutische Praxis beweist jedoch auch beim Krebs, daß die quantitative Beeinflussung der Reaktionsabläufe allein meist nicht zum Erfolg führt. Vermutlich ist beim Krebs, anders als bei anderen Erkrankungen, eine Regenerationshilfe von gesunden Organzellen nicht möglich, weil die Krebszellen nicht mehr auf natürliche exo-

gene Regulationsstoffe ansprechen und autonom geworden sind oder weil sie ein "Mehr" an genetischer Information enthalten als normale Zellen.

Eine 'direkte Beeinflussung der Krebszellen' ist jedoch durch Stoffe möglich, die fakultativ in der Plazenta während der Schwangerschaft gebildet werden. Andererseits lassen sich Krebszellen auch 'indirekt' beeinflussen, indem man die körpereigene Abwehr und die Vitalität des Organismus aktiviert. Hier zunächst eine Zusammenstellung der Mechanismen, über die hochmolekulare Organextrakte allgemein zur Wirkung kommen können:

#### Mögliche therapeutische Wirkungen von hochmolekularen Organextrakten

- A. Direkte Einwirkungen auf geschädigte Zellen- Normalisierung der Zellfunktionen über Synthesemechanismen
- b. Indirekte Einwirkung durch Normalisierung gestörter Korrelationen von Organbeziehungen mit Auswirkung auf phylakogene Reaktionen:
  - a) zellulär
  - b) humoral
  - c) neural

#### Mechanismen

- a) Substitution von Informationsüberträgern und Regulationsstoffen für die Synthesevorgänge;
- b) Substitution von Syntheseendprodukten und Enzymen;
- c) Übertragung von funktionstüchtigen Mustern und Enzymen für die Wiederherstellung defekter Moleküle durch Rekonstruktion, Reaggregation, Reassoziierung;
- d) Übertragung von DNS-Molekülen zur Rekombination am defekten Genom.

Extrakte aus dem isolierten maternalen Anteil der Dezidua und fetalen Anteil (Chorion und Trophoblast) von Plazenten haben therapeutisch einen dosisabhängigen Antagonismus auch in ihrer Wirkung auf Tumorgewebe. Dies konnten JACHERTZ an zellfreien Synthesystemen, WRBA, GEIßEL und RÜSSE an Zellkulturen und SORKIN tierexperimentell nachweisen. Z.B. betrug beim Yoshida-Tumor die Hemmung des Stoffwechsels durch hochmolekulare Deziduaextrakte, gemessen an der Aufnahme von radioaktivem Phosphat, minus 30% gegenüber Kontrollen,

denen dieses Präparat nicht zugesetzt wurde. Normale Leberzellen werden hingegen durch das gleiche Präparat in gleicher Konzentration um plus 16% stimuliert.

Die 'Antikörperproduktion der Milzzellen' in Mäusen hat SORKIN durch Dilutionen von hochmolekularen Organextrakten aus fetaler Leber und Herzmuskel im Hämolyse-Geltest um das Zehnfache der positiven Kontrollen steigern können. MAYR und BUSCHMANN haben je nach Dosierung der Dilutionen eines Kombinationspräparates aus verschiedenen Organarten, wie wir es zur Behandlung allergischer Erkrankungen verwenden, bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  g eine Hemmung auf etwa ein Drittel der bei den Kontrollen gefundenen Werte und

-9

bei Anwendung einer Verdünnung von  $10^{-9}$  g eine annähernde Verdopplung der Anzahl der plaque bildenden Zellen in der Milz gefunden. Auch war die Auswirkung auf die Phagozytoserate signifikant erhöht.

Eine Einwirkung auf die immunologischen Abwehrfunktionen vermuten wir auch über die Beeinflussung von Hormondrüsen, insbesondere über Hypophyse, Nebenniere und Schilddrüse.

An der unspezifischen Krebsabwehr von viralen Tumorzellen könnte Interferon beteiligt sein, dessen Synthese durch Organextrakte mit doppelsträngiger RNS aus Leber und Plazenta stimuliert wird.

#### Spezielle Wirkungen von hochmolekularen Organextrakten beim Krebs

##### A. Direkte Einwirkung auf Krebszellen:

- a) Stoffwechselhemmung der Tumorzellen durch Deziduaextrakte;
- b) Sensibilisierung von Tumorzellen gegen Strahlen- und Chemotherapie durch Extrakte aus Chorion- und Trophoblastenzellen;
- c) prophylaktische Tumorabwehr durch aktive Immunisierung gegen etwaige fetale Organantigene, die auch in Tumoren vorkommen können - Durchbrechung einer Immuntoleranz gegen solche fetalen Antigene.

##### B. Indirekte Einwirkungen:

- a) Beeinflussung der vegetativ-hormonalen Reaktionslage und Verringerung der Proliferationstendenz der Krebszellen;
- b) Aktivierung der zellulären und humoralen Abwehr (Phagozytose, zelluläre und zirkulierende Antikörper);

- c) Revitalisierung von Stoffwechselorganen und dem blutbildenden System zur Überwindung von Autointoxikationen infolge von Tumorabbau;
- d) Roborierung und Schmerzlinderung.

Aus dem Schema ergeben sich für die hochmolekulare Organtherapie verschiedene Möglichkeiten für die Krebsprophylaxe.

#### Möglichkeiten einer Krebsprophylaxe durch Organotherapie

- A. Behandlung von Krankheitszuständen und Altersprophylaxe - Normalisierung der Organ- und Zellfunktionen.
- B. Sensibilisierung gegenetwaige Tumorantigene, die in fetalen Gewegen (Leber und Darm) vorkommen.
- C. Entgegenwirkung der Entstehung einer immunologischen Toleranz gegen Tumorantigene durch Mobilisierung der immunologischen Abwehr.

Die Therapie mit hochmolekularen Organextrakten hat also verschiedene Auswirkungen auf die immunbiologischen Mechanismen der natürlichen Tumorabwehr und Resistenz.

Die eigentliche Immunologie des Krebses gewinnt ständig an Bedeutung. Ihre Wirkung ist jedoch begrenzt und erst dann optimal, wenn die Hauptmasse der Tumorzellen beseitigt ist. Die immunologische Abwehr unterliegt dem Massenwirkungsgesetz und ist umgekehrt proportional der Anzahl der Tumorzellen, d.h. um so effektiver, je weniger Tumorzellen vorhanden sind. Deshalb streben wir in unserem Arbeitskreis eine Kombinationsbehandlung an, bei der zunächst die Tumormassen chirurgisch beseitigt werden sollen und dann ein stufenweiser Abbau des restlichen Tumorgewebes stattfindet, wobei zwischen Phasen der Roborierung mit Verstärkung der allgemeinen Abwehrvorgänge und Phasen mit einem immunochemischen Tumorabbau abgewechselt werden soll. Wir nennen diese Methode "multifaktorielle Krebstherapie".

Eine 'spezifische Immunotherapie' ist nur möglich, wenn Tumorantigene vorhanden sind, die in Normalzellen nicht vorkommen. Es hat den Anschein, daß die Tumorantigene bei jeder Tumorart individuell verschieden sind und sich bestenfalls in Gruppen von Tumoren mit gleicher Ursache, z.B. virusbedingten Sarkomen, entsprechen. Bis-

her wurden keine Tumorantigene gefunden, die obligat in allen Tumoren enthalten wären. Die Immunotherapie des Krebses ist deshalb mehr oder weniger eine Individualtherapie, bei der die Tumorantigene aus einem Operationspräparat oder einem durch Biopsie gewonnenem Präparat zur aktiven Immunisierung verwendet werden. Um diese Präparate gegebenenfalls auch später für die Wiederholungsbehandlung und die Testung der Antikörper verwenden zu können, sollten die karzinogenen Potenzen inaktiviert und die Tumorantigene durch Konservierung haltbar gemacht werden.

Gewinnung von Tumorantigenen durch Operation oder Nadelbiopsie

Aufarbeitung:

- a) Inaktivierung von Karzinogenen;
- b) immunologische Isolierung;
- c) Konservierung.

Verwendung:

- A. Beim Patienten zur aktiven Immunisierung unter Mitverwendung von Adjuvantien, z.B. Organextrakten, kolloidale Komplexverbindungen aus Al-Hydroxid und Kieselsäure, Freundsches Adjuvans.
- B. Bei einem Mittlerindividuum (Mensch, Tier) zur aktiven Immunisierung wie bei A und Gewinnung von zirkulierenden Antikörpern und Immunozyten.
- C. Zur Testung der humoralen Antikörper:
  - a) durch in-vitro-Methoden, z.B. Gelpräzipitation, Radiogel-diffusion, Immunelektrophorese, Trägermethoden, Immunfluoreszenz, direkte und indirekte Antiglobulinkonsumption, Zytotoxintest;
  - b) durch in-vivo-Methoden, z.B. Intrakutantest, Prausnitz-Küstnersche-Reaktion.
- D. Zur Testung der zellulären Sensibilisierung durch Lymphozytentransformation, Leukozytolyse

Eine aktive Immunisierung mit Tumorzellen oder Antigenen ist nur möglich, wenn keine Immuntoleranz gegen die Tumorantigene vorliegt d.h., wenn die Tumorantigene vom Körper noch als körperfremd erkannt werden und eine Antikörperbildung möglich ist. Die kann unter Mitverwendung von Extrakten aus lymphatischen Geweben und anderen Adjuvantien, so z.B. dem Freundsches Adjuvans oder einer kol

loidalen Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure, geschehen.

Aufgaben einer immunologischen Krebstherapie

- A. Erfassung der immunologischen Reaktionslage durch Antikörpernachweis:
  - a) humoral
  - b) zellulär
- B. Beseitigung einer etwaigen Immuntoleranz gegen Krebsantigene durch:
  - a) Behandlung mit Organextrakten aus lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Thymus, Milz)
  - b) Transfusion von allogenen Immunozyten, die gegen die Tumorantigene sensibilisiert sind, oder Behandlung mit daraus hergestellten Zellextrakten (informative RNS)
- C. Induktion der Antikörpersynthese durch aktive Immunisierung mit Tumorantigenen unter Mitverwendung von Adjuvantien
- D. Boosterung der Antikörperproduktion durch Wiederholung der Injektionen von Tumorantigenen
- E. Unspezifische Verstärkung der Antikörpersynthese:
  - a) durch Verwendung von Adjuvantien bei der aktiven Immunisierung
  - b) durch separate Injektionen von Organdilutionen
  - c) durch BCG-Impfungen

Es ist auch möglich, daß bei der aktiven Immunisierung eine besondere Art von Antikörpern, die man "enhancement antibodies" nennt, entstehen. Darunter versteht man Antikörper oder Antikörperbruchstücke, die in der Lage sind, Rezeptoren des Antigens auf den Tumorzellen zu blockieren, so daß sich daran keine komplementbindenden Antikörper oder Immunozyten mehr festsetzen können, die Tumorzellen auflösen. Es handelt sich hier also um einen Schutzmechanismus der Zellen, den wir seit 1957 bei immunopathogenen Autoaggressionen, insbesondere bei den Kollagenosen, therapeutisch nutzbar gemacht haben, indem wir patienteneigene Antikörper chemisch in Bruchstücke zerschlagen und den Patienten reinjizieren. Die Bruchstücke wirken hier wie "enhancement antibodies" und blockieren den zellschädigenden Mechanismus. Auch bei Organtransplantationen halten wir diese Methode für zweckmäßig, um schädigenden Immunreaktionen vorzubeugen. In der Krebstherapie ist die-

ser Schutzmechanismus aber unerwünscht, weil man hier ja die Krebszellen vernichten will. Deshalb verwenden wir hier die Antikörperbruchstücke mit einem Tropismus zu Krebszellen nur als 'Schlepperstoffe'<sup>1</sup> für zytotoxische oder zytolytische Substanzen. Diese wirken weit mehr zerstörend auf Krebszellen als zytotoxische Antikörper und Immunozyten. Bei einer aktiven Immunisierung läßt sich vermutlich die Entstehung von "enhancement antibodies" durch geeignete Dosierung und die Anwendung von Adjuvantien vermeiden. Eine passive Immunisierung gegen Krebs erscheint nicht sehr aussichtsreich wegen:

1. Schwierigkeiten der Beschaffung ausreichend großer Serummen-  
gen mit Immunglobulinen gegen individuelles Tumorantigen;
2. möglichen Gegenreaktionen gegen xenogene bzw. allogene Immun-  
globuline mit Blockierung der Wirkung durch Anti-Immunglobulin-  
Antikörper;
3. pathergische Reaktionen gegen Frühgifte, Anaphylatoxine, Se-  
umkrankheit u.a.

Die Behandlung mit Immunozyten von einem sensibilisierten Individuum hat einen anderen Wirkungsmechanismus als eine passive Immunisierung mit humoralen Antikörpern. Hier induzieren 'informative RNS' aus den Immunozyten die Antikörperbildung (JACHERTZ). Es handelt sich also um eine besondere Form der Informationsübertragung, die auch eine etwaige Immuntoleranz zu überwinden vermag.

Anstatt einer passiven Immuntherapie verwenden wir eine 'immunochemische Therapie', bei der die Antikörper oder die tumortropen Antikörperbruchstücke nur als Schlepperstoffe für exzessiv zellschädigende Substanzen benutzt werden. Eine solche gezielte Chemotherapie hat weniger schädliche Nebenwirkungen und kann auch gleichzeitig mit der üblichen Chemotherapie angewendet werden.

Die Verwendung von Antikörperbruchstücken als Vehikel kann gegenüber der Verwendung von nativen immunglobulierten chemischen Wirkgruppen und der gezielten Wirkung Gegenreaktionen auslösen, die besser verträglich sind und eine größere Permeabilität besitzen. Wegen der substituierten chemischen Wirkgruppe und der gezielten Wirkung sind hier nur kleinere Mengen von Antikörpern bzw. Antikörperbruchstücken erforderlich.

Die Aufspaltung von nativen Immunglobulinen (Abb.1) erfolgt che-

misch durch Reduktion mit Merkaptanen. Dies führt zu einer Sprengung von Disulfidbrücken im Antikörpermolekül, wodurch die leichten L- und schweren H-Ketten gewonnen werden. Eine Aufspaltung ist aber auch durch proteolytische Fermente, z.B. Papain, möglich. Hier entstehen die sog. Fab- und Fc-Fragmente. Über die Aufspaltung von Antikörpern gibt es eine umfangreiche Literatur, die schon in Lehrbücher eingegangen ist (vgl. STEFFEN: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, Georg Thieme-Vlg., Stuttgart 1968).

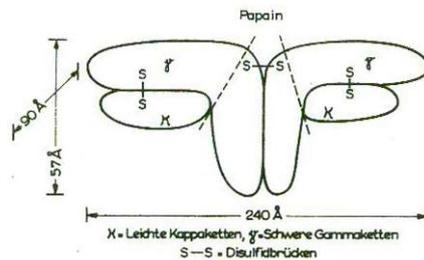


Abb. 1: Schema der Zusammensetzung eines Immunglobulins  
(nach G.M. EDELMAN)

Die Ankopplung von chemischen und biologischen Wirkstoffen an Antikörperbruchstücke erfolgt ähnlich wie in der Immunhistochemie die fluoreszierenden Farbstoffe über chemische Brücken, z.B. durch Diazotierung. Es sind aber auch eine direkte Ankopplung nach vorheriger chemischer Aktivierung der zu konjugierenden Moleküle und eine adsorptive Bindung möglich. Je nach Art der Ankopplung der chemische Wirksubstanzen könnten diese innerhalb der Zelle abgekoppelt werden und isoliert zur Wirkung gelangen (Abb.2).

Wir verwenden derzeit 5-Fluor-Uracil. Diese Verbindung wird in die RNS eingebaut und bewirkt bei der Translation, d.h. der Übersetzung der in der mRNA enthaltenen Information, im Protein den Einbau falscher Aminosäuren. Die meisten Antibiotika greifen ebenfalls in diesen Mechanismus, der an den Ribosomen abläuft, ein.

Tumortrope Antikörper können sowohl nach aktiver Immunisierung eines Mittlerindividuums als auch vom Patienten selbst gewonnen und zur Therapie verwendet werden. Für diese Modifikation der Eigen-

blutbehandlung ist es dann zweckmäßig, vor der Blutentnahme die Antikörperproduktion des Patienten durch eine geeignete Organotherapie zu aktivieren. Die Herstellung der konjugierten Antikörperbruchstücke aus Eigenblut ist weniger aufwendig als die Herstellung aus Fremdblut, bei der eine Absättigung gegen art- bzw. individualspezifische sowie Organantigene zu empfehlen ist. Auch werden die Präparate aus körpereigenen Antikörpern besser vertragen. Jedoch sollte man das Blut auf das Vorhandensein von tumortropen Antikörpern untersuchen; sonst läßt sich aber auch eine Therapie "ex juvantibus" durchführen und gegebenenfalls parallel dazu eine zytostatische Chemotherapie, die in üblicher Weise durchgeführt wird. Die "multifaktorielle Krebstherapie" kann also modifiziert werden, je nachdem, ob Tumorantigene zur Verfügung stehen oder nicht. Auch kann gegebenenfalls die Organotherapie allein durchgeführt werden.

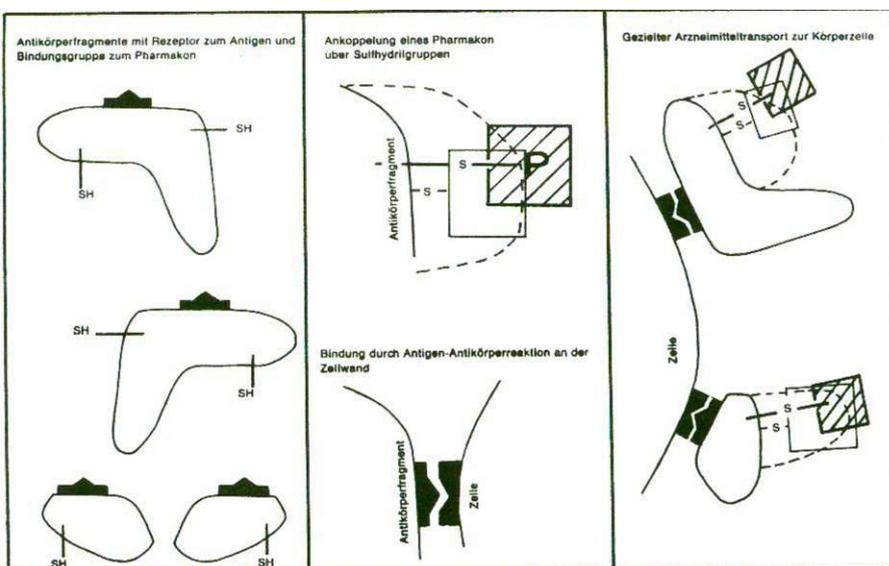


Abb. 2: Schema über die Ankopplung eines Pharmakons an leichte und schwere Ketten von Immunglobulinen.

Die Behandlung mit den konjugierten Antikörperbruchstücken erfolgt i.V., an vier bis sechs Tagen zunächst täglich, dann jeden zweiten Tag, insgesamt zehn-bis zwölfmal. Die Dosierung richtet sich

nach der Verträglichkeit, wobei auf etwaige hyperergisch-allergische Reaktionen zu achten ist. Diese würden zur Anwendung höherer Verdünnungsgrade und kleinerer Injektionsmengen zwingen. Zur Anwendung ist auch die Dauertropfinfusion geeignet.

#### Modifikation der multifaktoriellen Krebstherapie

##### I. Methoden ohne Tumorantigene

##### A. Organotherapie mit i.v.-Injektionen von Dilutionen aus dem ma-

-9

ternen Anteil der Plazenta in Verdünnung 10<sup>-9</sup>, jeweils 5 bis 10 ml an vier aufeinanderfolgenden Tagen, dann jeden zweiten bzw. dritten Tag, insgesamt 10 bis 15 Injektionen. Gleichzeitig mit der fünften bis sechsten Behandlung zusätzlich i.m.-Injektion der Suspension von Organtrockensubstanzen eines Kombinationspräparates für Malignome, danach evtl. BCG-Impfungen. - Zwei bis drei Wochen nach der Injektion der Trockensubstanzen Gewinnung und Herstellung von konjugierten Präparaten aus Antikörperbruchstücken, die im Anschluß an die Phase der Organotherapie injiziert werden, dann wiederholter Wechsel von Organotherapie und immunochemischer Therapie. Nachbehandlung ipit organotherapeutischen Lingualpräparaten.

##### B. Organotherapie wie bei A., ohne nachfolgende Therapie mit konjugierten Antikörperbruchstücken, gegebenenfalls aber anschließend oder gleichzeitig Chemo- oder Strahlentherapie.

##### II. Methoden mit Tumorantigenen

##### A. Organotherapie wie bei I. - Gewinnung von Tumorantigenen und aktive Immunisierung des Patienten mit diesen - Herstellung von konjugierten Antikörperfragmenten aus Patientenblut, die im Anschluß an die Phase der Organotherapie injiziert werden - dann Wiederholung der Organotherapie und anschließende immunochemische Therapie - Nachbehandlung mit organotherapeutischen Lingualpräparaten.

##### B. Behandlung wie bei A., jedoch Sensibilisierung eines Mittler-individuums mit Tumorantigenen und Gewinnung der konjugierten Antikörperfragmente aus dessen Blut, zusätzliche Gewinnung von sensibilisierten Immunocyten und Behandlung des Patienten.

Das Tumorgeschehen gibt viele Probleme auf. Schon der Versuch einer Synopsis zeigt, daß eine optimale Krebsbehandlung an verschiedenen Faktoren angreifen muß. Bis heute ist eine gezielte Prophylaxe noch erfolgversprechender als die Therapie. Dieserhalb hat die Früherkennung der Krebsdisposition Vorrang vor der Frühdiagnose des Tumors. Mit fortschreitender Erkrankung wird das Tumorgeschehen immer komplexer. Deshalb sollte die Behandlung an möglichst vielen Punkten multifaktoriell angreifen und über eine längere Zeitspanne hinweg durchgeführt werden.

Workshop: Onkologie - Praktische Konsequenzen für die Therapie

Leitung: Th. STIEFEL, Forschungs-  
laboratorium Karl Theurer für Organo-  
und Immuntherapie, Stuttgart-Ostfildern

Herr STIEFEL: In den vorangegangenen Vorträgen zur Behandlung von Tumoren mit NEYTUMORIN hat sich gezeigt, daß zwei Gesichtspunkte zur Zeit im Vordergrund der Arbeiten stehen:

1. Erforschung der Wirkungsmechanismen,
2. Klinischer Wirkungsnachweis.

Zur Frage der molekularen Wirkungsmechanismen von NEYTUMORIN konnten durch die Arbeiten von LETNANSKY vom Krebsforschungsinstitut Wien und MUNDER, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, wesentlich neue Erkenntnisse gewonnen werden. So gelang es nunmehr nachzuweisen, daß für bestimmte inhibierende Faktoren von NEYTUMORIN spezifische Rezeptoren auf Tumoroberflächen vorhanden sein müssen, wodurch die in vitro beobachtete spezifische Inhibierung der DNA-Synthese von Tumorzellen erklärbar wird. Demgegenüber tritt in den Arbeiten von MUNDER immer mehr die Bedeutung des Immunsystems für die Wirksamkeit von NEYTUMORIN hervor. So zeigen die Versuche an Nu-Mäusen, die über keine Thymusfunktion mehr verfügen, daß eine optimale Wirksamkeit von NEYTUMORIN nur durch intakte immunologische Strukturen möglich ist, und dieser Effekt kann auch in vitro nachgewiesen werden. So können z.B. Milzzellen, die von Mäusen stammen, die mit NEYTUMORIN behandelt wurden, dazu gebracht werden, in vitro syngene Tumorzellen massiv anzugreifen und abzutöten. Diese Untersuchungen werden durch Ergebnisse einer Pilotstudie von KETELSEN ergänzt, der nachweisen konnte, daß die Proteindichte der Zellmembran einer mit NEYTUMORIN behandelten Tumorzellkultur sich in Richtung der Verhältnisse einer Normalzelle verschiebt.

Diese reproduzierbaren Experimente werden mehr und mehr durch klinische Erfahrungen bestätigt, die inzwischen sowohl von Praktikern wie auch von Klinikern gesammelt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen in diesem Workshop im Vordergrund stehen, da sich die Thematik in erster Linie mit praktischen Konsequenzen aus den Ergebnissen der Grundlagenforschung beschäftigen soll. Neben der Diskussion der Vorträge von WALTER und KÖSTLER, die uns über ihre Erfahrungen mit NEYTUMORIN berichtet haben, wollen wir im Rahmen dieses Workshops auch die Herren REUTER von der Urologischen Klinik in Stuttgart und RÖHRER von der Inneren Abteilung des Rosmannkrankenhauses in Breisach zu Wort kommen lassen, um das inzwischen angesammelte Erfahrungsgut auf eine erweiterte Basis zu stellen.

Da die Vorträge von LETNANSKY, KETELSEN und MUNDER aus Zeitgründen im Plenum nicht diskutiert werden konnten, wollen wir hier die Gelegenheit nutzen, nochmals kurz die Grundlagenforschung zu Wort kommen lassen. Ich darf deshalb um Fragen zu diesen Vorträgen bitten.

Herr BIRR: Ich möchte meine Frage an Herrn MUNDER richten. Die sekundären Immunorgane, Milz, Lymphknoten sind Speicherorgane für bestimmte Gruppen der T-Lymphozyten. Welche T-Lymphozytengruppe ist Ihrer Meinung nach hauptsächlich in der Milz deponiert und dort abrufbereit?

Herr MUNDER: In der Milz liegen B- und T-Lymphozyten vor. Was wir wahrscheinlich messen nach Stimulation in vivo bzw. auch in vitro ist eine polyklonale Stimulierung zytotoxischer T-Lymphozyten.

Herr BIRR: Ich habe eine Antwort in dieser Richtung erwartet. Ich möchte daher folgenden Kommentar anknüpfen: Wir haben das Thymosin-alpha-1, das ich Ihnen ja vergangenes Jahr hier vorgestellt habe, in Detailstrukturen zerlegt, diese Detailstrukturen synthetisch aufgebaut und um einzelne Aminosäuren modifiziert, die aber in der natürlichen Sequenz des Thymosin-alpha-1 ebenfalls vorkommen. Wenn man diese Serie von niedermolekularen Studien über etwa die Hälfte des Gesamtmoleküls Thymosin-alpha-1, das 28 Aminosäuren enthält, ausdehnt und untersucht solche kleinen Peptide, die also genau molekular charakterisiert sind, im E-Rosettenassay und in der gemischten Lymphozytenkultur, dann bekommt man Antworten in diesen Assays, die ich im wesentlichen schon publiziert habe. Generell haben wir gefunden, daß bei Strukturen, die folgende Sequenzmerkmale haben: N-terminal basisch, dann sauer, lipophil und wieder sauer, daß solche Strukturen niedermolekularer Natur an peripheren Humanlymphozyten im E-Rosettenassay hochgradig stimulierend sind. In der gemischten Lymphozytenkultur beobachtet man eine suppressive Aktivität - und jetzt kommt das wichtige - wenn man solche Strukturen an einem Milzzellen-Azathioprin-Inhibitions-Assay studiert, dann findet man, daß nur solche Strukturen, die diese Merkmale enthalten, dort hochgradig stimulierend sind. Wenn also die Milz hauptsächlich zytotoxische Zellen enthält, so ist daraus zu schließen, daß ein niedermolekularer Stoff, ein immunologisches Signal, das die eben genannten Peptidsequenzmerkmale besitzt, ein Signal dafür darstellt, zytotoxische Zellen zu stimulieren. Man kann also in der Aussage, die Sie heute getroffen haben, sehr viel weiter gehen. Man kann bereits ein molekulares Signal angeben. Die molekulare Größe ist nicht größer als Pentapeptide. Es gibt Tetrapeptide, die diese charakteristischen Merkmale enthalten und ebenfalls hochgradig immunologisch aktiv sind.

Herr MUNDER: Prinzipiell würde ich Ihnen zustimmen. Sie gehen erheblich weiter. Aber trotzdem muß ich eines festhalten: Die antitumorale Wirkung der Präparation die wir verwendet haben, hängt nicht am Thymus. Sie hängt mit Sicherheit aber davon ab, daß das Gewebe, das verwendet wird - ich rede jetzt nur von dem antitumoralen Effekt, also von dem Effekt, der Tumoren zur Regression bringt, für den tumortragenden Wirt xenogen ist. Es kann durchaus sein, daß schlußendlich eine molekulare Struktur dafür verantwortlich ist, die Sie eben beschrieben haben.

Herr BIRR: Das wollte ich im Grunde genommen gesagt haben. Denn für uns ist Thymosin-alpha-1 nur eine der möglichen Studienformen für dieses Phänomen. Aber das Prinzip, das ich eben aufgezeigt habe, scheint ein generelles, und andere, z.B. in den USA, finden dieses Prinzip innerhalb der Gesamtsequenz des Thymopoietins ebenfalls. Es gibt wieder andere Gruppen, die einfach nur mit niedermolekularen Peptiden, unabhängig von Isolationen aus Organen, gearbeitet haben und solch ein Prinzip verwandter Art gefunden haben, z.B. die Forschungsgruppe der Farbwerke Hoechst. Es ist noch anzumerken, daß diese Arbeit, von der ich gerade sprach, im Septemberheft in "Biochemistry" publiziert ist.

Herr DOLD: Herr MUNDER, ich wollte auch noch einmal auf diesen einen Befund zurückkommen, den Sie in einer Abbildung gezeigt haben. Sie mußten dort nach etwa einer Woche den Verlust der Tumorchemmung feststellen. Sie haben bei Ihrem Vortrag gesagt, daß das verwendete Zellsystem auch Zytostatika-resistent war. Die erste Frage: War es vorher Zytostatika-empfindlich, d.h. geht parallel mit der Entwicklung einer Zytostatika-Resistenz, die dann hier sehr schnell käme, dieser Verlust des Response einher, oder haben Sie irgendwelche Erläuterungen, wie es zu diesem Response-Verlust kommt?

Herr MUNDER: Dieses Resistenzphänomen, das ich erwähnt habe, das bei der Behandlung von implantierten Methylcholanthren-induzierten Tumorzellen nach drei bis vier Wochen auftritt, ist ebenso unter Chemotherapie zu beobachten. Wir sehen, daß bei 3-4 Tieren bei einer Gruppe von 10 Tieren der Tumor einfach nur sistiert also nicht weiterwächst und dann in der 4. Woche durchbricht. Dieses Resistenzphänomen finden wir genauso, wenn wir die Tiere für drei Wochen 2x wöchentlich mit 0,5 bis 1 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht behandeln. Auch da haben wir eine Gruppe von Tieren, sagen wir 5 von 10, deren Tumor zunächst nicht mehr weiterwächst, dann aber trotz massiver Erhöhungen der Cyclophosphamidgabe durchbricht und nicht mehr zu beeinflussen ist. Aber diese mit Cyclophosphamid vorbehandelten Tiere lassen sich auch nicht mehr - und ich muß betonen, es sind erst zwei oder drei Versuche - durch die Gabe von NEYTUMORIN zurückhalten. Umgekehrt ist es aber so: Die Tumoren, die durchwachsen, trotz Behandlung mit NEY-

TUMORIN oder anderen xenogenen Präparaten, lassen sich auch mit Cyclophosphamid nicht mehr halten. Es handelt sich hierbei offensichtlich um eine resistente Tumorzellpopulation, die wahrscheinlich sehr eng mit dem Tumorproblem an sich zusammenhängt, d.h. es sind Tumorzellen, die eigentlich - wahrscheinlich werden auch die Kliniker etwas dazu sagen können - mit den bisher uns bekannten Möglichkeiten therapeutisch nicht erreicht werden können. Es sind vielleicht Tumorzellen in der G<sub>0</sub>-Phase, um nur eine Vermutung zu äußern.

AUDITORIUM: Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen in der Praxis: Wir haben unter einer ganzen Reihe von Tumorpatienten zwei, bei denen zunächst ein Stillstand des Tumorwachstums erreicht werden konnte. Urplötzlich wuchs der Tumor jedoch ohne weitere Beeinflussung, weder durch Chemotherapie noch durch entsprechende biologische NEYTUMORIN- oder Ozongabe. Ist es möglich, daß es sich bei den Mäusen um ähnliche Effekte handelt?

Herr MUNDER: Wenn Sie in unserem System - z.B. in dem Methylcholanthren-induzierten Tumorsystem - diese Tiere mit Cyclophosphamid behandeln, dann haben Sie Bereiche, wo Sie einen Antitumoreffekt haben. Sie haben aber auch einen Bereich - und das habe ich nicht gezeigt - wo Sie eine definitive Steigerung des Tumorwachstums haben, und zwar bei hohen Dosen von Cyclophosphamid. Die hohe Cyclophosphamidabgabe bewirkt die Ausschaltung des Immunsystems, wodurch eine enorme Steigerung des Tumorwachstums eintritt. Das haben wir mit NEYTUMORIN nicht gesehen. Dies soll jedoch nicht als Attacke gegen die bisherige Therapie verstanden werden, sondern es soll die Bedeutung des Immunsystems bei der Abwehr von Tumoren aufzeigen. Man kann durch Ausschaltung des Immunsystems - und das habe ich ja gezeigt mit den nackten Mäusen und mit den bestrahlten Mäusen - und ebenso durch aktive Behandlung mit Chemotherapeutika eine Stimulierung des Tumorwachstums erzielen, die dann durch nichts mehr zu halten ist.

Herr DOUWES: Vielleicht darf ich dazu etwas sagen. Das Tumorenancement ist ja eine bekannte Geschichte. Schon in den Anfängen der Immuntherapie war dies befürchtet worden. Inzwischen wissen wir auch von Studien, auch von adjuvanten Studien, z.B. BCG-adjuvant beim Mammakarzinom, daß die Immuntherapie-Gruppe hier schlechter abschnitt als die Kontrollgruppe. Auf der anderen Seite gibt es aber ebenso Studien, die belegen, daß durch Immunstimulanzien die Behandlungsergebnisse bei den unterschiedlichsten Tumoren auch erheblich verbessert werden können. Vergleicht man diese Studien näher, so sieht man, daß das entscheidende Kriterium für Tumorenancement oder Tumortherapie, die Dosierung des Immunstimulans ist. Die Dosis ist also das Vabanquespiel für den Kliniker, d.h. er muß die Dosierung finden, die ein Enhancement ausschließt und dafür brauchen wir

Meßinstrumente. Dies ist allerdings nach meinem Dafürhalten noch sehr problematisch, weil geeignete Meßinstrumente noch nicht zur Verfügung stehen. Jeder, der mit Immuntherapie gearbeitet hat, weiß, daß er Patienten unter dieser Therapie wunderbar zellulär restituieren kann. Sie zeigen sowohl bei Haut- als auch bei T-Lymphozyten-Stimulationstesten und E-Rosetten-Testen hervorragende Werte. Immunologisch wären das Riesen und trotzdem wächst der Tumor weiter, er wächst sogar schneller als zuvor. Das Problem ist also, daß wir uns bei der Beurteilung des Immunstatus auf Dinge stützen, die keine Aussagekraft bezüglich der Tumor-Abwehrsituation des Patienten besitzen.

Herr STIEFEL: Es wurde hier ein sehr wichtiges Problem angesprochen, und zwar das Problem der richtigen Dosierung. Ich muß allerdings darauf hinweisen, daß wir bei NEYTUMORIN weder experimentell, wie das ja Herr MUNDER ausgeführt hat, noch in der Klinik bisher Hinweise auf ein Tumor-Enhancement gesehen haben. Dennoch ist die Frage der richtigen Dosierung einer Therapie mit biologischen Response Modifikatoren ein zentrales Problem. Dies wurde auch auf dem diesjährigen Internationalen Krebskongress in Seattle wieder deutlich, bei dem eine Vielzahl neuer Studien vorgetragen wurden, in denen Chemotherapie, Strahlentherapie und Chirurgie mit solchen biologischen Response Modifikatoren kombiniert waren. Bei Studien, bei denen durch eine extreme zytotoxische Behandlung das Immunsystem vollständig lahmgelegt wurde, kann man von einer Therapie mit Response Modifikatoren sicher keine Aktivierung körpereigener Abwehrkräfte mehr erwarten. Hier kann es in der Tat dann zu einer Stimulierung des Tumorwachstums kommen, einfach deshalb, weil die immunologischen Prinzipien zerstört sind, die hier aktiviert werden sollen. Auf der anderen Seite wurden jedoch in Seattle auch Studien vorgestellt, wo z.B. bestimmte Thymusfraktionen zusätzlich zu einer gemäßigten Chemo-Therapie eingesetzt wurden. Bei diesen Studien konnte eine signifikant längere Überlebenszeit bei verschiedenen Tumoren im Hals- und Nackenbereich statistisch belegt werden. Ich möchte nun Herrn JACHERTZ bitten, aus fundierter immunologischer Sicht nochmals zu dieser Problematik Stellung zu nehmen.

Herr JACHERTZ: Im wesentlichen kann ich das bestätigen, was Herr DOUWES gesagt hat. Ich finde, es ist sehr wichtig, daß man erkennt, daß eine Immunotherapie eine Gratwanderung zwischen zwei Abgründen darstellt. Der eine Abgrund ist die überschüssende zelluläre, der andere Abgrund ist die überschüssende humorale Immunität. Dies ist sicher der Grund, warum die Ergebnisse, die man in der Literatur liest, und vor allem die Ergebnisse, die man hinter vorgehaltener Hand mitgeteilt bekommt, so stark voneinander differieren. Uns fehlt eigentlich in der praktischen Krebstherapie eine vernünftige Diagnostik, die verlässliche Verlaufparameter liefern könnte über den derzeitigen Zustand der humoralen und zellulären Abwehr.

Herr DOUWES: Nach meinem Dafürhalten wäre es gerade auch vor diesem Auditorium wichtig, einmal zusammenzutragen, was man heute klinisch praktikabel als Immun-Parameter im weitesten Sinne des Wortes erfassen sollte. Insbesondere dann, wenn wir randomisierte klinische Studien mit diesen Präparaten durchführen wollen, sollte man, nach all dem, was wir nun aus der Grundlagenforschung über die Wirkungsweise des NEYTUMORINS gehört haben, auch diesen immunologischen Aspekt gebührend berücksichtigen. Wir haben z.B. in unserer Klinik Hautteste eingeführt, die einfach durchzuführen sind und nach unseren bisherigen Erfahrungen eine gute Leitlinie darstellen, um die Immun-Situation eines Patienten zu beurteilen. Natürlich reicht das nicht aus, und wir sind zusammen mit den Grundlagenforschern bestrebt, neue Möglichkeiten auf diesem Gebiet ausfindig zu machen.

AUDITORIUM: Eine Frage, die eben nur angeklungen ist, sollte etwas vertieft werden: Nämlich die Frage nach der Kombinierbarkeit von NEYTUMORIN und einer aggressiven Chemo-Therapie. Es gibt Autoren, die die Meinung vertreten, daß der Tumor sich mit einem Schutzmechanismus umgibt, der den körpereigenen Abwehrkräften einen Angriff gegen den Tumor nicht ermöglicht. Die aggressive Chemo-Therapie sei in diesem Fall in der Lage, diesen Wald zu durchbrechen, und dadurch könnten die Wirkstoffe von NEYTUMORIN überhaupt erst zur Wirkung kommen. Ich persönlich habe gerade an einem Fall eines Mamma-Karzinoms den Eindruck, diese These eher bestätigt zu sehen. Jedenfalls bin ich der Ansicht, daß auch eine gedankliche Synthese zwischen diesen beiden antitumoralen Prinzipien hergestellt werden könnte.

Herr STIEFEL: Sicherlich gibt es für biologische Anti-Tumor-Konzepte eine natürliche Grenze ihrer Wirksamkeit, die im wesentlichen von der Zahl der vorhandenen Tumorzellen abhängen wird. Ist dieser "point of no return" überschritten, so wird man gezwungen sein, aggressivere Therapiemethoden hinzuzuziehen. Hier zeichnen sich in der onkologischen Forschung ganz neue Wege ab, um z.B. zytotoxische Substanzen direkt am Tumor anzureichern. Wir verfolgen diese Gesichtspunkte sehr intensiv in unserem Forschungsbereich. Gelänge es, zytotoxische Substanzen gezielt an den Tumor heranzuführen und dort ihre zytotoxische Wirkung entfalten zu lassen, so wäre man auch in dem Problem der toxischen Nebenwirkungen heutiger Chemo-Zytostatika einen erheblichen Schritt vorangekommen. Eine richtig dosierte Kombination einer solchen zielgerichteten Chemo-Zytostase mit NEYTUMORIN könnte auch bei großen Tumoren und generalisierten Metastasierungen neue Wege in der Tumor-Therapie eröffnen. Man könnte dann Chemo-Zytostatika einsetzen, um große Tumormassen zu reduzieren und dann durch eine gezielte Immuno-Therapie die körpereigenen Regulations- und Abwehrmechanismen zusätzlich aktivieren.

AUDITORIUM: Herr DOUWES hatte vorher die Frage gestellt, wie man die humorale oder die zelluläre Abwehr messen kann. Es wäre für uns doch sehr interessant, ob dies überhaupt messbar ist und wie man die Messungen durchführt.

AUDITORIUM: Ich möchte hier einmal meine Erfahrung aus der Praxis mitteilen: Ich mache das bei meinen Tumorpatienten so, daß ich einen Immun-Status erheben lasse. Gemessen wird dabei die humorale Immunität, die zelluläre Immunität, das Komplementsystem, die gängigen Tumormarker. Daneben kontrolliere ich zusätzlich die normalen Labor-Parameter, Spektralanalysen, Mineralien, Senkung, Blutbild usw. Ich muß sagen, daß ich damit in der Beurteilung recht gut zurecht komme und diese Untersuchungen auch vor den Operationen durchführe. Wenn der Immun-Status sehr schlecht ist, behandle ich intensiv mit NEYTUMORIN vor, und ich kann beweisen, daß diese Parameter sich verbessern. Dann lasse ich operieren, und nach der Operation - ich habe das mit einem Melanom-Patienten gemacht - ist der Immun-Status fast nicht abgesunken, was ohne Vorbehandlung nicht der Fall ist. Dem Patienten ging es trotz großer Operation und großer Eindringtiefe erstaunlich gut.

AUDITORIUM: Sie sagten, Sie machen einen Immun-Status. Was verstehen Sie unter einem Immun-Status?

Herr STIEFFEL: Ein Immun-Status ist zunächst einmal die Reaktionslage des Immunsystems. Man kann dabei in verschiedenen Testen, wie z.B. der gemischten Lymphozytenkultur, dem Lymphozyten-Stimulationstest, dem E-Rosetten-Test und dem von Herrn DOUWES angeführten Hauttest, gewisse Aussagen über das zelluläre Abwehrsystem machen. Schwieriger wird es beim humoralen Abwehrsystem, hier kann man gewisse Aussagen über die quantitative Messung der Immun-Globuline IgM, IgG und IgA durch Immun-Elektrophorese gewinnen. Daneben besteht die Möglichkeit, speziell bei Tumorpatienten die bei der jeweiligen Tumorerkrankung sinnvollen Tumormarker als Verlaufsp Parameter des Tumorwachstums zu bestimmen. All diese Methoden sind jedoch nur als grobe Anhaltspunkte zur Beurteilung eines Immun-Status, z.B. in Bezug auf eine Tumorerkrankung, zu werten. Sehr viel spezifischer wäre die Aussage, welche T-Zell-Subpopulationen z.Zt. überwiegen, d.h. Suppressorzellen, Killerzellen oder Helferzellen. In diesem Zusammenhang möchte ich Herrn MAURER fragen, ob er in seinem Testsystem die Möglichkeit sieht, solche Subpopulationen von T-Lymphozyten zu erfassen und damit auch den Verlauf bei einem Patienten unter einer Behandlung mit seinem Testsystem zu verfolgen.

Herr MAURER: Wir arbeiten z.Zt. an der Entwicklung entsprechender klonaler Assays für die Subpopulationen von Lymphozyten. Ich bin überzeugt, daß auch diese Zellen - und die vorläufigen Ergebnisse zeigen dies - sich züchten lassen zu entsprechenden Kolonien. Wir sind jedoch mit der Entwicklung dieses Tests

noch nicht am Ende und verfügen deshalb auch noch über keine klinischen Erfahrungen.

Herr STIEFEL: Nachdem wir nunmehr die Immunologie ausführlich haben zu Wort kommen lassen, sollten wir uns, bevor wir zu den konkreten Fällen aus der Praxis kommen, zu einer Forschungsrichtung kommen, die bei der direkten, regulativen Wirkung des NEYTUMORINS eine besondere Rolle spielt. In der Zellkultur sehen wir ja nicht die immunologische Wirkung des NEYTUMORINS, sondern die direkte zytotoxische bzw. zytostatische Wirkung dieses Präparates. Herr KETELSEN hat ausführliche Untersuchungen an Zellmembranen von Tumorzellen gemacht, die mit NEYTUMORIN oder mit einem Chemo-Zytostatikum behandelt worden waren. Meine Frage nun an ihn: Kann man sich heute schon vorstellen, warum Normalzellen eine geringere Proteindichte als Tumorzellen in ihrer Membran besitzen? Die zweite Frage wäre die: Würde sich die Bestimmung der Proteindichte in Membranen dazu eignen, den Verlauf und die Wirkung einer Tumorbehandlung am Patienten zu verfolgen?

Herr KETELSEN: Zu Ihrer ersten Frage: Untersuchungen zur Vermehrung intramembrärer Proteinbestandteile, wie wir sie im Gefrierätzbild sehen, sind mit dieser Methode erst an sehr wenigen Tumoren durchgeführt worden. Deswegen hatte ich in meinem Vortrag einige Beispiele erwähnt, wie das von WEINSTEIN 1976 zum ersten Mal im Gefrierbruch untersuchte Blasenkarzinom. Beim humanen Blasenkarzinom ist die Partikelvermehrung mit dieser Methode im präinvasiven Stadium zu sehen. Invasive Blasenkarzinomzellen zeigten dagegen Normalwerte. Hier ergaben sich gewisse Unterschiede zu experimentellen Ergebnissen, die dann am chemisch induzierten Blasenkarzinom der Ratte erhoben wurden: Die intramembranösen Proteinpartikel waren sowohl im präinvasiven wie auch im invasiven Stadium vermehrt. Was nun die Tumor-Zellkultur anbetrifft, so wird in unserer Pilotstudie der Unterschied zwischen der Membranstruktur von normalen Amnionzellen und von Wisch-Tumorzellen deutlich. Es gibt meines Wissens nach bisher kaum Untersuchungen mit der Gefrierätzung über Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs.

Ihre zweite Frage: Können wir mit dieser Methode morphologisch Unterschiede unter der Beeinflussung von Zytostatika, Chemo-Zytostatika und NEYTUMORIN sehen? Ich glaube schon, daß das recht gut dokumentiert werden konnte. Ihre Frage, warum nun mehr Protein in der Membran von Tumorzellen nachweisbar ist, kann arbeitshypothetisch am Beispiel virusinduzierter Neoplasien sehr gut begründet werden. Man hat in den letzten Jahren herausfinden können, daß das veränderte Genom in der virusinduzierten Tumorzelle offensichtlich ein sehr charakteristisches, wenn nicht gar spezifisches Protein bildet. Dieses Protein lagert sich der äußeren Zellmembran an oder wird in sie eingebaut. Man hat es aus diesen

Virus-induzierten Tumoren isolieren können, hat Antikörper dagegen gebildet und hat dann mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die Anlagerung oder den Einbau dieses Proteins in die Zellmembran nachweisen können. Möglicherweise passiert bei den nicht Virus-induzierten Tumoren ähnliches, womit sich indirekt eine Korrelation zu den Gefrierätzbefunden herstellen läßt, die morphologisch an nicht invasiven und invasiven Karzinomzellen erhoben wurden.

Herr BIRR: Dies möchte ich aus dem molekularen Blickwinkel ergänzen. Wenn Sie von einer Lipid-Membran sprechen und sehen unter irgendeinem veränderten physiologischen Zustand eine Zunahme an Proteinen in dieser Membran, dann muß man sich fragen, wie diese Dichte-Erhöhung von Proteinen zustande kommen kann, ohne daß die Lipid-Doppelschicht gestört wird. Andersherum ausgedrückt, diese Proteine haben ein Charakteristikum einer Lipid-Membran. Es müssen Proteine hoch-lipophiler Natur sein. Wenn diese Proteine aber hoch-lipophiler Natur sind, dann ist eine solche Zelle äußerlich - jetzt makroskopisch ausgedrückt - mit einer Art "proteinischem Klebstoff" versehen, der diese Zelle durch Interaktion mit anderen Zellen immunogen abschirmen kann. Damit wäre auch erklärbar, daß eine solche Tumorzelle keine hohen Antikörper-Titer erzeugt.

Herr STIEFEL: Herr LETNANSKY, Sie haben aus dem maternalen Anteil der Placenta eine Proteinfraction isoliert, die die DNS-Synthese von Tumorzellen spezifisch hemmt. Sie haben nun nachweisen können, daß für diesen Inhibitor, der auch in NEYTUMORIN enthalten ist, ein spezifischer Rezeptor auf Tumoroberflächen existiert. Meine Frage nun: Haben Sie bereits Untersuchungen gemacht, um was für ein Molekül es sich bei diesem Rezeptor handelt? Ist es ein Protein oder ein Glykoprotein und in welchem Molekulargewichtsbereich bewegt sich die Molekülgröße etwa?

Herr LETNANSKY: Die Frage ist kurz zu beantworten: Wir haben bis jetzt einige orientierende Untersuchungen in dieser Richtung gemacht, können aber noch keine konkrete Aussage machen. Wir haben, wie ich Ihnen gezeigt habe, zunächst einmal eine Auftrennung in den Polyacrylamid-Gelen gemacht. Wir haben sie angefärbt, sowohl mit Proteinfärbemethoden als auch mit PAS-Färbung, wo eine Anfärbbarkeit auf Zuckerreste gegeben ist. Wir erfaßten damit also Proteine und Glycoproteine. Wir wissen aber noch nicht, welche dieser Fraktionen jene Komponenten sind, die den Inhibitor binden. Diese Versuche sind jetzt im Gange. Man wird erst dann etwas näheres über die Struktur, über die Zusammensetzung, den Aufbau und natürlich auch über das Molekulargewicht sagen können.

Herr STIEFEL: Das Thema unseres Workshops heißt "Praktische Konsequenzen für die Therapie". Wir können deshalb nach Diskussion der mehr theoretisch angelegten

Vorträge zu den Erfahrungen der Praxis in der Behandlung von Tumorpatienten mit NEYTUMORIN kommen. Ich darf bei dieser Gelegenheit noch einmal darauf hinweisen, daß durch die neue galenische Form des NEYTUMORIN-SOL es nunmehr möglich geworden ist, die in den Experimenten als optimal ermittelten Dosen auch beim Menschen anzuwenden. Die Verträglichkeit dieses volllöslichen Lyophilisats, das damit auch intravenös applizierbar ist, wurde in einer Phase-I-Studie an über 30 Patienten geprüft. Dabei war eine außerordentlich gute Verträglichkeit festzustellen. Ich darf nun Herrn RÖHRER aus der Inneren Abteilung des Rosmann-Krankenhauses in Breisach bitten, uns seine Erfahrungen mit NEYTUMORIN mitzuteilen.

Herr RÖHRER: Ich darf Ihnen zunächst einmal über eine Patientin berichten, die jetzt 66 Jahre alt ist. Ganz kurz zur Anamnese: Sie kam vor vier Jahren zu uns wegen einer fulminanten Beckenvenen-Thrombose. In diesem Zusammenhang fanden wir eine Thrombozytose von über einer Million Thrombozyten, außerdem eine Leukozytose um 70.000. Alkalische Leukozyten-Phosphatase deutlich erhöht, massive Splenomegalie, wobei die Milz bis ins kleine Becken hineinreichte, weniger ausgeprägt auch eine Hepatomegalie. Man fand histologisch sowohl in der Leber als auch in der Milz Zeichen einer ausgeprägten extramedullären Blutbildung. Es handelte sich also um ein myeloproliferatives Syndrom, letztlich also um eine maligne Erkrankung. Die Therapie war zunächst die, daß die Thrombose behandelt wurde nach den bekannten Methoden. Danach mußte die Milz entfernt werden, weil sie massive Raumverdrängungserscheinungen im gesamten Bauchraum bewirkte. Hernach war dann die Patientin für eine gewisse Zeit in einer anderen Klinik und wurde dort mit MYLERAN behandelt, worauf die Thrombozyten und Leukozyten abfielen. Vor etwa zwei Jahren kam die Patientin dann wieder mit einer ausgeprägten Anämie, einem Hb zwischen 5-6 g/%, Erys 1,5-2 Mio., einer Leukopenie, die zwischen 1000 und 2000 Leukozyten schwankte. Im Differentialblutbild fanden sich relativ wenige Segmentkernige, dafür eine ausgeprägte relative Lymphozytose. Die Thrombozytenzahlen lagen im Mittel um 10.000, bei verschiedenen Kontrollen auch wesentlich tiefer. Die Patientin war in ihrem Allgemeinbefinden massiv beeinträchtigt durch die Anämie, die wir kompensieren konnten durch Transfusionen. Allerdings war es dann im nachfolgenden so, daß die Zeitabstände, in denen sie transfundiert werden mußte, immer kürzer wurden. Der Abstand betrug zuletzt etwa vier Wochen, nach denen sie dann sechs bis acht Erythrozyten-Konzentrate bekam. Keinen Einfluß hatten wir auf die Leukopenie, die immer wieder zu rezidivierenden Infekten führte. Sie hatte mehrfach Pneumonien, ebenso mehrfach eitrige Tonsillitis. Die Thrombopenie äußerte sich in petechialen Blutungen, Suggilationen und vor allen Dingen in einem rezidivierenden Nasenbluten. In der Zwischenzeit wurde auch hausärztlicherseits mit Anabolika, Eisengaben und Vitamin-B-Komplex erfolglos versucht,

die Hämatopoese anzuregen. Bei einer Beckenkamm-Biopsie fand sich in der Zwischenzeit das Bild einer ausgeprägten Osteo-Myelofibrose mit einer massiv hypoplastischen Erythropoese, Granulozytopoese und Thrombozytopoese. Wir wagten dann einen Behandlungsversuch mit NEYSANGUIN, das Organlysate aus fetalen und juvenilen Blutzellen, fetaler Milz und Knochenmark enthält. Unsere Vorstellung war, daß man unter Umständen dadurch einen Stimulus auf die Blutbildung erreichen könnte. Die Behandlung mit NEYSANGUIN wurde, beginnend mit Stärke I über Stärke II bis zur Stärke III, intravenös im Abstand von zwei Tagen durchgeführt. Anschließend wurde fortlaufend im Abstand von zwei Tagen je eine Ampulle NEYSANGUIN Stärke III intravenös appliziert. Die Behandlung begann am 1. Mai 1982 und führte nach drei Wochen zu einer Normalisierung der Leukozytenzahl und des weißen Differentialblutbildes. Die Thrombozyten stiegen auf Werte zwischen 40.000 bis 50.000 an. Die Patientin fühlte sich unter dieser Therapie subjektiv hervorragend. Die Anämie verschwand (Hb-Werte zwischen 12 und 13 g/%, Erythrozyten zwischen 3,5 und 4 Mio.). Die lästige Müdigkeit war aufgehoben, die Leistungsbeeinträchtigung nicht mehr vorhanden. Die Petechialblutungen und das rezidivierende Nasenbluten sowie die rezidivierenden Infekte sind ebenfalls nicht mehr aufgetreten. Nun ist es natürlich sehr schwierig zu interpretieren, was hier geschehen ist. Um festzustellen, ob eine substituierende Wirkung des NEYSANGUINs vorliegt, haben wir dann Mitte August mit einem Auslaßversuch begonnen, indem wir nur noch Placebo verabreichten. Nach drei bis vier Wochen sah man wieder einen - wenn auch nicht sehr ausgeprägten - Rückfall der Werte für die Erythrozyten und Hämoglobin. Die Leukozyten hielten sich einigermaßen, aber auch die Thrombozyten gingen wieder zurück, allerdings nicht in dem Ausmaße, wie wir es gewohnt waren vor der Behandlung mit NEYSANGUIN. Es scheint also so zu sein, daß durch das Präparat ein substitutiver Effekt entsteht, der möglicherweise über einen Proliferations-Stimulus auf pluripotente Stammzellen abläuft. Entscheidend für uns und auch für die Patientin ist jedoch, daß es ihr unter dieser Therapie gut geht und sich die hochpathologisch-veränderten Blutwerte doch weitgehend normalisiert haben. Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß bei dieser Patientin ab Anfang Mai mit der Behandlung mit NEYSANGUIN begonnen wurde. Die Behandlung wurde bis zum Auslaßversuch Mitte August mit einer Ampulle NEYSANGUIN Stärke III im Abstand von zwei Tagen fortgeführt. Die Behandlung wurde nach dem Auslaßversuch in gleicher Weise wieder aufgenommen und bei der Patientin wird bis heute eine Dauer-Therapie mit NEYSANGUIN weitergeführt. Ihre Blutzellwerte haben sich vollständig normalisiert

Herr THEURER jun.: Wurden während dieser Zeit Erythrozyten-Konzentrate verabreicht?

Herr RÖHRER: Nein, nicht mehr.

Herr WALTER: Ich hatte unlängst einen Patienten, der hatte eine Pannmyelopathie, den ich verloren habe. Sind Sie der Meinung, daß das gleiche Therapieschema hier hätte zutreffen müssen?

Herr RÖHRER: Möglicherweise.

AUDITORIUM: Ich habe jetzt diese Fallbeobachtung, die bei einer Erkrankung, die man sonst durch nichts behandeln kann, zumindest was die Thrombopoese und die Granulozytopoese anbelangt, einen beachtlichen Behandlungserfolg darstellt. Ein Behandlungsversuch wäre deshalb sicher auch in diesem Fall empfehlenswert gewesen. Ich bin der Meinung, Sie haben zwei Diagnosen. Einmal die Osteomyelofibrose und zum anderen das myeloische proliferative Syndrom. Das sind ja nun in der Prognose zwei verschiedene Sachen. Dazu möchte ich meinen eigenen Fall kurz schildern. Im März vorigen Jahres tastete man bei mir über dem Beckenkamm zwei Knoten, die einem myeloisch-proliferativen Syndrom zugeschrieben wurden. Im Blutbild waren schon unreife Zellen vorhanden, die Thrombozyten auf 750.000, die Milz war vergrößert, über dem Kamm 25 cm und eine ziemlich vergrößerte Fettleber. Die Fettleber stammt von zwei Hepatitiden her, die eine als Kind, und die zweite habe ich mir bei einem Patienten seinerzeit inokuliert. Eine Knochenmarkspunktion aus dem Sternum ergab die Diagnose "myeloisches proliferatives Syndrom". Das Blutbild war einigermaßen normal mit 4.800 Erythrozyten, 4.800 Leukozyten, einigen unreifen Formen und damals 750.000 Thrombozyten. Ich habe seinerzeit als einzige Therapie die NEYTUMORIN-Therapie angefangen und zwar mit der tolerogenen Vorbehandlung, und seither spritze ich mir zweimal in der Woche das NEYTUMORIN. Der Effekt Die Kondition, die ziemlich heruntergekommen war, ist sehr gut geworden. Nach fünf Monaten war die Milz um ca. 5 cm kleiner geworden. Die Leber ist noch immer vergrößert und es finden sich noch immer die Fetteinlagerungen. Die Thrombozytenwerte haben sich wesentlich gebessert.

Herr RÖHRER: Ich darf jetzt noch über einen weiteren Fall berichten: Ein 68-jähriger Patient, bei dem vor etwa einem Jahr anlässlich einer Thoraxaufnahme ein großer zentraler Rundschatten im Bereich der linken Lunge festgestellt wurde mit beginnender Atelektase des linken Ober- und Unterlappens. Auf den Schichtaufnahmen war dann ein Tumor mit der Abmessung 3 x 4 cm zu erkennen, bronchoskopisch eindeutig ein maligner Tumor, histologisch ein endifferenziertes Plattenepithel-Karzinom des Bronchus. Eine Operation kam aufgrund des Alters und der beeinträchtigten Funktion der rechten Lunge nicht in Frage. Eine zytostatische Therapie kam

bei diesem histologischen Typ ebenfalls nicht in Betracht. Eine Strahlentherapie wurde von dem Patienten abgelehnt. Wir haben ihn nun folgendermaßen behandelt: Zunächst einmal mit NEYTUMORIN in der bekannten tolerogenen Dosierung, also mit NEYTUMORIN-Dilutionen, anschließend mit NEYTUMORIN-SOL. Im Anschluß daran wurde eine längerfristige Behandlung mit NEYTHYMUN durchgeführt. Dem Patienten, der zunächst in einem klinisch sehr schlechten Zustand war, ging es unter der Therapie zunehmend besser. Als Verlaufsparemeter wurden regelmäßig neben den üblichen labor-chemotechnischen Parametern wie BSG, Blutbild usw. die beiden Tumormarker CEA und TPA bestimmt. Das Tissue-Polypeptide-Antigen (TPA) lag bei Beginn der Therapie bei 2.700 U/l. Nach Abschluß der Behandlung zeigt das TPA Normwerte ( $\approx 100$  E/l). Auch das CEA, das zu Beginn der Behandlung erhöhte Werte um 9 ng/ml zeigte, wies nach der Behandlung praktisch Normwerte (um 3 ng/ml) auf. Dem Patienten geht es nach wie vor sehr gut. Ich glaube, gerade die Verlaufskontrolle anhand dieser Tumormarker zeigt uns an, daß sich hier etwas zum Positiven entwickelt hat. Röntgenologisch hat sich der Rundherd eindeutig verkleinert. Er mißt jetzt ca. 2 x 3 cm. Zu einer abermaligen Bronchoskopie mit Histologie konnte sich der Patient allerdings leider nicht entscheiden.

Herr STIEFEL: Ich möchte nun Herrn REUTER von der Urologischen Klinik Stuttgart bitten, über seine Erfahrungen mit NEYTUMORIN bei urogenitalen Tumoren zu berichten. Herr REUTER hat sehr früh die antitumorale Wirkung von NEYTUMORIN erkannt und bereits seit mehreren Jahren Beobachtungen an einem größeren Patientengut durchführen können.

Herr REUTER: Wir waren uns darüber im klaren, Herr Kollege THEURER und ich, daß nur unter statistischen Kriterien durchgeführte und über lange Zeit beobachtete Fälle überhaupt einen Aussagewert besitzen. Wir haben uns bemüht, Langzeitbeobachtungen zu machen und zwar spiegelt sich in dem, was ich Ihnen nun sage, die Geschichte des Hauses THEURER, mit dem ich seit 25 Jahren zusammenarbeite, wider. Wir haben 77 Patienten über ein bis dreizehn Jahre beobachtet. Begonnen haben wir mit dieser Therapie im Jahre 1969 mit der sero-chemischen Behandlung mit Tumorpimpfungen, d.h. wir haben den Ehefrauen eingefrorene, abgetötete Tumorzellen in Form von Tumorkvakzinen immunogen gespritzt. Diese Ergebnisse wurden bereits 1979 publiziert (Erfahrungsheilkunde 28, 232-234, 1979). Bei 19 Patienten mit gemischten Tumoren der Harnwege lebten nach 11-13 Jahren noch sechs Patienten. Bei 11 Hypernephrom-Patienten lebten nach 13 Jahren noch vier Patienten. Ab 1971 bis 1978 stellten wir auf die sero-chemische Behandlung mit angekoppeltem Fluorouracil um. Resultate nach 3-11 Jahren: Von 27 Patienten sind noch über 50 % am Leben. 1978 wurde dann die GEGENSENSIBILISIERUNG eingesetzt. Von 19 Patienten sind noch 13 am Leben, das sind also rund 2/3. Seit 1981 führen wir die Behand-

lung mit NEYTUMORIN, zum Teil ergänzt durch FEGACOREN, bei Bestrahlung durch. Zu den einzelnen Statistiken: Das Blasenkarzinom haben wir 3-13 Jahre beobachtet. Dabei leben noch 9 von 20 Patienten, das sind also fast 50 %. Die internationale Statistik weist eine FUnf-Jahres-überlebensrate bei Blasenkarzinom von 35-40 % aus. Beim Prostatakarzinom haben wir ebenfalls 3-13 Jahre beobachtet. Mit allen Radikaloperationen, Lymphadenektomien und der zusätzlichen NEYTUMORIN-Behandlung beträgt die Flnf-Jahres-überlebenszeit bei uns ca. 60 % gegenüber 40 % in der internationalen Statistik. Wir beobachten hier 16 Patienten. Das Nierenkarzinom ist vielleicht der interessanteste Tumor. Die Überlebensrate ist nämlich nach fünf Jahren international unter 35 %. Wir haben 23 Operationen, davon leben heute noch 12, das sind über 50 %. Auch hier liegt die Mehrzahl der Beobachtungszeit eher bei 10 als bei 5 Jahren. Grundvoraussetzung für jede derartige Therapie ist eine möglichst vollständig durchgeführte Radikal- oder Total-Chirurgie zur Schwächung des Tumors. Wir sind der Ansicht, daß es möglich ist, durch die Chirurgie den Tumor in ein niedrigeres Stadium herabzustufen, und daß wir dann mit additiven Therapien wesentlich bessere Erfolge haben. Das klassische Beispiel dafür ist das Prostatakarzinom. Mit unseren Kombinationen aus möglichst radikaler Operation und antitumoraler Behandlung mit NEYTUMORIN haben wir die Überlebenszeit von unter 35 auf 60 % gesteigert. Der Resttumor scheint mit dieser Therapiekombination also eher beherrschbar.

Herr STIEFEL: Die Zahlen von Herrn REUTER sind so beeindruckend, daß wir verpflichtet sind, dieses antitumorale Prinzip an repräsentativen Patientenkollektiven zu überprüfen, um wirklich auf reproduzierbare Werte zu kommen. Im Laufe dieser Diskussion haben wir gesehen, daß die Wirkungsmechanismen von NEYTUMORIN in der Grundlagenforschung sehr gründlich untersucht werden. Wir haben aber auch gesehen, daß in der Praxis und in der Klinik Fälle vorhanden sind, die uns dazu zwingen, dieses Anti-Tumor-Prinzip weiter zu verfolgen. Wir haben auch über die Notwendigkeit gesprochen, reproduzierbare Aussagen über klinische Doppelblindstudien zu gewinnen. Allerdings sind hier Studiendauern von mehreren Jahren in Kauf zu nehmen. Die Frage ist nur, wie weit man heute schon dem Praktiker empfehlen kann, aufgrund der bis jetzt vorliegenden Erkenntnisse aus Forschung und Praxis, NEYTUMORIN bei seinen Patienten einzusetzen. Dazu kann von unserer Seite gesagt werden, daß wir inzwischen weit über 100 Patienten übersehen, die in kontrollierten klinischen Studien mit NEYTUMORIN behandelt wurden. Eine mindest ebenso große Zahl wurde im Rahmen einer Feldstudie bei einzelnen Praktikern erfaßt. Die vorläufigen Ergebnisse sind sehr ermutigend, und wir werden diesen Weg konsequent bis zu einer gültigen statistischen Auswertung weiterverfolgen. Heute muß es dem Arzt zur Entscheidung überlassen werden, ob er bei der derzeitigen

unbefriedigenden Situation bei der chemo-therapeutischen Zytostase aufgrund der von uns bis jetzt vorgelegten experimentellen und klinischen Daten den Weg der biologischen Krebsbehandlung mit NEYTUMORIN wählt. Wir haben im Verlauf dieser Diskussion über Tumorpatienten geredet, ohne diese Patienten selbst zu Wort kommen zu lassen. Es ist deshalb sehr zu begrüßen, daß Herr TÜRMER von der Liga für Krebsgefährdete in Wiesbaden sich bereit erklärt hat, im Rahmen dieser Diskussion über die Situation des Tumorpatienten bezüglich der biologischen Tumorbehandlung Stellung zu nehmen.

Herr TÜRMER: Ich selbst bin Krebspatient, der vor 16 Jahren Darmkrebs hatte, dann geheilt wurde mit biologischen Heilweisen, auch VITORGAN-Präparaten in letzter Zeit. Aus über 200 Büchern der Krebsliteratur habe ich ein Merkblätterprogramm entwickelt, wie ein Tumorpatient seine Lebensweise, seine Ernährung, seine körperliche Aktivierung und seine seelisch-geistige Einstellung umstellen muß, um damit die Therapie des Arztes zu unterstützen. Die von mehreren Studien, die z.T. im Auftrag der Bundesregierung durchgeführt wurden, festgestellte unbefriedigende Versorgung der Krebskranken hat mich bereits vor elf Jahren dazu veranlaßt, den Vorschlag zu machen, die gesundheitliche Versorgung der Krebskranken dadurch zu verbessern, daß man einen farbigen Rezeptblock für den praktischen Arzt einführt, damit diese Behandlung des Krebspatienten aus der Vierteljahres-Abrechnung herausgenommen wird. Damit könnten die Krankenkassen im Falle der Krebsbehandlung nicht mehr die Wirtschaftlichkeitsklausel heranziehen und den Arzt zum Regress laden, wenn er den Krebspatienten ausreichend mit Präparaten versorgt. Verschärft wurde dieser Aspekt durch das Kostendämpfungsgesetz, das die Möglichkeiten des Arztes gegenüber seinem Krebspatienten weiter einschränkt. Mein zweiter Vorschlag war die Einführung eines Krebspasses, damit von der Entdeckung des Tumors durch den Hautarzt oder durch den Patienten selbst über die klinische Behandlung, Operation, über die Nachsorgeklinik bis hin zum Hausarzt ein Pass geführt wird, der festhält, was mit dem Patienten alles geschehen ist und weiter durch den Hausarzt geschehen sollte. Drittens ist die Überprüfung von biologischen Methoden zur Krebsbehandlung in einer Klinik durch ein gemischtes Ärzteteam unumgänglich, um die Effektivität der ganzheitlich internen Tumortherapie als zusätzliche vierte Waffe gegen den Krebs (Prof. ZABEL) wissenschaftlich nachzuweisen.

Herr STIEFEL: Herr TÜRMER, Sie haben die derzeitige Situation des Krebspatienten sehr deutlich akzentuiert. Auf der einen Seite gibt es heute mehr denn je Krebspatienten, die eine Chemo-Therapie nicht vertragen oder ablehnen, und die wir optimal biologisch behandeln sollten. Und hier können wir nach all dem, was wir bis heute wissen, die Behandlung mit NEYTUMORIN als ein aussichtsreiches

Konzept empfehlen. Wir haben aber auf der anderen Seite die Verpflichtung, durch Grundlagenforschung sowie durch exakte klinische Studien den Beweis zu erbringen, daß wir mit NEYTUMORIN, vor allen Dingen mit der NEYTUMORIN-Sol Reihe, eine eindeutig antitumorale Wirkung objektivieren können. Wir sollten uns jedoch nicht dazu verleiten lassen, die Reduzierung großer Tumormassen mit den bisherigen Methoden der Chirurgie, der Strahlentherapie und der Chemo-Therapie zu unterlassen. Vielmehr sollten wir uns solange noch mit NEYTUMORIN als Ergänzung bisheriger Methoden zufrieden geben, bis wir Möglichkeiten und Grenzen dieses Präparates eindeutig nachgewiesen haben. Ich möchte daher diesen sehr vielschichtigen, von vielen Einzelproblemen getragenen Workshop abschließen. Wenn wir mit nach Hause nehmen, daß wir mit NEYTUMORIN über ein biologisches Anti-Tumor-Konzept verfügen, das die Lebensqualität des Patienten verbessert, die Effizienz üblicher Therapiemethoden anhebt, Nebenwirkungen reduziert und gleichzeitig einen Tumortherapeutischen Effekt erzielt, so hat sich diese Diskussion sicherlich gelohnt.

i.v.-gängiges NEY-TUMORIN-SOL:

ein entscheidender Fortschritt in der Onkotherapie

Th. STIEFEL

Forschungslaboratorien Karl Theurer für Organo- und  
Immunotherapie, Stuttgart-Ostfildern

Die heutige Krebsforschung beschäftigt sich in erster Linie mit der Verfeinerung und Verbesserung der derzeitigen Möglichkeiten der Krebstherapie. So wird an neuen diagnostischen Verfahren gearbeitet, die eine frühere Erkennung von Krebs ermöglichen sollen, Operations- und Bestrahlungsmethoden werden optimiert, chemotherapeutische Schemen weiter variiert, um damit die Hauptprobleme der starken Nebenwirkungen bei geringem therapeutischen Effekt anzugehen.

Neben diesen "klassischen" Methoden "Stahl, Strahl, Chemotherapie" wird jedoch vor allem in den USA ein Trend immer offensichtlicher: Die Erforschung, gezielte Stimulation und damit Nutzbarmachung körpereigener Krebsabwehrmechanismen. Der gesunde Organismus verfügt über verschiedene Möglichkeiten, Tumorzellen unschädlich zu machen. Erkennt das Immunsystem Tumorzellen als "fremd", so ist es in der Lage, durch die Bildung von Antitumor-Antikörpern oder durch Produktion von Killerzellen gegen den Tumor vorzugehen. Neben diesen komplexen Abwehrmechanismen des Immunsystems verfügt ein gesunder Organismus jedoch auch über Faktoren, die das Wachstum und die Malignität von Tumorzellen direkt beeinflussen können. Die Bildung dieser Faktoren hängt sehr eng mit der interzellulären Regulation innerhalb von Geweben zusammen und dürfte deshalb entwicklungs-geschichtlich vor der Bildung des Immunsystems anzusiedeln sein. Diese beiden Wege körpereigener Tumorabwehrmechanismen haben zu zwei neueren Antitumorkonzepten geführt, die heute intensiv erforscht werden.

1. Durch neue Zellkulturtechniken können monoklonale Antikörper, die gegen bestimmte Tumortypen gerichtet sind, in großen Mengen gewonnen werden. Die große Schwierigkeit derartiger Antitumorkonzepte ist jedoch die Spezifität solcher monoklonalen

Antikörper. Bis heute ist es noch nicht gelungen, Antikörper mit einem Spezifitätsgrad zu produzieren, der die alleinige Anreicherung am Tumor gewährleistet.

2. Andererseits kennt man inzwischen Substanzen, meist biologischen Ursprungs, die in der Lage sind, das Verhältnis zwischen Tumor und Wirt zu Ungunsten des Tumors zu verändern. Diese Substanzen werden als "Biological Response Modifiers" bezeichnet. In den Vereinigten Staaten gibt es bereits ein nationales Forschungsprogramm, das sich ausschließlich diesen zukunfts-trächtigen Substanzen widmet. Die Wirkstoffe, die die Kriterien der "Biological Response Modifiers" erfüllen, können in mindestens zwei Richtungen wirken:

- Stimulierung und Verstärkung der körpereigenen immunologischen Abwehrmechanismen und
- direkte regulative Inhibition der Tumorzellen.

Diese Wirkungsmechanismen werden aufgrund ausgedehnter experimenteller Grundlagenforschung bei dem Präparat NEYTUMORIN diskutiert, das damit der Gruppe von biologisch aktiven Response Modifiern zuzuordnen ist. Alle bisherigen in vitro- und in vivo- Untersuchungen zur tumorhemmenden Wirkung von NEYTUMORIN haben gezeigt, daß zur Erzielung eines maximal tumorhemmenden Effekts Mindestkonzentrationen erforderlich sind, die im Bereich von  $10^{-4}$  g Protein/1 Mio. Tumorzellen bei in vitro-Testsystemen und bei  $10^{-2}$  g/kg Körpergewicht bei tierexperimentellen Tumormodellen liegen.

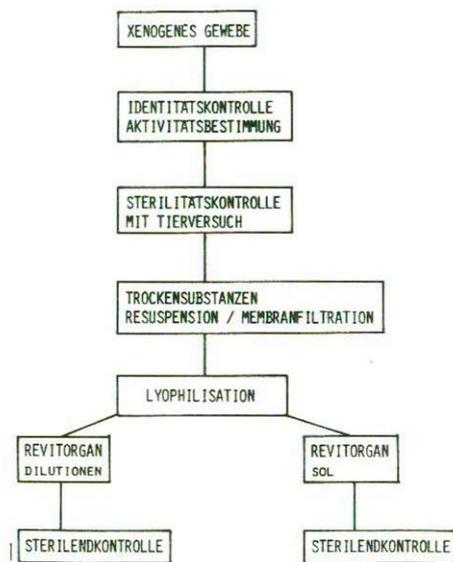
Der Einsatz von NEYTUMORIN am Menschen erfordert deshalb Tagesdosen bis zu 0,5g, die mit den bisher zur Verfügung stehenden galenischen Formen nicht zu erreichen waren. Auch die intramuskuläre Applikation der bisherigen 15 mg Trockensubstanzen erlaubte nicht die Erzeugung genügend hoher NEYTUMORIN-Spiegel, um massiv gegen den Tumor vorzugehen. Der therapeutische Einsatz hochdosierten NEYTUMORINS setzte deshalb die Umstellung auf eine i.v.-gängige NEYTUMORIN-Präparation voraus. Diese Anforderung erfüllt die lösliche Ausgangssubstanz für die Herstellung der NEYTUMORIN-Dilutionen. Der Ersatz der bisher nur suspendierbaren Trockensubstanz durch dieses volllösliche Lyophilisat setzte allerdings die Ent-

Wicklung großtechnischer Produktionsverfahren voraus. Das patentierte vitOrgan-Herstellungungsverfahren (DBP 1 090 821) liefert dafür die erste Voraussetzung, da es durch partielle Sulfatierung der Organpräparate die Wasserlöslichkeit ermöglicht und fördert. Der Gehalt wasserlöslicher Bestandteile aus dem Zytoplasma von Organzellen konnte mit diesem Herstellungsverfahren gegenüber der reinen wässrigen Extraktion deutlich verbessert werden. Die Isolierung der aktiven löslichen Komponenten unter völlig sterilen Bedingungen setzte jedoch die Entwicklung völlig neuer Produktionsmethoden voraus (Abb.1). Mehrjährige Entwicklungsarbeiten haben nunmehr einen Produktionsweg eröffnet, der die Herstellung größerer Mengen volllöslicher NEYTUMORIN-Lyophilisate ermöglicht\*. Zur Unterscheidung dieser Präparategeneration von den bisherigen Trockensubstanzen wurde der Begriff "Solubile" gewählt, der zur Bezeichnung <sup>1</sup>NEYTUMORIN-SOL<sup>1</sup> geführt hat. Mit dieser Substanz wurden nunmehr umfangreiche in vivo- wie auch in vitro-Untersuchungen durchgeführt, um die unverminderte tumorhemmende Wirkung nachzuweisen. Die Zugabe von NEYTUMORIN-SOL zu verschiedenen Tumorzellkulturen (Abb.2) bewirkte eine dosisabhängige Inhibierung der DNA-Synthese. Mit dem gleichen Präparat wurden Normalzellen in ihrer DNA-Synthese nicht inhibiert, sondern eher dosisabhängig stimuliert (1-4). Auch im Tierversuch erwies sich diese Präparation in verschiedenen Tumormodellen als sehr erfolgreich (5).

Der Einsatz am Menschen setzte zunächst die Prüfung der Verträglichkeit in hoher Dosierung voraus. Privatdozent KISSELER, Kreis-krankenhaus Böblingen, prüfte deshalb in einer Phase-I-Studie an 31 Tumorpatienten die Verträglichkeit nach intravenöser Applikation von NEYTUMORIN-SOL. Da es sich auch bei diesen löslichen Faktoren um xenogene Peptide und Proteine handelt, die eine gewisse Antigenität besitzen, muß vor Einsatz des NEYTUMORIN-SOL mit NEYTUMORIN-Dilutionen einschleichend behandelt werden, um im Sinne einer spezifischen Hyposensibilisierung eine immunologische Toleranz gegenüber den Antigenstrukturen des Präparates zu erzeugen (6). Somit kann die intravenöse Applikation von NEYTUMORIN-SOL erst nach einer 1-2 tägigen Behandlungsserie mit NEYTUMORIN-Dilutionen in ansteigender Konzentration erfolgen. Nach dieser Toleranz erzeu-

\* Besondere Verdienste um die Entwicklung neuer Produktionsverfahren haben sich Herr Dr. PORCHER, Herr O.KOTTWITZ und Frau Dipl.-Ing. S. WOLFGRAMM erworben.

genden Behandlung können bis zu 20 Ampullen NEYTUMORIN-SOL in 1000 physiologischer Kochsalzlösung gelöst als Infusion appliziert werden .



**Abb. 1: Schema der Herstellungsschritte und Inprozesskontrollen bei der NEYTUMORIN-SOL-Produktion**

Die Tabelle 1 zeigt die Diagnostik, die bei der Phase-I-Studie mit NEYTUMORIN-SOL an 31 Tumorpatienten angewandt wurde. Neben den Laborwerten BSG, Großes Blutbild, LDH, Serum-Elektrophorese, wurden insbesondere die Verläufe der Tumormarker CEA, TPA und Ferritin geprüft. Daneben wurde die Lage des Tumors durch Röntgenthorax in zwei Ebenen sowie durch Szintigramme der Organe Lunge, Knochen,

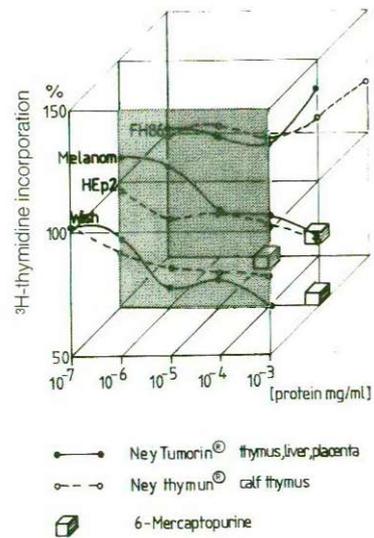


Abb. 2: Dosis-Wirkungsrelation von NEYTUMORIN-SOL und NEYTHYMUN bei malignen und benignen Zellen in Kultur, verglichen mit 6-Mercaptopurin. Tumorzellen Melanom, HEP-2, Wish; Diploide Fibroblasten: FH-86

Leber und Hirn objektiviert. Die Auswertung der Studie (Tabelle 2) ergab, daß 19% der Patienten Nebenwirkungen im Sinne eines Exanthems, Juckreiz, Kreislaufbeschwerden aufwiesen. Alle diese Nebenwirkungen waren reversibel durch Gabe von Antihistaminika, Kalzium oder Cortison. Keine Nebenwirkungen zeigten sich bei 81 % der Patienten. Eine örtliche Venenreizung war bei keinem der Patienten zu beobachten. In Tabelle 3 und 4 sind diese Werte nochmals zusammengestellt. Bei denjenigen Patienten, bei denen Nebenwirkungen festzustellen waren, wurden Serumproben entnommen und auf ihren Antikörpergehalt gegen NEYTUMORIN-SOL geprüft. Mit den eingesetzten Methoden (.Immunelektrophorese) konnten bei keinem Patienten Anti-NEYTUMORIN-SOL-Antikörper nachgewiesen werden, die bei einer Sensibilisierung gegen das Präparat hätten nachweisbar sein müssen.



## 10 Patienten mit MAMMAKARZINOM

Bei allen Patienten KEINE VENENREIZUNG  
 Bei 7 Patienten GUTE VERTRÄGLICHKEIT  
 KEINE NEBENWIRKUNGEN  
 Bei 3 Patienten EXANTHEM, JUCKREIZ,  
 KREISLAUFBESCHWERDEN,  
 (Durch Gabe von Ca,  
 Antihistaminika, Cortison  
 reversibel)

Tab.3: Ergebnisse der Verträglichkeitsstudie bei 10 Patienten mit Mammakarzinom

TUMOR	GESCHL.	NEBEN- WIRK.	VENEN- REIZG.	SUBJ. VER- TRÄGLICHK.	AK g. NEYT.
PROSTATA	♂	KEINE	KEINE	+	
PROSTATA	♂	KEINE	KEINE	+	
PROSTATA	♂	+	KEINE	-	-
BRONCHIAL	♂	KEINE	KEINE	+	
	♂	KEINE	KEINE	+	
	♂	KEINE	KEINE	+	
	♂	KEINE	KEINE	+	
	♂	KEINE	KEINE	+	
COLON	♂	KEINE	KEINE	+	
	♂	KEINE	KEINE	+	
OROPHARYNX	♂	KEINE	KEINE	+	
SCHILDDRÜSE	♂	+	KEINE	-	-
OVARIAL	♂	KEINE	KEINE	+	
HYPOPHARYNX	♂	KEINE	KEINE	+	
HYPERNEPHROM	♂	KEINE	KEINE	+	
M. HODGKIN	♂	+	KEINE	-	-
ADENO	♂	KEINE	KEINE	+	
ZUNGE	♂	KEINE	KEINE	+	
WEICHTEIL HALS	♂	KEINE	KEINE	+	
CERVIX	♂	KEINE	KEINE	+	
COECUM	♂	KEINE	KEINE	+	
UNTERLIPPEN-CA	♂	KEINE	KEINE	+	

Tab.4: Auswertung der Verträglichkeitsstudie (Phase I) von NEYTUMORIN-SOL und Ergebnisse der Antikörperuntersuchungen gegen NEYTUMORIN.

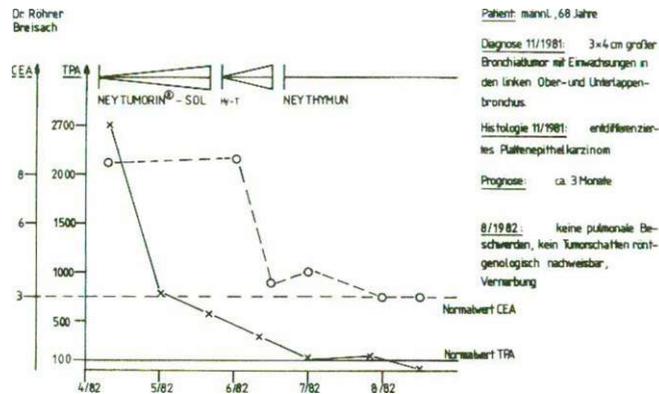


Abb. 3: Verlauf der Tumormarker CEA (Carcino-embryonal Antigen) und TPA (Tissue Polypeptide Antigen) bei einem Patienten mit einem Bronchialtumor (Oberarzt Dr. RÖHRER, Rosmann-Krankenhaus, Breisach).

Inzwischen liegen auch erste Befunde zur therapeutischen Wirkung des NEYTUMORIN-SOLs in dieser hohen Dosierung vor (7). Danach scheint sich die Behandlung mit NEYTUMORIN-SOL in einer Reduzierung der Tumormasse sowie in einer Normalisierung von Tumormarkern auszuwirken. In Abbildung 3 ist der Verlauf zweier Tumormarker (CEA und TPA) bei einem Patienten mit einem 3x4 cm großen Bronchialtumor mit Einwachsungen in den linken Ober- und Unterlappenbronchus dargestellt. Die Histologie ergab im November 1981 ein entdifferenziertes Plattenepithelkarzinom mit einer Überlebensprognose von ca. 3 Monaten. Im April 1982 wurde eine NEYTUMORIN-SOL-Behandlung durchgeführt. Ab Juli 1982 wurde die Behandlung mit NEYTHYMUN-Dilutionen Stärke III fortgeführt. Im August 1982 konnte röntgenologisch kein Tumorschatten mehr nachgewiesen werden, die pulmonalen Beschwerden des Patienten waren deutlich gebessert. Die Tumormarker lagen zu dieser Zeit bereits im Normalbereich.

Solche Einzelergebnisse dürfen jedoch nicht überbewertet werden, vielmehr muß die Wirksamkeit von NEYTUMORIN-SOL unter härtesten statistischen Kriterien an größeren Patientenzahlen überprüft werden. Randomisierte klinische Studien dieser Art werden zur Zeit an mehreren Kliniken durchgeführt; die statistische Auswertung wird in 1-2 Jahren vorliegen. Die endgültige therapeutische Beurteilung des NEYTUMORINS muß diesen statistischen Auswertungen vorbehalten bleiben.

Dennoch weist NEYTUMORIN gegenüber den herkömmlichen Chemozytostatika einige Vorteile auf, die sich aufgrund der experimentellen Untersuchungen schon heute klar abzeichnen: Während Chemozytostatika auch gesundes Gewebe massiv angreifen und so zu erheblichen Nebenwirkungen führen, inhibiert NEYTUMORIN selektiv die Proliferation von Tumorzellen. Die Verträglichkeit, auch in extrem hohen Dosen, ist gut. Die radikale Reduzierung großer Tumormassen wird jedoch mit diesem biologischen Modifizier kaum zu erwarten sein. Hier wird nach wie vor die Entfernung eines klinisch manifesten Tumors mit Hilfe der Chirurgie oder der Radiologie die Möglichkeit der Wahl bleiben. NEYTUMORIN-SOL wird jedoch bei der präoperativen Rückbildung peritumorale Entzündungen und zur Vorbereitung eines klar abgegrenzten Operationsfeldes, bei der Prophylaxe von Mikrometastasen, zur Roborierung zwischen Zytostatikastößen und der Strahlentherapie, zur adjuvanten Tumorthherapie, zur postoperativen Nachbehandlung, zur Rezidivprophylaxe und bei der palliativen Tumorthherapie neue Perspektiven in der Onkologie eröffnen.

#### Literatur

1. PAFFENHOLZ, V., THEURER, K.: Einfluß von makromolekularen Organ-substanzen auf menschliche Zellen in vitro. I. Diploide Kulturen. Z. Kassenarzt 27, 5218-5226 (1978)
2. PAFFENHOLZ, V., THEURER, K.: Einfluß von makromolekularen Organ-substanzen auf menschliche Zellen in vitro. II. Tumorzellkulturen. Z. Kassenarzt 19, 1876-1887 (1979)

3. PAFFENHOLZ, V. : Different Effects of thymus extracts on human fibroblasts and cancer cells in culture. In: Structure and Activity of natural peptides. (Eds. W. VOELTER, G.WEITZEL) 539-546 (1981)
4. LETNANSKY, K.: Inhibition of thymidine incorporation into the DNA of normal and neoplastic cells by a factor from bovine maternal placenta: in the action of the inhibitor with cell membranes. Bioscience Reports **2**, 39-45 (1982)
5. MUNDER, P.D., STIEFEL, Th., WIDMANN, K.H., THEURER, K.: Antitumorale Wirkung xenogener Substanzen in vivo und in vitro. Onkologie **5**, 2-7 (1982)
6. THEURER, K.E., THEURER, K.G.: Immunologisch tolerogene, intravenöse Anwendung von xenogenen makromolekularen Organextrakten bei chronischen Erkrankungen und Leiden. In: Organo- und Immunotherapie als neue Denkweise in der Medizin (Eds.K. THEURER, G.F. DOMAGK, H. KRAFT) 56-64 (1982).
7. RÖHRER, H.: Persönliche Mitteilung 1982

Was leistet die Therapie mit REVITORGAN-Präparaten  
und der Gegensensibilisierung bei rheumati-  
schen Krankheitsbildern?

A. KEITEL  
Lüdenscheid

Innerhalb von 4 Jahren wurden mehr als 100 Patienten nach den vorliegenden Schemata mit REVITORGAN-Präparaten behandelt. Das Alter der Patienten lag zwischen 25 und 70 Jahren. Alle waren bereits über Jahre in üblicher Form und mit allen neu entwickelten Präparaten behandelt worden, ohne daß der erwünschte Erfolg eintrat. Nachdem die Behandlung mit zytoplasmatischer Therapie und der GS wirkungsvoll war, kam auch der Wunsch nach der gleichen Therapie bei anderen Erkrankungen. So nahm die Behandlung klimakterischer Beschwerden zu. Während bei arthrotischen und rheumatischen Beschwerden die Dilutionen Nr. 43 und 68 Verwendung fanden, wurden hier die Dilutionen Nr. 60, 61 und 64 angewandt. Depressionen unklarer Genese konnten mit den Präparaten Nr. 11, 23 und 64 positiv beeinflußt werden.

Auch die Behandlungserfolge beim Asthma waren sehr überzeugend. Die zwischen 40 und 65 Jahre alten Patienten mit seit Jahrzehnten bestehenden Beschwerden wurden nach ihren Berichten eindrucksvoll gebessert. Nach Durchführung der vorgeschlagenen Therapie wurde in einigen Fällen auch mit einer allein angewandten GS der Erfolg noch verbessert. Röntgenologisch wurden in einigen Fällen erstaunliche Besserungen des Lungenbefundes festgestellt.

Zusammenfassend darf man sagen: Die zytoplasmatische Therapie heilt und hilft - besonders bei gleichzeitiger Anwendung der GS; sie hält Verschlechterungen in hohem Maße auf. Besonders bei hyperergisch-allergischen Erkrankungen sollte man auf die GS nicht verzichten. In letzter Zeit wurde grundsätzlich - mit Erfolg - Dilution Nr. 29 dazugegeben.

Therapie der chronischen Polyarthritits  
nach immunologischen Gesichtspunkten

Z. HOFFMANN  
Stuhr - Brinkum

In der vorliegenden katamnesticen Studie werden die Ergebnisse einer neuartigen ambulanten Therapie mit sogenannten "biological response modifiers" bei 150 Patienten beschrieben, die an progressiver chronischer Polyarthritits erkrankt waren. Bei allen Patienten war bereits eine klassische Basistherapie mit Antirheumatika und Antiphlogistika durchgeführt worden. Diese Therapieformen mußten wegen Unverträglichkeit abgesetzt werden; andere Probanden des Patientengutes waren gegen die klassischen Pharmaka therapieresistent.

Diagnostik und Einteilung der Erkrankungsstadien erfolgte nach den Richtlinien der American Rheumatism Association. Die Therapie erfolgte nach einem Mehrstufenschema, bei dem die polypeptidhaltigen Präparate zunächst einschleichend dosiert wurden. Zur Anwendung kamen die Präparate NEYARTHROS, NEYTHYMUN F, NEYNORMIN und NEYTROPH. Appliziert wurden die Substanzen subcutan; bei NEYARTHROS z.T. auch intraartikulär. Gleichzeitig wurde eine immunbiologische Behandlung mit autologen Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten (Gegensensibilisierung und Hydrolysat) durchgeführt. Bei etwa 50% aller Stadien trat eine Konversion des zuvor positiven Rheumafaktors ein. Im Stadium I waren nach der Behandlung 93%, im Stadium II 69% und im Stadium III 24% frei von Entzündungen und Medikamenten. Das ist in der Rheumatherapie allgemein die positivste Formulierung, die für jegliche Therapieform gilt. Die therapeutische Effizienz dieser neuartigen Behandlungsmethode zwingt zur weiteren Analyse der Wirkungsmechanismen sowie zu breit angelegten prospektiven klinischen Doppelblindstudien.

Eine Statistik von RAINER und ULREICH hat ergeben, daß 30% aller cP-Patienten ihre Basistherapie wieder abbrechen müssen. Das bedeutet, daß die Klinik ein Therapieprogramm aufgestellt hat, den Patienten in die ambulante Praxis entläßt, wo sich dann nach eini-

ger Zeit die Unverträglichkeit einstellt. Diese Praxis hat sich nun mit dem Versagen der chemischen Immunsuppression und der evtl. Allergie auseinanderzusetzen. Für 30% aller cP-Patienten ist mithin eine alternative Therapieform notwendig. Diese Form der biologischen Immunsuppression wurde an 300 cP-Patienten durchgeführt, davon wurden 150 Fälle mit einer Beobachtungszeit von 1 1/2-4 Jahren ausgewählt und vorgestellt.

Eine kausale Therapie chronisch progredienter Arthritiden wird durch die heute zur Verfügung stehenden Chemopharmaka nur in Ansätzen ermöglicht. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß die Grundlagenforschung noch zu wenig über die Mechanismen weiß, die für den Verlauf dieser Erkrankungen verantwortlich sind. Eine Gruppe pharmakologisch aktiver Substanzen, die sog. "biological response modifiers", scheinen eine neue Ära in der Behandlung rheumatischer Erkrankungen einzuleiten. Diese äußerst komplexen Gemische aus Proteinen und Peptiden werden nach patentierten Herstellungsverfahren aus tierischen Organismen isoliert und in speziellen Bioassays nach ihrer biologischen Aktivität standardisiert. Diese natürlichen Faktoren greifen physiologisch in den Zellmetabolismus ein, ohne den Organismus zu schädigen.

Die therapeutischen Ansatzpunkte einer sinnvollen biologischen Behandlung der progressiv-chronischen Polyarthrititis müssen demnach auf drei Ebenen liegen:

1. Die Hyperreagibilität des Immunsystems muß allgemein gedämpft werden. Hierzu wird das biologische Immunsuppressivum NEYTHYMUN F, das fetale Thymushormone enthält, eingesetzt. Andererseits müssen immunopathogene Antigen-Antikörper-Reaktionen spezifisch - also selektiv - zurückgedrängt werden. Dies wird durch Einsatz autologer Antikörper und Antikörperfragmente (Gegensensibilisierung und Hydrolysat) erreicht.
2. Der Stoffwechsel und die mitotische Aktivität der Schleimhäute, die Ort der chronisch rezidivierenden Infekte sind, müssen reaktiviert werden. Dazu erwies sich NEYNORMIN für Rachenraum und Luftwege oder NEYNEPHRIN für die Harnwege als besonders gut wirksam.
3. Der Stoffwechsel und die mitotische Aktivität der Chondrozyten sowie der Stoffwechsel der Mesothelzellen der Synovialis müssen

reaktiviert werden. Dazu erwies sich das Präparat NEYARTHROS als besonders geeignet, da die in diesem Präparat enthaltenen Faktoren aus Knorpelgewebe die Mitose der Chondrozyten nachhaltig aktivieren.

Andererseits wird in diesen Zellen die Syntheserate der sauren Glykosaminoglukane signifikant gesteigert. Diese Effekte erklären auch die Zunahme der Elastizität eines bereits arthrotisch veränderten Knorpelgewebes, wie sie von DAHMEN u. Mitarb. durch Inkubation von arthrotisch veränderten Gelenkknorpelfragmenten mit NEYARTHROS demonstriert werden konnte.

Die Wirksamkeit dieser Antigenisierung autologer pathogener Antikörper wurde von SEIFERT u. Mitarb. an mehreren Tiermodellen nachgewiesen. Der zweite Bestandteil der Serumkur (Hydrolysat) wirkt über einen kompetitiven Mechanismus der pathologischen Aktivierung des Komplementsystems entgegen.

#### Durchführung der Behandlung

Eine Behandlungskur dauerte ca. 2 Monate (Therapieschema siehe Abb.1). Sehr wichtig ist die einschleichende Dosierung dieser Präparate, beginnend mit Stärke I der Dilutionen ( $10^{-12}$  g Prot./ml) über Stärke 1

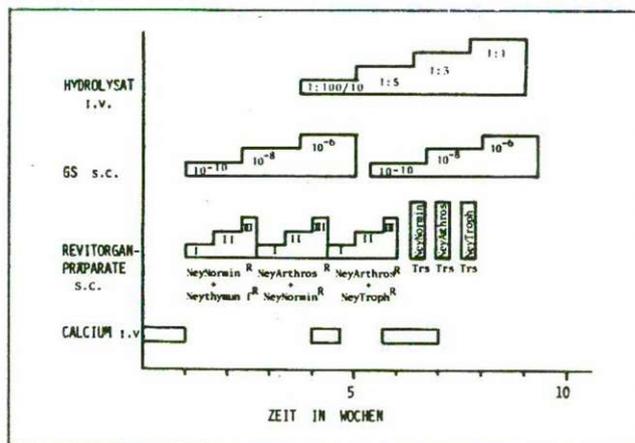


Abb. 1s Behandlungsschema der katamnesticen Studie an 150 ambulanten Patienten mit progressiv-chronischer Polyarthrititis.

( $10^{-9}$  g Prot./ml), Stärke III ( $10^{-6}$  g Prot./ml) zu den Trockensubstanzen (15 mg), die nach Suspension mit dem beigelegten Lösungsmittel intramuskulär appliziert werden. Die autologen Antikörperbehandlungen wurden ab dem 10. Behandlungstag ebenfalls in ansteigender Dosierung vorgenommen.

Bei veralteten und austherapierten Fällen wird man eine 2. Kur gleich anschließen müssen, um zu Erfolg zu kommen.

#### Patientengut

In einem Zeitraum von 4 Jahren wurden in unserer Ambulanz 150 nach statistischen Kriterien ausgewählte Patienten mit chronisch-progredienter Polyarthrititis mit dem angegebenen Therapieschema behandelt. Die Patienten befanden sich in den Stadien I (n=57), II (n=59) und III (n=34) der Erkrankung. Die Hälfte der Patienten wiesen einen positiven Rheumafaktor, aber alle eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit auf. Bei Beginn der Behandlung wurden die Patienten nach den Richtlinien der American Rheumatism Association in die Stadien I - III eingeteilt. Die obligatorischen und möglichen zusätzlichen Kriterien, nach denen die Patienten anhand ihrer Beschwerdebilder in diese Stadien eingeteilt wurden, sind in Tab.1 ausführlich angegeben. Bei 80% der Patienten hatt eine zuvor durchgeführte klassische Basistherapie nicht den erhofften Erfolg, sie litten unter den typischen starken Nebenwirkungen.

Stadium	Klinisches Bild
I	1 Arthralgien, keine klinischen oder serologischen Entzündungszeichen
II	1 Arthralgien
	2 Entzündungszeichen in einem oder <i>mehreren Gelenken</i>
	3 röntgenologisch <i>keine Gelenkveränderungen</i>
III	(4) gelegentlich beginnende, <i>gelenknahe Osteoporose</i>
	1 Polyarthrititis
	2 röntgenologisch: <i>Osteoporose</i> mit beginnenden <i>Skelettdestruktionen</i> , beginnende <i>Knorpelschäden</i>
	3 keine Deformierung, allerdings beginnende <i>Einschränkung der Beweglichkeit</i>
	(4) Atrophie benachbarter Muskelpartien
IV	(5) extraartikuläre Bindegewebsschäden ( <i>Knötchen, Tendovaginitis</i> )
	1 Polyarthrititis
	2 röntgenologisch: Nachweis von <i>Knorpel- und Kochenschäden</i> , Osteoporose
	3 Gelenkdeformierung ( <i>Subluxation, Ulnardeviation, Hyperextension</i> ) ohne Ankylose
	(4) ausgeprägte <i>Muskelatrophie</i>
(5) wie bei II	

Kursive Zahlen — obligatorische Zeichen  
Zahlen in Klammern - mögliche zusätzliche Zeichen

#### Untersuchungskriterien und -methoden

Für die Verlaufsuntersuchung der Patienten wurden ebenfalls die von der American Rheumatism Association empfohlenen Untersuchungsmethoden angewendet. Ebenso wurde der Gelenkindex nach RITCHIE erstellt und die Greifkraft durch Messung mittels eines Vigrometers ermittelt. Unter den routinemäßig durchgeführten Laboruntersuchungen wurde in erster Linie die Normalisierung der bei Behandlungsbeginn in allen Fällen erhöhten BKS beurteilt. Ebenso wurde die Normalisierung von Blutbildverschiebungen berücksichtigt. Als Normalbereiche wurden die Daten des Systeme International d'Unite herangezogen. Zur Bestimmung des Rheumafaktors wurde die Agglutinationreaktion des Latex-Rheumafaktortests verwendet.

Wie in den Abb.2 und 3 erkennbar, konnten im Stadium I bei 57% der Fälle eine Konversion des zuvor positiven Rheumafaktors erzielt werden. Eine Normalisierung der BSG und des Blutbildes wurde in 74% der Fälle erreicht. Nach Beendigung der Kurzbehandlung waren von den Patienten im Stadium I 93% völlig beschwerdefrei, sie hatten freies Gelenkspiel und gute Muskelkräftigung wieder erlangt. Bei weiteren 7% war die Gelenkfunktion wesentlich verbessert worden, sie waren schmerzfrei. 89% der Probanden dieser Gruppe benötigten nach der Kurzbehandlung überhaupt keine weitere Medikation.

Im Stadium II der Erkrankung konnte bei 57% der Fälle, bei denen vorher der Rheumafaktor positiv gewesen war, eine Konversion nachgewiesen werden. Die BSG normalisierte sich bei 64% der Probanden, das Differentialblutbild bei 51%. Nach der Kurzbehandlung waren in dieser Gruppe 69% der Patienten völlig entzündungs- und beschwerdefrei, und bei weiteren 26% konnte die Gelenkfunktion nachweislich verbessert werden. Nur bei 5% dieser Gruppe blieb die Gelenkfunktion unverändert. Jedoch waren nach beendeter Behandlung 85% dieser Gruppe völlig medikamentenfrei.

Im Stadium III der rheumatoiden Polyarthrititis konnte in 53% der Fälle eine Konversion des zuvor positiven Rheumafaktors erzielt werden. Bei 36% dieser Patienten wurde die BSG normal, bei 40% auch das Differentialblutbild. Nach der Behandlung waren 24% der Probanden völlig frei von Entzündungsschmerz und Medikamenten. Die Muskulatur kräftigte sich. In weiteren 52% der Fälle wurde die Funktion der Gelenke gebessert, sie benötigten nur noch eine geringe abendliche Dosis von Antirheumatika.

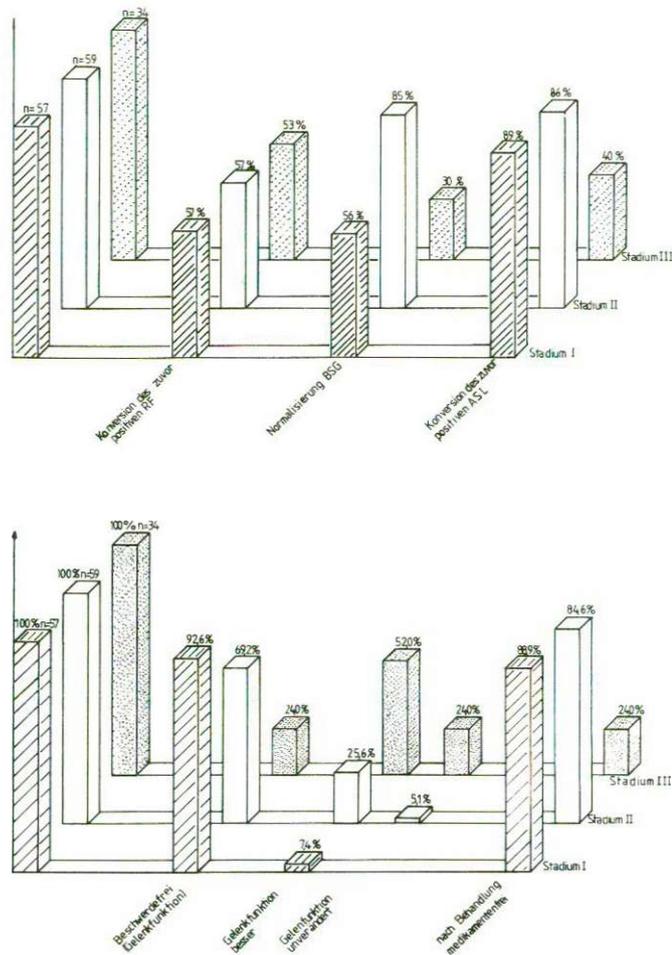


Abb. 2 und 3 : Ergebnisse der katamnestischen Studie an 150 Patienten mit progressiv-chronischer Polyarthritits der Stadien I, II und III nach ambulanter Behandlung mit Revitorgan-Präparaten

### Diskussion

Die durchgeführte Kurzbehandlung der Polyarthritiden nach dem angegebenen Schema hat sich im wesentlichen bei allen Probanden bewährt. Neben dem durch diese biologischen Präparate erzielbaren Therapieerfolg ist die gute Verträglichkeit der Präparate besonders zu erwähnen. So konnten bei keinem Patienten im Behandlungszeitraum unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet werden. Es konnte darüber hinaus in der Beobachtungszeit von 4 Jahren keine Progredienz der cP mehr nachgewiesen werden.

Die Konversionsrate der positiven Rheumafaktoren lag nach Beendigung der Therapie im Mittel bei immerhin 57%. Dieser Befund deutet auf einen kausaltherapeutischen Ansatz dieser Präparate auf immunologischer Ebene hin. BSG und Differentialblutbild normalisierten sich im Durchschnitt bei 60-85% der Patienten. Fast 90% der Kranken benötigten außerdem nach dieser biologischen Behandlung keine Antirheumatika mehr.

Da man bei dieser Behandlungsweise ohne Kortikosteroide auskommt, bietet sich hier die Möglichkeit, diejenigen Patienten zu behandeln, die die bisherige Basistherapie und Chemotherapie wegen Unverträglichkeit absetzen mußten. Durch dieses neuartige Behandlungsschema wurden dagegen bei keinem der Probanden allergische Symptome ausgelöst.

Bemerkenswert ist weiterhin die Tatsache, daß ätiologisch unterschiedliche cP-Fälle wie Bechterew, Arthropathia Psoriatica, M. Crohn, Lupus erythematodes durch entsprechende Anpassung der zytoplasmatischen Therapeutika gleichermaßen gut ansprachen.

Behandlung von Arthrosen mit zytoplasmatischen  
Substanzen in der Geriatrie -  
eine klinische Doppelblindstudie

K.-S. LACHNIT  
Pflegeheim der Stadt Wien - Lainz

In früheren Jahrestagungen konnte über Untersuchungen an alten geriatrischen Patienten berichtet werden. Dabei bezogen sich unsere Untersuchungen auf jene Organveränderungen, die im Alter am häufigsten betroffen sind, das Herz und das Gehirn. In der geriatrischen Praxis bestehen jedoch größte Schwierigkeiten mit den Gelenkveränderungen, den Arthrosen. Diese stellen für die Betroffenen einen hohen Leidenscharakter dar und sind zu den eigentlichen Altersbeschwerden zu rechnen, die das Alter in den meisten Fällen zur Last machen. Für die Therapie kennen wir neben der medikamentösen Behandlung, und hier sind es vor allem die nicht-steroiden Antirheumatika, lokale Maßnahmen und die physikalische Therapie bis hin zu den Bädern. Nebenwirkungen, Kontraindikationen und die gefürchteten Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten schränken die Arzneimitteltherapie im Alter erheblich ein. Aber auch die physikalische Therapie hat ihre Grenzen und stößt oft auf unüberwindliche technische Schwierigkeiten. Der Effekt ist meist eher bescheiden.

Die Entstehung der Arthrosen wird heute nicht mehr ausschließlich auf reine Abnützungerscheinungen zurückgeführt, sondern auf Veränderungen der Makromoleküle (Proteoglykane, Kollagen), besonders im Bereich des Gelenkknorpels. Es lag daher nahe, unsere guten Erfahrungen mit der zytoplasmatischen Organotherapie bei der Behandlung von kardialen und cerebralen Insuffizienzen, auch auf die Behandlung von Arthrosen im Alter auszudehnen.

42 Patienten mit bisher therapie-resistenten arthrotischen Veränderungen wurden ausgewählt und in Form einer randomisierten, kontrollierten klinischen Doppelblindstudie durch 6 Wochen hindurch untersucht. Das Alter der Patienten war zwischen 68 bis 93 Jahren,

mit einem Durchschnittsalter von 80 Jahren. Davon waren 5 Patienten Männer und 37 Patienten Frauen. Die Aufteilung in Diagnosen ergab Spondylarthrose, Coxarthrose und Gonarthrose. 2 Patienten fielen zu Beginn aus, so daß die tatsächliche Zahl 40 Patienten betrug. Die Versuchsanordnung zeigt Tab.1. Es ist zu bemerken, daß während der Studiendauer keine weitere antirheumatische Therapie gegeben wurde und zwar weder medikamentös noch physikalisch. Die Beurteilung erfolgte durch Prüfung der Wirbelsäule und der einzelnen Extremitätengelenke, und zwar hinsichtlich Schwellung, Druck- und Klopfempfindlichkeit, Ruheschmerz und Bewegungsschmerz. Bei den Extremitätengelenken wurden außerdem die Funktionen: Flexion und Extension, Abduktion und Adduktion, Innenrotation und Außenrotation, nach Winkelgraden gemessen und geprüft. Zuletzt erfolgte die Beurteilung durch den Arzt in: Gebessert, Keine Änderung oder Verschlechterung. Die Behandlung selbst erfolgte nach folgendem Schema:

Behandlungsschema: 2mal täglich 10 Tropfen NEYTROPH perlingual,  
NEYCHONDRIN, NEYARTHROS i.m.

	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
MD	NEY- ARTHROS Dil I NEY- CHONDRIN	NEY- ARTHROS Dil H NEY- CHONDRIN	NEY- ARTHROS Dil 11 NEY- CHONDRIN	NEY- CHONDRIN TS oder SOL
DI	NEY- ARTHROS NEY- CHONDRIN <sup>0 11 1</sup>			
MI	NEY- ARTHROS NEY- CHONDRIN <sup>0 11 11</sup>	NEY- ARTHROS NEY- CHONDRIN <sup>0 11 11</sup>		
DO			NEY- CHONDRIN TS oder SOL	
FR	NEY- ARTHROS NEY- CHONDRIN <sup>0 11 31</sup>	NEY- ARTHROS NEY- CHONDRIN <sup>Dil m</sup>		

Dil = Dilution; TS = Trockensubstanzen

Nach Beendigung der Studie wurden die Untersuchungsbögen gesammelt und zur Auswertung an das Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Wien (Prof. Dr. WOHLZOGEN) übersandt wobei ich besonders Herrn Dozent Dr. BAUER für die Mitplanung der Studie und die Auswertung der Untersuchungsbögen dankbar bin. Die Aufteilung der Gruppen in Verum- und Placebogruppe ergab in den Ausgangswerten keine statistisch gesicherten Unterschiede in Bezug auf Alter, Gewicht und Größe (Abb.1).

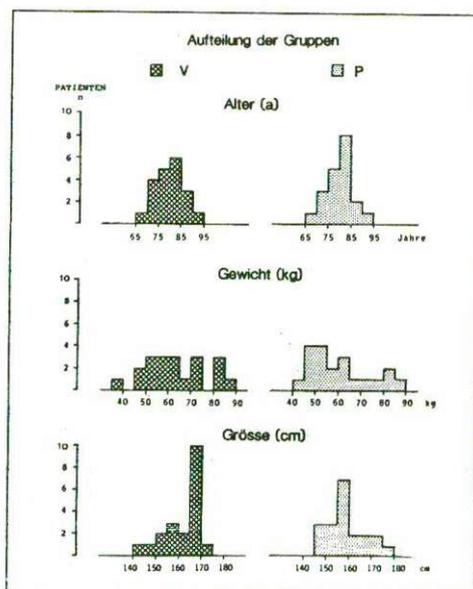


Abbildung 1 Ausgangswerte für Alter, Gewicht und Größe

Ähnliches zeigte sich auch in der Aufteilung nach der Lokalisation wobei sich ebenfalls keine Unterschiede ergaben.

Spondylarthrotische Veränderungen waren bei 16 Patienten in der Verumgruppe, bei 17 in der Placebogruppe. Veränderungen des Kniegelenks bei 11 Patienten in der Verumgruppe, bei 10 in der Placebogruppe und schließlich Veränderungen des Hüftgelenks bei 4 Patienten in der Verumgruppe und bei 5 in der Placebogruppe. Abb.2 zeigt die Veränderungen der spondylogenen Schmerzen, aufgeteilt nach Ruheschmerz und Bewegungsschmerz, innerhalb der einzelnen Abschnitte

## Veränderungen der spondylogenen Schmerzen

	Ruheschmerz			Bewegungsschmerz		
	NICHT GEBESSERT	GEBESSERT		NICHT GEBESSERT	GEBESSERT	
cerv.	V	0	4	0	6	p < 0,002
	P	4	3	10	1	
			N.S.			
thorak.	V	1	4	1	8	p < 0,01
	P	6	2	7	2	
			N.S.			
lumb.	V	0	7	1	8	p < 0,002
	P	6	1	9	1	
			p < 0,01			
ileosakr.	V	1	1	0	2	
	P	3	0	7	1	

Abb. 2: Veränderungen der spondylogenen Schmerzen im Verlauf der Studie nach Anzahl der Patienten

zervikal, thorakal, lumbal, ileosakral und getrennt nach Verum- und Placebogruppe. Wir finden vor allem signifikante Besserungen des Bewegungsschmerzes im zervikalen Abschnitt, im thorakalen Abschnitt, im lumbalen Abschnitt, in dem auch der Ruheschmerz signifikant gebessert ist. Für die Beurteilung der ileosakralen Veränderungen waren zu wenig Fälle, um eine deutliche Signifikanz herauszuarbeiten. Ähnliche Ergebnisse finden wir auch bei der Prüfung von Ruhe- und Bewegungsschmerz in den Knie- und Hüftgelenken, und zwar Besserung in beiden Gelenken, wobei sich allerdings in der strengen statistischen Auswertung keine Signifikanz ergab.

	G	C	Sp	G+Sp	G+C	C + Sp	G+C+Sp	
V (n)	3	0	5	4	1	4	3	20
P (n)	3	0	7	2	0	3	5	20
insgesamt	6	0	12	6	1	7	8	40

(G = Gonarthrose; C = Coxarthrose; Sp = Spondylarthrose)

		nicht gebessert		gebessert			
Gon-arthrose	V	1	6	N.S.	9	10	N.S.
	P	2	1				
Cox-arthrose	V	1	3	N.S.	6	v 2	N.S.
	P	1	4				

Die Änderung der Extremitätengelenke sei am Beispiel des Kniegelenkes dargestellt (Abb.3). Der Flexionswinkel, aufgeteilt in Graden, zeigt eine signifikante Besserung, wobei allerdings hier die statistisch gerechtfertigte Aufteilung in rechtes und linkes Kniegelenk klinisch ja eigentlich weniger relevant ist. Und schließlich ergibt die Beurteilung durch den Arzt eine statistisch gesicherte hochsignifikante Besserung in der Verumgruppe gegenüber der Placebogruppe von  $p > 0,001$  nach dem exakten Fisher-Test (Abb.4).

Zuletzt sei noch bemerkt, daß es während der Studie, abgesehen von den anfänglichen Ausfällen, zu keinem Abbruch kam und die Verträglichkeit gut war. Die Laborwerte waren unverändert. Nebenwirkungen

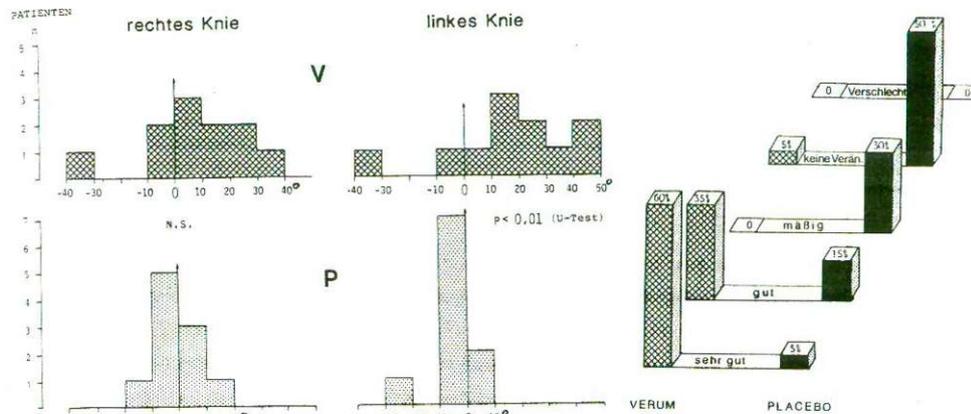


Abb. 3: Veränderungen des FlexionsWinkels

Abb. 4: Ärztliche Beurteilung

traten nicht auf. Diese Ergebnisse beweisen nicht nur die Korrektheit der Studiendurchführung, sondern geben uns vor allem den wichtigen Hinweis, daß mit der zytoplasmatischen Therapie auch die im Alter durch Arthrosen hervorgerufenen Beschwerden wirkungsvoll behandelt werden können.

#### Literatur

1. LACHNIT, K.-S.: Altern und Krankheit - ein makromolekulares Problem? Therapiewoche 30, 8023-8033 (1980)

#### Diskussion zu den Vorträgen von Z. HOFFMANN und K.-S. LACHNIT

Auditorium: Herr LACHNIT, wie haben Sie die Dilutionen appliziert? Intraartikulär oder subcutan?

Herr LACHNIT: Dilutionen können intraartikulär appliziert werden, Trockensubstanzen nicht. Da die Kriterien einheitlich sein sollten, haben wir sowohl die Dilutionen als auch die Trockensubstanzen intramuskulär verabreicht.

Auditorium: Herr HOFFMANN, Sie haben unter anderem auch die Blutsenkung angeführt. Ich habe nun eine größere Zahl an PcP-Patienten mit sehr hoher Blutsenkung, also Dysproteinämien. Es gelang mir bisher nicht, mit der Gegensenibilisierung und dem Hydrolysat schwere Dysproteinämien zu beeinflussen.

Herr HOFFMANN: Ich gebe Ihnen insofern recht, als Sie bei den hohen Blutsenkungen zunächst nichts sehen. Man muß manchmal 4,6,8 Monate durchbehandeln, ehe die Effekte erkennbar werden. Meistens normalisierten sich dann aber 50-80% der Fälle.

Sollten die Blutsenkungen nicht beeinflusst werden, besteht der eine oder andere Krankheitsfaktor weiter. Haben Sie denn auch die Sanierung von Herden berücksichtigt?

Auditorium: Sind Sie der Meinung, daß bei jedem rheumatischen Geschehen eine Fokalerkrankung vorliegt?

Herr HOFFMANN: Ja! Man muß den Begriff "Herd" nur weit genug fassen. Irritationen, vegetative Irritationen sind vielleicht das eine. Bedenken sollte man auch, daß beispielsweise die mit einem Karzinom auftretende rheumatische Arthritis ebenso durch Gewebszerfallsprodukte entstanden sein kann. Auch das gehört mit in den Begriff des "Herdes", so wie ich ihn verstanden haben möchte.

Herr DERBOLOWSKY: Stimmt es, daß Sie die Nachuntersuchung schon eine Woche nach Verabreichung der Trockensubstanz durchgeführt haben?

Herr LACHNIT: Ja, das ist richtig.

Herr DERBOLOWSKY: Nun ist doch bekannt, daß nach der Gabe der Trockensubstanzen die positiven Effekte erst nach einem etwas längerem Zeitraum eintreten, also nach 3 Wochen noch günstiger sein dürften als nach einer Woche.

Herr LACHNIT: Ich danke Ihnen für diese Anregung. Eine klinische Studie ist notwendig um eine Substanz zu prüfen. Daran zweifelt heute niemand mehr. Einwände kann es allenfalls von moralischer und ethischer Seite geben, vor allem bei der Doppelblindstudie. Wir haben deshalb 20 Patienten, die in der Placebogruppe waren, nachträglich, weil die Besserung in der Verumgruppe offensichtlich war, mit NEYCHONDRIN und NEYARTHROS behandelt, und danken der Firma, daß sie uns hierfür noch kostenlose Präparate zur Verfügung gestellt hat. Die Wirkung war auch hier nachweisbar, ohne daß wir dann die Ergebnisse natürlich statistisch erfaßt haben, weil die Studie schon abgeschlossen war.

Ich gebe Herrn DERBOLOWSKY mit seinem Einwand natürlich recht. Nur ist die Nachbeobachtung auf längere Zeit nach einer klinischen Studie mit größeren Schwierigkeiten verbünden. Obgleich wir also schon eine Woche nach Therapieabschluß die Studie auswerteten, waren die Ergebnisse sehr gut. Daß wir von einer länger dauernden Beobachtung dann nur noch mehr zu erwarten hätten, liegt auf der Hand.

Auditorium: Waren Ihre Patienten alle normalgewichtige?

Herr LACHNIT: Wir haben ein ziemlich homogenes Krankengut mit geriatrischen Patienten. Die Übergewichtigkeit spielt dabei eigentlich eine relativ untergeordnete Rolle, etwa 16%, die wir natürlich mitberücksichtigt haben.

Herr KETEISEN: Es wurden uns hier degenerative Gelenkprozesse sowie rheumatische und entzündliche Krankheitsbilder vorgestellt, bei denen die Ergebnisse besser waren, als wir das so üblicherweise in der Praxis sehen. Sehr häufig haben wir es aber mit Weichteilrheumatismus zu tun, Periarthrosen, Tendomyosen, Pannikulosen und Tendopathien. Haben Sie da auch ähnlich gute Ergebnisse?

Herr HOFFMANN: Tendopathien, Periarthritiden, Neuralgien können meist miteinander vergesellschaftet vor, beispielsweise Neuralgien zusammen mit Tendopathien usw. Diese Krankheitsbilder fasse ich alle als Weichteilrheumatismus zusammen. Den Weichteilrheumatismus, auch die hartnäckigen Epikondylitiden oder Lumbalgien haben ich mit der Gegensensibilisierung, der Herdsanierung und mit REVIT-ORGAN-Präparaten recht gut beeinflussen können. Immerhin habe ich heute schon eine über 20jährige Erfahrung auf diesem Gebiet.

Herr KETELSEN: Zählt überhaupt Weichteilrheumatismus zu den entzündlichen Erkrankungen? Hier spielen doch viele andere Ursachen eine Rolle, unter anderem auch psychosomatische, die nicht unbedingt eine antientzündliche Therapie erfordern.

Herr HOFFMANN: Der Weichteilrheumatismus beginnt mit der Infektanfälligkeit. Nehmen Sie die Laborparameter, wir haben immer die entzündlichen Komponenten dabei, wenn nicht in der Blutsenkung, so in der Immunelektrophorese. In der Anamnese, das ist heute eigentlich das Wichtigste, finden sich immer die wiederkehrenden Infekte. Nicht von ungefähr schreibt man heute der Entstehung der Arthrose eine arthritische Grundkomponente zu. Ich habe schon immer die Arthrosen gerne mit der Gegsensensibilisierung zusätzlich behandelt. Die sogenannten aktivierten Arthrosen, also jene mit arthritischem Reiz, sprechen sehr gut auf die Gegsensensibilisierung an; anschließend können dann NEYCHONDRIN und NEYARTHROS intraartikulär verabreicht werden.

Sie haben hier etwas sehr interessantes angeregt: die psychosomatische Komponente. Ich gebe Ihnen recht. Das ist ein besonderes Gebiet, selbst bis hinein in die Polyarthritiden. Die depressiven Reaktionen - ich deutete sie als Reaktionen auf die Polyarthritiden an - müssen selbstverständlich mitbehandelt werden. Dr. DERBOLOWSKY wird uns sicher noch etwas vom neurologischen Standpunkt her dazu sagen können. Vom orthopädischen Standpunkt aus jedenfalls habe ich beobachtet, daß die große Schmerzüberempfindlichkeit manchmal schon hysterische Züge annimmt, während andere Menschen ihre Polyarthritiden wie einen "Baum" tragen. Das ist sehr unterschiedlich. Sehr gut wirksam ist in diesen Fällen NEYCALM. Damit bekommen Sie diese Übersensibilität, die mit der Depressivität einhergeht, durchaus in den Griff.

Herr THEURER: Ich möchte hier eine Anregung geben. Bei Agitiertheit, bei vegetativ bedingten sympathikomimetischen Tendenzen, würde ich zusätzlich Epiphyse\* empfehlen. Epiphyse beruhigt den übererregten Patienten und beeinflußt über das vegetative Nervensystem die Psyche. Umgekehrt würde ich bei mehr melancholischen Tendenzen Hypophyse\*\* geben. Mit der zytoplasmatischen Organotherapie ist es möglich, auf diese antagonistischen Prinzipien einzuwirken.

Herr HARTH: Der gleiche pathologische Befund muß nicht den gleichen Schmerz verursachen. Hier spielen auch andere physiologische Faktoren eine Rolle, nicht nur psychovegetative.

Auditorium: Herr HOFFMANN, in welcher zeitlichen Abfolge haben Sie die Gegsensensibilisierung, REVITORGAN-Präparate und das Hydrolysat verabreicht?

Herr HOFFMANN: Ich möchte die Antwort aufteilen in eine von mir und eine von Herrn THEURER. Die Wirkungsweise der Gegsensensibilisierung und des Hydrolysates liegt auf verschiedenen Ebenen. Deshalb ist es eigentlich gleichgültig, in welcher Kombination oder in welcher Reihenfolge die Präparate verabreicht werden. So habe ich mich in der Praxis verhalten: Ich habe mit der Gegsensensibilisierung begonnen, zusammen mit den Dilutionen, und dann das Hydrolysat, das zur Fertigstellung inklusive Transport etwa 4-5 Wochen benötigt, parallel mitlaufen lassen. Es konnten keine Interferenzen, keine gegenseitigen Störungen oder etwa eine Wirkungsminderung beobachtet werden.

Herr THEURER: Die Antwort ist sicher nicht einfach. Theorie und Praxis müssen übereinstimmen. Wenn die Praxis reproduzierbare Ergebnisse bringt, kann ihr nicht mit der Theorie widersprochen werden. Die Theorie besagt jedoch, daß die Gegsensensibilisierung eine aktive therapeutische Maßnahme ist, die erst sekundär durch Gegenreaktionen des Organismus zum Tragen kommt, während Antikörperfragmente eine passive therapeutische Methode sind, in dem Sinne, daß Antikörperfragmente auf Haptene blockierend wirken, und damit den Mechanismus der Auto-sensibilisierung durchbrechen.

\* REVITORGAN-Dilution Nr. 23 ; \*\* REVITORGAN-Dilution Nr. 22

Die Dilutionsbehandlung hat, jeweils abhängig von der Art, wie Sie dosieren, zwei Faktoren. Sie kann iitimogen wirken bei hohen Konzentrationen, wenn nicht tolerogen vorbehandelt wird, oder sie kann tolerogen wirken, wenn durch hohe Verdünnung eine Toleranz aufgebaut wird. Die Therapie muß auf den Patienten abgestimmt sein.

Bei chronischen Infektionen, oder überhaupt bei chronischen Krankheiten gibt es meist Blockierungsvorgänge der Reaktionsbereitschaft. Zur Wiedergewinnung der Reaktionsbereitschaft leiten wir die Behandlung mit Dilutionen ein, vor allem wenn, wie meist bei rheumatischen Erkrankungen, mit Kortokoiden vorbehandelt wurde. Hier ist keine Reaktion mehr zu erwarten, da sämtliche Prozesse gedämpft sind. Kortikoide sind mesenchymale Reaktionshemmer. Während einer Kortikoid-Therapie läßt sich also keine Gegsensensibilisierung durchführen. Eine passive Therapie, wie mit Antikörperfragmenten, ist allerdings ohne weiteres gleichzeitig mit der Kortikoid-Therapie möglich. Auch Organdilutionen können aufgrund ihrer molekularen Effekte gleichzeitig mit Kortikoiden verabreicht werden. Die Wirkung ist allerdings nicht so ausgeprägt, als wenn die Kortikoide abgesetzt würden.

Von der Theorie ausgehend, muß man sich grundsätzlich überlegen, wie die Reaktionslage des Patienten ist. Spricht der Patient noch an, kann ohne weiteres eine aktive Therapie durchgeführt werden. Ist die Reaktionsbereitschaft gestört, dann muß man mit Kortikoiden ausschleichen, ehe eine Gegsensensibilisierung durchgeführt wird. In der Zeit, in der die Kortikoide in der Dosis reduziert werden, kann schon mit Dilutionen oder mit dem Hydrolysat behandelt werden. Im Grunde genommen kann nur durch die theoretische Vorstellung des Wirkungsmechanismus eine optimale Anwendung erzielt werden. Eigentlich kontraindiziert ist jedoch die GS auch während der Kortikoidanwendung nicht, nur ist dann die Wirksamkeit beeinträchtigt.

Über die Bedeutung von NEYCHONDRIN und NEYARTHROS•in der  
Sportmedizin bei Chondropathia patellae und post-  
traumatischen Gelenkknorpelschäden.

A. KLÜMPER  
Sporttraumatologische Spezial-Ambulanz  
Universität Freiburg

Der Anwendung von NEYCHONDRIN und NEYARTHROS liegt die Zielvorstellung zugrunde, GeLaikknorpel zu regenerieren oder zumindest soweit zu stabilisieren, daß eine Chondromalazie nicht weiter fortschreitet. Theoretisch erfordert dieser therapeutische Ansatz zunächst ein sich-lösen von der geltenden Lehrmeinung, der Gelenkknorpel sei grundsätzlich nicht regenerabel. Diese Lehrmeinung stützt sich nahezu ausschließlich auf tierexperimentelle Untersuchungen, die zu keiner Zeit das mögliche und denkbare therapeutische Spektrum ausgeschöpft haben.

Standardtherapie trotz Lehrmeinung

Ungeachtet der geltenden Lehrmeinung werden eine Reihe von Substanzen, die zu einer Knorpelheilung beitragen sollen, schon länger als ein Jahrzehnt parenteral, als auch intraartikulär in der täglichen Praxis eingesetzt. Zu dieser längst existierenden Standardtherapie wäre es wohl kaum gekommen ohne entsprechende positive Ergebnisse, die sich in Form zahlreicher Publikationen niedergeschlagen haben. Dieser Beweisführung liegen allerdings nahezu ausschließlich klinische Parameter zugrunde, ein "Mangel", der nicht das Konzept im grundsätzlichen betrifft, jedoch noch eine Menge Fragen offen läßt, insbesondere hinsichtlich histomorphologischer und histochemischer Vorgänge im Verlaufe einer Knorpelregeneration. In praxi ist damit der Gelenkknorpel ein vitales Organ, das nachgewiesener Maßen therapeutisch beeinflußbar ist und sich entsprechend der biologischen Grundregel "die Funktion erhält die Form" verhält und nicht umgekehrt.

Der überwiegende Anteil der Patienten einer Sporttraumatologie setzt sich aus Jugendlichen und jugendlichen Erwachsenen zusammen.

Da der Sport in unserer Gesellschaft jedoch keineswegs mehr ein Vorrecht der Jugend ist, nimmt die Zahl aus nahezu allen Dezennien rapide zu. Meistens überwiegen in der Sporttraumatologie Gelenkprobleme, wobei es sich keineswegs nur um die konsequenten Folgen sportspezifischer Belastung handelt, sondern in erster Linie um prädisponierte Chondropathien als Folge vorhandener gelenkmechanisch ungünstiger Formen. Einen hohen prozentualen Anteil haben auch posttraumatische Knorpelschäden in sämtlichen Graduierungen.

#### Knorpel-stabilisierende Substanzen: Ein neuer Weg

Auf kaum einem anderen Sektor der Medizin ist das Therapieangebot so vielfältig und umfangreich wie bei den schmerzhaften Arthralgien. Sicher sind mit percutanen Salbenbehandlungen, balneologischen Maßnahmen und der ganzen Breite physikalischer Behandlungsmethoden oder Analgetika, Antiphlogistika und Antirheumatika temporäre Besserungen oder auch Beschwerdefreiheit zu erzielen. Die angestrebte Ausheilung eines Knorpelschadens ist weder zu erwarten noch zu realisieren.

Erst die intraartikuläre Injektion mit "Knorpel-stabilisierenden" Substanzen geben zu berechtigter Hoffnung Anlaß. Im wesentlichen handelt es sich dabei um Monosubstanzen, die als normaler Bestandteil der Matrix des hyalinen Knorpels bekannt sind. In wenigen Jahren zeigte sich jedoch, daß die intraartikulären Injektionen mit Monosubstanzen alleine keine befriedigenden Ergebnisse brachte. Seit nun über 10 Jahren werden von uns nun Mischinjektionen der verschiedensten Konstellationen erprobt, die mit zunehmender und besonders langzeitiger Erfahrung zu einer erheblichen Verbesserung der Therapieerfolge führten. Ein deutlicher Schritt nach vorn bedeutet die zusätzliche Anwendung von NEYCHONDRIN und NEYARTHROS.

#### Nur Langzeitergebnisse sind beweisend

In der Therapie von Knorpelschäden sind ausschließlich Langzeitergebnisse sinnvoll, die sich nach unseren bisherigen Erfahrungen mindestens über 5 Jahre erstrecken müssen. Allein schon die Transformation des Gelenkknorpels setzt eine kontinuierliche Therapie über wenigstens ein Jahr voraus. Die üblichen, zeitlich meist begrenzten medizinischen Empfehlungen reichen deshalb für eine Knorpel-stabilisierende oder gar Knorpel-regenerierende Therapie nicht

aus. Hierin liegt sicher auch einer der wesentliche Gründe, warum heute immer noch die Meinungen über die vorliegende Behandlungsform weit auseinander gehen. Die konservative Therapie von Knorpelschäden verlangt Zeit und Geduld.

#### Zytoplasmatische Substanzen - Echte Alternativen für die Sport-Medizin

Die zytoplasmatische Therapie bietet für sportmedizinische Indikationen ein fundiertes und verlockendes Konzept an. Dieser molekularen Oragnotherapie liegt allgemein die Idee zugrunde, physiologische Verhältnisse wiederherzustellen und gestörte Organfunktionen sowie Regulationen wieder in Gang zu bringen. Für das Organ "Gelenkknorpel" wäre dies ein denkbarer und wünschenswerter Weg, da die bisherige Arzneimittelbehandlung im wesentlichen als symptomatische Therapie bezeichnet werden muß. Zur Objektivierung der Therapieergebnisse bedarf es allerdings einer umfassenden Feldstudie bei vergleichbaren Gelenkveränderungen allein oder in Kombination mit bereits erprobten Mischungen. Diese Kriterien zugrunde gelegt, benötigten wir für mehr als 5.000 intraartikuläre Injektionen unter Verwendung von NEYARTHROS , NEYCHONDRIN und NEYCHONDRIN "N" über 3 Jahre. Diese Zeitspanne reicht zwar noch nicht aus, um ein endgültiges Zahlenmaterial vorlegen zu können, die bisherigen Ergebnisse erlauben trotzdem folgende Zwischenbilanz:

Die Zeit bis zur beschwerdefreien Funktion und Belastungsfähigkeit in den unterschiedlichsten Belastungsformen verkürzte sich unter dieser Therapie bis zu 30%. Die zeitlichen Abstände der einzelnen intraartikulären Injektionen konnten bis zu 50% verlängert werden. Die besten Ergebnisse wurden mit NEYCHONDRIN "N", Stärke I erzielt. Nebenerscheinungen wurden nicht beobachtet.

Eine standardisierte Mischinjektion mit NEYCHONDRIN "N", Stärke I, gehört sei über 3 Jahren nun zum festen Bestandteil unserer Therapie. Bei Erwachsenen wird die Behandlung mit einer Entzündungsbestrahlung unter Röntgen-Tiefen-Therapie-Bedingungen eingeleitet, wobei über das betroffene Gelenk insgesamt 600 rad appliziert werden. Während der Entzündungsbestrahlung, die fälschlicherweise immer noch als "Schmerzbestrahlung" apostrophiert wird, erfolgen die ersten drei intraartikulären Injektionen mit NEYCHONDRIN "N". Nachinjiziert wird dann 3-4mal in vierwöchentlichen Abständen, an-

schließlich im vierteljährlichen Turnus über wenigstens zwei Jahre.

#### Chondropathia patellae und posttraumatische Gelenkknorpelschäden profitieren

Mit dieser standardisierten Therapiemethode haben wir bisher allein für die so häufig und vermehrt auftretende Chondropathia patellae innerhalb eines Jahres eine beschwerdefreie normale Funktions- und Belastungsfähigkeit von 87% erzielen können. Ähnlich gute Ergebnisse sind bei den posttraumatischen Gelenkknorpelschäden zu erzielen.

Die klinisch guten Ergebnisse sind röntgenologisch verifizierbar. Die existierenden, aber nota bene in geringer Zahl vorliegenden Inspektionen per Rearthrotomie oder Rearthroskopie bestätigen eine deutliche Verbesserung oder sogar Normalisierung des Gelenkknorpels nach durchgeführter Langzeitbehandlung.

Den Nachweis einer Beeinflussbarkeit des Knorpels durch intraartikulär applizierbare Substanzen haben WEH, DAHMEN und FRÖSCHLE (3) erbracht. An Gelenkknorpel-Proben von Operationsmaterial wurde dabei die Eindringtiefe einer Kugel in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Hierzu wurden die Knorpelimplantate in einer Nährlösung verschiedenen intraartikulär injizierbaren Präparaten ausgesetzt. Verglichen wurden die Eindringtiefen der Ausgangsmessung mit den Werten nach 11- bzw. 12-tägiger medikamentöser Inkubation. Abgesehen von einem Kortikoid-Präparat konnte bei allen geprüften Medikamenten eine Erhöhung der Eindringtiefe, bezogen auf die unbehandelte Vergleichsserie beobachtet werden. Der deutlichste Effekt in Richtung des gesunden Knorpelgewebes war bei NEYARTHROS festzustellen. Interpretiert wurden die Ergebnisse als eine Pharmakon-bedingte, vermehrte interstitielle Flüssigkeitseinlagerung.

#### Längere Bioverfügbarkeit zytoplasmatischer Substanzen

Ob damit "nur" die Ansicht von BENNINGHOFF bestätigt wird, welche Bedeutung der intra- und perichondralen Flüssigkeit für das mechanische Verhalten des Gelenkknorpels zukommt, muß offen bleiben. Insbesondere ist das Zusammenspiel zwischen Synovia und Gelenkknorpel zu berücksichtigen. Nach intraartikulären Injektionen mit physiologischen Monosubstanzen als Teilbestand der Knorpelmatrix geht der nahezu immer auftretende schmerzstillende Effekt schnell

wieder verloren. Das mag auf den enzymatischen Abbau des Pharmakons zurückzuführen sein, kann aber auch einem schnelleren Resorptionsmechanismus der Synovia zugeschrieben werden. Der deutlich länger anhaltende Effekt nach Injektion von nativen Makromolekülen, wie sie in NEYARTHROS und NEYCHONDRIN enthalten sind, könnte somit allein einer erschwerten und verzögerten Resorption der Synovia zugeschrieben werden. Das bedeutet jedoch gleichzeitig, daß die heterologen Makromoleküle eine längere Bioverfügbarkeit besitzen und damit auch eine bessere Chance zur morphologische Regeneration des Knorpels. In dieser Richtung läßt sich auch die weitere Verbesserung der Effektivität in Kombination mit der Entzündungsbestrahlung erklären.

#### Morphologische Regeneration durch zytoplasmatische Substanzen

Es gibt wohl kaum eine chondropathisch bedingte Arthralgie, die nicht von einer mehr oder weniger ausgeprägten Synovitis begleitet wird. Mit einer Entzündungsbestrahlung kann nun die Synovitis recht sicher beseitigt, zumindest erheblich gebessert werden. Mit der Entzündungsbestrahlung wird damit die Voraussetzung geschaffen, intraartikulär applizierte Pharmaka länger im Gelenkinneren zu belassen. Ob der Entzündungsbestrahlung eine zusätzliche Induktorwirkung zu ausreichender Synthese der Matrixsubstanzen zukommt, ist wahrscheinlich, aber noch nicht bewiesen. Ebenso könnte die Rezeptorfähigkeit durch eine einleitende Entzündungsbestrahlung für zelluläre Wirkstoffe verbessert werden. Es muß darüber hinaus geprüft werden, ob die xenogenen Makromoleküle nicht in der Lage sind, als Proteinmoleküle spontan zu Kollagen zu aggregieren. Sie würden damit die Funktion einer "Kittsubstanz" in der mehr oder weniger aufgerauhten oder rissigen Oberfläche des Gelenkknorpels erfüllen oder die Kongruenz der Gleitfläche wieder herstellen. Unter dieser metastabilen Oberfläche könnten sich intrachondraler Flüssigkeitshaushalt und Chondrozyten erholen, sowie die Knorpeltransformation normalisieren.

Über die Aktivierung von Synthesevorgängen und Stimulierung der Zellproliferation durch Zusatz zytoplasmatischer Organtherapeutika liegen eindeutige Ergebnisse vor (1,2). Die Stimulierung somatischer Zellen durch zytoplasmatische Organextrakte war dabei über einen Zeitraum von mehreren Tagen feststellbar. Gerade dieser Zeit

faktor spielt sicher für ein von Natur aus träges Organ wie den Gelenkknorpel eine wichtige Rolle.

Über die bisher bekannten Ergebnisse der Grundlagenforschung hinaus ist bezüglich der biochemischen Wirkungsmechanismen der verwendeten Pharmaka in vivo wenig bekannt. Da jedoch die Analgesie als möglicher Wirkfaktor auch der subjektiven Besserung - selbst unter Berücksichtigung des geringen Prednisolonacetat-Anteilsim NEYCHONDRIN "N" - ausscheidet, gleichzeitig ein Langzeiteffekt als gesichert gelten darf, verbleibt nur der berechnete Schluß, daß die intraartikulär applizierten zytoplasmatischen Substanzen offensichtlich zu einer Besserung des geschädigten Gelenkknorpels, zu einer Stabilisierung und letzten Endes morphologischen Regeneration in welchem Umfang auch immer, beitragen.

#### Literatur

1. PFAFFENHOLZ, V., THEURER, K.: "Einfluß von makromolekularen Organ-substanzen auf menschliche Zellen in vitro", I. Diploide Kulturen; Der Kassenarzt 27, (1978)
2. PFAFFENHOLZ, V., THEURER, K.: "Einfluß von makromolekularen Organ-substanzen auf menschliche Zellen in vitro", II. Tumorzellkulturen; Der Kassenarzt 9, (1979)
3. WEH, L., DAHMEN, G., FRÖSCHLE, G.: "Einfluß einiger intraartikulär injizierbarer Pharmaka auf die mechanischen Gelenkknorpel-eigenschaften in vitro", Aktuelle Rheumatologie (1981)

Workshop "Orthopädie und Rheumatologie:  
Biologische Alternativen"

Leitung: K.G. THEURER jun.  
Teilnehmer: Frau ZITZMANN, Vorsitzende der Liga  
für Bechterew-Erkrankte  
Herr Z. HOFFMANN, Arzt für Orthopädie  
in Stuhr - Brinkum  
Herr LACHNIT, Chefarzt IV. Med. Abt.,  
Pflegeheim Wien - Lainz.

Herr THEURER jun.: Die erste Frage an Herrn HOFFMANN: Es wird oftmals in der Frage der Gelenkerkrankungen und speziell beim Morbus Bechterew und der PcP die Radon-Therapie im Thermalstollen in Bad Gastein empfohlen. Wie sind hier ihre Erfahrungen?

Herr HOFFMANN? Mit der Radon-Behandlung alleine können Sie natürlich beispielsweise bei der PcP die Blutwerte und die Blutsenkung nicht normalisieren, ebenso tritt keine Konversion der Rheumafaktoren auf. Die Erfolge sind natürlich auch nicht so lange anhaltend und erfahrungsgemäß müssen diese Patienten ca. einmal im Jahr in den Stollen. Anhaltender ist da die biologische Alternative "zytoplasmatische Therapie mit der Serumkur".

Herr THEURER jun.: Nun weiß man ja auch nicht genau, wie die Wirkung des Radons auf die Gelenke zustande kommt, aber es ist uns allen bekannt, daß eine physiotherapeutische Behandlung den gelenkerkrankten Patienten als Unterstützung einer jeglichen medikamentösen Therapie nützlich ist. Vielleicht sollten wir nochmals erwähnen, daß Herr HOFFMANN diesen besonderen Effekt, nämlich die Normalisierung von BKS und Konversion der Rheumafaktoren in einem hohen Prozentsatz der Fälle durch die kombinierte Therapie von Gegensensibilisierung-Hydrolysat mit NEYARTHROS, NEYCHONDRIN und NEYTROPH erzielt. Mit dem REVITORGAN-Präparat NEYDESIB wird eine allgemeine ubiquitäre Dämpfung der überschüssigen Immunreaktionen bei der PcP herbeigeführt, NEYDESIB dürfte wohl auch für diesen eigentlich spektakulären Erfolg, nämlich der Normali-

sierung der Laborparameter und vor allem der Konversion der zuvor positiven Rheumafaktoren verantwortlich sein.

Herr HOFFMANN: Ja, ich hatte bereits vorher ein Dia dazu gezeigt. Bei der progressiven chronische Arthritis habe ich bei der Blutsenkung unter anderem den Rheumafaktor bestimmt. Differentialdiagnostisch sind die serologischen Befunde, also positive Antistreptolysin-Titer beim rheumatischen Fieber und positiver Latex-Fixationstest bei der progressiven chronischen Polyarthritiden in ca. 70% der Fälle für die Diagnosestellung richtungsweisend. Da das pathologische Geschehen an der Synovialis abläuft, läßt sich dennoch nicht immer in allen Fällen der Rheumafaktor im Blut nachweisen. In der Klinik kann der Rheumafaktor auch in der Synovialflüssigkeit identifiziert werden, was ich in der Praxis nicht durchführe. Es hat sich gezeigt, daß sich unter der Behandlung diese verschiedenen pathologischen Parameter normalisieren und zwar in einer Häufigkeit von 50-80% der Fälle. Bemerkenswert ist, daß alle diese Fälle zunächst vor der biologischen Alternativbehandlung therapieresistent waren. Die Patienten dieses Krankengutes sind also nach den üblichen Methoden der Schulmedizin aus unterschiedlichen Gründen nicht mehr therapierbar gewesen. Durch die biologische Therapie haben diese Patienten ihre Symptomatik allmählich verloren, ebenso die Labor-Symptomatik.

Herr THEURER jun.: Darf ich nochmals herausheben, daß NEYDESIB hauptsächlich am Immunsystem als biologisches Immunsuppressivum angreift. Wir wissen, daß die Suppressorzellen des lymphadenoiden Systems durch NEYDESIB und vor allem durch die darin enthaltenen Thymusfaktoren - aus dem fötalen Teil des Thymus - stimuliert werden. Das ist genau das, was wir bei allen Autoimmunerkrankungen anstreben, wir können ja auch zumindest einen Teil der Pathogenese der Pcp Autoimmunphänomene zuschreiben. Gibt es noch andere Fragen?

Auditorium: Ich hätte noch eine Frage an Herrn Kollegen HOFFMANN: In meinem Hause ist es so, daß auch wir Therapieversager haben, die schulmedizinisch austherapiert sind und die 5-6, aber auch oftmals 10 Jahre lang an Pcp leiden, Schmerzen haben und diese lange Zeit hindurch Cortison und Analgetika verabreicht bekamen. Nun würde mich interessieren - setzen Sie das sofort ab? Bei meinen Patienten kann ich das aufgrund der Schmerzen nicht, sie wür-

den mir durchs Fenster springen, wenn ich Analgetika und Antiphlogistika sofort absetzen würde. Was machen Sie mit solchen Patienten?

Herr HOFFMANN: Ich bin ganz Ihrer Meinung - man kann diesen Menschen ihre Krücken nicht sofort wegnehmen, man muß sie ihnen vorerst lassen. Andererseits muß man aber wissen, und das sagte vorher Herr THEURER - die normalen Antiphlogistika unterdrücken das Reaktionsverhalten im Immunsystem. Gerade dieses Reaktionsverhalten im Immunsystem soll aber durch die GS angesprochen werden. Man kann also, solange man Cortison gibt, mit der GS wenig erreichen. Wohl kann man in dieser Zeit die zytoplasmatischen Substanzen geben und nach Fertigstellung das Hydrolysat. Ich gebe dann auch mehrmals im Wechsel Trockensubstanz von Leber, NEYDESIB und NEY-IMMUN, sowie NEYCALM. Herr THEURER empfiehlt zusätzlich Epiphyse, weil das nicht nur die seelische Obererregbarkeit der Patienten, sondern auch die vegetative Reaktionslage der Patienten beruhigt. Diese Menschen müssen zunächst einmal wieder Vertrauen zu einer Therapie bekommen, denn sie sind ja bisher Jahr für Jahr enttäuscht worden.

Ich gebe Ihnen vollkommen recht: dieses Prinzip des Ausschleichens der Kortikoide muß unbedingt eingehalten werden. Das erfordert von jedem einzelnen unter Ihnen ein hohes Maß an ärztlicher Kunst.

Herr THEURER jun.: Nach so langen Jahren der Cortison-Therapie kommt es meistens zu einer Involution der Nebennierenrinde durch die dauernde Substitution. Wir empfehlen hier die Zufuhr von DIL Nr. 20, einem Präparat, das Faktoren aus Nebennierenrinde enthält und die Nebennierenrinde stimuliert. Zusätzlich sollte noch DIL Nr. 51 zur Aktivierung der hypothalamo-hypophysären Achse, die ja durch die lange Cortison-Therapie mitsupprimiert wurde, gegeben werden. Man kann dann mit den Kortikoiden langsam ausschleichen.

Vielleicht kann Herr HOFFMANN auch auf die exakte Dosierung eingehen. Wie oft in der Woche kommen Ihre Patienten zur Applikation? Spritzen Sie bei der PCP auch intraartikulär in die kleinen Gelenke?

Herr HOFFMANN: Am Anfang lasse ich die Patienten gerne jeden Tag kommen, solange wir mit den höheren Verdünnungsstufen, also den Dilutionen behandeln. In der ersten Woche fünfmal gleich hinter-

einander, wenn möglich auch in der zweiten Woche und dann dreimal die Woche. Drei Sitzungen in der Woche sind schon notwendig. Intraartikulär bei der Polyarthrits spritze ich garnicht. Die DIL-Nr. 43 (NEYARTHROS) muß ja alle Gelenke erreichen, denn in vielen Gelenken ist die Synovialis entzündet. Nach den sehr interessanten Untersuchungen von Herrn SEIFERT gelangen Medikamente dieser Art über den Blutweg zu ihrem Ziel.

Auditorium: Ich gebe vor allem Kaltanwendungen an die stark betroffenen Gelenke, beispielsweise Quarkumschläge oder auch Enelbin Kaltumschläge.

Herr THEURER jun: Durch die Kälte wird die Hyperämie im Entzündungsbereich gestoppt und es kommt zur Vasokonstriktion. Allerdings entsteht nach Wiedererwärmung eine reaktive Hyperämie, die die Schmerzen noch verstärken kann. Es gibt ja viele Anhänger der thermalen Behandlung - auch der heißen Sand-Therapie. Nun sollten wir aber Herrn LACHNIT zu Wort kommen lassen. Er hat eine groß angelegte exakte klinische Doppelblindstudie durchgeführt und statistisch harte Daten ermittelt.

Herr LACHNIT: Es ging und in erster Linie darum, herauszufinden, ob auch in einer Doppelblindstudie Erfolge mit dieser Therapie zu erzielen sind. Aus dem Patientengut wurde von den Statistikern eine Placebo-Gruppe und eine Verum-Gruppe randomisiert. Der Schluß sei wurde am Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Wien aufbewahrt. Wir haben dann die Präparate bekommen, die sich sowohl als Verum- wie auch als Placebo-Präparate äußerlich nicht unterschieden. Nach Durchführung der Behandlung wurden die von den Ärzten der Abteilung geführten Prüfbögen an das Universitätsinstitut für Statistik zurückgeleitet und dort nach Aufbrechen des Codes ausgewertet. Sie erinnern sich noch an die Zahlen: In der Verum-Gruppe wurden insgesamt 95% gebessert, in der Placebo-Gruppe hingegen nur 20%. Es war für uns Ärzte, die schon lange in der Geriatrie tätig sind und uns daran gewöhnt haben, daß die arthrotischen Veränderungen gewöhnlich kaum oder nur vorübergehend beeinflusbar sind, erstaunlich, wie mit diesen Präparaten erstmals eine länger dauernde Besserung verzeichnet werden konnte.

Auditorium: Darf ich Ihnen noch eine Frage stellen bzgl. der Doppelblindstudie? Waren das aktivierte Gonarthrosen oder waren das chronische Fälle, die zufällig ausgesucht wurden?

Herr LACHNIT: Die Patienten wurden nach statistischen Kriterien ausgesucht und den Gruppen zugeteilt. Insofern wurde eine Selektion getroffen, als wir nur jene Patienten in die Studie aufnahmen, die wir therapeutisch überhaupt nicht mehr beeinflussen konnten, also weder durch physikalische noch durch medikamentöse Therapie.

Auditorium: Das Problem in der Praxis liegt ja meist darin, daß Patienten mit einer aktivierten Gonarthrose kommen, die dann gleich schmerzfrei sein wollen. So kommen dann die Leute meist alle vier Wochen und "holen" sich ihre Spritze, Gerade in diesen Fällen ist es so, daß man mit einer Mischung aus Cortison und einem Lokalanästhetikum einen Schnellerfolg erzielt. Die Leute gehen dann wieder nach Hause und arbeiten weiter.

Herr LACHNIT: Das ist mit gewissen Einschränkungen richtig. Der akute Effekt ist natürlich bei der intraartikulären Cortisoninjektion, gemischt mit einem Lokalanästhetikum, beeindruckend. Nur dürfen wir nicht vergessen, daß im Alter - und ich kann eben nur von alten Patienten sprechen - mit Cortison eher zurückhaltend umgegangen werden muß. Außerdem ist der Effekt nur vorübergehend und läßt bei mehrfacher Anwendung nach. Daher glaube ich, man sollte Kortikoide nur auf ganz wenige akute Notfälle beschränken. Es wäre aber zu erwähnen, daß bei jener Patientengruppe, die später als Verum-Gruppe verifiziert wurde, schon nach den ersten Injektionen - wie mir auch meine Ärzte berichtet haben - Effekte da waren und die Patienten erklärten, daß es ihnen deutlich besser ginge. Nun muß ich dazu sagen, daß wir anfangs diese schnelle Besserung für einen Placebo-Effekt hielten. Bei der Auswertung mußten wir aber feststellen, daß der Placebo-Effekt mit nur 5% sehr gering war. Also ein Placebo-Effekt ist da, aber doch nicht in dem Ausmaß, in dem es den Patienten besser ging. Ich glaube, daß mit den REVITORGAN-Präparaten eine effiziente schnelle Besserung bei Arthrosen erzielt werden kann.

Herr THEURER jun.: Ich möchte nochmals auf die Studie der Orthopädischen Klinik der Universität Hamburg hinweisen. DAHMEN und WEH haben darin eindeutig nachgewiesen, daß Kortikoide auf den Knorpel keinerlei regenerierende Wirkung haben. Andererseits war durch das Präparat NEYARTHROS im Knorpelimplantat des Operationsmaterials eine deutliche Zunahme der Elastizität zu verzeichnen, die mit keinem anderen Präparat in dieser Serie erreicht werden konnte.

Auditorium: Ließe sich dieses NEYARTHROS zu Beginn mit einem Lokalanästhetikum mischen?

Herr THEURER jun.: Sie sollten dieses Präparat nicht mit einem Lokalanästhetikum mischen, auch nicht um unmittelbare Schmerzfreiheit zu erzielen. Typische Lokalanästhetika liegen als Salze starker Basen vor, die nach der Dissoziation alkalisch reagieren, was für die Wirksamkeit der Lokalanästhetika Bedingung ist. Andererseits bestehen die REVITORGAN-Präparate aus biologisch-aktiven Polypeptiden und Proteinen, deren sterische Konfiguration, wie sie in der Ampulle vorliegt, für die Wirksamkeit notwendig ist. Bei einer Mischung der zytoplasmatischen Präparate mit Lokalanästhetika, die keinen neutralen pH-Wert haben, kann es demnach zu sterischen Änderungen der Moleküle kommen mit Aggregationen bis hin zur Denaturierung der Wirksubstanzen, was natürlich eine Wirkeinbuße mit sich bringen würde. Also von unserer Seite her können allerhöchstens Mischungen mit Lokalanästhetika vorgenommen werden, die einen neutralen pH-Wert besitzen.

Auditorium: Ich spritze intraartikulär NEYCHONDRIN pro inj. und NEYARTHROS. Die Patienten sind danach relativ schnell schmerzfrei.

Herr THEURER jun.: Natürlich wird durch NEYARTHROS und NEYCHONDRIN bei intraartikulärer Injektion nicht augenblicklich eine Schmerzfreiheit erzielt. Wir wissen aber, daß auf der anderen Seite die zytoplasmatischen Substanzen - und hier sei ein kleiner Exkurs auf das NEYTUMORIN genehmigt - bei längerer systemischer Applikation einen analgetischen Effekt haben; Herr WÜSTER vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München hat auf der Jahrestagung 1981 darüber gesprochen. Wahrscheinlich wirken die zytoplasmatischen Substanzen auf die Biosynthese der körpereigenen Endorphine und ähnliche Enkephaline ein, die als "endogene Opiate" eine schmerzhemmende Wirkung entfalten. Dies würde auch die Tatsache erklären, daß bei Patienten, die sich in finalen Stadien einer Krebserkrankung befinden und mit NEYTUMORIN behandelt werden, durch die systemische Applikation eine weitgehende, schwer zu erklärende Schmerzfreiheit besteht, wodurch Opiate eingespart werden können.

Es wäre nicht unmöglich, daß der festgestellte analgetische Effekt von NEYCHONDRIN und NEYARTHROS auf ähnliche Mechanismen zurückzuführen ist, vielleicht müßte man da auch die periphere lokale Prostaglandin-Synthese diskutieren.

Abschließend wäre noch wichtig zu erwähnen, daß bei rheumatoiden und rheumatischen, also entzündlichen Gelenkserkrankungen, bei denen das Immunsystem beteiligt ist, immer die GS und das Hydrolysat zusätzlich zu den REVITORGAN-Präparaten einzusetzen sind. Bei rein degenerativen arthrotischen Veränderungen, die Herr LACHNIT in seiner Studie behandelt hat, wird die GS und das Hydrolysat weggelassen. Vorteilhaft ist auch die Infiltration von Sehnenansätzen und die Injektion in Sehnencheiden besonders mit NEYCHONDRIN.

Abschließend wollen wir Frau TITZMANN als Vertreterin der Patienteninteressen zu Wort kommen lassen.

Frau TITZMANN: Ich bedanke mich für Ihr Interesse an meinem Problem, obwohl hier der Morbus Bechterew nur am Rande erwähnt wurde. Ich bin für die Deutsche Vereinigung Morbus Bechterew tätig. Was die besprochene Kälte-Behandlung angeht, so glaube ich, daß es sehr schwierig wird, in welcher Form auch immer, sie auf größere Bereiche der Wirbelsäule anzuwenden. Das stelle ich mir problematisch vor. Zur Cortison-Behandlung möchte ich noch von einem Phänomen berichten, mit dem vielleicht der eine oder andere Fachmann unter Ihnen etwas anfangen kann. Bei meinem Mann und meinem Sohn treten schubparallel akneartige Hautausschläge auf, an denen ich persönlich schon den Schub erkenne, bevor die Kranken selber es eigentlich richtig spüren. Zumindest bei meinem Mann, der mehrfach mit Cortison behandelt wurde, verschwindet diese sog. Akne innerhalb weniger Stunden nach der Einspritzung von Cortison wirklich völlig spurlos. Es bleiben noch nicht einmal irgendwelche Narben auf der Haut zurück, obgleich vorher böse Knoten sichtbar waren. In einem Zeitraum von ca. 8-14 Tagen tritt der Ausschlag dann wieder auf. Ich möchte darüber zum Nachdenken anregen, welche Zusammenhänge das haben könnte. Nochmals danke ich für Ihr Interesse.

Originalia sind in der "Therapiewoche" nachzulesen

## Kasuistik und Optimierung der Therapie

H. BUCHHEIT	G. POLLMÄCHER	H. WIRSAM	G. REINELT
Blieskastel	Freiburg	Bad Harzburg	München

Übersichtsreferat zusammengestellt von H. KRAFT, München

Nach einer umfassenden Einführung in das Wesen der Akupunktur, bezogen auf die embryologische Entwicklung der Säugetiere, weist BUCHHEIT darauf hin, daß enge Zusammenhänge zwischen Organerkrankungen und entsprechenden Hautveränderungen bestehen. Die Haut wird als "Spiegelbild für innere Krankheiten" betrachtet. Er hat die These entwickelt, daß das System der Akupunkturmeridiane als sog. urchervale Steuerung zu betrachten ist. Diese Hypothese werde noch durch die Meßergebnisse mit der Elektroakupunktur und die Kirilian-Photographie untermauert. Die Chinesen sind nach Meinung des Autors bereits vor mehreren tausend Jahren ohne die heute üblichen diagnostischen Hilfsmittel zu gleichen Erkenntnissen gekommen.

Im weiteren wird die organbezogene Akupunktur mit zytoplasmatischen Substanzen ausführlich besprochen. Folgende Organdilutionen werden verwendet, dahinter stehen die jeweils subcutan behandelten Akupunkturpunkte:

Nr. 2 (Lunge)	Lu 5, Lu 7, Lu 9, B 13,
Nr. 6 (Herz)	H 3, H 9, B 15, KG 14,
Nr. 7 (Niere)	N 2, N 4, N 7, N 8, N 27, B 23,
Nr. 26 (Leber)	Le 2, Le 5, Le 8, B 18,
Nr. 55 (Schleimhäute, Mischung von Nase, Rachen, Magen, Darm, Gallenblase und Harnblase)	Di 4, Di 6, Di 11, M 25, M 36, B25,
Nr. 59 (fötale Blutgefäße)	3E 3, 3E 5, KG 17, MP 6, B 10, B 14,

Die Wahl der Akupunkturpunkte erfolgte empirisch. Begonnen wurde mit der Dilution Stärke I, ein- bis zweimal in der ersten Woche. Ab der zweiten Woche wurde Stärke II im Abstand von 3 bis 7 Tagen, im Anschluß daran wurde Dilution Stärke III gegeben. In bestimmten Fällen wurden an einzelnen Akupunkturpunkten auch mehrere Dilutio-

nen gleichzeitig gespritzt. Fallstudien über Herzinsuffizienz, Verdauungsbeschwerden, Ekzem, rezidivierende Rhinitis, Sinusitis, Niereninsuffizienz, Emphysem mit lebensbedrohlichen Asthmaanfällen, Hepatitis werden vorgeführt. Der Verfasser, der seit Jahren wohl die klassische Nadelakupunktur als auch die Pharmaakupunktur in die Behandlung von Krankheiten voll in seine Praxis integriert hat konnte den Beweis erbringen, daß die "zytoplasmatische Akupunktur" nicht nur wirkungsvoll ist, sondern ggf. als organspezifische Therapie der Nadelakupunktur vorgezogen werden sollte, da sie Akupunktur und zytoplasmatische Therapie zu einer optimal wirksamen Einheit verbindet.

POLLMÄCHER berichtete über die Behandlung einer seit 23 Jahren persistierenden Papillomatose der Glans penis, die weder von Klinik noch von Fachärzten erfolgreich behandelt werden konnte. NEYTUMORIN, NEYTHYMUN und Dil. Nr. 39 anfangs dreimal wöchentlich, später alle drei Monate zweimal wöchentlich, brachten die pilzartigen Wucherungen zur Abheilung. Eine von Fachärzten empfohlene Penisamputation konnte dadurch abgewendet werden.

NEYCALM als Psychopharmakon hatte sich WIRSAM als Vortragsthema ausgewählt. Im Gegensatz zu den bisherigen Erfahrungen mit ANTI-FOCAL, NEYTROPH, NEYTOP und NEYCALM zur Behandlung von Psychosen und psychogen überlagerten Organerkrankungen hat sich die Therapie in dieser Richtung zu Gunsten des NEYCALM verschoben. Das Präparat wird bei gegebener Indikation in der Mischspritze verabreicht. Unter steigender Dosis wird versucht, die Psychopharmaka abzubauen. Als Übergangsmedikamente haben sich Ersatzpräparate wie L-Tryptophan, LEVOTHYM und die modernen Präparate aus mexikanischem Baldrian als sehr nützlich erwiesen. Ist es zu einer Stabilisierung gekommen, so wird NEYCALM-Trockensubstanz injiziert und dem Patienten wird damit in der Regel über mehrere Monate Ruhe verschafft. Ggf. kann man danach noch das homöopathische *Viscum album D 15* geben. Bei einer Vielzahl von Patienten hat sich diese Kur mit der Standardbehandlung über 3-4 Wochen bestens bewährt. Die Patienten fühlten sich wesentlich erleichtert und insbesondere nicht mehr abhängig von Benzodiazepinen.

Auch bei kindlicher Hirnreifestörung mit einer gewissen Fahrigkeit, Unruhe und Konzentrationsschwäche wird NEYCALM nach dem oben angeführten Applikationsschema bevorzugt. Selbstverständlich muß

differentialdiagnostisch eine Hyperthyreose ausgeschlossen werden. Am Rande sei bemerkt, daß NEYCALM das Therapiespektrum des früher verwendeten Präparates Nr. 23 (Epiphyse) wesentlich erweitert und bereichert hat.

Auch bei ruhig verlaufenden Schizophrenien und bei Hypomanikern (hier ggf. zusammen mit Lithium-Präparaten) hat sich NEYCALM ebenso bewährt, wie bei all den Menschen, die im hektischen Alltagsleben zur Nervosität neigen. Im Zusammenhang mit Hypnosen zeigt sich durch die Verabreichung von NEYCALM eine bessere Ansprechbarkeit für diese Therapie und die Hypnose-Tiefe wird verbessert.

REINELT schilderte den Verlauf eines "steroid-sensiblen nephrotischen Syndroms" mit minimalen Glomerulusveränderungen, das bei einem Knaben über 15 Jahren bestand. Zunächst mit klassischen Mitteln wie Kortikosteroiden behandelt, sprach der Patient jeweils an, zeigte aber rasch Rezidive. Allmählich traten massive Nebenwirkungen auf und es wurde deshalb versucht mit einem Immunsuppressivum (Chlorambucil) die Krankheit in den Griff zu bekommen. Nach einer 4 1/2 monatigen Remission wurde dann erneut die oben erwähnte Therapie durchgeführt. Nach weiteren Rezidiven, die fast alle nur mit Kortikosteroiden behandelt wurden, kam dann die zytoplasmatische Therapie und die GS zum Einsatz. Verabreicht wurden die Dil. Nr.7, 69N und 78 von Stärke I-III ansteigend je zweimal jeden 2. -1 2                    -4

Tag i.m., die GS alle 2-4 Tage beginnend mit 10 bis 10 . Die Remission hielt daraufhin fast ebenso lange an, wie die nach Cyclophosphamid. Eine schwere Darminfektion konnte rasch beherrscht werden, wie überhaupt die Immunitätslage des Patienten so gut wurde, daß banale Erkältungskrankheiten u.ä. das nephrotische Syndrom im Gegensatz zu früher nicht mehr auslösten.

Mit der zytoplasmatische Organotherapie und der GS war also in diesem Falle eine Behandlungsmethode gefunden worden, die keine der gravierenden Nebenerscheinungen der früher gegebenen Medikamente auslöste und deren Wirksamkeit reproduzierbar ist.

Behandlung einer  
kindlichen Nephrose  
( G.REINELT, München)

Abbildung 1 Krankheitsverlauf während der Therapie mit Fluocortolon in der Zeit vom 22.3. bis 15.10.73. Die gestrichelten Linien zeigen das Ausmaß der Proteinurie, während die durchgezogenen Linien die Fluocortolondoala in mg/Tag darstellen

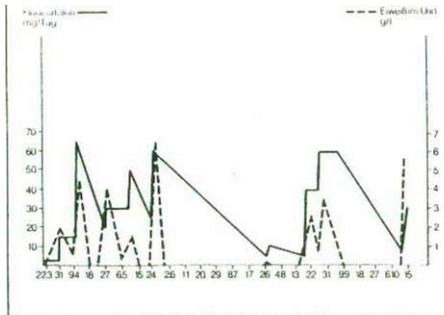


Abbildung 2 Krankheitsverlauf während der Therapie mit Chlorambucil + Fluocortolon in der Zeit vom 7.1. bis 30.6.1978

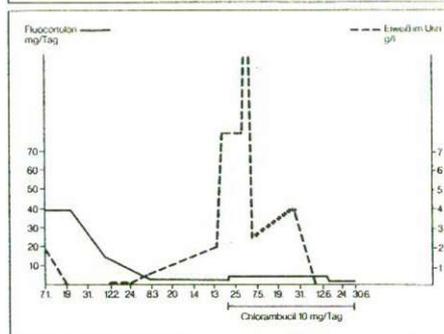


Abbildung 3 Krankheitsverlauf während der Therapie mit Cyclophosphamid + Fluocortolon in der Zeit vom 17.10.1974 bis 8.2.1974

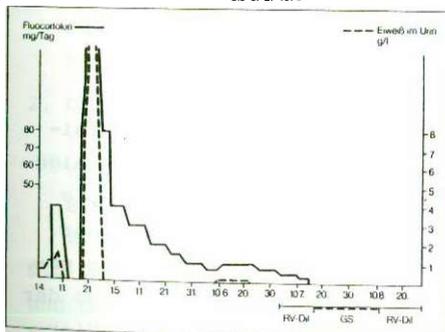
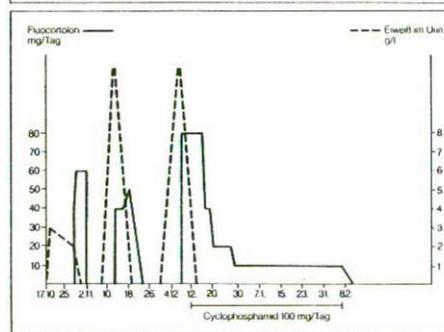


Abbildung 4 Krankheitsverlauf während der Therapie mit Revitorgan®-Dilutionen in der Zeit vom 1.4. bis 11.9.1981. RV-DIL = Revitorgan®-Dilutionen; GS = Gegenseitbilisierung

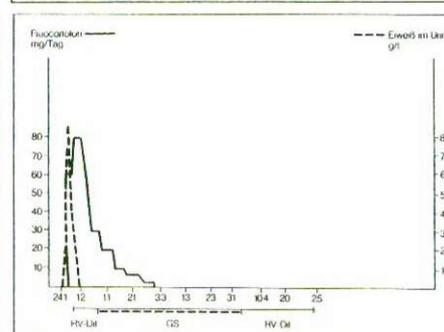


Abbildung 5 Krankheitsverlauf während der Therapie mit Fluocortolon + Revitorgan®-Dilutionen + Gegenseitbilisierung seit 24.1.1982. RV-DIL = Revitorgan®-Dilutionen; GS = Gegenseitbilisierung

Akute und chronische Organerkrankungen  
eine Domäne der zytoplasmatischen Therapie mit Organ-  
antigenen und den modifizierten Methoden der Eigenblut-  
behandlung (Gegensensibilisierung und Hydrolysat nach  
Prof. THEURER)

K.G. THEURER  
Stuttgart - Ostfildern

Bei den Arzneimittelspezialitäten der REVITORGAN-Reihe zur therapeutischen Anwendung kommende Faktoren sind pharmakologisch hochaktive Substanzen, die der Substanzklasse der "Biological Response Modifiers" zugeordnet werden. Die Wirkstoffe sind vorwiegend im Zytoplasma der Zellen zu finden, da die phänotypische Spezifität einer Zelle in ihrem Zytoplasma lokalisiert ist.

Die therapeutisch verwendeten molekularen Zellbestandteile, wie Peptide und Proteine, werden nach geschützten Herstellungsverfahren aus tierischen Organismen isoliert und in speziellen Bioassays nach ihrer biologischen Aktivität standardisiert. Als natürliche Faktoren greifen sie physiologisch in den Zellmetabolismus der unterschiedlichen Zellarten ein und beeinflussen sowohl den Stoffwechsel als auch die mitotische Aktivität der Zielzelle, ohne den Organismus zu schädigen.

An menschlichen Zellkulturen läßt sich nachweisen, daß zytoplasmatische Substanzen die Syntheserate von Normalzellen signifikant steigern können. Andererseits werden maligne entartete Zellen in ihrem Wachstum stark inhibiert.

#### Gezielte Therapie durch Organotropie

Der Organotropismus dieser Substanzen wurde an mehreren Universitätsinstituten nachgewiesen. Die den organotropen Substanzen eigene Organspezifität ermöglicht eine indikationsbezogene Therapie mit REVITORGAN-Präparaten mit unterschiedlicher Organprovenienz. Die immunologische Dosierbarkeit der REVITORGAN-Präparate vom pg- über den ng- zum  $\mu$ g- und mg-Bereich stellt dabei die Grundlage der tolerogenen Dosierung und damit der Low-Zone-Tolerance dar. Hier-

durch wird eine spezifische Immuntoleranz für die xenogenen Antigene erzeugt, gleichzeitig die Verträglichkeit und Wirksamkeit blockiert, da keine blockierenden Antikörper gegen die Wirkfaktoren entstehen können. Sämtliche REVITORGAN-Präparate sind frei von Konservierungsmitteln, da diese mit biologischen Systemen inkompatibel sind.

#### Patienteneigene Antikörper therapeutisch genutzt

Bei der Serumkur werden autologe Antikörper und Antikörper-Fragmente therapeutisch nutzbar gemacht. Im akuten Krankheitsgeschehen bei immunopathogenen Erkrankungen in hohem Titer vorhandene pathogene Antikörper werden durch Anlagerung an Siliziumdioxid und Aluminiumhydroxid in ihrer Antikörperstruktur geringgradig sterisch modifiziert. Durch dieses Grundprinzip der Gegensensibilisierung werden zum Antigen umgewandelte pathogene Antikörper nach Reinjektion zur Synthese/Anti-Idiotyp-Antikörper ausgenutzt. Der ursprüngliche pathogene Antikörper wird dabei zurückgedrängt. Ein weiterer diskutierter Mechanismus der Gegensensibilisierung ist nach STIEFEL die spezifische Hyposensibilisierung mit den im akuten Krankheitsgeschehen humoral vorhandenen pathogenen Antigenen.

Die Therapie mit dem Hydrolysat als Eigenblutbehandlung mit autologen Antikörper-Fragmenten stellt einen weiteren Ansatzpunkt in der Behandlung immunopathogener Erkrankungen dar. Bei diesem Verfahren werden durch spezifische enzymatische Reaktionen die im Patientenblut vorhandenen Autoantikörper in Fab- und Fc-Fragmente gespalten und intravenös appliziert. Am Immunsystem werden zwei Angriffspunkte diskutiert:

1. Durch die Zufuhr der Fc-Fragmente werden Komplementfaktoren gebunden und abgefangen; diese stehen damit für den zytologischen Effekt nur noch in vermindertem Maße zur Verfügung.
2. Durch Autoantigen-spezifische Fab-Fragmente werden die Autoantigene spezifisch maskiert. Die mit den Fab-Fragmenten maskierten Autoantigene wirken damit nicht mehr antigen. Dies entspricht einem "Entantigenisierungseffekt", d.h. bei fehlendem Antigen-Reiz werden keine neuen Autoantikörper mehr gebildet.

Die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten der Gegensensibilisierung und des Hydrolysates sowie deren Kombination mit den REVITORGAN-Präparaten bei akuten und chronischen Organerkrankungen sind in der Praxisfibel "REVITORGAN-Therapie und Serum-Desensibilisierung" niedergelegt.

## Biomimetik als Chance:

Die zytoplasmatische Therapie und die  
Gegensensibilisierung im Spiegel der naturwissenschaft-  
lichen und klinischen Forschung

H. PORCHER

Forschungslaboratorien Karl THEURER  
für Organo- und Immunotherapie

Ostfildern

Die isolierte Betrachtungsweise von Problemen in der Medizin hat zu einer Spaltung der Ansichten geführt. In dem Maße, wie sich die Lehrmedizin vermehrt auf Analyse und Behandlung von Symptomen durch Chemopharmaka spezialisiert hat, wurde der Organismus als Ganzes vernachlässigt. Diese einseitige, chemisch orientierte Betrachtungsweise hat Arzneimittel hervorgebracht, die in das komplexe System des Stoffwechsels und der Organfunktionen nachteilig eingreifen und neue Krankheitszeichen auslösen können. Möglicherweise steht sogar die Zunahme chronischer Krankheiten dazu in einem gewissen Zusammenhang.

Zytoplasmatische Peptide und Proteine steuern Stoffwechselgeschehen

Die biochemischen Grundprozesse des Organismus erfordern hingegen ein biologisch, biochemisch und ganzheitsmedizinisch ausgerichtetes Konzept. Die zytoplasmatische Therapie mit biomimetischen Substanzen bietet hier eine sinnvolle biologische Alternative, sind doch die Angriffspunkte von Arzneimitteln von Natur aus Rezeptoren für körpereigene oder körperähnliche Regulationsstoffe und Mediatoren. Biomimetik bedeutet: Imitation von Funktionen von im Organismus natürlich vorkommenden Metaboliten, Enzymen, Hormonen, Regulationsstoffen, Transmittern und Induktoren, die in bestimmten pathogenen Situationen qualitativ und quantitativ nicht mehr in physiologisch notwendigen Mengen synthetisiert werden.

Die zytoplasmatische Therapie verwendet natürlich Regulationsstoffe und Stoffwechselmetabolite mit phylogenetisch bedingter Ähnlichkeit zu den Körperbestandteilen: Überwiegend handelt es sich hier-

bei um Proteine und Peptide, aus dem Zytoplasma differenzierter Zellen, die in den Stoffwechselablauf der Zelle spezifisch und steuernd eingreifen. Im anglo-amerikanischen Schrifttum werden diese Faktoren auch in die Gruppe der "Biological response modifiers" eingeordnet. Diese Induktions-, Inhibitions- und Differenzierungsstoffe sind in der Lage, geschädigte Regulationsvorgänge wieder auf physiologische Weise zu normalisieren und den Heilungsprozess kausal zu unterstützen.

#### Forschungsimpulse für wissenschaftliche Disziplinen

Die Gegensensibilisierung, eine modifizierte Eigenblutbehandlung nach THEURER, macht sich die Tatsache zunutze, daß jedes Krankheitsgeschehen seinen Niederschlag im Blut findet. Die Gegensensibilisierung wird bei hyperergisch-allergischen Erkrankungen und bei immunopathogenen Autoaggressionskrankheiten erfolgreich eingesetzt. Sie beruht auf der wiederholten Injektion von körpereigenen Antikörpern nach Art der aktiven Immunisierung zur biologischen Immunsuppression.

Durch die Inauguration der zytoplasmatischen Therapie und der Methoden der Serum-Desensibilisierung wurden wesentliche Anstöße für die wissenschaftliche Forschung auf den Gebieten der Organimmunologie, Allergologie, Molekularbiologie, Onkologie und Geriatrie gegeben. Entwicklungsgeschichtlich lassen sich drei Phasen unterscheiden:

In der ersten Phase bestätigten die überzeugenden Ergebnisse aus der Praxis die Richtigkeit der therapeutischen Überlegungen. In der 2. Phase gelang die Objektivierung im Bereich der Veterinärmedizin und Grundlagenforschung.

Die 3. Phase schließlich ist durch die wissenschaftliche Konsolidierung in Klinik und Praxis gekennzeichnet.

## Genetik und Membranforschung

H. RAHMANN

Institut für Zoologie

Universität Stuttgart - Hohenheim

Zu Beginn des Themenkreises "Genetik und Membranforschung" möchte ich eine kurze Einführung in die Bedeutung von Liposomen geben. Mit Liposomen haben wir aufgrund der Verträglichkeit körperbekannter Lipide, wie Lecithin oder Cholesterin, die Möglichkeit, Substanzen und Pharmaka zu verpacken und sie auf diese Weise in die Blutbahn einzubringen, ohne daß gegen die Pharmaka immunologische Abwehrreaktionen auftreten. Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen und Allergien, die sonst gegenüber Proteinen und Peptiden, wie u.a. dem Penicillin, zu erwarten sind, können mit diesen, in Lipidmembransystemen verpackte Substanzen vermieden werden. Darüberhinaus verringert sich auch die Gefahr, daß diese inkorporierten Substanzen enzymatisch abgebaut werden.

Wir können davon ausgehen, daß diese in Lipidmembranen verpackte Substanzen durch Schrankensysteme, wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke oder die Blut-Plazenta-Schranke hindurchgelangen, weil sie in den Vesikeln wesentlich länger im Blutkreislauf bleiben, ohne daß sie der natürlichen Degradation der Enzyme unterliegen.

Desweiteren kann mit Hilfe einer Liposomen-Verpackung von Pharmaka eine gezielte Organspezifität erreicht werden, insofern als die Liposomenmembranen z.B. aus solchen Lipiden zusammengesetzt wird, wie sie in den Membranen des Zielorgans vorkommen. Im Falle des ZNS denken wir dabei an eine zusätzliche Ausstattung der Lecithin-Cholesterin-Liposomen mit Gangliosiden, da diese bekanntermaßen im ZNS spezifisch angereichert sind.

Auch für die Onkologie ergeben sich interessante Aspekte: Krebszellen zeigen bekanntlich verstärkte phagozytotische Aktivitäten. Daraus konnte man ableiten, daß Tumorzellen in Liposomen verpackte Pharmaka stärker einbauen als andere, nicht so stark phagozytierende Zellsysteme. Damit bietet sich ein völlig neuer Ansatzpunkt in der Onkotherapie. Die Aufnahme und der Einbau dieser Liposomen-

verpackten Substanzen geschieht mit Hilfe der Endozytose oder aber über eine Membranfusion. Dabei fusioniert die künstlich zusammengesetzte Liposomenmembran mit der Membran der natürlichen Zelle. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die Liposomen mit den Zellen aggregieren und aufgrund der längeren Verweildauer die inkorporierten Pharmaka eine Möglichkeit haben ins Zellinnere hindurchzudiffundieren. - Das zu den Aufnahmemechanismen.

Es gibt allerdings auch einige wenige Negativ-Hinweise darauf, daß sich Liposomen toxisch bemerkbar machen können, etwa nach einer intrazerebralen Applikation. Darüberhinaus können Liposomen, wenn niedermolekulare Substanzen verpackt wurden, durchaus auch "lecken". Wir können somit nicht unbedingt von einer unbegrenzten Haltbarkeit dieser Transportvesikel für Pharmaka ausgehen. Wir wissen heute auch, daß Liposomen, sobald sie von einer Zelle aufgenommen wurden, den Zell-lysosomalen Stoffwechsel nachteilig beeinflussen können. - Diese wenigen Negativ-Aspekte treten allerdings in den Hintergrund, betrachtet man die zukünftigen positiven Möglichkeiten von Liposomen in der Medizin.

Ziel der Anwendung von Liposomen ist - ich möchte es nochmals wiederholen - eine gezielte Drogenbehandlung spezifischer Organe: Das kann dadurch erreicht werden, daß in die äußere Vesikelmembran Immunglobuline eingebaut werden, die komplementär zum entsprechenden Antigen der aufnehmenden Zelle des Erfolgsorgans sind. Ziel sollte weiterhin sein, daß wir neben dem Einbau von Proteinen in äußere Lipid-Vesikel-Membranen noch zusätzlich spezifische Lipide, gewissermaßen als Art Rezeptor-Bestandteile der Membran, einbauen, um dadurch die Organspezifität derartig zusammengesetzter Liposomen zu erhöhen.

Zur besseren Veranschaulichung seien zwei Beispiele aus der Literatur referiert:

Einmal kann man Akkumulationen körperfremder Substanzen, die es im Wirbeltier-Organismus nicht gibt, erzielen. Bei einem solchen Experiment wurde D-Glucoseoxidase, die normalerweise nicht im Wirbeltierhirn vorkommt, in Liposomen-Vesikel verpackt. Diese Liposomen-inkorporierte D-Glucoseoxidase wurde Ratten i.v. appliziert. Anschließend konnte festgestellt werden, daß völlig wider Erwarten immerhin bis zu 5% der D-Glucoseoxidase in das Rattenhirn eingebaut wurden. Eine völlig körperfremde Substanz würde also mit Hil-

fe dieser Transportvesikel eingebaut (2).

Erste Ansätze für eine Nutzbarmachung der Liposomentechnik sind auch in Richtung der Behandlungsweise der Multiplen Sklerose beschrieben worden. Verabreicht man Meerschweinchen täglich subcutan Hirnextrakt über einen Zeitraum von etwa vier Wochen, kommt es zu Multiple - Sklerose - ähnlichen Ausfallerscheinungen, die schließlich in Paralyse und Tod übergehen. Leupeptin ist eine Substanz, die eine Protease-Aktivität inhibiert. Höchstwahrscheinlich wird nun bei der MS die Demyelinisierung durch eine Proteaseaktivierung ausgelöst. Wird liposomal verpacktes Leupeptin vorsensibilisierten Meerschweinchen appliziert, so werden die MS-ähnlichen Erscheinungen durch 1-2malige Behandlung nach 1-2 Tagen aufgehoben (1) .

Literatur:

1. NAGAI, Y.: Persönliche Mitteilung (1982)
2. NAOI, M., YOGI, K.: Effects of Glycolipids on the incorporation of liposomes containing enzymes into the brain", In: Glycoconjugates (YANAKAWA, T., OSAWA, T., HANDA, S.; Eds.), Japan Sei. Soc. Press, Tokyo, S. 172 (1981)

Pseudogene, Transposons  
und Retroviren

D. JACHERTZ

Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Universität Bern

(Vortragsreferat erstellt von H. PORCHER, Ostfildern)

Molekularbiologische Denkweisen und Methoden haben schon relativ früh den Fluß von biologischer Information aus dem Genom ins Zytoplasma beschrieben und verständlich gemacht. Die Vorgänge der Transskription, des Spieissens und der Translation sind von ihren Grundzügen bekannt. Information fließt demnach vom Genom, d.h. von der DNA, über verschiedene Messenger-RNA-Stufen zum Protein.

Neben dem Genom sind auch die verschiedenen Messenger-RNA-Stufen und das Protein der Umwelt ausgesetzt und damit die primären Objekte, an denen die Selektion angreift. Dieser Sachverhalt legte seit langem die Frage nahe, ob nicht Information in umgekehrter Richtung, also vom Protein über Messenger-RNA-ähnliche Strukturen, zum Genom fließen könne.-Die Diskussion dieser Probleme ist in der vergangenen Zeit durch die Entdeckung von sogenannten Pseudogenen wieder aktiviert worden. Sie war früher schon anlässlich der reversen Transskription von Tumorvirus-Genomen, der Transposons und anderer extrachromosomaler Informationen wie Plasmide, i-RNA, i-DNA und extrazellulärer DNA immer wieder aufgetreten.

Pseudogene, Transposons und Retroviren weisen Gemeinsamkeiten auf, die auf eine sogenannte illegitime Kombination schließen lassen. Illegitim wird diese Art des Einbaus von Information in das Genom genannt, weil sie im Genom an einem Ort stattfindet, der der normalen Rekombination nicht zugänglich ist. Sie beruht auf Mechanismen, die sich von der üblichen. Rekombination unterscheiden und Informationen in bisher unbekannter linearer Zuordnung etabliert. Neben den rein strukturellen Gemeinsamkeiten existieren auch funktionelle Gemeinsamkeiten, die geeignet sind, den Kreis extrachromosomaler informatorischer Elemente zu erweitern und die biologische Konsequenz in Hinblick auf Anpassung und Selektion verständlich zu machen.

### Diskussion

Herr SCHNELLEN: Es gibt immer noch ernstzunehmende Leute, die die Mutationstheorie und die Klon-Selektions-Theorie von BURNET vertreten. Genetisch kann doch höchstens vorprogrammiert sein, daß eine Abwehr gegen Fremdeiweiß erfolgt. Aber es kann doch nicht alles genetisch derart vorprogrammiert sein, daß keine Möglichkeit mehr besteht, irgendein Fremdeiweiß zu inkorporieren.

Herr JACHERTZ: In der Wissenschaft gibt es Hypothesen, Dogmen und experimentelle Ergebnisse. Es kommt immer darauf an, auf welcher Seite man steht. Dann sagt man entweder: "Schade für die schönen Ergebnisse, sie stimmen mit dem Dogma nicht überein", oder "Schade für das schöne Dogma, es stimmt mit den Ergebnissen nicht überein." Ich glaube, wir haben uns verstanden.

Herr K.E.THEURER: Die Ergebnisse zeigen, daß Sie hauptsächlich mit Untereinheiten von der DNA und RNA arbeiten. Deswegen glaube ich, daß die entscheidende Weiterentwicklung unserer organotherapeutischen Methoden darin besteht, informative Untereinheiten und Domänen von Proteinen und Peptiden zu verwenden. Diese Untereinheiten könnten ggf. wieder rückläufig in genetische Informationen umgesetzt werden. Ein komplettes Proteinirolekül kann als ganzes jedenfalls nicht umgesetzt werden.

Eine sehr wichtige Frage wäre, ob Untereinheiten dieser Moleküle, die sog. Domänen, genügend Informationsinhalte für die Restitution und Regeneration von Molekülen vermittelt.

Eine weitere Frage ist die nach den Lernvorgängen für somatische Zellen. Keimzellen sind gewissermaßen abgeschirmt gegen eine Neuaufnahme von Information, um die Integrität ihrer eigenen Information aufrechtzuerhalten. Die somatischen Zellen müßten jedoch nach Ihren Ausführungen durchaus lernen können. Der Schritt von der RNA zur DNA ist mittlerweile geklärt. Für den Schritt vom Peptid zur RNA und dann zur DNA liegen noch keine lückenlosen Beweise vor, obwohl einige Indizien dafür sprechen (K. THEURER: "Eine neue Instruktionstheorie", *Infection* 3, 178-181 (1975)).

Herr JACHERTZ: Die Arbeitsgruppe und LEDER hat eindeutig gezeigt, daß Zellen in der Lage sind, zu lernen. Zellen sind, ebenso wie etwa Computer, lernfähige Systeme. Zur Frage, ob ein Informationsfluß vom Protein auf die RNA möglich ist, kann man im Moment noch nicht sagen. Vielleicht erinnert man sich jedoch an die Vorgänge um TEMIN, der die reverse Transkriptase bei diesen Retroviren, bei diesen onkogenen RNA-Viren entdeckt hatte. TEMIN hatte 10 Jahre lang zu kämpfen, bis er seine Ergebnisse publizieren durfte. LEDER sagte in Bezug auf seine Ergebnisse: "Hätte ich dieses Gen 1948 entdeckt, hätte es mir jeder ohne weiteres sofort abgenommen, weil diese Befunde mit dem, was wir von den prokaryonten Zellen kennen, zusammenpaßt. Schwierigkeiten wegen einer Publikation hat es nur deshalb gegeben, weil in der Zwischenzeit gezeigt wurde - ausgehend von den Ergebnissen der Adenoviren -, daß man eben in der eukaryonten Zelle unterscheiden muß zwischen Extrons und Introns.

Sie sehen aus diesen Hintergründen, daß nicht nur die experimentellen Daten ausschlaggebend sind, sondern auch gewisse Strömungen, Moden, Emotionen, das Bild unseres gegenwärtigen Irrtums, wenn ich das mal so sagen darf, beeinflussen. Man weiß nicht, ob irgendwo auf der Welt jemand existiert, der das zwar experimentell schon durchführen, seine Ergebnisse aber noch nicht veröffentlichen kann. Wer die Molekularbiologie von Anfang an verfolgt hat, wie viele hier von Ihnen, der wird in vieler Hinsicht gespannt sein, skeptisch sein, was alles noch auf uns zukommen wird. Entscheidende neuere Erkenntnisse, die alles wieder über den Haufen werfen können, können schon morgen in der Presse stehen, das kann aber auch noch 5 oder 10 Jahre dauern.

Herr STIEFFEL: Sie haben uns hier diese Umsetzung von Erbinformationen in die DNA am Beispiel der Antikörpersynthese demonstriert. Dabei haben Sie immer nur über den konstanten Anteil der Antikörpersynthese gesprochen. Wäre es denkbar, auch den variablen Anteil in dieser Weise zu codieren und in die DNA einzuschleusen und damit einen Antikörper zusammenzubauenden man für ganz spezielle Aufgaben codieren möchte, beispielsweise monoklonale Antikörper, die gegen ganz bestimmte Tumoren gerichtet sind.

Herr JACHERTZ: Das ist sicher möglich, habe das hier nur nicht diskutiert und nicht beschrieben, weil es für diesen speziellen Zweck aus didaktischen Gründen darauf ankommt, die Nachbarschaft des J-Gens mit dem T-Gen: zu zeigen. Die Nachbarschaft des J-Gens mit dem V-Gen hätte uns nicht diese Rückschlüsse erlaubt. Wenn Sie von einem V-Gen einen Klon herstellen, ist es sicher ohne weiteres möglich, diesen Klon mit einer entsprechenden C-Information zu kombinieren. Dann können Sie damit genauso spielen, wie es die Natur mit diesen Molekülen macht.

Herr STIEFFEL: Kennen Sie Experimente, die in dieser Richtung schon durchgeführt wurden? Liegen hier schon Publikationen vor?

Herr JACHERTZ: Also wenn ich mich nicht gerade selber zitieren möchte, dann wüßte ich im Moment niemanden, der daran arbeitet.

Auditorium: Wir wissen jetzt, die Zelle kann lernen, kann Informationen neu in sich aufnehmen. Wir stehen damit vor einem ganz großen Problem, wer und was steuert überhaupt, was eine Zelle lernen darf und was sie nicht lernen darf. Wenn sie alles lernen würde, was man ihr anbietet, müßte dies doch zur Katastrophe führen.

Herr JACHERTZ: Jahrzehntlang war man der Meinung, der hypothetischen Meinung möchte ich sagen, die DNA sei nur Mutationen zugänglich. Vom Standpunkt der Evolution, vom Standpunkt der Konstanz der Information und von Standpunkt der Vererbung hat man sich überaus sicher gefühlt. Diese Sicherheit ist zum ersten Mal mit der Entdeckung der Plasmide bei den Bakterien ins Wanken geraten. Die Konsequenz der Plasmide war die, daß wir plötzlich Antibiotika-resistente Bakterien haben. Dieses Unbehagen wurde noch drastisch verstärkt, als innerhalb der Plasmide die Transposons entdeckt wurden. Die Angst wurde noch vergrößert, als Restriktionsenzyme entdeckt wurden. Das hat geradezu zu hysterischen Reaktionen geführt, das Genetic engineering überhaupt zu verbieten. Es ist jedoch nachgewiesen, daß die Plasmide schon Jahrtausende vor der Erfindung der Antibiotika existierten, ganz einfach deshalb, weil die Antibiotika auch schon Jahrtausende existieren. Nur haben wir nichts davon gewußt. Trotzdem hatte die Welt eine gewisse Ordnung. Ebenso verhält es sich mit den Transposons, mit den Tumorviren und den ganzen hier beschriebenen Prozessen.

Natürlich haben wir, wenn wir etwas neues entdecken, zunächst einmal eine gewisse Entdeckerfreude, danach kommt immer das Wenn und Aber. Zunächst hat man ungeheure Angst. In dieser Angst sollte man sich am besten daran erinnern, daß die Natur ja nicht dadurch gefährlicher wird, daß wir sie verstehen. Sie bleibt so, wie sie ist. Was wir machen können, sind nur ganz geringe Veränderungen. Auch wenn wir heute noch nicht verstehen, so besteht trotzdem kein Anlaß, irgendwelche Monster auszumalen und in riesige Abgründe von Science fiction zu fallen. Diese Vorgänge spielen sich doch schon seit biblischen Zeiten oder noch länger ab.

## Rekonstruierte Virusmembranen als biologische Vehikel

R.T.C. HUANG

Institut für Virologie  
Fachbereich Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Penetration vieler sogenannter umhüllter Viren verläuft bekanntlich über eine Fusion der Virushülle mit der Zellmembran, wobei das im Virusinnern lokalisierte Material in die Zelle eingeschleust wird. Für diese Membranfusion sind Proteine der Virushülle verantwortlich. So zeigt sich, daß bei der Infektion der Influenzaviren die zwei Proteine der Virushülle, Hämagglutinin und Neuraminidase, in einer konzertierten Aktion Adsorption und Penetration der Viren ermöglichen.

Grundsätzlich können diese Einschleusungsmechanismen von viralem Material in die Zelle auch auf die Verabreichung anderer Substanzen übertragen werden, d.h. rekonstituierte Virusmembranen, die virale Proteine tragen, können mit biologisch aktiven Substanzen beladen und so als deren Vehikel für die Penetration in die Zelle benutzt werden.

Um Virusmembranen zu rekonstituieren, werden diese zuerst mit Detergentien solubilisiert, um sie von anderen Komponenten der Viren abzutrennen. Nach Entfernung der Detergentien - meistens durch Dialyse - assoziieren sich die solubilisierten Komponenten wieder zu einer Membranstruktur, die hauptsächlich aus geschlossenen Membrankapseln (Vesikeln) bestehen. Bei Benutzung der Influenzaviren als Ausgangsmaterial erhält man Membranvesikel, die sich elektronenmikroskopisch von der nativen Virusmembran nicht unterscheiden. Sie besitzen wie bei den nativen Viren zelladsorbierende und membranfusionierende Aktivitäten. Diese Vesikel schließen in ihrem Innern, je nach ihren internen Volumina, unterschiedliche Mengen der vorgelegten Lösung ein. Es ist daher möglich, rekonstituierte Virusmembranen mit beliebigen wasserlöslichen Substanzen zu beladen.

Rekonstituierte Virusmembranen sind in der Lage, bei Kontakt mit der Zelle ihren Inhalt in sie einzuschleusen. Daß dieser Vorgang tatsächlich stattfindet, wurde im Modellversuch mit Zellkulturen eindeutig bewiesen. So konnte z.B. gezeigt werden, daß fremde Gene mittels dieser Vesikel in Zellen eingeschleust wurden, wo sie ihre Funktion in neuer Umgebung ausüben konnten. Ebenfalls konnte mit einer ganz anderen Methode - nämlich durch Verwendung fluoreszierender Marker - gezeigt werden, daß die Vesikel ihren fluoreszierenden Inhalt in die Zelle einschleusen. Diese Ergebnisse bahnten den Weg zu einer neuen Methode, biologisch aktive Substanzen wie Pharmaka, Toxine, Enzyme oder sogar erwünschte Gene in die Zelle zu injizieren.

Zur therapeutischen Anwendung rekonstituierter Virusmembran als biologische Vehikel sind folgende Punkte zu überlegen:

1. Nach intravenöser Verabreichung sollen die Vesikel primär an die erkrankten Zielorgane transportiert werden, damit die gesunden Organe möglichst unangetastet bleiben. Um dies zu erreichen, muß ein "Lenksystem" oder ein "Lotsenmolekül" in die Membran miteingebaut werden. Dieses Lotsenmolekül kann z.B. ein Antikörper sein, der an ein organspezifisches Antigen bindet. Hormone können ebenfalls als Lotsenmoleküle dienen, da sie naturgemäß zu ihren Zielorganen geführt werden, wo sie von spezifischen Rezeptoren erkannt werden. Eine andere Art des "Lenkens" ergibt sich aus der Beobachtung, daß organspezifische Komponenten oft vorzugsweise an diese Organe transportiert werden. So können z.B. künstliche Vesikel, die ein gehirnspezifisches Lipid (das sog. Sulfatid) als Komponente enthalten, vorzugsweise an das Gehirn gelangen. Gleicherweise kann eine Vielzahl von Molekülen in das Lenksystem eingesetzt werden, wenn sich dieses Prinzip als allgemeingültig herausstellt.
2. Bei der Verwendung von Virusmembranen muß eine mögliche Immunreaktion des Körpers in Betracht gezogen werden. Für die Langzeittherapie müssen daher immer andere Viren für die Rekonstitution benutzt werden. Ein alternativer Weg wäre die Benutzung einfacher Vesikel, die keine Virusproteine tragen. Dafür könnten einige Lipide wie Lysolecithin und Monoglyceride aufgrund

ihrer bekannten Fusionseigenschaft die Virusproteine ersetzen. Diese Lipide besitzen jedoch starke lysierende Wirkung und können eine allgemeine Zellyse auslösen.

3. Die Besonderheit der rekonstituierten Virusmembran liegt wie bereits erwähnt in ihrer Fähigkeit, mit der Zellmembran zu fusionieren. Die Membranfusion ist aber ein ubiquitäres Phänomen, das außer im Virussystem noch vielfach Anwendung findet. Normale Zellen beispielsweise unterliegen ständig einem Membranflux, der durch wechselseitige Fusion zytoplasmatischer (intrazellulärer) Membranen und der Plasmamembran zustande kommt. Es ist anzunehmen, daß auch solche Membranfusionen durch spezifische Proteine vermittelt werden. Es besteht daher die Möglichkeit, körpereigene "Fusionsproteine" in die künstliche Vesikel einzubauen. Dann würde sich das Problem der Immunreaktion erübrigen.

Es muß zum Schluß festgehalten werden, daß das Experimentierstadium zu diesem neuen therapeutischen Prinzip - rekonstituierte Membranen als biologische Vehikel - noch nicht abgeschlossen ist. Nach den bisherigen Befunden ist die Aussicht für eine praktische Anwendung dieser Methode groß. Hieran arbeiten zur Zeit Mediziner, Chemiker und Physiker in gemeinsamer interdisziplinärer Forschung.

#### Diskussion

H. RAHMANN: Zwei Aspekte sollten wir beleuchten: Einmal die außerordentlich positiven Aspekte dieser Virusapplikation, zum anderen aber auch die Schwierigkeit, die Organspezifität derartiger Liposomen zu erhöhen.

H. PORCHER: Sie erwähnten, die Liposomen an sich wären nicht antigen. Ohne Beladung kann ich mir das zwar vorstellen; wie sieht es nun aber aus, wenn Liposomen mit Proteinen beladen werden?

H. RAHMANN: Selbstverständlich müssen wir - das hatte ich auch angedeutet - mit bestimmten Antigenitäten rechnen. Aber es ist ein Unterschied, ob wir Liposomen herstellen, bei denen die Lipidmembran ausschließlich aus Lipoiden besteht, oder wenn wir Proteine in die Membran einbauen. Im einen Fall ist die Antigenität verringert, bei in die Lipidmembran eingebauten Proteinen müssen wir allerdings

mit höherer Antigenität rechnen. Würden Sie mit mir darin übereinstimmen, Herr HUANG?

H. HUANG: Ja!

J. SEIFERT: Eine ganz entscheidende Frage scheint mir die Halbwertszeit dieser Liposomen oder auch dieser Viruspartikel zu sein. Ich habe Untersuchungen vermisst, die Rückschlüsse auf die Halbwertszeit der verschiedenen Liposomen auf der einen Seite und der Viruspartikel im lebenden Organismus auf der anderen Seite zulassen. Mich interessiert nicht so sehr, wie die Halbwertszeit im Reagenzglas aussieht, sondern wie lange ein solches Partikel - ob es sich nun um ein Liposom handelt oder ein Viruspartikel - beispielsweise im Blut im intakten Zustand nachweisbar ist.

H. RAHMANN: Die Halbwertszeit ist für liposomal verpackte Substanzen in jedem Fall erhöht. Wir können davon ausgehen, daß Peptide und auch andere Stoffe, die sonst sehr schnell in unserem Organismus abgebaut würden, wenn sie exogen zugeführt werden, in Liposomen inkorporiert eine wesentlich längere Verweildauer haben.

J. SEIFERT: Die biologische Verfügbarkeit ist ein weiterer Gesichtspunkt, der hier mitspielt. Die in Liposomen verpackten Substanzen sind in dem Moment nicht biologisch verfügbar.

H. RAHMANN: Nein, selbstverständlich nicht. Man geht davon aus, daß sich die liposomal verpackten Substanzen - so unsere Hoffnung - an Zellmembranen anlagern, dort mechanisch gesehen länger verweilen und auf diese Weise ihren Inhalt an die Zielzelle weitergeben.

D. JACHERTZ: Kann man das Problem der Antigenität nicht dadurch lösen, daß man als Protein Poolmaterial vom Blutspendedienst verwendet? Verwenden wir Proteine, die aus einem Pool stammen, aus vielen oder hunderttausenden Blutkonserven, ist erfahrungsgemäß die Antigenität erheblich reduziert.

Wenn wir Targeting betreiben, dadurch, daß wir Antikörper in die Membran einbauen, muß man hier nicht mit der Möglichkeit einer Komplementaktivierung rechnen? Besteht nicht die Gefahr, daß das Liposom in dem Augenblick kaputtgeht, wo es an die Zellmembran angelagert wird und der Antigen-Antikörper-Kontakt hergestellt wird? Könnte man dieses Problem dadurch lösen, indem man anstatt kompletter Antikörper Fab-Bruchstücke einsetzt?

K.E. THEURER: Wir haben auf diesem Gebiet eigene patientierte Verfahren entwickelt und verwenden sowohl Zellmembranen von Organzellen als organotrope Komponenten, als auch Antikörperfragmente. Ein Problem ist die primäre Stabilität der Liposomen. In Form der reinen Phospholipide sind Liposome nicht sehr stabil. Man kann die Liposomenmembran aber durch Polymerisationsprodukte stabilisieren. Wenn man nicht-pathogenes und nicht-toxisches Material zur Stabilisierung der Liposomenmembran mitverwendet, sehe ich ganz große Möglichkeiten, die in verschiedenen REVITORGAN-Präparaten bereits realisiert sind.

Untersuchungen zur Pharmakokinetik  
Gangliosid-haltiger Liposomen

W. PROBST, M. MÜHLEISEN, B. HEPPELMANN  
H. RAHMANN

Institut für Zoologie, Universität Stuttgart-Hohenheim

Liposomen, von Lipidmembranen umschlossene Vesikel mit wässrigem Innenraum, gewinnen in der Pharmakologie immer mehr an Bedeutung insofern, als sie als Transportsysteme für sonst leicht abbaubare Pharmaka dienen können.

Das Forschungsinteresse bezüglich dieser künstlichen Transportvesikel konzentriert sich derzeit zum einen besonders auf die Verbesserung ihrer Stabilität, z.B. durch polymerisierbare Lipide (2), und zum anderen auf die Möglichkeit, durch Einbau verschiedenster Substanzen in die Liposomenmembran eine Organspezifität zu erhalten. Eine Möglichkeit ist z.B. die Ausstattung der Liposomen mit spezifischen Proteinen (3). Man handelt sich dadurch aber eine stark erhöhte Antigenität der Liposomen ein und verschlechtert so wieder die Pharmakokinetik verpackter Substanzen. Der Einbau spezifischer Lipide in die Liposomenmembran bringt diesen Nachteil nicht oder nur schwach mit sich.

Für unsere Untersuchungen stellten wir mit Hilfe einer Dialyseapparatur (Lipoprep, Fa. Diachema), bei der alle Herstellungsparameter kontrollierbar sind, uni- bis bilamellare Liposomen mit einem Durchmesser von 90 - 150 nm her. Die Größe der Liposomen bestimmt schon zu einem großen Teil ihre Verteilung im Körper: So ist die Anreicherung von Liposomen in Leber und Milz um so höher, je größer und heterogener die Liposomen sind. Hohe Plasmaspiegel können nur durch kleine, homogene uni- bis bilamellare Vesikel erreicht werden (1).

Als Matrixlipide verwandten wir Lecithin aus Hühnerei und radioaktiv markiertes Cholesterol. Als Gehirn-spezifische Lipide benutzten wir ein aus Rattenhirn extrahiertes und gereinigtes Gangliosidgemisch. Ganglioside sind Neuraminsäure-haltige Glykolipide, die zusammen mit Glykoproteinen die Glykocalix jeder Zelloberfläche

aufbauen und dadurch die Spezifität der Zelle mitbestimmen. Im Nervengewebe jedoch sind solche Ganglioside im Vergleich zu allen anderen Geweben 20fach angereichert.

Lecithin, Cholesterol und Ganglioside wurden im molaren Verhältnis 1 : 0,5 : 0,25 zur Liposomenherstellung eingesetzt. Für die Untersuchungen verwandten wir Liposomen aus: 1) Lecithin und Cholesterol sowie aus 2) Lecithin, Cholesterol und Gangliosiden. Darüberhinaus gelangten diese drei Bestandteile auch noch als wässrige Mizellensuspension, d. h. als zylindrische, sphärische oder ellipsoide Lipidpartikel sehr verschiedener Größe, zur Anwendung.

Eine Suspension der Liposomen bzw. Mizellen in physiologischem Phosphatpuffer wurde jeweils 5 Ratten in die Schwanzvene injiziert. Nach verschiedenen Inkorporationszeiten wurden die Tiere getötet und es wurden Blut, Leber und Cerebellum (als Teil des Zielorgans Gehirn) entnommen. Wie die Abb. 1 zeigt, bleibt der Blutspiegel für beide Liposomenpräparationen im Gegensatz zur Mizellensuspension länger stabil hoch. Wie eingangs schon erwähnt, werden auch hier die inhomogenen und relativ großen Partikel der Mizellensuspension schnell von der Leber abgefangen (Abb. 1b) und von dort langsam, wahrscheinlich schon in metabolisierter Weise, an das Blut weitergerreicht (Abb. 1a und b). Zwischen Liposomen mit und ohne Gangliosiden scheinen sich nur im Falle des Cerebellums (Abb. 1c) Unterschiede zu ergeben. Beachtet man aber die unterschiedliche Ordinatoreinteilung, so wird deutlich, welcher verschwindend geringer Anteil insgesamt überhaupt nur durch die Blut-Hirnschranke gelangte (ca. 1 %).

Eine Aussage über Organspezifität läßt sich daher aufgrund dieser Befunde noch nicht machen. Dahingehend wurde noch einmal die Möglichkeit zur Verbesserung der Pharmakokinetik (längere Verweildauer im Blut) mit Hilfe von kleinen homogenen Liposomen bestätigt.

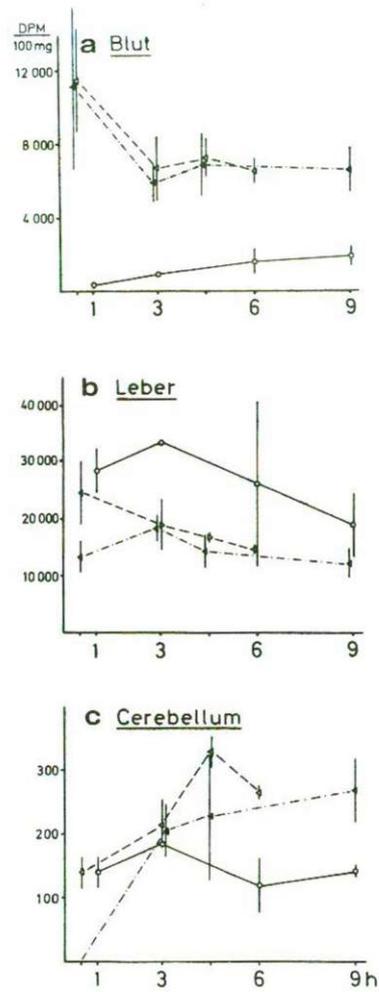


Abb. 1: Verteilung der Radioaktivität (DPM / 100 mg Gewebe) in Blut (a), Leber (b) und Cerebellum (c) nach verschiedenen Inkorporationszeiten.

○ — ○ = Mizellen;  
 ▼ - - ▼ = Liposomen ohne Ganglioside;  
 ▼ - - ▼ = Liposomen mit Gangliosiden.

Literatur:

1. BELLENBERG, G.: "Pharmakokinetik von physikalisch-chemisch definierten unilamellaren und multilamellaren Liposomen in der Ratte"; Dissertation Nr. 6644 an der ETH Zürich, S. 16 (1980)
2. GROS, L., RINGSDORF, H. und SCHUPP, H.: "Polymere Antitumor-mittel auf molekularer und zellulärer Basis"; *Angew. Chem.* 93, 311-332 (1981)
3. HUANG, R.T.C.: vgl. Referat in diesem Symposium

## Myasthenia gravis :

Die Pathogenese einer Autoimmunkrankheit.

U.-P. KETELSEN

Universitätskinderklinik und Max-Planck-Institut  
für Immunbiologie  
Freiburg

Die Myasthenia gravis ist bei einer jährlichen Neuerkrankungsrate von 2-5 Patienten pro Millionen Bevölkerung und einem ständigen Vorkommen von ca. 50 Patienten pro Millionen eine vergleichsweise sehr seltene Erkrankung. Dessen ungeachtet ist die Myasthenie seit Jahren Gegenstand intensiver Forschungsanstrengungen. Das mag z.T. darin begründet sein, daß die Aspekte dieser Krankheit Forscher der unterschiedlichsten Disziplinen interessieren und in geradezu klassischer Weise eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Physiologen, Immunologen, Pathologen und Neurologen erbrachte. Wir werden sehen, wie segensreich sich diese Zusammenarbeit, die auch bei anderen myogenen und neuromuskulären Erkrankungen zu fordern ist, für die Aufklärung der Ursache und Krankheitsentstehung auswirkte.

Im Jahre 1933 erlebte die schottische Neurologin MARY WALKER (17) einen therapeutischen Triumph. Unter ihren Patienten befand sich ein Myastheniker mit der klassischen neurologischen Symptomatik, d. h. einer abnormalen Muskelschwäche, insbesondere Ermüdbarkeit nach körperlicher Bewegung und teilweise Erholung nach Ruheperioden. Dieses Krankheitsbild erinnerte WALKER an Vergiftungen mit dem südamerikanischen Pfeilgift Curare. Sie handelte folgerichtig und behandelte mit dem Gegengift Physostigmin. Der Erfolg war dramatisch. Der Patient erschien vorübergehend geheilt. Allerdings hielt die Besserung nur so lange an, wie genügend hohe Dosen im Organismus vorhanden waren. Physostigmin, das war schon damals bekannt, verstärkt die neuromuskuläre Erregungsübertragung, also mußte der Defekt bei der Myasthenie im Bereich dieser neuromuskulären Erregungsübertragung liegen. Diese Schlußfolgerung wurde inzwischen vielfach und eindeutig bestätigt. Allerdings ist

heute bekannt, daß die Myasthenie nicht alleine eine neuromuskuläre Erkrankung, sondern die gestörte Signalübertragung an den Kontaktstellen zwischen Nerven und Muskeln Folge eines Autoimmunleidens ist.

#### Das Immunsystem und Autoimmunleiden

Dringen Bakterien, Pilze oder Viren in unseren Körper ein, so werden die meisten von ihnen, noch ehe sie sich einnisten und Unheil stiften können, vom Immunsystem abgefangen und beseitigt. So lebensnotwendig damit dieses Abwehrorgan ist, so lebensbedrohend kann es werden, wenn es sich irrtümlich gegen körpereigene Strukturen wendet. Es kommt dann zu sog. Autoimmunleiden. Ein Beispiel dafür ist die Myasthenia gravis. Die wichtigsten Werkzeuge der Immunabwehr sind Lymphozyten, d. h. weiße Blutkörperchen. Etwa eine Billion dieser Zellen ist über den gesamten Organismus verteilt. Sie haben die Aufgabe, körperfremde Strukturen, d.h. sog. Antigene, zu erkennen und in Zusammenarbeit mit anderen Zellen des Immunsystems unschädlich zu machen. Beide Prozesse, die Immunerkennung wie die anschließende Immunreaktion, erfolgen hochspezifisch, d.h. ganz gezielt. Jeder Lymphozyt ist nur auf eine ganz bestimmte Antigenstruktur spezialisiert. Deshalb muß das Immunsystem, um einen lückenlosen Schutz zu gewährleisten, für jede denkbare Antigenstruktur die passenden Lymphozyten bereithalten. Man schätzt, daß das Immunsystem bis zu einer Million Lymphozyten von unterschiedlicher Spezifität enthält. Dabei bezeichnet man sämtliche Lymphozyten mit jeweils gleicher Spezifität als Klon. Trotz seines breit gefächerten Arsenalts darf das Immunsystem nur gegen körperfremde, nicht aber gegen körpereigene Strukturen reagieren: Es muß also "fremd" nicht nur erkennen, sondern auch von "selbst" unterscheiden. Es war lange umstritten, worauf diese "Selbst"-Toleranz beruht. Die einen meinen, daß selbsterkennende Lymphozyten als verbotene Klone noch während der Embryogenese, also vor der Geburt ausgesiebt würden. Dagegen stand die andere Ansicht, daß auch im reifen Immunsystem potentiell selbsterkennende Lymphozyten vorliegen, aber durch Kontrollmechanismen daran gehindert werden, ihre gefährliche Funktion auszuüben. Tatsächlich trifft diese zweite Hypothese zu. So weiß man heute, daß an jeder Immunreaktion auch kontrollierende Zellen beteiligt sind, die als sog. Suppressorzellen den rein aggressiven Lymphozyten entgegen-

wirken. Sie sorgen dafür, daß eine Immunreaktion sich in vernünftigen Grenzen hält. Die erwähnte Selbsttoleranz beruht also darauf, daß die selbsterkennenden Lymphozyten durch kontrollierende Suppressorzellen niedergehalten werden. Folglich können Autoimmundleiden nur dann entstehen, wenn diese Kontrolle versagt, wenn z.B. die Suppressorzellen zahlenmäßig oder funktionell geschwächt sind, oder wenn die selbsterkennenden Lymphozyten übermäßig aktiviert werden und die fein abgestimmte Kontrolle durchbrechen.

#### Merkmale der Myasthenia gravis

Die Myasthenia gravis zeichnet sich durch 4 ganz charakteristische Merkmale aus.

1. durch die bereits erwähnte Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung mit dem Hauptsymptom der abnormalen Muskelschwäche.
2. findet man im Blutserum dieser Patienten Autoantikörper, die gegen bestimmte Empfangsstrukturen im Bereich der Signalübertragung vom Nerven auf den Muskel reagieren, nämlich gegen die noch zu erläuternden Acetylcholinrezeptoren. Diese von Lymphozyten gebildeten Antikörper zeigen an, daß eine Autoimmunreaktion im Gange ist.
3. gelten Vergrößerungen oder Wucherungen des Thymus, eines Organs des Immunsystems, das hinter dem oberen Brustbein sitzt, als charakteristisches Merkmal der Myasthenie und
4. besteht eine gewisse genetisch bedingte Bereitschaft für Myasthenie, die sich in einer familiären Häufung, nicht aber Erblichkeit des Leidens ausdrückt. Diese genetische Bereitschaft ist an dieselben Erbfaktoren gebunden, die auch die individuelle Reaktionsbereitschaft des Immunsystems bedingen.

Klassische Fälle der Myasthenie weisen alle 4 Charakteristika auf, wenn auch mit unterschiedlicher Ausprägung und Gewichtung. Bis in die jüngste Zeit war es nicht gelungen, diese charakteristischen Merkmale in ein einheitliches Bild zu fassen.

#### Die neuromuskuläre Erregungsübertragung

Die **Erregungsübertragung** vom motorischen Nerven zum Muskel geschieht **über** einen komplexen Mechanismus, der in mehreren Einzelphasen **abläuft** und an dem in **streng** koordinierter Weise alle die

Zellspezialisierungen beteiligt sind, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

Die Kontaktstelle zwischen Nerv und Muskel läßt sich in 3 strukturelle Elemente aufgliedern (Abb. 1):

1. Die Endigung des motorischen Nerven,
2. den Faltenbereich der innervierten Muskelzellmembran und
3. den zwischen beiden Strukturen liegenden, sog. subsynaptischen Spalt.

Die axonale Nervenendigung ist knopfartig aufgetrieben und enthält charakteristische Strukturen. Gehäuft finden sich kleine Bläschen, die den chemischen Boten für die Erregungsübertragung enthalten, das Acetylcholin. Alle Bläschen sind ungefähr gleich groß und können etwa 5-10.000 Acetylcholinmoleküle aufnehmen. Auf eine Nervenenerregung, aber auch in geringem Maße spontan, gelangen diese Acetylcholin-speichernden Bläschen an die Membran der Nervenendigung, verschmelzen mit ihr und entleeren ihren Inhalt in den darunterliegenden subsynaptischen Spalt, der den Nerven vom Muskel trennt. Besonders hoch spezialisiert ist nun die Membran der darunterliegenden Muskelzelle. Sie besitzt eine Vielzahl z.T. verzweigter Falten, an deren Scheitelregionen die bereits erwähnten Acetylcholinrezeptoren sitzen, an die das aus den Bläschen der Nervenendigung entleerte Acetylcholin vorübergehend gebunden wird. Die Acetylcholinrezeptoren sind Membranproteine, die die gesamte Membran durchdringen. Sie sind aus Untereinheiten zusammengesetzt und bilden eine Ringstruktur, deren zentrale Lücke wahrscheinlich ein Kanal für Ionen darstellt (9). Die Acetylcholinmoleküle werden nun an eine spezifische Bindungsstelle dieses Rezeptormoleküls gebunden. Durch die Bindung von Acetylcholinmolekülen wird das Rezeptormolekül sterisch verändert. Offensichtlich wird die zentrale Lücke im Rezeptorkomplex erweitert und erlaubt dadurch den zeitlich begrenzten Durchfluß bestimmter Ionen (Natrium und Kalium). Dadurch schließlich werden die elektrischen Eigenschaften der Muskelzellmembran verändert, was letztlich über weitere komplizierte Mechanismen zur Kontraktion, zum Zusammenziehen der Muskelzelle führt. Diese hier kurz skizzierte Erregungsübertragung vom Nerven auf den Muskel ist zeitlich scharf begrenzt, folglich darf die Überträgersubstanz Acetylcholin nur kurzzeitig wirken. Um sicherzustellen, daß nicht gebundene, über-

schüssige Acetylcholinmoleküle oder vom Rezeptor wieder freigesetztes Acetylcholin weiter freie Rezeptormoleküle besetzten, findet sich über den gesamten Bereich dieses Membranareals verteilt ein Enzym, welches das freie Acetylcholin spaltet.

Die Spaltprodukte können z.T. in der Nervenendigung wieder erneut zur Synthese des Acetylcholins verwendet werden.

#### Die myasthenische Endplatte

Der hier kurz skizzierte Signalfluß zwischen Nerven und Muskel wird beim Myastheniker immer stärker behindert und am Ende völlig blockiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung von Muskelgewebe dieser Patienten bietet nur geringe pathologische Veränderungen. Zwar wurde von abnormen Verteilungen der Nervenendigungen auf die befallenen Muskeln berichtet (2), und in seltenen Fällen fanden sich auch einkernige Zellen, die in diesen Bereich eingewandert waren, insgesamt sind diese Veränderungen aber selten oder nur milde ausgeprägt.

Um so dramatischer sind hingegen die ultrastrukturellen Veränderungen an der motorischen Endplatte, wie sie sich bei elektronenmikroskopischer Analyse darbieten (5). In fortgeschrittenen Fällen imponiert eine nahezu vollständige Abflachung des muskelzellulären Faltenapparats. Dies ist vor allem in späten Phasen der Erkrankung der Fall. Dabei ist das beschriebene Nervenende in keiner Weise verändert. Diese elektronenmikroskopischen Befunde werden vollständig durch elektrophysiologische Ergebnisse bestätigt. Die Dosis und Wirksamkeit der aus den erwähnten Bläschen des Nervenendes entleerten Acetylcholinmoleküle sind völlig normal. Die Muskelschwäche beruht also auf einer Zerstörung oder Blockierung des muskelzellulären Faltenapparats und, wie wir heute wissen, insbesondere der dort lokalisierten Empfangsstrukturen, den Acetylcholinrezeptoren. Die Muskelschwäche und Ermüdbarkeit läßt sich folgendermaßen erklären:

Um **einen** teilweise zerstörten Faltenapparat zu erregen, müssen **hohe** Dosen des Acetylcholins aus den Bläschen des Nervenendes **ausgeschüttet** werden. Bei wiederholter Erregung nähern sich die im **Nervenende** gespeicherten Acetylcholinvorräte der Erschöpfung und **umgekehrt** bilden sich die Symptome nach Erholungspausen teilweise **zurück**. Heute ist klar, daß Autoantikörper mit ausschließlicher

Spezifität gegen die Rezeptoren des Faltenapparates für die Veränderungen dieses Muskelzellbereichs verantwortlich sind. Wir verdanken dieses Wissen einer intensiven Forschungstätigkeit, die durch einen Bericht des Jahres 1973 ausgelöst wurde (12).

#### Experimentelle Autoimmun-Myasthenie

Die kalifornischen Neurobiologen PATRICK und LINDSTROM (12) wollten Antikörper gegen isolierte Rezeptormoleküle herstellen, um damit biochemische Strukturanalysen dieses Moleküls zu ermöglichen. Sie isolierten den Rezeptor aus dem elektrischen Organ des Zitterrochenes Torpedo, der die reichste Quelle des Rezeptors überhaupt darstellt, und injizierten dieses Material in Kaninchen. In der Tat ließen sich nach der üblichen Frist vom 14 Tagen die gewünschten Antikörper aus dem Serum dieser Tiere nachweisen. Völlig überraschend waren aber alle Tiere schwer erkrankt. Sie waren gelähmt und die Lähmungserscheinungen wurden nach geringen Bewegungen noch weiter verschlimmert. Es stellte sich heraus, daß diese Tiere an Myasthenie erkrankt waren. Neben den fischspezifischen Antikörpern gegen den Rezeptor hatten sich nämlich Antikörper gebildet, die an die eigenen Rezeptoren banden, also echte Autoantikörper gegen den Rezeptor darstellten. Daß diese überraschenden Ergebnisse im Tierexperiment auch für die menschliche Myasthenie Gültigkeit haben mußten, wurde nun durch mehrere Beobachtungen bestätigt. Wie bereits erwähnt, können auch bei Myasthenie-Patienten Autoantikörper gegen die eigenen Rezeptoren im Blutserum nachgewiesen werden. TOYKA und Mitarbeiter übertrugen 1975 diese Antikörper auf Mäuse und erreichten damit bei diesen Tieren das klassische Bild einer Myasthenie (16). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Myasthenie von Säuglingen myasthenischer Mütter, welche einen "Antikörper-transfer-Versuch der Natur" darstellt. In späten Phasen der Schwangerschaft gelangen offensichtlich diese Antikörper über die Plazenta der myasthenischen Mütter in den fötalen Kreislauf. Sie verursachen dort die Symptome einer Myasthenie. Da aber im Fötus keine solchen Antikörper aktiv gebildet werden, sinkt der Antikörpertiter nach der Geburt, die Antikörper werden ausverdünnt und die Säuglinge erholen sich regelmäßig.

Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Wirksamkeit von Autoantikörpern gegen den Acetylcholinrezeptor beim Menschen war der di-

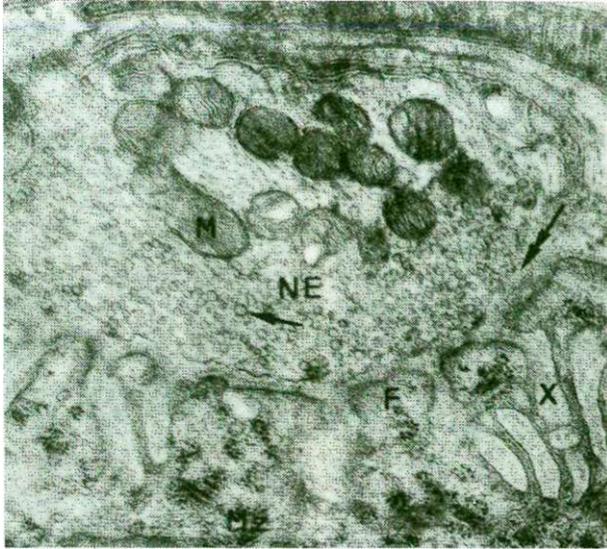


Abb. 1: Normale motorische Endplatte. Nervenende (NE) mit zahlreichen Vesikeln (—^ ) und Mitochondrien (M). Postsynaptische Falten (F) des Plasmalemmms der Muskelzelle (Mz) mit primärem ( ) und sekundärem (X) synaptischen Spalt.



Abb. 2a: (Legende siehe folgende Seite)

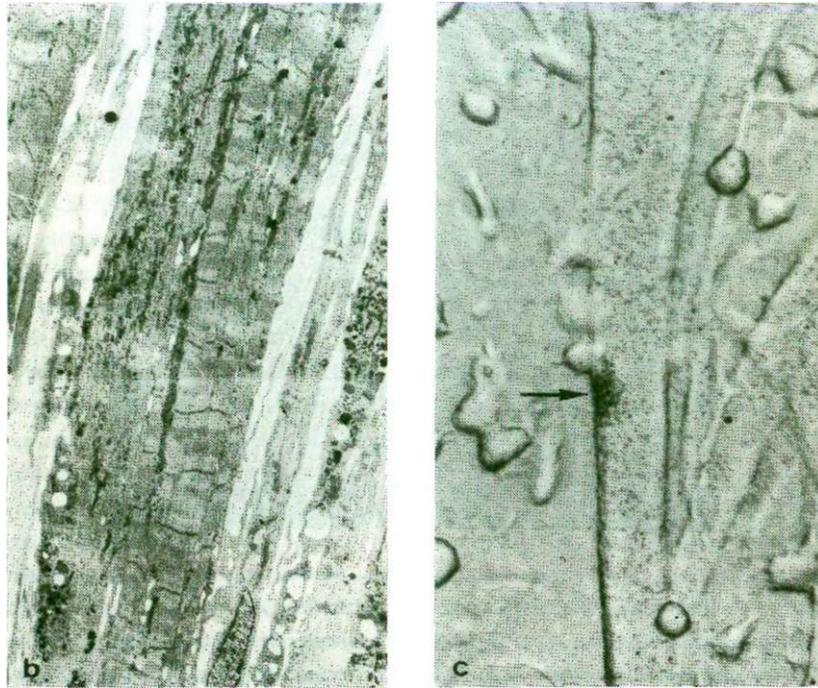


Abb. 2a-c: Myotuben aus der Kultur von Thymusretikulum jung-adulter Mäuse.

2a: (siehe vorangehende Seite): Langgestreckte Myotuben im phasenkontrastmikroskopischen Bild. Vergr. ca. 140 x

2b: Längsschnitt durch eine ausgereifte Thymusmuskelzelle im elektronenmikroskopischen Bild. Deutlich sind die feinen Muskeifilamente mit ihrem regelmäßig angeordneten Querstreifenmuster erkennbar. Vergr. ca. 3600 x

2c: Darstellung von Acetylcholinrezeptoren auf einer Myo-<sub>125</sub>tube aus der Thymuszellkultur nach Bindung von J-Bungarotoxin. Die Rezeptoren sind regelmäßig oder in Form von "hot spots" (-) auf der Zelloberfläche verteilt. Vergr. ca. 280 x

rekte Nachweis der Bindung markierter Antikörper an den veränderten Faltenapparat der Muskelzellen dieser Patienten (4) und der ultrastrukturellen Lokalisation von Immunkomplexen (Ig G und C<sub>3</sub>) an der Endplatte bei experimenteller Autoimmun-Myasthenie (13). Darüberhinaus können wir heute den Acetylcholinrezeptor markieren und damit seinen Verlust (6), oder seine Blockierung im beschriebenen Faltenapparat bei Myasthenie insbesondere elektronenmikroskopisch direkt nachweisen (4).

#### Thymus und Myasthenie

So zwanglos man die Muskelschwäche bei Myasthenie mit den Autoantikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren vereinen konnte, so unklar war die Rolle des Thymus geblieben.

Wie anfangs erwähnt, weisen diese Patienten Veränderungen des Thymusorgans in Form von Thymushyperplasien oder Thymomen auf. Der Erstbericht über das Auftreten einer Thymusveränderung bei Myasthenie stammt aus dem Jahre 1901. WEIGERT berichtet von einem Myastheniepatienten mit Thymom (18). Dieser anekdotischen Beobachtung wurde durch unerwartete Therapieerfolge neues Gewicht verliehen, welche sich ab der 40er Jahre nach Entfernung des Thymus bei diesen Patienten einstellten (1). Diese unerklärten Zusammenhänge stimulierten eine Reihe von Hypothesen. SIMPSON in Schottland postulierte als einer der Ersten eine Autoimmunpathogenese (14,15) und GOLDSTEIN in Amerika diskutierte die Möglichkeit, daß sich als Folge einer Entzündung dieses Organs eine erhöhte Sekretion eines Curare ähnlichen Stoffes ergebe, welcher die neuromuskuläre Blockierung in der Peripherie verursache (7). Wie wir gesehen haben, ist die autoimmune Natur der Myasthenie heute unbestritten. 1974 konnten wir in Freiburg eine überraschende Beobachtung machen, die es ermöglichte, daß in der Folgezeit in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von WEKERLE am Max-Planck-Institut für Immunbiologie erstmals sämtliche Symptome der Myasthenie in einen logischen Zusammenhang gebracht werden konnten. Ausgangspunkt der von uns entwickelten 3 Stadien Hypothese zur Krankheitsentstehung der **Myasthenie** war die Entdeckung, daß in Kulturen von Mäusethymusretikulumzellen nach einiger Zeit Muskelzellen auftauchen, die in ihrem feinstrukturellen Aufbau und in ihrer Funktionsfähigkeit voll ausgebildet waren (8, 22).

Abb. 2a-c zeigt solche Muskelzellen der Thymuszellkultur. Insbesondere elektronenmikroskopisch (Abb.2b) werden die für die Skelettmuskelzelle charakteristischen kontraktilen Proteinfilamente nachweisbar. Diese Muskelzellen sind mehrkernig und entstehen in der Zellkultur aus einkernigen Vorläufern oder Stammzellen des Retikulums, die schließlich zu mehrkernigen Zellen verschmelzen und die muskelspezifischen Muskelzellstrukturen ausbilden. Überraschend war nun weiterhin, daß diese Muskelzellen Acetylcholinrezeptoren ausbilden (21). Wir können diese Acetylcholinrezeptoren mit einem radioaktiv markiertem Schlangengift, dem Alphabungarotoxin nachweisen (10), welches spezifisch an die Rezeptoren bindet (Abb. . Von grundlegender Bedeutung waren diese Befunde deshalb, weil der Thymus natürlicherweise Ursprungsort von Lymphozyten ist, die von ihm fortwährend gebildet und in den Organismus entsandt werden. Wenn nun, so unser Grundgedanke, auch im menschlichen Thymus derartige ortsfremde Muskelzellen gebildet werden können, dann läßt sich daraus die Entstehung der Myasthenie ableiten. Tatsächlich wurde dieser Nachweis von Muskelzellen in Thymusdrüsen von Myastheniepatienten in der Zwischenzeit in verschiedenen Forschungszentren der Welt erbracht. Diese intrathymischen Muskelzellen tragen ebenfalls Acetylcholinrezeptoren. Darüberhinaus gelang inzwischen der Arbeitsgruppe von DRACHMANN und Mitarbeitern (3) in Analogie zu unseren Thymusmuskelzellkulturen der Nachweis, daß auch menschliche Thymuszellen von Myasthenikern in Kultur zu Muskelzellen ausreifen.

#### Drei-Stadien-Hypothese zur Pathogenese der Myasthenie

Die Bildung solcher Muskelzellen im Thymus ist als erster Schritt in der Krankheitsentstehung der Myasthenie zu sehen (Abb.3a). Sie geschieht im Zusammenhang einer abnormen Gewebsvermehrung, also eben jenen Vergrößerungen oder Wucherungen des Thymus, die man bisher nicht in die Pathogenese der Myasthenie einzuordnen wußte. Zugleich spielen hierbei genetische Faktoren eine wichtige Rolle, wie wir dies an den Mäusethymuskulturen nachweisen konnten (19). Von ihnen hängt es ab, ob und wieviele Muskelzellen entstehen. Es handelt sich dabei überraschenderweise genau um die Gene (Haupttransplantatgenkomplex HLA), die beim Menschen die Immunreaktivität steuern und denen man, wie erwähnt, eine gewisse Empfänglichkeit für das Entstehen der Myasthenie zuschreibt.

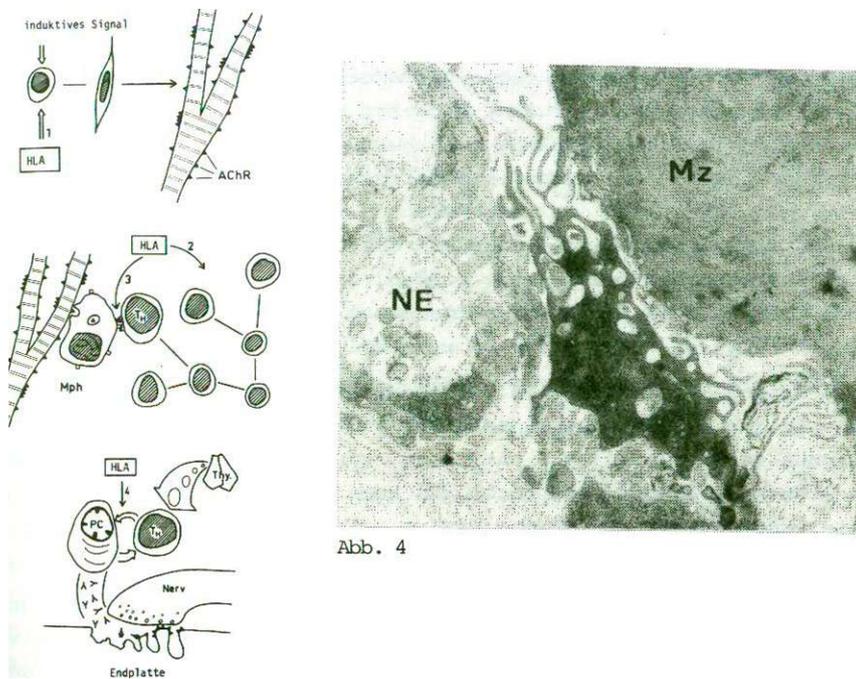


Abb. 4

3 a-c: Graphische Darstellung des Drei-Stadien-Modells zur Pathogenese der Myasthenie.

- a) I. Stadium: Induktion myogener Zellen im Thymus und Ausbildung von Acetylcholinrezeptoren auf den Oberflächen der Thymusmuskelzellen
- b) II. Stadium: Erkennung der Acetylcholinrezeptoren durch spezifisch reaktive T-Lymphozyten ( $T^h$ ) unter Vermittlung von Makrophagen (Mph)
- c) III. Stadium: Kooperation der im Thymus aktivierten Lymphozyten mit Antikörperproduzierenden Plasmazellen (Pc) in der Peripherie des Organismus. Zerstörung oder Blockierung der muskelzellulären Acetylcholinrezeptoren durch diese neugebildeten Antikörper.

Möglicher Einfluß des HLA-Systems (HLA) auf die Thyrimusmyogenese (1,1), auf die Bildung spezifisch reaktiver Lymphozyten (11,2), auf die Antigenerkennung (11,3) und auf den Mechanismus der Antikörperbildung (11,4).

- 4: Motorische Endplatte in der akuten Phase der experimentellen Myasthenia gravis. Erhaltene Nervenenden (NE) bei Degeneration und vollständiger Abflachung der postsynaptischen Muskelzellmembran. Degenerierte Membranreste werden von Zellfortsätzen des Makrophagen umgeben. Die Muskelzelle (Mz) weist in diesem Bereich insbesondere degenerative Veränderungen der Myofibrillen auf. Vergr. ca. 10000 x

Daß Muskelzellen im Thymus gebildet werden, ist allein jedoch noch nicht hinreichend für das Entstehen dieser Erkrankung. Entscheidend ist dafür ein zweiter Schritt: Nämlich die sog. Autoimmunisierung von Lymphozyten gegen die Acetylcholinrezeptoren. Dieser Prozess, wie anfangs erwähnt eine Art Prägung, geschieht offensichtlich in Wechselwirkung zwischen neugebildeten Lymphozyten im Thymus und den Acetylcholinrezeptoren der Thymusmuskelzellen. Es ist anzunehmen, daß die neugebildeten Thymusmuskelzellen z.B. als Folge eines Entzündungsprozesses zerstört und dabei ihre Acetylcholinrezeptoren freigesetzt werden. Diese freigesetzten Rezeptoren können von Makrophagen aufgenommen werden, die sie nun spezifisch reaktiven T-Lymphozyten präsentieren (Abb.3b).

Der dritte Schritt schließlich bedeutet den endgültigen Ausbruch des Leidens. Die autoimmunsensibilisierten Lymphozyten werden vom Thymus in den Organismus entlassen, streuen aus und treffen auf die echten Acetylcholinrezeptoren. Es kommt zur Autoimmunreaktion und die vermeintlichen Antigene werden angegriffen, blockiert oder zerstört (Abb.3c).

Wie zu Beginn ausgeführt, können Autoimmunerkrankungen nur dann entstehen, wenn das vorhandene Gleichgewicht zwischen aggressiven und dämpfenden Faktoren des Immunsystems gestört ist, wenn also Regulationsmechanismen zwischen aggressiven Lymphozyten und den sie kontrollierenden Suppressorlymphozyten in ein Ungleichgewicht geraten. Der Thymus ist das zentrale Immunorgan, in welchem ständig hochspezialisierte Lymphozyten neu gebildet werden. Unter diesen Lymphozyten befinden sich auch solche, die den Acetylcholinrezeptor erkennen können. Ihre Anzahl wird genetisch kontrolliert. Trifft nun ein Acetylcholinrezeptor-spezifischer Lymphozyt auf eine Präsentierzelle, die sein Antigen, nämlich den Acetylcholinrezeptor ausgebildet hat, wird dieser Lymphozyt unweigerlich aktiviert und nimmt dann seine programmierte Funktion auf.

Er kann nun entweder direkt die Acetylcholinrezeptoren an der Skelettmuskelzelle angreifen oder als sog. Helferzelle mit anderen Lymphozyten im Organismus zusammenarbeiten und deren Produktion von Antikörpern induzieren, die dann ebenfalls spezifisch gegen den Rezeptor gerichtet sind. Welcher dieser Lymphozyten nun aber tatsächlich bei der Myasthenie beteiligt ist, konnte in aufwendigen Untersuchungen der letzten Jahre mit großer Sicherheit geklärt

werden. So gelang es der Arbeitsgruppe WEKERLE spezifisch gegen den Acetylcholinrezeptor aktivierte T-Lymphozyten zu isolieren und ausserhalb des Organismus in Kultur zu vermehren. Sie konnten durch immunhistochemische Untersuchungen als Helferzellen identifiziert werden. Sie werden dann, gemeinsam mit den erwähnten B-Lymphozyten, die Antikörper produzieren können, in normale Tiere zurückinjiziert, deren eigenes Immunsystem vorher durch Bestrahlung lahmgelegt worden war. Wie erwartet, erkrankten diese Tiere an Myasthenie. Abb.4 zeigt die dramatische Zerstörung des Faltenapparates der neuromuskulären Endplatte dieser Tiere. Während, wie bei Myasthenikern, das Nervenende mit seinen vielen Acetylcholinbläschen erhalten geblieben ist, sind die neuromuskulären Falten verschwunden und zerstört. Membrantrümmer werden von Makrophagen abgeräumt.

#### Therapiemöglichkeiten

So vielschichtig und komplex wie die Ursache und Krankheitsentstehung der Myasthenie ist, ist auch das Spektrum der Therapiemöglichkeiten, welches die Myasthenie bietet (3). Die älteste wirksame Therapie der Myasthenie wirkt an der vordersten Front der hier dargelegten 3 Stadien. Wirkstoffe, wie das bereits von WALKER 1934 angewandte Physostigmin, blockieren jenes Enzym, welches überschüssiges Acetylcholin spaltet. Durch diese Therapie wird ein Anstau des Acetylcholins verursacht, welcher eine Erregungsübertragung auch bei vermindert empfindlichen Membranen des Faltenapparates erlaubt. Diese Therapie ist deswegen rein symptomatisch und kann in frühen Stadien und in leichten Fällen zeitweilig mit Erfolg eingesetzt werden. Sie wirkt aber auf keinen Fall der weiteren Verwüstung des Faltenapparates entgegen.

Es wurde gezeigt, daß im ersten Stadium dieser Erkrankung Lymphozyten im Thymus gegen Acetylcholinrezeptoren aktiviert werden und diese aktivierten Immunzellen erst sekundär in die Peripherie auswandern. Die Entfernung des Thymus stellt also die radikalste, ursächliche Therapie der Myasthenie dar.

Wie durch Therapieanalysen bestätigt wurde, sind in gewissen vorhersagbaren Fällen hervorragende Ergebnisse zu erzielen. Diese sind:

1. frühe Verlaufsstadien, in denen die Autoimmunreaktion noch weitgehend auf den Thymus beschränkt ist und sich noch nicht im pe-

riperen Immunsystem verselbstständigt hat.

2. das Syndrom bei jungen Frauen mit Thymusvergrößerungen oder Hyperplasie, bei denen offensichtlich dieser Thymusmechanismus am weitesten überwiegt.

Neben diesen Therapiemöglichkeiten kann die Behandlung der Myasthenie durch medikamentöse Untedrückung des Immunsystems zu guten Erfolgen führen (11). Leider werden bei dieser Therapie alle Abwehrleistungen innerhalb des Immunsystems ohne Rücksicht auf die Spezifität bestimmter Lymphozyten reduziert. Dies bringt Risiken mit sich, die sich z.B. in einer erhöhten Infektionsgefahr äußern. Eine weitere oft unterschätzte Gefahr liegt im Wesen der Autoimmunität selbst: Die Selbsttoleranz ist das Ergebnis einer strikten intrazellulären Regulation zwischen Immunzellen. Potentiell aktivierte Lymphozyten werden danach durch spezifische Suppressorzellen an ihrer gefährlichen programmierten Funktion gehindert. In vielen Autoimmunständen scheint, wie auch bei der Myasthenie, diese Regulation aus dem Gleichgewicht geraten zu sein. Durch eine generelle, aber ungenügende Immunsuppression kann nun die ohnehin schon geschwächte Suppressorzellfunktion noch weiter reduziert werden, so daß eine paradoxe Verschlimmerung des Krankheitsbildes die Folge ist.

Mit den hier in Kürze dargestellten Forschungsergebnissen der letzten Jahre zeichnen sich jedoch Möglichkeiten ab, spezifisch die autoaggressiven Lymphozytenklone im Organismus zu manipulieren. Damit könnte die derzeit gebräuchliche Methode der generellen Untedrückung des Immunsystems abgelöst werden. Diese gezielte Therapie könnte darin bestehen, spezifische Suppressorzellen zu isolieren, sie dann außerhalb des Körpers in Kulturen zu vermehren und dann dem Patienten wieder zu injizieren. Sie würden die Autoimmunreaktion verstärkt bremsen.

Selbst wenn, wie in unseren Experimenten, nur aktivierende Helferzellen zur Verfügung stünden, wäre eine ähnliche Hilfe denkbar. Normalerweise würden zwar die Helferzellen die Autoimmunreaktion verstärken. Anders jedoch, wenn es gelänge, sie in Kulturen zu vermehren und gleichzeitig zu inaktivieren, nämlich so, daß sie nurmehr äußerlich, aber nicht mehr funktionell als Helferzellen wirken. Wieder injiziert, könnte dieses scheinbar übermächtige Aggres-

sionspotential die im Organismus kontrollierenden Suppressorzellen dazu anregen, verstärkt dämpfend einzugreifen. Die Autoimmunreaktion würde damit auf indirekte Weise unterdrückt. Diese Therapien sind noch nicht klinisch einsatzbereit. Es ist jedoch vorstellbar, daß hier eine therapeutische Strategie der Zukunft vorliegt.

#### Literatur

1. BLALOCK, A., HARVEY, A.M., FORD, F.F., LILIENTHAL, J.L., jr: The treatment of myasthenia gravis by removal of the thymus gland. *J. Amer. Med. Assoc.* 117, 1529 (1941)
2. COERS, C., DESMEDT, J.E.: Mise en evidence d'une malformation caracteristique de la jonction neuromusculaire dans la myasthenie. Correlations histo- et physiopathologiques. *Acta neurol. belg.* 59, 539-561 (1959)
3. DRACHMANN, D.B.: Myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med.* 298, 136-142, 186-193 (1978)
4. ENGEL, A.G.: Myasthenia gravis. In: *Handbook of Clinical Neurology.* (VINKEN, P.J. and BRUYN, G.W. Eds.) North-Holland Publ. Amsterdam, 95-145 (1979)
5. ENGEL, A.G., TSUJIHATA, M., LINDSTROM, J.M., LENNON, V.: The motor end plate in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis. A quantitative Ultrastructural study. *Ann. N. Y. Acad. Sei.* 274, 60-79 (1976)
6. FAMBROUGH, D.M., DRACHMANN, D.B., SATYAMURTI, S.: Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors. *Science* J\_82, 293-295 (1973)
7. GOLDSTEIN, G.: Thymitis and myasthenia gravis. *Lancet* 2, 1164 (1966)
8. KETELSEN, U.-P., WEKERLE, H.: Thymus-derived striated muscle clones: An ultrastructural analysis of cell differentiation. *Differentiation* 5, 185-187 (1976)
9. LINDSTROM, J.: Autoimmune response to acetylcholine receptors in M.g. and its animal model. *Adv, Immunol.* 21, 1-50 (1979)
10. MCGEER, E.G., MCGEER, P.L.: Neurotoxins as tools in neurobiology. *mt. Rev. Neurobiol.* 22, 173-1204 (81)

11. MERTENS, H.G., HERTEL, G., REUTHER, P., RICKER, K.: Effect of immunosuppressive drugs (Azathioprine). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 377, 691-708 (1981)
12. PATRICK, J., LINDSTROM, J.: Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 180, 871-872 (1973)
13. SAHASHI, K., ENGEL, A.G., LINDSTROM, J.M. LAMBERT, E.H., LENNON, V.A.: Ultrastructural localisation of immune complexes (IgG and C<sub>3</sub>) at the end plate in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 37, 212-223 (1978)
14. SIMPSON, J.A.: Myasthenia gravis - Validation of a hypothesis. *Scot. Med J.* 22, 201-210 (1977)
15. SIMPSON, J.A.: An evaluation of thymectomy in myasthenia gravis. *Brain* 8J, 112-144 (1958)
16. TOYKA, K.V., DRACHMANN, D.B., PESTRONK, A., KAO, I.: Myasthenia gravis: Passive transfer from man to mouse. *Science* 190, 397-399 (1975)
17. WALKER, M.B.: Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *Lancet* 1200-1201 (1934)
18. WEIGERT, C.: Pathologisch anatomischer Beitrag zur Erb'schen Krankheit (Myasthenia gravis). *Neurol. Zbl.* 20, 597 (1901)
19. WEKERLE, H., HOHLFELD, R., KETELSEN, U.-P., KALDEN, J.R., KALIES, I.: Thymic Myogenesis, T-Lymphocytes and the Pathogenesis of Myasthenia Gravis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 377, 455-475 (1981)
20. WEKERLE, H., KETELSEN, U.-P.: Myasthenia gravis. In: *Immunologie*, 2. Auflage (VORLAENDER, K.O., Hrsg.). Thieme, Stuttgart/New York (im Druck)
21. WEKERLE, H., KETELSEN, U.-P., ZURN, A.D., FULPIUS, B.W.: Intrathymic pathogenesis of myasthenia gravis: transient expression of acetylcholine receptors on thymus derived myogenic cells. *Eur. J. Immunol.* 8, 579-582 (1978)
22. WEKERLE, H., PATERSON, B., KETELSEN, U.-P., FELDMAN, M.: Striated muscle fibres differentiate in monolayer cultures of adult thymus reticulum. *Nature* 256, 493-494 (1975)

Diskussion

Herr PORCHER: Darf ich in Anlehnung an Ihren Vortrag hier therapeutische Gedankenspiele bringen? Es ist doch offensichtlich möglich, den Acetylcholinrezeptor aus dem Zitterrochen zu isolieren.

Herr KETELSEN: Ja! Sowohl aus dem Zitterrochen als auch aus der Ratte.

Herr PORCHER: Wäre es dann auch möglich, diesen isolierten Rezeptor zur spezifischen Desensibilisierung einzusetzen, in Anlehnung an unsere Organantigene der Reviatorgan-Reihe; d.h. also, spezifisch desensibilisieren ähnlich wie bei der klassischen Hyposensibilisierung mit dem Allergen. Weiter sprachen Sie davon, daß bei der Myasthenia gravis ein Ungleichgewicht des Immunsystems besteht. Therapeutisch interessant wäre es nun, die Suppressorzellen nicht zu isolieren - wie Sie vorgeschlagen haben - sondern diese spezifisch zu stimulieren, beispielsweise durch foetale Thymusfaktoren wie sie in NEYTHYMUN Nr. 29 f enthalten sind. Die Therapie sähe also wie folgt aus: Desensibilisierung mit dem Acetylcholinrezeptor und spezifische Beeinflussung der Suppressorzellen mit foetalen Thymusfaktoren.

Herr KETELSEN: Zu Ihrer ersten Frage: Diese Versuche sind sicher noch nicht durchgeführt worden. Ich kenne keine Literaturstelle, die diesen Weg besprochen hätte, obgleich es theoretisch durchaus denkbar wäre.

Zweitens: Theoretisch können inaktivierte, isolierte Helferzellen in der Lage sein, die Suppressor-Aktivität anzuregen. Wir müssen heute annehmen, daß bei der Myasthenie die Suppressorzellen vermindert sind oder gar fehlen. Der endgültige Nachweis ist noch nicht gelungen. Ein therapeutisches Prinzip bestünde dann in der Tat darin, diese Suppressorzellen zu inaktivieren oder in irgendeiner Weise zu vermehren. Das ist sicher auf verschiedenen Wegen möglich.

Herr K.E. THEURER: Ich möchte gerade die Gegensensibilisierung und die Behandlung mit Antikörperfragmenten hier in das Gespräch

bringen, vor allem die Antikörperfragmente mit konjugierten Arzneimitteln als pharmakologische Effektoren. Ich meine, daß es auf der Basis einer Transplantation von Zellen, die außerhalb des Körpers verändert worden sind und dann wieder injiziert werden, keine eigentliche Dauerwirkung möglich ist. Diese Zellen werden möglicherweise als fremd erkannt und vom Organismus abgebaut. Das ist ein allgemeines Transplantationsproblem.

Bei einer biologischen Therapie, wie wir es schon heute und gestern festgestellt haben, geht es dagegen um die Imitation natürlicher Heilungsvorgänge. Aus unserem Therapiekonzept käme hier die Gegensensibilisierung in Frage. Vielleicht könnte man auch mit Antilymphozytenserum, beispielsweise Anti-Thymusserum, ganz spezifisch bestimmte Faktoren vernichten.

Herr SEIFERT: Das Antilymphozytenserum ist an der Münchner Universitätsklinik bei der Myasthenia gravis schon erprobt worden, und zwar mit großem therapeutischem Erfolg. Nur ist es so, daß das Antilymphozytenserum, das derzeit aus tierischem Material, und zwar aus Pferdeserum, hergestellt wird, bei Patienten, sofern sie nicht entsprechend vorbehandelt wurden, nach einer gewissen Zeit zu Antikörpern gegen das Pferdeserum führte. Dadurch wird das Serum unwirksam, von den Nebenwirkungen einmal abgesehen. Insofern ist diese Behandlung eigentlich auch eine biologische Behandlung, nur eine extreme biologische Behandlung.

Herr K.E. THEURER: Mit der Gegensensibilisierung, als modifizierte Eigenblutbehandlung, wäre gewissermaßen die Fremdsensibilisierung ausgeschlossen.

Herr SEIFERT: Bietet man nun beispielsweise das Antigen in Form von Thymuspräparaten bei Myasthenia gravis an, wäre es doch denkbar, daß diese sensibilisierten Zellen blockiert werden und nicht mehr wirksam sind. Das ist eine Möglichkeit einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Die andere denkbare Möglichkeit bestünde allerdings darin, daß mit der Applikation von Thymuspräparaten das Krankheitsbild verschlechtert wird. Liegen hier an Tiermodellen schon Untersuchungen vor?

Herr KETELSEN: Mit Thymuspräparaten bisher sicherlich nicht. Sie müssen bedenken, wir haben hier äußerst spezialisierte Lymphozyten, die hier am Werk sind und den Acetylcholin-Rezeptor zerstören. Das haben wir durch die Isolierung von Lymphozyten und deren spezifische Sensibilisierung gegen den Acetylcholin-Rezeptor belegen können. Die Risiken einer generellen Immunsuppression bei Myasthenie habe ich in meinem Vortrag angedeutet. Therapeutische Möglichkeiten der Zukunft liegen in der Anwendung humoraler Antikörper (sog. antiidiotypischer Antikörper) vor, die gegen die autoaggressiven Lymphozyten gerichtet sind. Die Herstellung solcher humaner Antikörper ist bisher noch nicht gelungen.

Herr K.E. THEURER: Bei der Gegensensibilisierung gewinnen wir die Antikörper direkt aus dem Patientenblut. Diese Antikörper sind durch Fremdsensibilisierung entstanden und können auch gegen den Rezeptor gerichtet sein. Es ist nun interessant, daß Sie schon ein in vitro-Modell haben, in dem Sie sensibilisierte T-Lymphozyten transplantieren können. Diese sensibilisierten T-Lymphozyten können Sie nun in vitro mit diesen Immunfaktoren desensibilisieren. Vielleicht lösen Sie damit im Empfängerorganismus Gegenreaktionen aus und können zeigen, daß dieses Prinzip die Krankheitssymptomatik ursächlich beeinflußt. Dies wäre ein eindeutiger Beweis für diese Methode.

Auditorium: Wir müssen doch eigentlich davon ausgehen, daß die Myasthenie ein familiär bedingter Enzymdefekt ist. Die Autoaggression ist doch eher das Sekundäre. Wenn wir wirklich eine Kausaltherapie betreiben wollen, müssen wir doch zunächst den Enzymdefekt behandeln.

**Herr KETELSEN:** Wir können heute mit Bestimmtheit sagen, daß der **Myasthenia** gravis primär kein Enzymdefekt zugrunde liegt, sondern **daß** möglicherweise, das bestätigen die Befunde der letzten Jahre, **eine** genetisch fixierte Fehldifferentierung von Stammzellen im **Thymus** zu Muskelzellen ätiopathogenetisch ausschlaggebend ist. **Dadurch**, daß diese Muskelzellen im Thymus den Acetylcholin-Rezeptor tragen, kommt dort primär die immunologische Reaktion in **Gang**. Auf diesen Mechanismus gründet sich auch der therapeutische **Erfolg** der Thymektomie in frühen Stadien der Myasthenie, also zu

einem Zeitpunkt, wo sich der Autoimmunprozess noch nicht in der Peripherie verselbstständigt hat.

Herr JACHERTZ: Ich wollte eigentlich empfehlen, eine solche Situation einmal mit Fab-Bruchstücken zu behandeln. Man kann auto-aggressive Vorgänge, wie wir wissen, sehr gut mittels Fab-Bruchstücken unterbrechen. Das ist zwar ein bißchen aufwendig, das Serum in dieser Weise aufzubereiten, in dem man die Globuline isoliert, sie nachher ordnungsgemäß mit Papain verdaut und diese Bruchstücke anschließend über eine Säule isoliert. Ich selbst habe eine ganze Reihe sehr guter Erfolge mit dieser Methode gesehen. Das wäre eine Möglichkeit, die wir ergänzend zur Gegensensibilisierung einsetzen könnten.

Herr K.G. THEURER: Unser Hydrolysat enthält u.a. derartige Patienten-spezifische Fab-Fragmente. Durch spezifische enzymatische Reaktionen werden die im Patientenblut vorhandenen Autoantikörper in Fab- und Fc-Fragmente gespalten. Die Fc-Fragmente binden Komplementfaktoren und stehen damit für den zytolytischen Effekt nur noch in vermindertem Maße zur Verfügung. Die autoantigen-spezifischen Fab-Fragmente maskieren die Autoantigene. Dieser zweite Vorgang kommt quasi einem Entantigenisierungseffekt gleich, da bei fehlendem Antigenreiz keine neuen Antikörper mehr gebildet werden. Ich könnte mir vorstellen, daß dieses Prinzip, das sich gerade in der Behandlung immunopathogener Erkrankungen bewährt hat, einen weiteren neuen Ansatzpunkt in der Therapie der Myasthenia gravis darstellt.

Verbesserung der Transplantatüberlebenszeit durch  
tolerogene Verabreichung xenogener  
Gewebepräparationen

J. SEIFERT		K.G. THEURER
Experimentelle Chirurgie	und	Revitorgan
Universität Kiel		Ostfildern

Es ist eine bekannte Tatsache, die in der Transplantationschirurgie ihre Nutzenanwendung hat, daß Patienten, welche mit Blutkonserven vorbehandelt wurden, weniger Abstoßungskrisen eines transplantierten Organes wie z.B. der Niere zeigen als nicht vorbehandelte Patienten. Dies wird mit der Bildung von "enhancing antibodies" bzw. mit "Suppressor-T-Zellen" erklärt. Wenn die unspezifische Applikation von Blut zu einer Verbesserung der Transplantatüberlebenszeit führt, ist es denkbar, daß die parenterale Applikation eines spezifischen Antigens, wie fötale Haut, eine noch intensivere Anregung dieser Mechanismen bewirkt, so daß Hauttransplantate noch weniger abgestoßen werden.

Zur Überprüfung dieser Überlegung wurden folgende Versuchsgruppen konzipiert: Eine Gruppe von Ratten wurde 14 Tage lang mit aufsteigenden Dosen fötaler Rinderhaut intraperitoneal vorbehandelt. Während dieser Zeit wurden Gewichtskontrollen durchgeführt. Eine zweite Gruppe von Ratten erhielt ebenfalls parenteral über die gleiche Vorbehandlungsperiode Blut von Spendertieren übertragen. Eine dritte Gruppe blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Nach Beendigung der Vorbehandlung wurde bei allen Tieren eine homologe Hauttransplantation (DBg x Sprague Dawley) vorgenommen, wobei bei diesen Tieren der Zeitpunkt der Abstoßung registriert und zusätzlich nach zirkulierenden Antikörpern gefahndet wurde.

Wie Abb.1 zeigt, ist durch die Vorbehandlung keine Verminderung des **Körpergewichts** festzustellen. In der Zeit von 10 Tagen ist eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 6 g pro Tier zu beobachten.

Daraus kann gefolgert werden, daß die Behandlung mit gelöster fetaler Rinderhaut den gesundheitlichen Zustand während der Beobachtungszeit nicht beeinträchtigt hat.

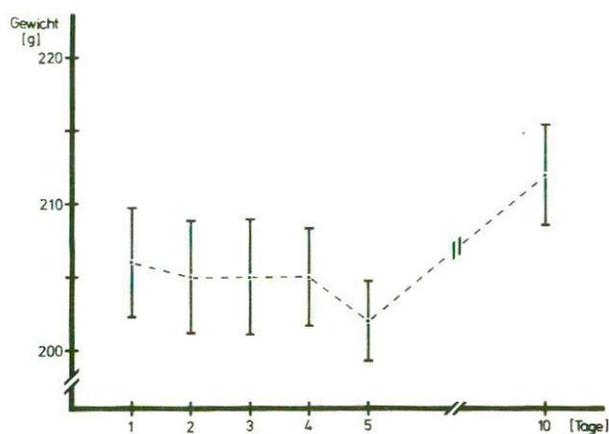


Abb.1: Gewichtsbeobachtungen von Ratten, behandelt mit fötaler Rinderhaut über die Zeit von 10 Tagen. Die Tiere zeigten keine signifikante Gewichtsabnahme und über die Zeit von 10 Tagen insgesamt eine Zunahme von durchschnittlich 5 g.

Die Abstoßung der transplantierten Haut wird durch diese Vorbehandlung signifikant verzögert. Wie die Abb.2 zeigt, stoßen unbehandelte Kontrolltiere ihr Hauttransplantat nach durchschnittlich 9 Tagen ab, während Tiere, die mit fötaler Rinderhaut vorbehandelt wurden, die Haut erst nach durchschnittlich 16 Tagen abstoßen. Der Unterschied zwischen der spezifischen Vorbehandlung mit fötaler Rinderhaut und der unspezifischen Vorbehandlung mit Spenderblut ist zwar zu beobachten, jedoch statistisch bei dem gewählten Umfang der Gruppen nicht zu sichern.

Die Suche nach Antikörpern, die möglicherweise durch die Vorbehandlung induziert worden sind, blieben in diesem Experiment erfolglos. Das bedeutet, daß die Tiere entweder keinen blockierenden Antikörper gebildet haben oder die Nachweismethode (Agargel-Doppeldiffusionstest) zu wenig empfindlich ist. Festzuhalten aus diesem

Experiment ist jedoch, daß man durch Vorbehandlung mit fötaler Rinderhaut bei Ratten die Abstoßung von homologem Hauttransplantat verzögern kann.

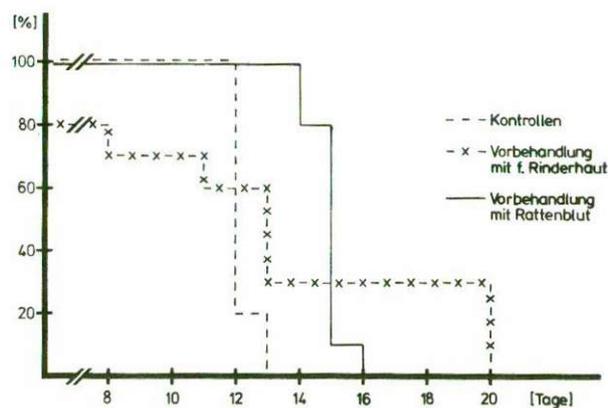


Abb.2: Transplantatüberlebenszeit von unbehandelten Kontrolltieren und mit einem Extrakt aus fötaler Rinderhaut bzw. Rattenblut vorbehandelten Testtieren.

In einem zweiten Experiment sollte geprüft werden, ob die orale Verabreichung von Organhomogenaten ebenfalls einen Einfluß auf die Abstoßung von Hauttransplantaten hat. Darüberhinaus sollte geklärt werden, ob dieser Effekt durch Spezies-spezifische Vorbehandlung verbessert werden kann. Dazu wurden Ratten über die Zeit von 4 Wochen zweimal wöchentlich mit einer definierten Menge von Organhomogenaten des Kaninchens (Leber, Lunge, Niere, Milz) gefüttert. **Danach** wurde bei diesen Tieren eine xenogene Hauttransplantation vorgenommen, wobei die Ratten Kaninchenohrhaut transplantiert bekamen. Auch in diesem Experiment wurde nach Vorbehandlung sowie **nach** der Transplantation nach Antikörpern gefahndet. Es wurden 3 **Gruppen** gebildet, wobei die Gruppe 1 mit 5 ml des Homogenates **vorbehandelt** wurde, Gruppe 2 ab dem Zeitpunkt der Transplantation **behandelt** wurde und Gruppe 3 sowohl **vor-** als auch **nachbehandelt** wurde. Die behandelten Gruppen wurden einer unbehandelten Kontrollgruppe gegenübergestellt. Wie die Abb.3 zeigt, wird die Kaninchen-

haut auf Ratten, welche vorbehandelt waren, signifikant um 10 Tage später abgestoßen als bei unbehandelten Kontrolltieren. Die tägliche Behandlung der Tiere nach der Transplantation führt zu dem gleichen Resultat wie die alleinige Vorbehandlung, deswegen wurden die Ergebnisse nicht extra in die Kurve eingetragen. Erst die Kombination von Vor- und Nachbehandlung mit Kaninchenorganhomogenat verbessert die mittlere Transplantationsüberlebenszeit weiterhin auf durchschnittlich 26 Tage.

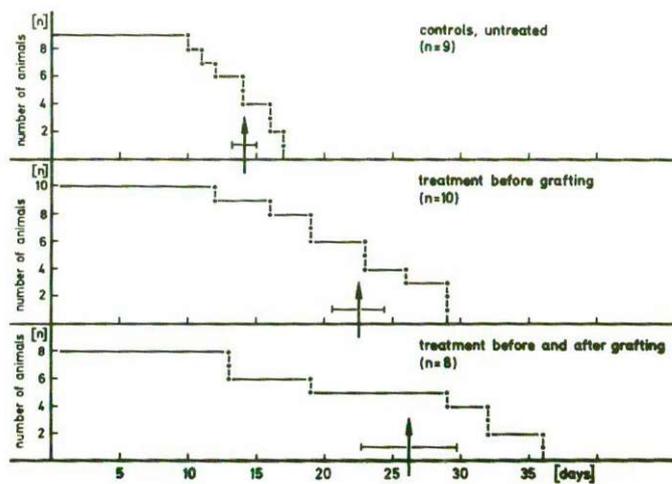


Abb.3: Überlebenszeit von Kaninchenohrhaut auf Sprague Dawley-Ratten bei Kontrolltieren, Tieren, die mit Kaninchenhomogenat gefüttert wurden, vor der Transplantation und Tiere vor und nach der Transplantation.

Es erhebt sich nun die Frage: Wodurch wird diese Transplantatsverlängerung ausgelöst? Zwei Möglichkeiten sind denkbar. Einmal könnte das Kaninchenhomogenat im Darmlumen zu einer Beeinflussung der Immunantwort führen. Durch den Kontakt des Fremdprotein mit der Darmwand könnte es zur Bildung von lokalen "enhancing antibodies" vom Typ IgA oder sogar zu einer immunologischen Toleranz kommen. Andererseits ist es auch denkbar, daß Teile des oral applizierten Homogenates resorbiert werden und nach der Darmwandpassage noch biologisch aktiv sind. Für beide Möglichkeiten wurden in einem weiteren experimentellen Ansatz Anhaltspunkte gewonnen.

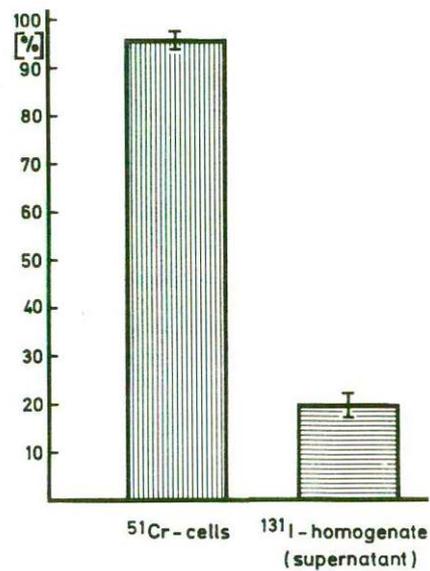


Abb.4: Resorptionsrate des gefütterten Homogenates. Durch radioaktive Markierung konnte die Restaktivität der zellulären Bestandteile und löslichen Proteine des Homogenates bestimmt werden. Daraus errechnet sich die resorbierte Menge. Somit wurde 4% der Zellen resorbiert und 80% des löslichen Homogenates.

**Markiert** man sowohl zelluläre Bestandteile wie auch die löslichen **Proteine** des verfütterten Homogenates mit verschiedenen radioaktiven Isotopen, so kann man aus der Restaktivität im Magen-Darm-Trakt **auf die** gesamte resorbierte Menge schließen. Die Abb.4 zeigt, daß **nach** 6-stündiger Resorptionszeit noch 95% der markierten Zellen **im Magen-Darm-Trakt** zu beobachten sind, d.h. nur 4% resorbiert wurden. Nach der gleichen Resorptionszeit findet man dagegen noch 20% **von dem** löslichen überstand als Restaktivität wieder, das bedeutet,

daß 80% resorbiert wurden. Die Zellen des Homogenates bleiben somit im Darmlumen und können damit auch zu einer immunologischen Beeinflussung des Lymphgewebes in der Darmwand führen, während die löslichen Proteine des Homogenates zum größten Teil die Darmwand der großmolekularen Form passieren und danach immunologisch wirksam sind.

Antikörper gegen Kaninchenproteine lassen sich jedoch am Ende der Fütterungsperiode nicht nachweisen. Erst nach Abstoßung der Hauttransplantate findet man präzipitierende Antikörper mit dem Agargel-Doppeldiffusionstest. Daraus kann mit methodischen Einschränkungen der Schluß gezogen werden, daß weder die enterale noch die parenterale Applikation von Fremdprotein in diesem Experiment zu einer Antikörperbildung geführt hat.

Der transplantatverlängernde Effekt nach Vorbehandlung mit xenogenem Protein kann dadurch erklärt werden, daß durch die Applikation bzw. Resorption von Fremdproteinen ein Teil der Antikörper gebunden werden, die gegen das Transplantat gerichtet sind. Da damit nur eine verminderte Anzahl von Antikörpern am Transplantat wirksam sein können, wird es verzögert abgestoßen. Daraus ließe sich der Schluß ziehen, je mehr Antigen auf enteralem Wege angeboten wird, desto mehr Antikörper werden gebunden, desto weniger wird das Transplantat abgestoßen. Diese Überlegung stimmt jedoch nur zu einem Teil, denn dabei sind die zellulären Prozesse unberücksichtigt geblieben, die gerade bei der Abstoßung der Haut eine dominierende Rolle spielen. So hat eine Überladung der Tiere mit Antigen die Transplantat-abstoßung zwar noch einige Tage verzögert, sie konnte jedoch damit nicht verhindert werden.

Die Experimente haben jedoch gezeigt, daß sowohl mit der parenteralen als auch mit der enteralen Behandlung mit Fremdproteinen eine partielle Transplantattoleranz zu erreichen ist.

#### Diskussion

Auditorium: Wenn die Theorie der Gegensensibilisierung stimmt - und es spricht ja nichts dagegen, dann müßte es doch möglich sein, einen optimalen Zeitpunkt herauszubekommen, an dem man nach einer Transplantation Blut entnimmt und die Gegensensibilisierung durchführt. Vorausgesetzt, man findet den richtigen Zeitpunkt, müßte das Transplantat doch angehen.

Herr SEIFERT: Derartige Experimente sind schon durchgeführt worden, und zwar ebenfalls an Ratten. Es konnte gezeigt werden, daß die Gegensensibilisierung zu einer Transplantatverlängerung führt. Eine dauerhafte Transplantat-Toleranz wird damit allerdings noch nicht erreicht. Trotz Behandlung werden die Transplantate nach einer gewissen Zeit abgestoßen. Eine Erklärung dafür ist in meinen Augen, Daß es sich bei diesen Untersuchungen um Hauttransplantate handelt, die primär durch zelluläre Prozesse abgestoßen werden und humorale Gesichtspunkte hier weniger zum Tragen kommen. Wenn Sie humorale Prozesse blockieren, wie wir das letztlich mit der Gegensensibilisierung tun, erreichen Sie nur einen Teil des erwünschten therapeutischen Effekts.

Herr K.E. THEURER: Hier liegen zwei Prinzipien der Toleranzerzeugung vor: Bei Organpräparaten die Toleranzerzeugung mit dem Antigen und bei der GS die Toleranzerzeugung über den Antikörper. Durch die zeitlich besser abgestimmte Kombination von beiden Methoden könnte man vielleicht eine weitere Verbesserung der Transplantat-Toleranz erreichen.

Es ist bekannt, daß Gedächtnis-Inhalte nicht so leicht gelöscht werden können. Ähnlich ist es auch bei der Sensibilisierung. Liegt schon einmal eine Sensibilisierung vor, kann diese nur zurückgedrängt werden; das immunologische Gedächtnis der Lymphozyten ist jedoch derart stabil, daß es bei irgendwelchen Reizen immer wieder durchbricht. Hat erstmal eine Sensibilisierung sattgefunden, wird man immer wieder desensibilisieren müssen. Wir haben nun mit der Gegensensibilisierung die Möglichkeit, ganz gezielt die Transplantat-gerichteten Antikörper zu supprimieren, ohne erwünschte phylogene Immunreaktionen zu unterdrücken.

**Herr** SEIFERT: Ich stimme Ihnen voll zu, möchte auf eines jedoch noch hinweisen: Das Experiment, das wir bisher noch nicht gemacht haben, ist die Kombination dieser Gegensensibilisierung und die Antigen-spezifische Desensibilisierung mit foetaler Rinderhaut. Ich erwarte, daß die Kombination beider Maßnahmen einen noch besseren therapeutischen Effekt erbringt.

**Herr** K.E.THEURER: Wichtig erscheint mir bei der tolerogenen Vorbehandlung mit Organpräparaten, daß nicht gleich große Antigenmengen verabreicht werden, sondern in Art der spezifischen Hyposensibilisierung oder Desensibilisierung die Konzentration und auch die

Injektionsabstände langsam gesteigert werden.

Bei einer Toleranz-erzeugenden Therapie mit Organpräparaten kommt es entscheidend auf die Dosis und die richtigen Behandlungsintervalle an. Es genügt nicht, konzentrationsmäßig nur in der Low-Zone Tolerance zu verbleiben, also bei hohen Verdünnungen, wie wir das mit den Dilutionen gemacht haben, sondern man muß die Konzentrationen schrittweise bis in den Bereich der High-Zone-Tolerance steigern. Es werden heute schon Gramm-Dosen von NEYTUMORIN-SOL i.v. toleriert, sofern eine Toleranz-erzeugende Vorbehandlung durchgeführt wurde. Voraussetzung für die Möglichkeit der wiederholten Verabreichung xenogener Eiweiße und Peptide ist die immunologische Dosierbarkeit zytoplasmatischer Präparate aufgrund des besonderen Herstellungsverfahrens bei ansteigender Dosierung in kurzen Abständen. Sind die jeweiligen Abstände zu lang - mehr als 5 Tage - so erreichen wir eine unerwünschte Sensibilisierung.

Dann gibt es noch die Möglichkeit der Schnell-Desensibilisierung. Hier werden in ganz kurzen Abständen, innerhalb von Stunden, wiederholt die Konzentration und die Dosis verdoppelt und dadurch das Immunsystem auf das eingebrachte Antigen unempfindlich gemacht. Man unterläuft so immunologische Gegenreaktionen des Organismus.

Workshop: Allergien und Autoimmunerkrankungen -  
Biologische Alternativen in der Therapie

Leitung: Herr PORCHER und Herr SCHNELLEN

Teilnehmer der Gesprächsrunde: Herr GILLISSEN, Vorstand der Abt. Medizinische Mikrobiologie der Med. Universität Aachen; Herr KETELSEN, Abt. Pädiatrische Muskelerkrankungen an der Universität Freiburg und dem Max-Planck-Institut, Freiburg; Herr SEIFERT, Abt. Experimentelle Chirurgie der Allgemeinchirurgie der Universität Kiel; Herr SCHNELLEN, Allergologe Württemberg. Bau- und Berufsgenossenschaft; Herr BONNET, Pädiater und Vorsitzender des Berufsverbandes der Kinderärzte im Landesverband Baden-Württemberg.

Folgende Punkte sollen besprochen werden:

Definition des Begriffes der "Immunopathie";

Beleuchtung der einzelnen immunopathologischen Entgleisungen wie Allergie und Autoimmunität;

Diskussion der klassischen Methoden des bisherigen therapeutischen Arsenal; biologische Alternativen.

Neben der Molekularbiologie beeinflusst die Immunbiologie zunehmend die medizinische Forschung. Zahlreiche, in der Praxis nur unvollkommen erkannte und symptomatisch behandelte Krankheitsbilder entpuppen sich plötzlich als Immunkrankheiten.

Die immunologische Homöostase charakterisiert zunächst einmal die normale immunologische Basis und Ausgangslage. Als krankmachender Faktor trägt das Immunsystem erst dann zur Pathogenese bei, wenn die Immunreaktionen qualitativ und quantitativ verändert sind. Typische Vertreter der "reinen" Immunkrankheiten sind die sog. Immundefektkrankheiten, mit denen wir uns heute nicht beschäftigen wollen, dann die allergischen Erkrankungen und Autoimmunkrankheiten, unser eigentliches Thema im Rahmen dieses Workshops.

Zuerst nun zu unserem ersten Teilthema, der Allergie: Während nun Immunität bedeutet, gegen Erkrankung geschützt zu sein, ist die Allergie ein ausgesprochen unangenehmes Phänomen. Bei Allergikern lösen Substanzen, die sonst als harmlos gelten, lästige, ja, u.U. sogar lebensbedrohliche Krankheitssymptome aus. Ungefähr 10% aller Menschen leiden an Allergien der einen oder anderen Art, und diese Tendenz ist steigend.

Der größte Teil der allergischen Reaktionen wird dem Soforttyp zugeordnet, eine Zeitlang auch als Reagintyp bezeichnet. Diesen Reaktionstyp bezeichnet man nach COOMBS und GELL als Typ-I-Reaktion. Nach vorausgegangener Sensibilisierung mit einem entsprechenden Allergen, beispielsweise Pollen, bilden sich Antikörper, die der Immunglobulinklasse E (IgE) angehören. Es ist bekannt, daß Allergiker als Gruppe wesentlich höhere Serum-IgE-Spiegel aufweisen, als etwa gesunde Probanden. Da jedoch keine einfache lineare Beziehung zwischen IgE-Serum-Spiegel und Beladung von basophilen und Gewebsmastzellen mit IgE-Antikörpern besteht, kann von einem erhöhten IgE-Serum-Spiegel - im Einzelfall - nicht ohne weiteres auf eine allergische Diathese oder gar eine allergische Erkrankung geschlossen werden. Trotzdem mißt man der Bindung dieser Reagine nach Kontakt mit dem Allergen an die Mastzelle größte pathophysiologische Bedeutung bei, werden doch dadurch pharmakologisch wirksame Substanzen frei wie Histamin, Heparin und Serotonin, die als Auslöser der allergischen Symptomatik gelten.

Die klinisch bedeutungsvollsten Allergien, denen eine Typ-I-Reaktion zugrunde liegt, sind die Pollinose, die allergische peremiale Rhinitis, das allergische Bronchialasthma, die Urticaria sowie teilweise Nahrungsmittelallergien und Arzneimittelallergien.

Typ-II-Reaktionen, auch als zytotoxische Reaktionen bezeichnet, spielen u.a. eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen, bei der Abstoßung von Transplantaten und Schädigung des blutbildenden Apparates.

Typ-III-Reaktionen, auch als Arthus-Typ bezeichnet, beruhen auf Antigen-Antikörper-Komplexen und Typ-IV-Reaktionen schließlich liegen sensibilisierte Lymphozyten zugrunde. Eine typische allergische Reaktion des Typ IV ist das sog. Kontaktekzem, das damit den berufsbedingten Allergien zuzurechnen ist.

Im wesentlichen werden wir es bei den hier zur Debatte stehenden Allergien, also Heuschnupfen, Nesselausschlag, Asthma bronchiale, Nahrungsmittelallergien und Kontaktdermatitiden mit Typ-I- sowie Typ-IV-Reaktionen zu tun haben, obgleich bei der Aktivierung eines allergischen Reaktionstyps alle anderen, wenn auch graduell, unterschiedlich mitbeteiligt sind.

Die Therapie von Allergien wird in der Regel in zwei Kategorien unterteilt:

1. in eine symptomatische Behandlung;
2. in eine mehr kausal orientierte Behandlung.

Zu den symptomatischen Therapiemethoden zählen Antihistaminika, Kortikosteroide und Cromoglicat.

Trotz beachtlicher Fortschritte in der Entwicklung von Antihistaminika zielt diese therapeutische Gruppe lediglich auf die Effektorphase der Allergie des Typs I, also der Mastzelldegranulierung, und erreicht damit nur eine vorübergehende Abschwächung der Symptomatik. Beim Bronchialasthma wirken Antihistaminika praktisch nicht. Ebenso haftet fast allen Wirkstoffen dieser Zusammensetzung mehr oder weniger der Nebeneffekt einer unerwünschten Ermüdung an. Kortikosteroide werden in der ärztlichen Praxis wegen ihres oft dramatisch erscheinenden Einflusses auf das klinische Beschwerdebild gern und auch hochdosiert gegeben. Kortikosteroide sind selbstverständlich indiziert in Notfall-Situationen, so beispielsweise beim Status asthmaticus. In hohen Dosen und über längere Zeit angewandt allerdings, können Kortikosteroide in ihren Nebenwirkungen ebenso problematisch sein wie der Zustand, den sie behandeln sollen. Wegen der ausgeprägten Nebenwirkungen, insbesondere einer Langzeitmedikation, sollte deshalb auf einen systemischen, länger dauernden Einsatz, wenn immer, möglichst verzichtet werden.

Gegen Pollinose und allergisches Asthma findet neuerdings das Natriumsalz der Cromoglicinsäure Verwendung. Man schreibt ihm membranabdichtende Eigenschaften zu. Insbesondere soll diese Substanz den Einstrom von Kalziumionen in eine stimulierte Mastzelle verhindern und damit letztlich die Freigabe der Speicherstoffe unterbinden. Das Mittel muß freilich verabreicht werden, ehe sich das Antigen an die Mastzelle bindet.

Zu den mehr kausal begründeten Therapiemethoden einer Allergie gehört die spezifische Hyposensibilisierung mit dem Allergen. Dabei verabreicht man kleine Mengen des auslösenden Antigens - sofern man es überhaupt identifizieren kann - in ansteigender Dosierung, um das Immunsystem des Patienten zur Bildung von IgG-Antikörpern zu veranlassen. Das IgG soll sich dann bei einer späteren Begegnung mit dem Antigen verbinden und so dessen Bindung mit dem IgE auf den Mastzellen verhindern. Die Desensibilisierung mit dem Allergen wird bei einigen Pollenarten eingesetzt, die Heuschnupfen hervorrufen. Für die Erfolgsaussichten gilt: je kleiner die Zahl der Allergene, desto besser. Begrenzte Erfolge zeigen sich noch beim Asthma, aber nicht mehr bei Nahrungsmittelallergien oder gar zellvermittelten allergischen Reaktionen vom Spättyp. Bescheiden sind die Erfolgsaussichten auch bei Mehrfachallergien.

Der Nachteil dieser Methode besteht vor allem darin, daß das Allergie auslösende Agens bekannt sein muß, die Allergen-Testung den Patienten sehr belastet, diese Methode zeitaufwendig, störanfällig und teuer ist, und die Methode schließlich nicht ganz ungefährlich ist.

Der größte Teil der allergischen Reaktionen wird dem Soforttyp zugeordnet, eine Zeitlang auch als Reagintyp bezeichnet. Diesen Reaktionstyp bezeichnet man nach COOMBS und GELL als Typ-I-Reaktion. Nach vorausgegangener Sensibilisierung mit einem entsprechenden Allergen, beispielsweise Pollen, bilden sich Antikörper, die der Immunglobulinklasse E (IgE) angehören. Es ist bekannt, daß Allergiker als Gruppe wesentlich höhere Serum-IgE-Spiegel aufweisen, als etwa gesunde Probanden. Da jedoch keine einfache lineare Beziehung zwischen IgE-Serum-Spiegel und Beladung von basophilen und Gewebsmastzellen mit IgE-Antikörpern besteht, kann von einem erhöhten IgE-Serum-Spiegel - im Einzelfall - nicht ohne weiteres auf eine allergische Diathese oder gar eine allergische Erkrankung geschlossen werden. Trotzdem mißt man der Bindung dieser Reagine nach Kontakt mit dem Allergen an die Mastzelle größte pathophysiologische Bedeutung bei, werden doch dadurch pharmakologisch wirksame Substanzen frei wie Histamin, Heparin und Serotonin, die als Auslöser der allergischen Symptomatik gelten.

Die klinisch bedeutungsvollsten Allergien, denen eine Typ-I-Reaktion zugrunde liegt, sind die Pollinose, die allergische peremiale Rhinitis, das allergische Bronchialasthma, die Urticaria sowie teilweise Nahrungsmittelallergien und Arzneimittelallergien.

Typ-II-Reaktionen, auch als zytotoxische Reaktionen bezeichnet, spielen u.a. eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen, bei der Abstoßung von Transplantaten und Schädigung des blutbildenden Apparates.

Typ-III-Reaktionen, auch als Arthus-Typ bezeichnet, beruhen auf Antigen-Antikörper-Komplexen und Typ-IV-Reaktionen schließlich liegen sensibilisierte Lymphozyten zugrunde. Eine typische allergische Reaktion des Typ IV ist das sog. Kontaktekzem, das damit den berufsbedingten Allergien zuzurechnen ist.

Im wesentlichen werden wir es bei den hier zur Debatte stehenden Allergien, also Heuschnupfen, Nesselausschlag, Asthma bronchiale, Nahrungsmittelallergien und Kontaktdermatitiden mit Typ-I- sowie Typ-IV-Reaktionen zu tun haben, obgleich bei der Aktivierung eines allergischen Reaktionstyps alle anderen, wenn auch graduell, unterschiedlich mitbeteiligt sind.

Die Therapie von Allergien wird in der Regel in zwei Kategorien unterteilt:

1. in eine symptomatische Behandlung;
2. in eine mehr kausal orientierte Behandlung.

Zu den symptomatischen Therapiemethoden zählen Antihistaminika, Kortikosteroide und Cromoglicat.

Trotz beachtlicher Fortschritte in der Entwicklung von Antihistaminika zielt diese therapeutische Gruppe lediglich auf die Effektorphase der Allergie des Typs I, also der Mastzelledegranulierung, und erreicht damit nur eine vorübergehende Abschwächung der Symptomatik. Beim Bronchialasthma wirken Antihistaminika praktisch nicht. Ebenso haftet fast allen Wirkstoffen dieser Zusammensetzung mehr oder weniger der Nebeneffekt einer unerwünschten Ermüdung an. Kortikosteroide werden in der ärztlichen Praxis wegen ihres oft dramatisch erscheinenden Einflusses auf das klinische Beschwerdebild gern und auch hochdosierte gegeben. Kortikosteroide sind selbstverständlich indiziert in Notfallsituationen, so beispielsweise beim Status asthmaticus. In hohen Dosen und über längere Zeit angewandt allerdings, können Kortikosteroide in ihren Nebenwirkungen ebenso problematisch sein wie der Zustand, den sie behandeln sollen. Wegen der ausgeprägten Nebenwirkungen, insbesondere einer Langzeitmedikation, sollte deshalb auf einen systemischen, länger dauernden Einsatz, wenn immer, möglichst verzichtet werden.

Gegen Pollinose und allergisches Asthma findet neuerdings das Natriumsalz der Cromoglicinsäure Verwendung. Man schreibt ihm membranabdichtende Eigenschaften zu. Insbesondere soll diese Substanz den Einstrom von Kalziumionen in eine stimulierte Mastzelle verhindern und damit letztlich die Freigabe der Speicherstoffe unterbinden. Das Mittel muß freilich verabreicht werden, ehe sich das Antigen an die Mastzelle bindet.

Zu den mehr kausal begründeten Therapiemethoden einer Allergie gehört die spezifische Hyposensibilisierung mit dem Allergen. Dabei verabreicht man kleine Mengen des auslösenden Antigens - sofern man es überhaupt identifizieren kann - in ansteigender Dosierung, um das Immunsystem des Patienten zur Bildung von IgG-Antikörpern zu veranlassen. Das IgG soll sich dann bei einer späteren Begegnung mit dem Antigen verbinden und so dessen Bindung mit dem IgE auf den Mastzellen verhindern. Die Desensibilisierung mit dem Allergen wird bei einigen Pollenarten eingesetzt, die Heuschnupfen hervorrufen. Für die Erfolgsaussichten gilt: je kleiner die Zahl der Allergene, desto besser. Begrenzte Erfolge zeigen sich noch beim Asthma, aber nicht mehr bei Nahrungsmittelallergien oder gar zellvermittelten allergischen Reaktionen vom Spättyp. Bescheiden sind die Erfolgsaussichten auch bei Mehrfachallergien.

Der Nachteil dieser Methode besteht vor allem darin, daß das Allergie auslösende Agens bekannt sein muß, die Allergen-Testung den Patienten sehr belastet, diese Methode zeitaufwendig, störanfällig und teuer ist, und die Methode schließlich nicht ganz ungefährlich ist.

Aus all diesen Gründen betrachten inzwischen viele Ärzte die spezifische Hypo-sensibilisierung mit einiger Zurückhaltung.

Eine biologische Alternative zu den bisherigen Konzepten bietet die Gegensen-sibilisierung, eine modifizierte Eigenblutbehandlung nach Prof. THEURER. Die Ge-gensen-sibilisierung hat gegenüber der symptomatischen Therapie mit Kortikoste-roiden und der Antigen-spezifischen Desensibilisierung folgende diagnostische und therapeutische Vorteile:

1. Eine spezifische Austestung ist nicht nötig, da nicht das Allergen, sondern die im Patientenblut, -plasma oder -serum enthaltenen krankmachenden Faktoren des Patienten selbst zur Desensibilisierung benutzt werden.
2. Die Gegensen-sibilisierung wirkt gegen alle Arten von Sensibilisierungen; selbst unspezifische und gemischte Allergien werden auf diese Weise erfaßt. Und schließlich
3. Gefahrenmomente, die der spezifischen Desensibilisierung anhaften, entfallen

Zur Beeinflussung der Hyperreagibilität des Immunsystems empfehlen sich noch Thymushormon enthaltende Präparate wie NEYTHYMUN und NEYDESIB. Ihre biologisch immunsuppressive Wirkung entfalten sie mit aller Wahrscheinlichkeit über die Stimulierung der T-Suppressorzellen, die einen entscheidenden Einfluß auf sämt-liche Phasen der Immunreaktion haben.

Herr BONNET, Sie haben sowohl mit der klassischen Hyposensibilisierung, als auch mit Glukokortikoiden und anderen symptomatisch wirkenden Arzneimitteln, ebenso wie mit der Gegensen-sibilisierung Erfahrungen sammeln können. Wie beur-teilen Sie den Stellenwert der einzelnen Therapiemethoden in der Pädiatrie?

Herr BONNET: Allergische Erkrankungen bei Kindern kommen wahrscheinlich weit häufiger vor als allgemein angenommen wird. Auch bei mir hat sich im Laufe der Zeit gezeigt, daß bei Kindern mit immer wiederkehrendem Schnupfen, ohne direk-ten Bezug zur Pollensaison, mit chronischen Sinusitiden oder mit hartnäckigem Tubenmittelohrkatarrh oftmals jeweils eine Allergie ursächlich vorlag. Die je-weiligen Krankheitsbilder sind ja geläufig: Conjunctivits, Rhinitis und Asthma. Natürlich sind im Notfall Kortikosteroide immer wieder angezeigt, keinesfalls jedoch als Dauertherapie.

Als Bereicherung in der Behandlung von Allergien empfinde ich die Cromoglicin-säure und deren Derivate. Es ist oftmals so, daß viele Patienten Cromoglicin-säure als Überbrückungstherapie benötigen, bis andere Maßnahmen wirksam gewor-den sind.

Was meine Erfahrungen auf dem Gebiet der spezifischen Hyposensibilisierung anbelangt, so war ich zunächst natürlich auch euphorisch, als mehr oder weniger definierte Allergenextrakte auf breiter Basis propagiert wurden. Meine Erfahrungen bei Kindern, besonders bei Mehrfachallergikern, waren allerdings die, daß nach einer dreijährigen durchgehenden Behandlung trotzdem wieder neue allergische Symptome aufgetreten sind. Bei einer gewissenhaften Nachtestung in Zusammenarbeit mit der Unikinderklinik in Tübingen hat sich dann gezeigt, daß für die neuen Beschwerden tatsächlich neue Allergene relevant geworden sind. So habe ich eine ganze Anzahl von Patienten, die ich über drei Jahre hinweg mit dieser Therapie "geplagt" habe, trotzdem immer noch in Behandlung.

Anders war das bei Monoallergien, z.B. bei Allergien auf einen einzigen Schimmelpilz oder bei Hausstaubmilbenallergie. Dort genügt meist eine konsequente einmalige Behandlung, um den Patienten beschwerdefrei zu bekommen. Bei multiplen Allergenen allerdings bin ich damit nicht weitergekommen.

Bei der Allergentestung habe ich oftmals positive Reaktionen festgestellt, sowohl auf Roggen, Weizen, Hafer, Gerste und auch noch Mais. Diese Befunde gaben wir weiter und erhielten vom Werk die fertigen Hyposensibilisierungskuren zugeschickt. Erst später hat mich ein Kollege vom Olga-Hospital in Stuttgart darüber informiert, daß beim Getreide eigentlich nur der Roggen relevant ist, weil er ein Windbestäuber ist und andere Getreidesorten überhaupt nicht in die Lösung hineingenommen werden müßten.

Als Erweiterung meiner Therapie bei atopischen Erkrankungen führte ich ab 1977 die zytoplasmatische Therapie und die Gegensensibilisierung in das Spektrum meiner Behandlungsmaßnahmen ein. Seit drei Jahren stehen diese Methoden in dem Mittelpunkt meiner therapeutischen Bemühungen bei Asthma, Pollinose, allergisch bedingten Sinubronchitiden, Rhinitiden und bei atopischer Dermatitis. Die z.T. überraschend guten Therapieerfolge wurden ab 1979 dokumentiert. Mittlerweile wurden 375 Patienten mit der zytoplasmatischen Therapie und den Methoden der Serum-Desensibilisierung behandelt. Bei 239 Patienten wurde die Behandlung mit folgendem, in Tab. 1 dargestellten Ergebnis, behandelt.

So viel zunächst einmal zu meiner praktischen Erfahrung.

Tab. 1: Statistische Auswertung der zytoplasmatischen Therapie und GS

Krankheit	Erfolg	Anzahl	GS	D/L	D/L/GS	D/L/ GS/T	D/T
<i>Pollinose Rhinitis</i>	sehr gut	81	19	18	35	8	1
	gut	50	9	11	23	6	1
	mäßig	21	5	7	7	2	
	erfolglos	7	4		3		
		3	1		2		
<i>Ästhma</i>	sehr gut	54	16	5	26	5	2
	gut	29	10	3	10	4	2
	mäßig	19	4	2	12	1	
	erfolglos	5	1		4		
		1	1				
<i>Infekte Sinusitiden</i>	sehr gut	24	3	4	13	2	2
	gut	14	1	2	8	1	2
	mäßig	7	1	2	3	1	
	erfolglos	3	1		2		
<i>Atopische Dermatitis</i>	sehr gut	11		3	8		
	gut	4		1	3		
	mäßig	3		2	1		
	erfolglos	3			3		
		1			1		
Krankheit	Erfolg	Anzahl		D/L		D/L/T/IP	
<i>Harnwegs- infekte</i>	sehr gut	10		1		10	
	gut			1		2	
	mäßig					5	
	erfolglos					2	
						1	

GS = Gegensensibilisierung

D = Dilutionen

T = Trockensubstanzen

L = Linguale

AUDITORIUM: Wie oft müssen Sie eine Gegensensibilisierung durchführen, ehe sich der Erfolg einstellt?

Herr BONNET: In der Regel einmal, in wenigen Fällen zweimal. Ich könnte mir aber vorstellen, daß man bei Allergikern, die über das ganze Jahr hinweg auf die ersten Frühblüher bis zu den letzten Spätblühern allergisch reagieren, möglicherweise auch drei Gegensensibilisierungskuren durchführen muß. Dieses Vorgehen ist durchaus verständlich, wenn man weiß, daß ein Patient einmal auf Birke, dann auf Haselnuß und schließlich später noch einmal im Jahr auf irgendeinen anderen Windbestäuber allergisch reagiert. In diesen Fällen verwendet man dann die erste Stammlösung vom Frühjahr, mischt diese mit der zweiten vom Herbst

und erhält so eine Misch-Gegensensibilisierung, die ein wesentlich breiteres Allergenspektrum abdeckt. Sie können einfach nicht erwarten, daß die Reagine des Frühjahrs noch im Herbst im Blut sind oder umgekehrt.

Herr PORCHER: Laut Herstellerangaben muß auch eine klassische Hyposensibilisierungskur mit dem Allergen mindestens ein Jahr lang durchgeführt werden. Im allgemeinen ist sogar eine Hyposensibilisierungszeit von zwei bis drei Jahren notwendig.

Frau GRAF: In der Regel muß ich zwei- bis dreimal gegensensibilisieren. In diesem Jahr hatten wir allerdings einige Rezidive. Wahrscheinlich hing dies mit dem verzögerten Frühjahr und dem vorgezogenen Sommer zusammen, wodurch sich die Pollenkonzentration offensichtlich erhöhte.

Herr SCHNELLEN: Rezidive nach einer Gegensensibilisierung gibt es nicht! Das sind Neuerkrankungen! Dieser Sachverhalt ist eigentlich auch verständlich. Ein Mensch mit einer Disposition zur Abwehrschwäche kann natürlich nach einer Gegensensibilisierung immer wieder neu allergisiert werden. Er kann sich sogar während einer Gegensensibilisierungskur gegen andere Stoffe sensibilisieren. Diese können aber dann bei einer erneuten Blutabnahme wieder miterfaßt werden. Darin besteht ja der grundlegende Unterschied zwischen einer Hyposensibilisierung und einer Gegensensibilisierung. Bei der Hyposensibilisierung desensibilisiert man nur gegen das ausgetestete Allergen. Bei der Gegensensibilisierung desensibilisiert man gegen sämtliche, sich im Blut des Menschen enthaltenen pathogenen Faktoren. Nur eines kann man mit der Gegensensibilisierung natürlich auch nicht: Man kann die Disposition zur Allergie, die Abwehrlage nicht verändern. Hier sind Organ-Dilutionen angezeigt, u.a. NEYTHYMUN und NEYDESIB, die korrigierend auf das Immunsystem einwirken. Was man bei der Hyposensibilisierung vor allem nicht erfaßt - und das ist mein besonderes Anliegen - man erfaßt nicht die Bruchstücke und nicht die Nahrungsmittelallergene. Man kann davon ausgehen, daß bei einer Pollinose nicht nur das intakte Polleneiweiß allergisierend wirkt, sondern schon daraus fraktionierte Moleküle. Beispielsweise enthält ein Eiweißmolekül mit einem Molekulargewicht von 700.000 schon eine Vielzahl von Allergenen. Bereits bei einem Molekulargewicht ab 4.000 besteht die Möglichkeit der Allergisierung. Bei der Hyposensibilisierung erfassen wir nun nur jene Prozesse, die ausgetestet wurden, bei der Gegensensibilisierung erfassen wir praktisch alles.

AUDITORIUM: Zu welchem Zeitpunkt muß Blut für die Herstellung einer Gegensensibilisierung entnommen werden?

Herr PORCHER: Das Blut sollte auf dem Höhepunkt der Erkrankung abgenommen werden, insbesondere auch noch vor Beginn jeglicher symptomatischer Medikation,

weil zu diesem Zeitpunkt der höchste krankheitsspezifische Antikörpertiter zu erwarten ist. Bei akuten Allergien ist die Blutabnahme deshalb in der Phase der Eosinophilie durchzuführen, bei chronischen Erkrankungen im akuten Schub. Bei saisonalen Pollenallergien sollte man zu dem jeweiligen Zeitpunkt eine neue Stammlösung herstellen, um eine eventuelle Fluktuation des Allergenspektrums therapeutisch zu integrieren.

AUDITORIUM: Wie geht man bei der Gegensensibilisierung praktisch vor?

-12

Herr BONNET: Von der höchsten Verdünnungsstufe ( $10^{-10}$ ) werden mittels einer Tuberkulinspritze und einer sehr dünnen Kanüle 0,2 ml paravertebral intrakutan in Form von 4 Quaddeln injiziert. Im Abstand von 1 - 3 Tagen werden dann 0,4 ml derselben Konzentration, das entspricht also 8 Quaddeln, injiziert, sodann 0,2 ml der Konzentration  $10^{-10}$ , danach 0,4 ml von  $10^{-10}$  usw. bis zur Stärke  $10^{-4}$ .

Bei lokalen Reaktionen in Art einer Rötung an den Injektionsstellen oder bei Zunahme der Beschwerden geht man eine oder mehrere Stufen zurück und erhöht erst wieder, wenn die Dosen reaktionslos vertragen wurden.

Neben den Quaddeln kann die Gegensensibilisierung übrigens auch intranasal, perlingual oder - was sich sehr gut bewährt hat - als Inhalation über einen Mikroinhalator verabreicht werden. Die Behandlung wird bis zum Abklingen der Beschwerden durchgeführt und dauert in der Regel 6 - 12 Wochen. Bei erneuten Beschwerden wird sie wiederholt. Wie Herr SCHNELLEN schon erwähnte, wird durch die Gegensensibilisierung die Disposition des Organismus zu atopischen Reaktionen nicht beeinflusst. Diese Disposition kann jedoch durch zytoplasmatische Präparate normalisiert werden.

Herr SEIFERT: Ich möchte nochmals auf die rege geführte Diskussion zurückkommen, weshalb einige Patienten auf eine dauernde Gegensensibilisierung angewiesen sind.

Sie dürfen nicht vergessen, daß diese Patienten krank sind, krank in dem Sinne, daß ihr Immunsystem überschießend auf den Kontakt mit Antigenen reagiert. Wenn Sie also gegen ein Antigen oder eine Vielzahl von Antigenen in einem Jahr oder in einer Saison erfolgreich gegensensibilisiert haben, ist noch lange nicht sichergestellt, daß Sie ihn damit für immer geheilt haben. Im nächsten Jahr kann er ohne weiteres gegen andere Allergene reagieren, weil er im Prinzip ja immer noch krank ist. Er hat zwar seinen Anti-Antikörper gegen einen Autoimmun-Antikörper oder gegen Reagin gebildet, ist aber nur gegen ganz bestimmte Antigene geschützt.

Herr GILLISSEN: Wenn wir von einer Gegensensibilisierung sprechen, so benutzen wir doch das Blutserum des Patienten, das auf dem Höhepunkt der Erkrankung ab-

genommen wurde. Betrachten wir einmal die humorale Seite des Geschehens, so kann man davon ausgehen, daß hier eine große Anzahl von Antikörpern in einer ganz bestimmten Spezifität vorhanden sind. Das ist entscheidend! Rein theoretisch kann das Verfahren nur wirksam sein, wenn wir antiidiotypische Antikörper induzieren - und in diese Richtung geht es ja wohl auch - und wir deshalb zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei einem Allergiker oder an einer Autoimmunerkrankung leidenden Patienten einen besonders hohen Spiegel von Antikörpern einer ganz bestimmten Spezifität haben. Alles andere wäre unspezifisch, was die individuelle Krankheit des Patienten anbelangt.

Eine andere Möglichkeit wäre natürlich noch, inwieweit die Gegensensibilisierung auch einen unspezifischen Einfluß auf die absolute und relative Zahl von T-Suppressorzellen ausübt. Diese Relation Helferzellen zu Suppressorzellen spielt vielleicht eine sehr wesentliche Rolle, gerade bei der zellulären Immunität.

Herr PORCHER: Unabhängig davon, welche Mechanismen der Gegensensibilisierung letztlich zugrunde liegen, für den Praktiker entscheidend ist natürlich immer: wirkt eine Therapie oder wirkt sie nicht. Daß es sich bei den Wirkmechanismen der Gegensensibilisierung - um wieder darauf zurückzukommen - in erster Linie um Induktionen von antiidiotypischen Antikörpern handelt, konnte Herr SEIFERT seinerzeit noch am Institut für experimentelle Chirurgie zusammen mit Herrn BRENDDEL, München, belegen. In Transplantationsexperimenten konnte der Nachweis einer Induktion von Gegenantikörpern gegen Transplantat gerichtete Antikörper geführt werden. Der Anti-Idiotyp-Netzwerk-Theorie in Zusammenhang mit der Gegensensibilisierung kommt deshalb eine sehr hohe Beweiskraft zu. Auf der anderen Seite wirken unsere Thymuspräparate - je nachdem, welche Effekte Sie erreichen wollen, ob nun immunsuppressiv oder immunstimulierend - mehr oder weniger spezifisch auf die Relation der Helferzellen zu den Suppressorzellen. Auch mit diesen Organ-Dilutionen haben wir deshalb eine sehr elegante Möglichkeit, in entgleiste Immunprozesse einzugreifen.

AUDITORIUM: Herr SCHNELLEN, Sie prägten in einer Ihrer letzten Arbeiten den Begriff der "Blind-Desensibilisierung". Was verstehen Sie darunter?

Herr SCHNELLEN: Unter "Blind-Desensibilisierung" verstehe ich, daß es bei der Anwendung der Gegensensibilisierung - im Gegensatz zu der klassischen Hyposensibilisierung mit dem Antigen - nicht der spezifischen Austestung von Allergenen bedarf, da die krankmachenden Faktoren des Patienten selbst zur Desensibilisierung benutzt werden.

Herr PORCHER: Darf ich Ihre Definition, Herr SCHNELLEN, als Schlußkommentar für den Themenkomplex "Allergie" auffassen und auf das Gebiet der Autoimmun-

erkrankungen überleiten? Auch hier sollen zunächst einmal theoretische Bemerkungen über die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen vorangestellt werden. In der Regel besitzt der Organismus gegenüber seinen eigenen Antigenen eine natürliche Toleranz. Eine Autoaggression dürfte eigentlich nicht eintreten. Paul EHRLICH prägte dafür auch den Begriff "horror autotoxicus". Normalerweise verfügt das Immunsystem über zahlreiche "Sicherungen", daß es nicht zu einer Autoaggression kommen kann. Das Problem einer Autoimmunerkrankung, quasi einem "Bürgerkrieg" im Organismus, stellt sich eigentlich erst dann, wenn das Immunsystem aufgrund ganz bestimmter exogener oder endogener Konstellationen körpereigenes Gewebe angreift. Verschiedene auslösende Faktoren kommen in die engere Wahl, Autoimmunprozesse zu begünstigen oder gar zu induzieren:

- Einige Körperzellen und körpereigene Substanzen sind beispielsweise aufgrund anatomischer Barrieren vom Immunsystem isoliert. Während der Ontogenese bestand keine Gelegenheit, mit immunkompetenten Zellen in Kontakt zu kommen, so daß sich auch keine Immuntoleranz entwickeln konnte. Spermatozoen, Augenlinse und das Thyreoglobulin gehören in diese Gruppe. Kommen derartige Proteine oder Zellen in Kontakt, erscheinen diese biologischen Verbindungen oder Strukturen für das Immunsystem als körperfremd. Die Folge ist eine Autoaggression mit der Tendenz zur Zerstörung körpereigenen Gewebes. Dieser Prozeß läuft meist in Art eines Circulus vitiosus ab.
- Autoaggressionsprozesse können aber auch dadurch in Gang kommen, daß körpereigene Substanzen gewissermaßen chemisch und physikochemisch, sei es durch Chemikalien aus der Umwelt, Arzneimittel, Toxine, ionisierende Strahlen, leicht verfremdet werden, so daß sie vom Immunsystem ebenfalls in die Kategorie "fremd" eingestuft werden.
- Auch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Bakterien und Eiweißkörpern oder Zellen des menschlichen Wirtsorganismus können die Ursache von Autoimmunerkrankheiten sein. So kommen beispielsweise bestimmte Streptokokken vor, die mit menschlichen Geweben wie Herzgewebe oder Nierengewebe kreuzreagieren können.
- Auch Viren sind theoretisch fähig, Autoimmunerkrankungen auszulösen, indem sie Zellen transformieren können mit neuen Membraneigenschaften und damit möglicherweise körperfremden Strukturen.
- Und schließlich können autoimmunologische Prozesse im Alter einfach durch Verschleiß und Denaturierung körpereigener Stoffe ausgelöst werden.

Es ist zweckmäßig, die menschlichen Autoimmunerkrankungen in zwei Hauptgruppen zu unterteilen:

1. in solche, bei denen vornehmlich ein Organ betroffen ist, die sogenannten organlokalisierten Autoimmunerkrankungen,
2. in solche, bei denen sich der Krankheitsprozeß auf viele Gewebe erstreckt, insbesondere Lunge, Niere und Gelenke; diese werden als systemische Autoimmunerkrankungen bezeichnet.

In ihrer Genese als organlokalisierte Autoaggression gesichert, gelten heute die Immunthyreoiditis, die sympathische Ophthalmie und die chronisch-aggressive Hepatitis. Als rein systemische Autoimmunerkrankung gilt die autoimmunhämolytische Anämie, die Autoimmungranulozytopenie, die Autoimmunthrombozytopenie. Der Lupus erythematodes visceralis disseminatus zeigt sich sowohl als organlokalisierte, als auch systemische Autoimmunerkrankung.

Die Myasthenia gravis konnte dank der Arbeitsgruppe um WEKERLE und KETELSEN vom Max-Planck-Institut in Freiburg mittlerweile eindeutig den Autoimmunerkrankungen zugeordnet werden. Die Myasthenia gravis ist als eine durch Rezeptorantikörper verursachte Erkrankung ein Sonderfall einer zytotoxischen Autoimmunitätsreaktion. Bei der Myasthenia gravis reagiert ein spezifischer Antikörper, mit dem Acetylcholinrezeptor in der Muskulatur und blockiert so die funktionelle Stimulation der Muskelzelle. Beim jugendlichen Diabetiker findet man übrigens eine ähnliche Konstellation, in dem Autoantikörper gegen die Inselzellen der Bauchspeicheldrüse nachgewiesen werden können. Auch die primär-chronische Polyarthrititis ist mittlerweile mit sehr großer Wahrscheinlichkeit den Autoimmunerkrankungen zuzuordnen. Vermutet, aber noch nicht sicher einzuordnen sind das rheumatische Fieber, die rheumatische Myokarditis, das Sjögren-Syndrom, das Felty-Syndrom, die Panarteriitis nodosa sowie organlokalisiert, der idiopathische Morbus Addison. So weit zur Ätiopathogenese und Einordnung von Autoimmunerkrankungen.

AUDITORIUM: Welche Therapiemethoden stehen in der Klinik bei Autoimmunerkrankungen im Vordergrund?

Herr SEIFERT: Ich bin zwar kein Kliniker, habe aber "über längere Zeit Autoimmunerkrankungen behandelt. Die Therapie variiert derzeit wenig. Aus einem breiten Spektrum immunsuppressiv wirkender Substanzen hat für die klinische Praxis eigentlich nur eine kleine Anzahl praktische Bedeutung erlangt, Steroide, Zytostatika, Alkylanzien, Antimetabolite, Antirheumatika und das Antilymphozytenglobulin. Es gibt natürlich nicht wenige Nachteile, die diese immunsup-

pressiven Medikamente haben. Ein wesentlicher Nachteil ist sicher die gestörte Infektabwehr. Bedingt durch die fehlende Selektivität dieser Immunsuppressiva kommt es nämlich zu einer generellen Schwächung der natürlichen humoralen und zellulären Abwehrmechanismen mit allen daraus ableitbaren Folgen.

Vergleicht man diese Nachteile der klassischen Immunsuppressiva mit den nahezu nebenwirkungsfreien Methoden der Gegensensibilisierung oder zytoplasmatischen Therapie, und sieht man den Patienten nicht nur als Objekt im Krankenhaus, sondern in seiner ganzen Schicksalshaftigkeit, dann kann man sicher von einem erheblichen Fortschritt sprechen, der mit der Gegensensibilisierung und der zytoplasmatischen Therapie eingeleitet wurde. Gegenüber der herkömmlichen Universitätsmedizin müssen diese Methoden allerdings nunmehr auf eine statistisch gesicherte Grundlage gestellt werden. Ich möchte deshalb anregen, über diese Therapiearten kontrollierte Studien durchzuführen.

Herr PORCHER: Kontrollierte Studien erfordern Zeit und die Öffnung und Mitarbeit der Kliniken. Bisher haben wir bei verschiedensten Indikationen, so bei hirnorganischen Störungen, Cataracta senilis, degenerativen Gelenkerkrankungen, Polyarthritiden und Tumoren kontrollierte, klinische Doppelblindstudien durchgeführt. Bei weiteren Indikationen, so auch beim Asthma bronchiale, sind Studien in die Wege geleitet worden, die innerhalb der nächsten Jahre abgeschlossen sind und zur Auswertung anstehen.

Herr GEESING: Welchen Stellenwert nimmt nun das IgE bei der Allergie ein, und welche Kriterien weisen auf eine Autoimmunerkrankung hin?

Herr PORCHER: Der IgE-Spiegel korreliert nicht unbedingt mit den allergischen Erscheinungen. Die IgE-Spiegel können deshalb nur als richtunggebender Hinweis im Rahmen einer Gesamtdiagnostik gesehen werden. Parameter für eine Autoimmunerkrankung sind Autoantikörper gegen eine oder mehrere Arten von Geweben, Immunglobulin-Konzentrationen, die oberhalb der Norm liegen, Nachweis von Lymphozyten und Plasmazellen in den betroffenen Geweben, die Besserung des Zustandes des Patienten, sobald er mit Immunsuppressiva behandelt wird und meist auch eine Familienanamnese.

AUDITORIUM: Wie behandle ich eine chronische Polyarthrititis? Ist hier nur das Hydrolysat indiziert oder auch die Gegensensibilisierung?

Herr PORCHER: Bei der pcP empfiehlt sich - wie Sie es aus dem Vortrag von Herrn HOFFMANN entnehmen konnten - einmal die Gegensensibilisierung zur Zurückdrängung pathologischer Antikörper, parallel hierzu oder auch anschließend das Hydrolysat zur Neutralisation freiliegender Autoantigene, NEYDESIB und NEYTHYMUN

zur schonenden biologischen Immunsuppression und abschließend zur Regeneration des geschädigten Gewebes NEYARTHROS und NEYCHONDRIN.

AUDITORIUM: Eine andere Frage ergibt sich, wenn Patienten kommen, die schon auf Kortikoide eingestellt sind, seien diese nun Asthmatiker oder Pollinotiker. Wieviel Zeit muß verstreichen, bis Blut für eine Gegensensibilisierung sinnvollerweise entnommen werden kann? Durch die Kortikoide wird ja die Bildung von Antikörpern unterdrückt. Für die Gegensensibilisierung ist es jedoch wünschenswert, möglichst viele Antikörper in der Serumprobe zu haben.

Herr BONNET: Es ist schon eine ziemliche Klippe, die man hier umschiffen muß, will man die Medikamente abbauen, überbrückungsweise können Sie hier mit Cromoglicinsäure arbeiten. Pollinotiker können Sie auch vier Wochen in eine Region schicken, in der andere Pollen dominieren, auf die er nicht gerade allergisch reagiert. Danach sind die Kortison-Spiegel in der Regel so weit abgebaut, daß man beim Auftreten neuer Symptome ohne weiteres Blut für die Herstellung einer Gegensensibilisierung abnehmen kann.

Herr SCHNELLEN: Vier Wochen müssen meiner Erfahrung nach mindestens verstreichen, ehe man den immunsuppressiven Effekt von Kortikosteroiden überwunden hat.

Herr PORCHER: Immunsuppressive Maßnahmen führen dazu, daß die pathogenen Antikörper so weit reduziert werden, daß sie nicht mehr für die therapeutische Nutzung in Form der Gegensensibilisierung ausreichen. In der Phase des "Ausschleichens" empfiehlt sich NEYNORMIN "N". Dieses Präparat enthält Glukokortikoide in subpharmakologischer Dosis, unter Ausnützung des Organtropismus zytoplasmatischer Präparate.

AUDITORIUM: Wie gehe ich beim Status asthmaticus vor?

Herr SCHNELLEN: Der Status asthmaticus ist ein wichtiges Indikationsgebiet für Kortikosteroide. In schweren Fällen ist die Anwendung gleichzeitig mit Sympathikomimetika und Theophyllin-Derivaten indiziert.

AUDITORIUM: Kann ich trotzdem gleichzeitig mit der Gegensensibilisierung beginnen oder muß ich abwarten, bis das Kortison abgeklungen ist?

Herr BONNET: Setzen Sie beim akuten Status asthmaticus Kortison ein, so nehmen Sie nach Möglichkeit vorher das Blut ab. Ich hänge dabei den Patienten an den Tropf, nehme das Blut ab, lasse die Infusion laufen und spritze dann Kortison und Euphyllin und anschließend Bricanyl. Bis dann die Gegensensibilisierung hergestellt ist, vergehen sowieso einige Tage. Die Gegensensibilisierung starte ich dann etwa zwei Wochen später.

AUDITORIUM: Mit der Gegensensibilisierung erfaßt man die krankheitsbezogenen Antikörper. Miterfaßt werden doch sicher auch andere Immunglobuline, die wir ständig im Blut haben. Stellt sich dadurch nicht das Problem einer unspezifischen Immunsuppression?

Herr PORCHER: Das ist eine sehr gute Frage! In der akuten Phase, in der wir das Blut abnehmen, erfassen wir einen hohen Prozentsatz an "pathogenen" Immunglobulinen, die im Krankheitsgeschehen relativ gesehen dominieren. Obgleich es nicht beabsichtigt ist, phylakogene Immunglobuline zu unterdrücken, könnte doch eine gelinde Immunsuppression eintreten. Wir empfehlen deshalb, bei akuten Erkrankungen, insbesondere bei bakteriellen Erkrankungen, die Gegensensibilisierung unter Antibiotikaschutz durchzuführen. Die Anwesenheit des Infekt-Antigens verhindert aber z.T. auch die Suppression der entsprechenden Antikörper

Betrachten wir jetzt einmal ein Hyperimmunglobulin gegen irgendwelche Toxine, so beträgt der wirksame, gegen das Toxin gerichtete Anteil 1 % oder noch weniger. 99 % des Hyperimmunglobulins bestehen aus Immunglobulinen verschiedenster Spezifität. Und trotzdem wird das Hyperimmunglobulin nach den spezifischen Antikörpern definiert, ähnlich verhält es sich auch bei der Gegensensibilisierung, die sich in erster Linie auf die Reagine oder Autoantikörper stützt.

AUDITORIUM: Der Organismus wird ja nicht so ohne weiteres Autoantikörper erzeugen. Zu einer Autoimmunerkrankung kommt es nur, wenn irgendwelche Gewebsteile oder Antigene verfremdet wurden, beispielsweise bei der Thyreoidea, wenn etwa durch eine Entzündung das Thyreoglobulin verändert wurde. Das Immunsystem greift in diesem Fall dieses veränderte Protein an, es kommt zu einer Autoimmunerkrankung. Im Falle eines lokalisierten Autoimmunprozesses kommt es sicher in erster Linie darauf an, die lokale Veränderung zu eliminieren. Handelt es sich nicht um eine organspezifische Autoimmunerkrankung, sondern mehr um eine systemische Erkrankung, liegt die Sache natürlich wesentlich komplizierter. Wie wirkt sich nun ein erhöhter Antikörpertiter gegen Thyreoidea aus? Was würden Sie in diesem Fall tun?

Herr PORCHER: Indiziert ist hier natürlich die Gegensensibilisierung und dann vor allem aber auch die Desensibilisierung mit Schilddrüsen-Antigenen, wie sie im Präparat Nr. 30 vorliegen. Diese organspezifische Desensibilisierung ist eine Methode, die klinisch noch viel zu wenig eingesetzt wird. Sie haben mit den REVITORGAN-Präparaten, vor allem mit den Organ-Einzelpräparaten, die Möglichkeit, bei jeder organlokalisierten Autoimmunerkrankung nach den Regeln der klassischen Hyposensibilisierung zu desensibilisieren.

Nehmen wir als Beispiel eine Autoimmunerkrankung gegen Lebergewebe, so können Sie mit xenogenem Leberantigen, wie es in der Dil. Nr. 26 vorliegt, organspezifisch desensibilisieren, beginnend mit  $10^{-12}$  g/ml, der Stärke I, bis  $10^{-6}$  g/ml, der Stärke III. Bei jeder Art von Autoimmunerkrankung empfiehlt sich deshalb neben der Gegensensibilisierung, dem Hydrolysat, eine Desensibilisierung mit dem xenogenen Organantigen.

Eine mehr experimentelle Fragestellung wäre die Oberprüfung der Gegensensibilisierung an der Myasthenia gravis, die durch Antikörper gegen Acetylcholinrezeptoren gekennzeichnet ist.

Herr KETELSEN: Die Myasthenie ist das einzig klare Modell einer Autoimmunerkrankung, das Sie im Kaninchen direkt nachvollziehen können. Sie haben hier Antikörper gegen das Antigen, können die Titer per Radioimmunoassay messen sowie die klinische Besserung unmittelbar objektivieren. Ihren Vorschlag, die Myasthenie als Modell zur Überprüfung der Gegensensibilisierung zu verwenden, greifen wir gern auf.

Herr PORCHER: Abschließend möchte ich noch das Ergebnis einer Feldstudie an 4104 Patienten vorstellen, ein Ergebnis, das uns in dieser Deutlichkeit selbst überraschte. Ziel dieser Studie war der Wirkungsvergleich bei exogenen Allergosen und endogenen Allergosen sowie Autoimmunkrankheiten zwischen der Gegensensibilisierung, Hydrolysat, REVITORGAN-Präparaten einerseits und bisherigen Therapiemethoden andererseits. Unter die exogenen Allergosen fallen das Asthma bronchiale, die Pollinose und Ekzeme. Unter die endogenen Allergosen und Autoimmunkrankheiten reihen wir die Thyreoiditis, Hepatitiden, Kollagenosen und die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.

Trotz vorausgegangener erfolgloser, mit hohem Nebenwirkungspotential belasteter symptomatischer Therapiemethoden, und dazu gehörten Glukokortikoide, Antihistaminika, Gold, Penicillamin und die Hyposensibilisierung, fiel das Ergebnis eindeutig zugunsten der Gegensensibilisierung, dem Hydrolysat und den REVITORGAN-Präparaten aus. Nicht nur bezüglich der Wirksamkeit, sondern vor allem auch der Verträglichkeit - ein überaus wichtiger Gesichtspunkt in der Therapie von Allergien und Autoimmunerkrankungen.

Damit wird nochmals deutlich, daß die Forderungen, die zukünftigen Forderungen an Therapiemethoden für immunopathologische Prozesse, seien diese nun allergischer oder autoimmunopathogener Natur, schonender, gezielter und wirkungsvoller sein müssen als derzeit oftmals eingesetzte Behandlungsmethoden. Mit der zytologischen Therapie in Form der Gegensensibilisierung, Antikörperfragmenten und Organantigenen haben wir heute schon ein wirksames Arsenal biologischer Therapeutika ohne größere Nebenwirkungen. Und "im Zweifelsfalle entscheide man sich für das Richtige", wie es Karl KRAUS schon treffend formulierte.

Reparative und regenerierende Therapie  
des vorderen Augenbereiches mit CONJUNCTISAN B  
nach Dauerbelastung durch Kontaktlinsenpflegemittel

H. WANDERKA

Institut für experimentelle Zellforschung,  
Mikrozirkulation und Dynamik,  
Viernheim

Die große Bedeutung der Konjunktivalerkrankungen ergibt sich aus den topographischen Beziehungen, vor allem zur Kornea. Die Hornhaut kann auf verschiedene Weise gefährdet werden. Indirekt ist die Gefährdung realisiert durch Beeinträchtigung der Ernährung infolge Drosselung des Randschlingennetzes bei chemotischer Anschwellung der limbusnahen Konjunktiva. Ein weiterer Modus der Gefährdung ergibt sich aus möglichen Folgen konjunktivaler Affektionen: Übergreifen des Trachoms auf die Lider bewirkt Trichiasis und damit Läsionen der Kornea. Die Veröduncj des oberen Fornix durch konjunktivale Narben nach Verätzung oder durch Pemphigus blockiert die Tränenproduktion und dadurch die Hornhaut. Ein zusätzlicher, in beide Richtungen weisender Modus der Gefährdung kann sich in Verbindung mit Kontaktlinsen, besonders mit weichen, hydrophilen Kontaktlinsen, ergeben. Infolge des Speicherunvermögens einer Reihe in Pflleaemitteln vorkommender chemischer Substanzen im Linsenkörper und infolge kontinuierlicher Abgabe der Substanzen beim Tragen an das Gewebe und den Tränenfilm kann eine Dauerbelastung für das Konjunktivalgewebe eintreten. In Verbindung mit dem Tränenfilm kann die Konjunktiva unter diesem Zustand ihre Schutzfunktion nicht mehr voll erfüllen. Wird zudem eine schlecht gereinigte Kontaktlinse angelegt, so führt diese unter Umständen gleichfalls zu einer infektiösen Bindehautentzündung, da die Linse ja die Erreger für die vorgeschädigte Konjunktiva liefert. Eine weitere Belastung des vorderen Augenbereichs in Verbindung mit Kontaktlinsen tritt dann auf, wenn ständig die Tragezeit erheblich überschritten wird und die dabei auftretenden Verluste des Tragekomforts durch soenannte Gleitmittel komnensiert werden.

Mit ein Grund für das verlängerte Tragen von Kontaktlinsen über die vorgegebene Zeit hinaus ist darin zu sehen, daß die Fülle der auf dem Markt befindlichen Pflegemittel in ihrer Handhabung für den Linsenträger problematisch und sehr zeitaufwendig sind. Pflegefehler schleichen sich sehr schnell ein. In einer Reihe von Veröffentlichungen wurde zum Pflegeproblem der Kontaktlinsen Stellung genommen (1). Der Verlust des Tragekomforts und die anschließende Belastung von Kornea und Konjunktivalbereich tritt auch unter verschiedener notwendiger Medikation auf, wie etwa Behandlung mit Cortison, Salicylaten, Seren, Psychopharmaka oder Rhinologika mit abschwellenden Wirkstoffen, um nur einige Stoffgruppen zu nennen.

In vierjähriger praxisbezogener Tätigkeit konnte einer Vielzahl von Kontaktlinsenträgern geholfen werden, den unter Belastung stehenden oder bereits erheblich geschädigten vorderen Augenbereich zur Norm zurückzuführen und das Tragen von Kontaktlinsen wieder zu gewährleisten. In all den Fällen, wo eine reparative und regenerative Therapie im Vordergrund stand, waren besonders gute Heilerfolge bei der Anwendung von CONJUNCTISAN B zu verzeichnen. Die Therapie mit CONJUNCTISAN B wurde bewußt durchgeführt, da in der Regel nicht nur die Konjunktivalschleimhäute, Goblet-Zellen und das tiefere Gewebe mit seiner Mikrozirkulation unter Belastung standen, sondern auch die Schleimhäute der abführenden Tränenwege bis hin zum Nasenbereich im dystrophischen Zustand waren.

Grundlagenversuche mit makromolekularen Organextrakten wurden vom Verfasser bereits in den Jahren 1970 bis 1976 durchgeführt (2,3). Verfolgt man den Fortschritt der Therapie mit makromolekularen Organextrakten bis heute, so werden einerseits viele überzeugende Heilerfolge gemeldet, andererseits erscheint die Zuordnung von vielschichtigen und unspezifischen Wirkungen für makromolekulare Organextrakte nicht aussagekräftig genug.

In einem 24 Monate andauerndem Großversuch an Kaninchen und Schweinen wurden die Therapieerfolge unter CONJUNCTISAN B aus der Praxis untersucht.

Ein lokales pathologisches Geschehen wird zwar am Zielort bekämpft dahinter steht jedoch die Gesamtheit eines Organismus mit der ineinandergreifenden Vielfalt notwendig gewordener Reaktionsmechanis-

men. Die zytoplasmatische Therapie mit makromolekularen Organextrakten ist daher eine auf den ganzen Organismus ausgerichtete Organtherapie mit Präparaten aus Einzelorganen und Organkombinationen für bestimmte Krankheitsarten (4,5,6,7). Die Behandlungsprinzipien beruhen auf der Substitution von Wirkfaktoren aus gesunden tierischen und fötalen Geweben, aber auch in der Stimulation und Induktion körpereigener Funktionen, die durch die Krankheit beeinträchtigt sind, und letztlich in der Reparatur von defekten Molekülen (DNS-Repair) und Austausch von Untereinheiten (Domänen in Proteinen). Behandlungs- und Heilungsprinzipien der "Zytoplasmatischen Therapie" wurden bereits in zahlreichen Veröffentlichungen dargestellt. So war das Ziel unserer Versuchsreihe nicht, im Ergebnis der Untersuchungen über den Heilerfolg zu berichten, vielmehr sollte mittels entsprechender Technik die reparative und regenerative Wirkung eines makromolekularen Organextraktes am geschädigten Gewebe sichtbar gemacht werden.

#### Technik

Vitalmikroskop und Vitalbiokularlupe (400fach) für Totaluntersuchung am lebenden Objekt; Yashika-Spiegelreflexkamera mit Raster und Bildautomatik; Sony DXC-1640 P - Video-Farbkamera; Sony V0-2630 Umatic-Farbvideospeicherrekorder; Sony Trinitron (56cm) Monitor Bildwand; Zusatz für Direktabnahme mit Polaroidtechnik; diverse mikro- und makrophotographische Zusatzgeräte.

#### Methodik

##### 1. Untersuchungen mit Kaninchen

50 Dalmatiner Rex-Bastard Kaninchen (25 männlich und 25 weiblich), Gewicht je 1,5 kg, erhielten Standardkost und wurden in sterilen Boxen bei 24°C und 75% Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Tiere erhielten weiche Linsen aus polymerisiertem Hydroxyäthylmethacrylat auf beide Augen aufgeklippt. Die tägliche Tragezeit betrug 14 Stunden mit nachfolgendem Abnehmen und Ruhezeit. In der Ruhezeit wurden die Linsen gereinigt und in einer NaCl-Lösung mit einem Zusatz von Chlorhexidindigluconat aufbewahrt (0,005 mg/ 100 ml). Zusätzlich bekamen die Tiere einmal täglich eine Applikation von Chlorhexidindigluconat in der minimalen Hemmkonzentration von 0,1ng/ml

an beide Augen.

Weiche Kontaktlinsen speichern Chlorhexidindigluconat, und dieses Konservierungsmittel besitzt eine hohe Affinität zu Schleimhäuten. Es zeigt bereits bei einmaliger Applikation eine Haftung bis zu 24 Stunden. Nach einer Linsentragezeit über 7 Monaten war der Konjunktivalbereich in seiner Funktion erheblich belastet, Schleimhautdenaturate konnten im Tränenfilm nachgewiesen werden. Im Innenlidbereich waren Gewebsläsionen erkennbar, das Randschlingennetz wies Ödeme infolge Kapillarbrüchigkeit auf. Die Schleimhautsekretion stagnierte, der Tränenfilm zeigte erhebliche Schwankungen hinsichtlich seiner Stabilität. Untersuchungen der abführenden Tränenwege bis hin zu den nasalen Schleimhautauskleidungen zeigten starke Rötung dieser Bereiche.

Nach der Linsentragezeit über 7 Monate wurden die Kaninchen in zwei Gruppen unterteilt.

Gruppe 1 = Kontrollgruppe mit 20 Tieren (10/10), wurden ohne Medikamente bis zur Abheilung beobachtet.

Gruppe 2 = Verumgruppe mit 30 Tieren (15/15), erhielt täglich den Inhalt einer Amphirole CONJUNCTISAN B in beide Augen geträufelt.

### 1.1 Ergebnis des Heilungsprozesses

Es dauerte 4 Monate bei der Kontrollgruppe, bis alle Tiere nennenswert abgeheilt waren. Lidrand und Gewebe des Innenlides wiesen Mikronarben auf.

Bei der Verumgruppe unter CONJUNCTISAN B war der Heilungsverlauf rascher und problemlos. Bereits nach 8 Wochen zeigten alle Tiere gute Abheilung unter ganz geringer, fast kosmetischer Vernarbung an den Stellen, wo bereits tiefergehende Gewebsschäden vorlagen.

## 2. Untersuchungen mit Hausschweinen

Nach Beendigung dieser Versuche schlossen sich die Untersuchungen mit Großtieren (Hausschweine) an. Die einleitende und vorbereitende Methode war identisch mit der der Kaninchenversuche.

10 Hausschweine (Läufer, 6 Monate, 5 männliche und 5 weibliche Tiere), erhielten beidseitig auf die Augen weiche Linsen aufge-

klippt. Die Tragezeit pro Tag betrug 14 Stunden mit nachfolgendem Abnehmen, Reinigen der Linsen und Ruhezeit. Bis zum täglichen erneuten Tragen der Linsen wurden diese nach der Reinigung in einer mit 0,005 mg pro 100 ml Chlorhexidin versetzten NaCl-Lösung aufbewahrt. Die Schweine erhielten gleichfalls täglich eine Applikation von Chlorhexidindigluconat in der MHK von 0,1 µg/ml an beide Augen. Die Gesamttragezeit der Kontaktlinsen betrug 7 Monate. Nach diesem Tragezeitraum zeigten alle Tiere die gleichen Sensationen im vorderen Augenbereich und Nasenraum wie die Kaninchen.

Nach 7 Monaten des Linsenstragens wurden die 10 Hausschweine in zwei Gruppen unterteilt:

Gruppe 1 = Kontrollgruppe mit 4 Tieren (2/2), wurde ohne Medikamente bis zur Abheilung beobachtet.

Gruppe 2 = Verumgruppe mit 6 Tieren (3/3), erhielt täglich den Inhalt einer Amphirole CONJUNCTISAN B in beide Augen geträufelt.

### 2.1 Ergebnisse des Abheilungsprozesses

Nur bei zwei Tieren der Kontrollgruppe trat über 4 Monate eine zufriedenstellende Abheilung auf. Bei den zwei restlichen Tieren mußten zusätzlich mit Antibiotika und Augensalben eingegriffen werden, um eine Abheilung zu bewirken. Bei allen Tieren gab es erhebliche Narbenbildung im Gewebe.

Bei der Verumgruppe unter CONJUNCTISAN B war der Heilungsablauf wiederum problemloser und rascher zu erkennen. Vollständige Herstellung mit kosmetischer Vernarbung wurde bei 4 Tieren innerhalb von 8 Wochen erreicht. Bei zwei Tieren war die Heilung erst nach der 9. Woche vollständig; diese Tiere wiesen aber auch bei Therapiebeginn großflächige Skleralödeme und Blutungen auf.

Wie schon eingangs erklärt, sollten diese Versuche nicht allein den Heilungserfolg unter CONJUNCTISAN B bestätigen, sondern am lebenden Gewebe wurde der reparative und regenerierende Wirkungsgrad von CONJUNCTISAN B fortlaufend beobachtet und dokumentiert. Diese Dokumentation bezieht aber auch die fortlaufende Schädigung des Gewebes unter Belastung mit ein. Die Beobachtungen eines Heilungsablaufs unter der Therapie mit CONJUNCTISAN B am vorgeschädigten Konjunktivalgewebe zeigten sehr deutlich, daß makromolekulare

Substanzen, wie sie in der "Zytoplasmatischen Therapie" zur Anwendung gelangen, genau den Forderungen entsprechen, die ein belastetes oder geschädigtes Gewebe benötigt. Im Vordergrund steht die Entlastung und Reparation von Zellen und Geweben; gleichzeitig wird aber auch der Restitution Rechnung getragen, die natürlich auch eine nutritive Versorgung des im Versorgungsnotstand befindlichen Gewebes einschließt.

#### Abwehrreaktion bei Nachbelastung

Beobachtungen der Kontrollen, bei denen ein Heilungsablauf unter Ausklammerung therapeutischer Hilfsmittel durchgeführt wurde, machten erkennbar, welche Anstrengungen nötig sind, bis der Organismus am geschädigten Gewebe eine Entlastung, Reparation und nutritive Versorgung durchführen kann.

Mit je zwei Tieren (Kaninchen) der Kontroll- und Verumgruppen (CONJUNCTISAN B) wurde nach der Abheilung eine Nachbelastung in Form einer Infektion durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Gewebsintaktheit nach der Abheilung bezüglich der Abwehrreaktion. Die Tiere der Kontrollgruppe reagierte sofort mit einer massiven Konjunktivitis. Bei der Verumgruppe, also den Tieren unter der Therapie mit CONJUNCTISAN B, kam es nur zu einer leichten Rötung der vorderen Augenbereiche. Nach vier Tagen wurde ein Normalzustand im Bindegewebe und Konjunktivalbereich festgestellt. Die Kontrolltiere mußten nach vier Tagen einer Antibiotikatherapie unterzogen werden.

#### Literatur

1. WANDERKA, H.: Sehprothese - Kontaktlinse. Therapiewoche, 28, 6348-6355 (1978)
2. WANDERKA, H.: Verhütung von Wachstums- und Entwicklungsstörungen bei Salamanderlarven und -jungtieren durch Wirkstoff- und Organ-Kombinationspräparate. Der praktische Tierarzt, 6, (1974)
3. WANDERKA, H.: Das Lern- und Anpassungsverhalten von Alttieren unter Applikation zytoplasmatischer Substanzen. Zschr. präklin. Geriatrie 10, (1975)

4. THEURER, K.: Med. Klinik, 17, 691-694 (1964)
5. REUTER, H.J.: Die zytoplasmatische Therapie in der Urologie. Erfahrungsheilkunde 4, 104 (1972)
6. PAUL, M.: Zytoplasmatische Therapie - Wert oder Unwert. Zschr. Allgemeinmed. 15, 749 (1972)
7. KRUG, E.: Gegensensibilisierung durch zytoplasmatische Therapie. Ärztl. Praxis 12, 519 (1974)

Strahlenschutzsubstanzen auf zytoplasmatischer Basis  
im Test mit letalen Strahlendosen

P. SCHICK

Institut für Radiobiologie  
München-Neubiberg

Im Labor für experimentelle Radiologie werden wehrmedizinische Fragestellungen bearbeitet. Insbesondere befassen wir uns, wie der Name des Labors schon sagt, mit der Diagnose, Prophylaxe und Therapie des Strahlenschadens.

Da wir nun in kritischen Situationen (Krieg, SuperGAU) mit einem Massenansturm von strahlengeschädigten Patienten zu rechnen haben, ist eine intensive, individuelle Therapie mittels Knochenmarktransfusionen oder auch Infusionen mit Leukozyten und Thrombozytenkonzentraten kaum oder nur schwer durchzuführen.

Es gibt gute prophylaktische Strahlenschutzsubstanzen, sogenannte "radioprotective agents", die jedoch bereits beim Eintreffen von ionisierenden Strahlen am Orte des Geschehens, d.h. in der Zelle anwesend sein müssen, um ihre Schutzeigenschaften zu entwickeln. Daneben wenden wir uns in verstärktem Maße einer therapeutischen Möglichkeit zu, die nach einer stattgehabten Bestrahlung angewandt werden kann.

Ein limitierender Faktor ist auf jeden Fall die Bestrahlungsdosis. Z.B. liegt die Dosis einer kurzzeitigen Ganzkörperbestrahlung über 800 - 1000 cGy (rd), so ist fast jede Therapie bis jetzt erfolglos. Es ist also nicht günstig, gleich mit den Extremfällen zu beginnen, wenn man nach neuen therapeutischen Mitteln sucht. Vielmehr sollte man in den  $LD_{50}$ -Bereich gehen, in dem bei den konstitutionell oder konditionell schwächeren Individuen eine Aussicht auf Erfolg bei ausreichender Substitution gegeben ist.

Wir haben in früheren Untersuchungen festgestellt, daß strahlenkranke Mäuse zum Höhepunkt der Strahlenkrankheit stark exsiccotisch sind. Eine Therapie mit täglichen Kochsalz-Injektionen s.c. und i.p. konnte die Letalität nicht senken. Es müssen also ein

anderer oder auch mehrere Mechanismen diesem Krankheitsgeschehen zugrunde liegen. Eine mögliche Ursache ist eine Verblutung aufgrund einer Thrombozytopenie. Als Versuchstier wurde die Ratte genommen. Die LD<sup>50</sup> bei 800 cGy (rd) Ganzkörperbestrahlung. Man kann deutlich sehen, daß am 10. Tag nach der Bestrahlung petechiale Blutungen deutlich auftreten. In diesen Zeitraum fällt auch die größte Anzahl der Todesfälle.

Nun zur Therapie: Immer noch besteht vielfach die Meinung, daß sich aufgrund einer Lymphozytopenie eine endogene Bakteriämie entwickelt. Dies haben wir nur bei kombiniert geschädigten Versuchstieren feststellen können, aber nie bei Strahlenschädigungen allein. Und wenn mal einige Keime (Größenbereich  $10^2 - 10^3/\text{mm}^3$ ) gefunden wurden, dann war es nur praefinal, also kurz vor dem Exitus. In einem Gespräch mit Herrn THEURER wurde die Hypothese aufgestellt, daß man den lädierten, sprich strahlengeschädigten Proliferationsorganen Bausteine zuführen muß, die von den Zellen aufgenommen werden und in die repairmechanismen einbezogen werden, so daß die Zelle in diesem Sinne Energie für eigene Syntheseleistungen sparen kann. Voraussetzung ist allerdings eine noch Mindestfunktion der Zelle für bestimmte Stoffwechselleistungen.

Im Tierexperiment starteten wir zunächst einen Vorversuch, wobei die Strahlendosis fast im 100% letalen Bereich liegt. Die Ergebnisse sind zwar nicht signifikant, zeigen aber einen Trend in Richtung längerer Überlebensrate und geringerer Letalitätsquote bzw. höherer Überlebensrate.

Die hier günstig erscheinenden Ergebnisse wurden durch die Präparate I und II, das sind: I = Dilution Nr. 70, Stärke II (maternal Anteil der Plazenta) und II = Dilution Nr. 71, Stärke II (foetaler Anteil der Plazenta) erzielt. Nr. III ist NEYTUMORIN (Dil. Nr. 66) und Nr. IV NEY NORMIN (Dil. Nr. 65).

Jeder Versuchsgruppe liegen acht Versuchstiere (Ratten) zugrunde. Wir begannen also mit einer Dosis von 900 rd. Diese Dosis schien für die Untersuchung des Wirkungsmechanismus der makromolekularen Substanzen zu hoch. Daher wurde ein weiterer Versuch mit 700 rd unternommen. In Abbildung 1 sehen wir jedoch, daß diese Bestrahlungsdosis hinsichtlich der Letalität zu gering ist. Gleichzeitig haben wir die Anzahl der Lymphozyten (Leukozyten) im peripheren

Blutbild verfolgt. Es konnte festgestellt werden, daß nach einer Bestrahlung mit 700 rd die behandelten Versuchsgruppen eine höhere Anzahl an Leukozyten aufwiesen, als die unbehandelten Kontrollgruppen. Nach einer Bestrahlung mit 900 rd ist dieser Effekt jedoch nicht mehr so deutlich zu erkennen. In einem weiteren Versuch wurde mit 800 rd bestrahlt. Diese Dosis führte zu einer Überlebensrate von genau 50%. Bei der mit VitOrgan-Präparat IV, in diesem Fall handelt es sich um ein lyophilisiertes Präparat einer löslichen Trockensubstanz von NEYTUMORIN, behandelten Gruppe, starb keines der Tiere. Dieser Behandlungserfolg ist mit  $p < 0,05$  signifikant. Ein Wiederholungsversuch konnte leider noch nicht durchgeführt werden, da der Reaktor einer Wartungspause unterzogen werden mußte.

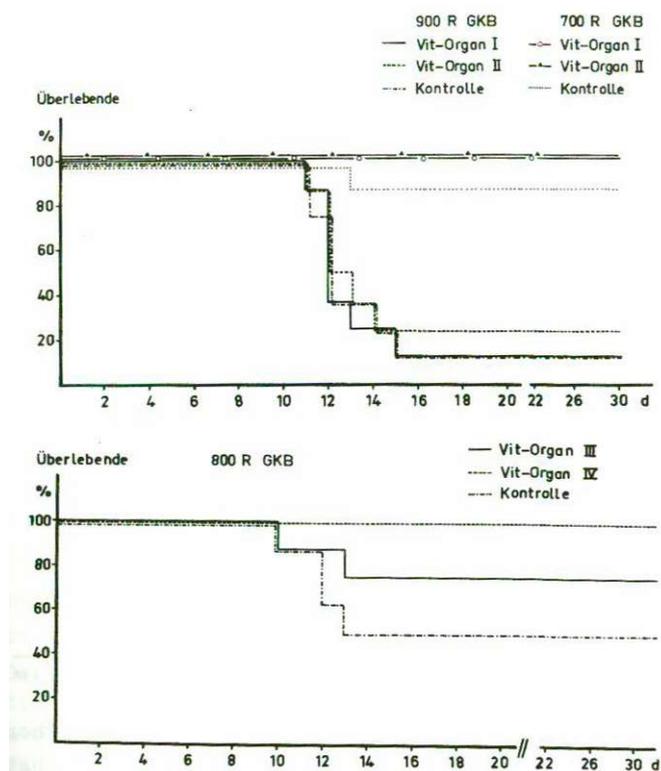
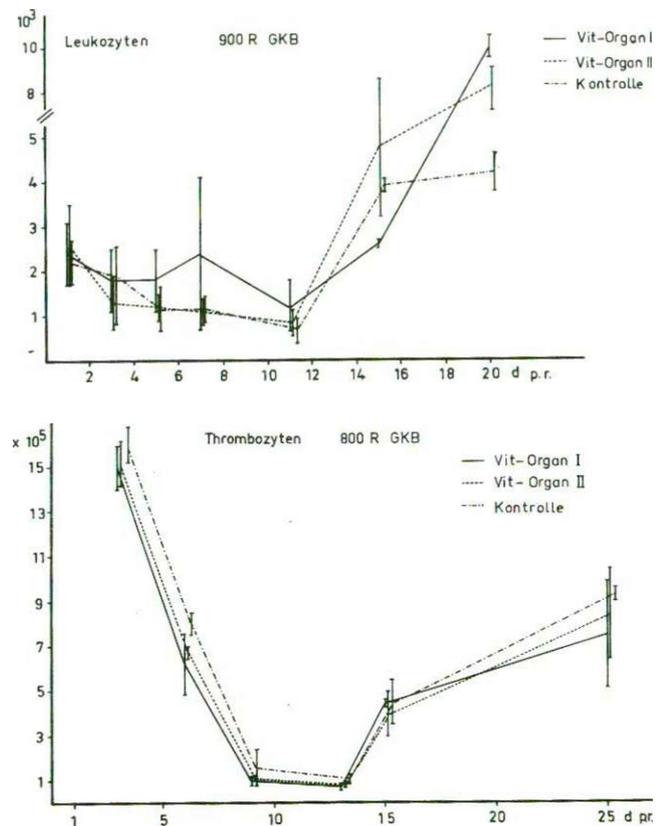


Abb. 1: Letalität von Ratten, die nach einer Bestrahlung mit 900 bzw. 800 rd mit verschiedenen REVITORGAN-Präparaten behandelt wurden.

## Diskussion

Die Vermutung, daß die Todesursache nach einer letalen Bestrahlung in einer Verblutung zu suchen ist, ist noch nicht bewiesen. Zumindest wirken die Dilutionen 70 und 71 nicht in dieser Richtung, wie Abb.2 zeigt. Es könnte aber durchaus ein besseres Ergebnis bei Anwendung der löslichen Trockensubstanz gefunden werden.



Wir stehen mit den Bemühungen um eine feldbrauchbare Therapie des Strahlenschadens erst am Anfang. Es sind viele neue Substanzklassen und Mittel auf dem Markt, die durchaus in unserer Richtung geprüft werden sollten. Nach den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen ist die makromolekulare Organtherapie als erfolgversprechend anzu-

sehen in der Unterstützung der Erholungs- und Repairmechanismen nach einer Strahlenschädigung. Jedoch sind jetzt gezieltere Untersuchungen notwendig (MCV, Differentialblutbild, Aminosäuren).

#### Diskussion zum Vortrag

Herr-MUNDER: In welcher Dosierung wurde in Ihren Experimenten das NEYTUMORIN verabfolgt?

Herr SCHICK: 0,3 ml der vorgegebenen Dosis pro Tier intramuskulär, das entspricht 2,25 mg Organlysat. Aus wehrmedizinischer Sicht wird gefordert, daß man alles möglichst per os geben sollte. Ob jedoch nach einer derartigen Strahlenbelastung, bei der diese Blutungen im Magen auftreten, oral überhaupt noch etwas aufgenommen wird, das wage ich zu bezweifeln. Auf der anderen Seite wird sicher auch eine Schockbehandlung durchzuführen sein, so daß man ohne weiteres in diesem Zusammenhang spritzen kann.

Herr KAHL: Wenn ich mir das so recht betrachte, bin ich für politische Prophylaxe.

Herr SCHICK: Selbstverständlich! Ich auch!

Herr THEURER: Nachdem BUSCHMANN die Applikation i.v. durchgeführt hat, wäre es interessant zu erfahren, wie wirksam die Präparate auch in Ihrem System bei einer i.v.-Anwendung wären. Das ist natürlich bei den Kleintieren schwieriger. Über die Schwanzvene wäre es trotzdem vielleicht möglich oder aber auch intraperitoneal. Bei dieser Applikation käme es zudem auch zu einer rascheren Verteilung.

Herr SCHICK: Das ist durchaus möglich!

Herr THEURER: Dann müßten auch höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Bei den Strahlengeschädigten spielt die immunologische Reaktion ja gar keine Rolle! Nach der Bestrahlung können Sie jede Menge spritzen. Und das vor allem mit diesen voll löslichen Organpräparaten wie dem NEYTUMORIN-SOL.

Herr SCHICK: Ist das NEYTUMORIN-SOL konzentrierter als die anderen Lösungen?

Herr THEURER: Im Gegensatz zu den korpuskulären Trockenpulvern ist das NEYTUMORIN-SOL ein voll lösliches Organlysat. Sie können nach

Auflösung mit physiologischer Kochsalzlösung nahezu jede Konzentration einstellen.

Auditorium: Bisher wurde immer nur über die Ganzkörperbestrahlung diskutiert. Wie sieht es nun bei einer lokalen Bestrahlung, bei der nicht das ganze Knochenmark, nicht die Leber, nicht die Milz und nicht das ZNS betroffen ist. Ist es denkbar, daß NEYTUMORIN auch bei der lokalen Bestrahlung mit ulzerösem Hautdefekt oder Schleimhautdefekt auch positive Wirkungen zeigt?

Herr THEURER: Bei lokalen Strahlenschäden der Haut hat sich die Salbenanwendung bewährt. In diese Organsalben können Sie noch zusätzlich Dilutionen einbringen.

Herr MUNDER: Herr SCHICK, Ich finde das natürlich schon aufregend, daß Sie bei 800 rd 100% überleben bekommen, und das bei einer Behandlung nach der Bestrahlung. Sehen Sie einen weiteren Effekt, wenn Sie das Knochenmark aus Mäusen oder Ratten, die Sie mit 800 rd bestrahlt haben, noch zusätzlich in vitro mit NEYTUMORIN inkubieren? Sehen Sie da eine beschleunigte Erholung des Stammzellkompartiments in vitro?

Herr SCHICK: Wir haben nur in vivo Untersuchungen durchgeführt. Es wäre sicher einmal interessant, Knochenmark zu bestrahlen und dann zytoplasmatische Substanzen hinzuzufügen und nachzuschauen, ob die Zellteilungsfähigkeit beeinflusst werden kann und wie schnell die erste Mitoserate wieder aufgenommen wird.

Herr MUNDER: Ich meinte eigentlich die Entnahmen des Knochenmarks aus bestrahlten Tieren, ob dieses sich in Gegenwart der Substanzen wieder erholt und proliferiert.

Herr SCHICK: Eine sehr gute Anregung für die zukünftige Arbeit! Danke für den Hinweis!

Herr THEURER: Die große Schwierigkeit besteht beim Knochenmark wohl darin, daß es durch eine ödematöse Schwellung eingeengt wird und damit in vivo zusätzlich belastet wird. Vergleiche sind deshalb in dem Maße vielleicht gar nicht so möglich, denn der Knochenmarkraum ist durch die knöcherne Fixierung vorgegeben und eine Schwellung erschwert die Beurteilung der Zellteilungsfähigkeit.

Herr SCHICK: Das ist kein technisches Problem, weil wir ohne weiteres das Knochenmark nach der Bestrahlung ausspülen können. Wir

brauchen nur die zellulären Elemente, die ohne weiteres herausgespült, nachgezählt, ausgesät und inkubiert werden können.

Herr THEURER: Ich meine, daß in vivo zusätzlich durch die Bestrahlung eine Sekundärschädigung hinzukommt, indem sich durch den Entzündungsvorgang und eine Exsudation der Druck im Knochenmark erhöht.

Herr SCHICK: Das ist natürlich möglich. Das Entscheidende in der Biologie ist eben nicht, geradlinig kausal zu denken, sondern in vernetzten Systemen. In der Biologie bestehen Wechselwirkungen in verschiedene Richtungen. Die Naturwissenschaft versucht jedoch immer, vereinfachende Experimente durchzuführen, wobei es zwangsläufig zu einer gewissen Simplifizierung kommen muß, die es in der Natur nicht gibt. Die experimentell gefunden Erkenntnisse müssen wir dann wieder zusammensetzen, um überhaupt erkennen zu können, was biologisch abläuft. Jeder in vivo-Versuch sagt deshalb mehr aus, als die isolierte Betrachtung eines künstlichen Systems.

Untersuchungen an Schweinen über die Beeinflussung eines Strahlenschadens auf das Immunsystem durch Behandlung mit Revitorgan-Präparaten aus foetalem Thymus und Plazenta

H. BUSCHMANN

Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und  
Seuchenmedizin der Universität München

Untersucht wurde der Einfluß einer Behandlung mit den Revitorgan-Präparaten Nr. 29 f+k und Nr. 71 auf den strahleninduzierten Schaden am Immunsystem des Schweines. Für die Untersuchungen standen 4 weibliche Schweine zur Verfügung, die einer Ganzkörperbestrahlung mit Gammastrahlen unterworfen wurden.

Material und Methodik:

Versuchstiere: Vier weibliche Schweine, Alter ca. 12 Wochen.  
Behandlung und Bestrahlung der Tiere: Am 22. 4. und am 26. 4. erfolgten Blutentnahmen mit anschließender Feststellung des Immunstatus bei den Tieren, um die Werte vor der Bestrahlung möglichst zuverlässig zu bestimmen. Am 27. 4. erfolgte die Ganzkörperbestrahlung mit 300 rd am Reaktor Neuherberg (Gammastrahlung, Bestrahlungzeit: 3 min. 40 sec.) . Vorher waren die Tiere mit Ketanest (Parke-Davis, 5 ml i.m.) sediert worden. Vor und nach der Bestrahlung wurde mit den Revitorgan-Präparaten wie folgt behandelt:

Behandlung ca. 2 Stunden vor der Bestrahlung:

Schwein 3445 erhält Stärke II ( $10^{-9}$ ) 4 ml Nr. 29 f+k und 2 ml Nr. 71 intravenös  
Schwein 3365 erhält Stärke II ( $10^{-9}$ ) 4 ml Nr. 71 und 2 ml Nr. 29 f+k intravenös  
Schwein 3416 erhält Stärke III ( $10^{-6}$ ) 4 ml Nr. 29 f+k und 2 ml Nr. 71 intravenös  
Schwein 3374 dient als Kontrolle und wird nicht mit Revitorgan-Präparaten behandelt.

Ungefähr zwei Stunden nach der Bestrahlung wurden die Tiere erneut behandelt:

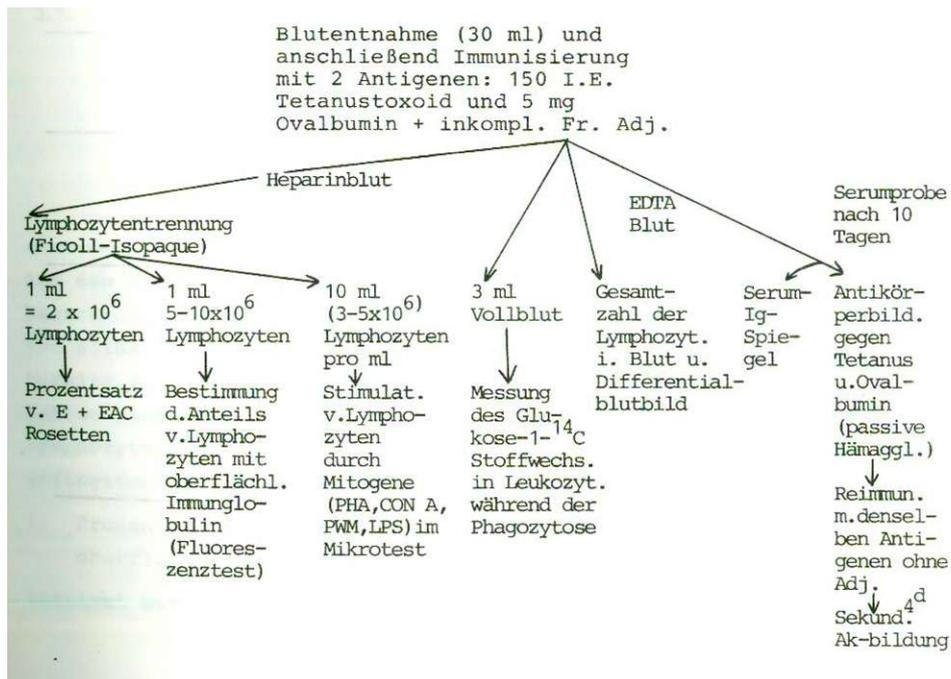
Nr. 3445 erhält Stärke II 2 ml Nr. 29 f+k und 4 ml Nr. 71 i.v.  
Nr. 3365 erhält Stärke II 4 ml Nr. 29 f+k und 2 ml Nr. 71 i.v.  
Nr. 3416 erhält Stärke III 2 ml Nr. 29 f+k und 4 ml Nr. 71 i.v.

Gleichzeitig wurden die Tiere zur Überprüfung des Antikörperbildungsvermögens mit 5 mg Ovalbumin in 2,5 ml physiol. Kochsalzlösung + 2,5 ml inkompl. Freund Adjuvans i.m. und 1 Ampulle Tetanus Vakzine Behringwerke (= 150 I.E. Tetanus-Adsorbat-Impfstoff) i.m. immunisiert. 24 Stunden nach der Bestrahlung, d.h. am 28. 4., wurde der Immunstatus anhand von Blutproben bei den Tieren erneut ermittelt und es erfolgte im Anschluß daran eine weitere Behandlung mit Revitorgan-Präparaten:

Nr. 3445 und 3365 erhielten Stärke II, gemischt 3 Airpullen Nr. 29 f+k und 3 Ampullen Nr. 71 intravenös;

Nr. 3416 erhielt Stärke III, gemischt 3 Ampullen Nr. 29 f+k und 3 Ampullen Nr. 71 intravenös.

Weitere Blutentnahmen mit Bestimmung des Immunstatus erfolgten am 29. 4. (48 Stunden nach der Bestrahlung), am 3. 5. (6 Tage nach der Bestrahlung), am 7. 5. (Bestimmung des Antikörpertiters gegen Ovalbumin und Tetanustoxoid) mit gleichzeitiger Reimmunisierung mit 5 mg Ovalbumin (ohne Adjuvans) und 1 Ampulle Tetanus Vakzine (Behringwerke). Die letzte Blutentnahme erfolgte am 11. 5. (Bestimmung des sekundären Antikörpertiters gegen Ovalbumin und Tetanustoxoid).



Über die Bestimmung des Immunstatus gibt das beiliegende Schema Aufschlüsse. Mit Hilfe dieses Untersuchungsschemas wurden bestimmt: die Gesamtzahl der Leukozyten und das Differentialblutbild, der Prozentsatz von B- und T-Lymphozyten im Blut (Rosettenbildung, Fluoreszenstests), die Phagozytosefähigkeit von Blutleukozyten, die Reaktivität des zellulären Immunsystems (Stimulation von Lymphozyten durch verschiedene Mitogene), das primäre und sekundäre Antikörperbildungsvermögen.

Ergebnisse:

1. Leukozytenzahlen und Differentialblutbild

Das Ergebnis ist in den Tab. 1 und 2 niedergelegt.

Tab. 1: Leukozytenzahlen vor und nach der Bestrahlung pro ml Blut

Datum	Schwein	3445	3365	3416	3374
22.4.	(vor Bestr.)	$1,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
26.4.	(vor Bestr.)	$1,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
28.4.	(24 <sup>h</sup> nach B.)	$9,8 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$7,9 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
29.4.	(48 <sup>h</sup> nach B.)	$8,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$
3.5.	(6 <sup>d</sup> nach B.)	$2,0 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$

Tab. 2: Differentialblutbild vor und nach der Bestrahlung

Datum	Schwein	3445	3365	3416	3374	
22.4.	(vor B.)	Lymphozyten:	45 %	60 %	60 %	60 %
		Neutrophile:	50 %	38,5 %	32 %	36 %
		Eosinophile:	2,5 %	-	4 %	2 %
		Monozyten :	2,5 %	1,5 %	4 %	2 %
26.4.	(vor B.)	Lymphozyten:	60 %	52 %	56 %	54 %
		Neutrophile:	34 %	41 %	39 %	40 %
		davon Stabk:	28 %	8 %	7 %	6 %
		" Segmentk:	6 %	33 %	32 %	34 %
		Eosinophile:	3 %	3 %	2 %	3 %
		Monozyten :	3 %	4 %	3 %	3 %

## noch Tab. 2

Datum	Schwein		3445	3365	3416	3374
28.4.	(24 <sup>h</sup> nach B.)	Lymphozyten:	26 %	26 %	39 %	30 %
		Neutrophile:	66 %	65 %	53 %	59 %
		dav. Stabk:	9 %	13 %	6 %	5 %
		" Segmk :	57 %	52 %	47 %	54 %
		Eosinophile:	3 %	4 %	4 %	6 %
		Monozyten :	5 %	5 %	5 %	3 %
		Basophile :	-	1 %	-	2 %
<hr/>						
29.4.	(48 <sup>h</sup> nach B.)	Lymphozyten:	19 %	16 %	22 %	25 %
		Neutrophile:	75 %	78 %	72 %	68 %
		dav. Stabk:	6 %	9 %	2 %	8 %
		" Segmk :	69 %	69 %	70 %	60 %
		Eosinophile:	2 %	2 %	1 %	3 %
		Monozyten :	4 %	4 %	5 %	4 %
		Basophile :	-	-	-	-
<hr/>						
3.5.	(6 <sup>d</sup> nach B.)	Lymphozyten:	39 %	31 %	31 %	29 %
		Neutrophile:	58 %	64 %	66 %	66 %
		dav. Stabk:	3 %	3 %	8 %	4 %
		" Segmk :	55 %	69 %	58 %	62 %
		Eosinophile:	-	1 %	1 %	2 %
		Monozyten :	3 %	4 %	2 %	3 %
		Basophile :	-	-	-	-

Aus den Tab. 1 und 2 geht hervor, daß es bei den Schweinen nach der Bestrahlung zu einem Absinken der Leukozytenzahlen im Blut kommt. Vor allem auffällig ist der starke Lymphozytensturz, nachweisbar bereits 24h nach der Bestrahlung. Am 6. Tag nach der Bestrahlung hatten sich die Lymphozytenzahlen noch nicht erholt. Den stärksten Lymphozytensturz beobachtete man bei den Tieren 3445 und 3365, am geringsten war er beim Tier 3416 ausgeprägt.

2. Prozentsatz rosettenbildender Lymphozyten und Lymphozyten mit oberflächlichem Immunglobulin im Blut

**Bestimmt** wurde der Prozentsatz von Lymphozyten, die in der Lage

waren, mit Schafblut Spontanrosetten zu bilden (E-Rosetten) sowie der Prozentsatz von Lymphozyten, die Rosetten mit Schafblut, das mit einem nicht agglutinierenden IgM anti-Schafblutserum vom Kaninchen vorbehandelt worden waren, bildeten (EAC-Rosetten). Der Nachweis von oberflächlichem Immunglobulin an den Lymphozyten erfolgte mittels eines Ziegen-anti-Schwein IgG Serums und eines FITC-Kaninchen-anti-Ziegen-Ig Serums. Die Inkubation der Zellen mit den Seren erfolgte bei 4°. Ausgewertet wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mindestens 200 Zellen pro Ansatz. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

**Tab. 3:** Prozentsatz rosettenbildender Lymphozyten und Lymphozyten mit oberflächlichem Immunglobulin im Blut von Schweinen vor und nach einer Bestrahlung

Datum	Schwein	3445			3365			3416			3374		
		E	EAC	Ig	E	EAC	Ig	E	EAC	Ig	E	EAC	Ig
22.4.	(vor Bestr.)	30	14	-	33	13	-	33	15	-	32	12	-
26.4.	(vor Bestr.)	30	15,6	5,8	29,5	14,5	13	28	14	7,3	31	13	7,4
28.4.	(24 <sup>h</sup> nach B.)	12	13,5	1,1	25	11,1	0	13	12	0,8	15	11,7	0
29.4.	(48 <sup>h</sup> nach B.)	14	11,5	0,9	19	13,7	0,8	16	12	0,4	16	10,2	0,8
3.5.	(6 <sup>d</sup> nach B.)	-	-	0,8	15	25	0,3	-	-	5,9	16	21	2,0

Aus Tab. 3 geht hervor, daß es nach der Bestrahlung zu einem starken Absinken der E-rosettenbildenden Zellen und der Zellen mit oberflächlichem Immunglobulin kommt. Die Erholung ist am 6. Tag nach der Bestrahlung noch nicht vollständig. Den höchsten Prozentsatz Ig-positiver Lymphozyten zeigt am 6. Tag nach der Bestrahlung Tier Nr. 3416; offensichtlich tritt bei diesem Tier die Erholung am schnellsten ein.

Die z.T. erhöhten Werte EAC-rosettenbildender Zellen nach der Bestrahlung erklären sich unserer Meinung nach durch das Auftreten von "Scheinrosetten" aufgrund der Strahlenwirkung an den Zellen; wahrscheinlich werden durch den Strahlenschaden an den hochempfindlichen Lymphozyten vorher verdeckte Rezeptoren freigelegt.

### 3. Stoffwechsel der Granulozyten während der Phagozytose

Gemessen wurde die Stimulation des D-1-<sup>14</sup>C Glukosestoffwechsels der Granulozyten während der Phagozytose von abgetöteten Bakterien (Staphylococcus epidermidis) und inerten Partikeln (Difco Latex).

Gemessen wurden die Counts per Minute in einem Flüssigkeitsszintillator bzw. es wurde das mittlere Verhältnis der  $^{14}\text{C}$  Freisetzung in Gegenwart und in Abwesenheit der zu phagozytierenden Partikel bestimmt (P/R). Die Ergebnisse finden sich in den Tab. 4 und 5.

Tab. 4: Stimulation des D-1- $^{14}\text{C}$  Glukosestoffwechsels während der Phagozytose von abgetöteten Staph. epidermidis. Angegeben sind counts per minute (cpm) bzw. das P/R Verhältnis (Durchschnitt von jeweils 10 Messungen).

Datum	Schwein	3445		3365		3416		3374	
		cpm	P/R	cpm	P/R	cpm	P/R	cpm	P/R
22.4.	(vor Bestr.)	990,6 ± 291,7	14,09	1686,4 ± 204,9	10,2	680,2 ± 177,7	8,4	921 ± 209	14,6
26.4.	(vor Bestr.)	1176 ± 582	12,4	970,5 ± 259	14,4	712 ± 186	11,4	769 ± 192	14,4
28.4.	(24 <sup>h</sup> n. B. )	503 ± 82	8,0	823,6 ± 310	10,4	651 ± 187	13,1	610 ± 329	13,1
29.4.	(48 <sup>h</sup> n. B. )	629 ± 149	11,6	946,7 ± 222	15,6	654 ± 194	11,0	474 ± 170	7,9
3.5.	(6 <sup>d</sup> n. B. )	244 ± 91	4,7	620 ± 179	4,6	354,5 ± 105	3,9	604 ± 356	6,6

Tab. 5: Stimulation des D-1- $^{14}\text{C}$  Glukosestoffwechsels während der Phagozytose von Latex Partikeln. Angegeben sind counts per minute (cpm) bzw. das P/R Verhältnis (Durchschnitt von jeweils 10 Messungen).

Datum	Schwein	3445		3365		3416		3374	
		cpm	P/R	cpm	P/R	cpm	P/R	cpm	P/R
22.4.	(vor Bestr.)	175,5 ± 71	2,5	956 ± 173	5,8	282 ± 130	1,6	256 ± 88	4,1
26.4.	(vor Bestr.)	214 ± 65	2,2	792 ± 305	11,8	335,5 ± 123	5,4	321 ± 54	6,0
28.4.	(24 <sup>h</sup> n. B. )	117 ± 32,5	1,9	468 ± 95	5,9	228 ± 59	4,6	227 ± 167	4,9
29.4.	(48 <sup>h</sup> n. B. )	113 ± 41	2,1	522 ± 155	8,6	341 ± 123	5,8	362 ± 215	6,0
3.5.	(6 <sup>d</sup> n. B. )	109 ± 23	2,1	378 ± 161	2,8	212 ± 90,5	2,3	524,5 ± 387	5,7

Aus den Tab. 4 und 5 geht hervor, daß der Glukosestoffwechsel der Leukozyten durch die Bestrahlung nicht signifikant beeinflußt wurde. Das Phagozytosevermögen der Granulozyten blieb auch nach einer Bestrahlung erhalten.

#### 4. Stimulation der Lymphozyten durch verschiedene Mitogene

Untersucht wurde der Einfluß einer Bestrahlung auf die Stimulationsfähigkeit von Schweinelymphozyten durch die Mitogene Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A), Pokeweed Mitogen (PWM) und durch ein bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), gewonnen aus *Salm. typhosa* nach der Westphal-Methode. Die Messung der Stimulation geschah aufgrund des Einbaus von <sup>14</sup>C-Thymidin in den Kern der Lymphozyten. Angegeben werden in den Tab. sowohl counts per minute als auch der Stimulationsindex (S.I.) und die Aufnahme der radioaktiven Base in Mol.

Datum	Schwein	3445		3365		3416		3374	
		cpm	S.I.	cpm	S.I.	cpm	S.I.	cpm	S.I.
			Aufnahme		Aufnahme		Aufnahme		Aufnahme
			in Mol		in Mol		in Mol		in Mol
22.4.	(vor Bestr.)	32569 ± 4284	111 3,551 ± 0,467 x 10 <sup>-12</sup>	-	-	33149 ± 2272	121 3,581 ± 0,324 x 10 <sup>-12</sup>	24649 ± 1539	34 2,690 ± 0,186 x 10 <sup>-12</sup>
26.4.	(vor Bestr.)	35268 ± 2774	209 3,603 ± 0,358 x 10 <sup>-12</sup>	35867 ± 1408	233 3,901 ± 0,241 x 10 <sup>-12</sup>	12161 ± 2922	123 1,361 ± 0,403 x 10 <sup>-12</sup>	36232 ± 1350	272 3,936 ± 0,164 x 10 <sup>-12</sup>
28.4.	(24 <sup>h</sup> n. B.)	98 ± 57	1,4 11,199 ± 6,477 x 10 <sup>-15</sup>	26 ± 11	1,3 4,682 ± 1,797 x 10 <sup>-15</sup>	24 ± 6	1,2 3,059 ± 0,629 x 10 <sup>-15</sup>	30 ± 12	1,3 3,496 ± 1,33 x 10 <sup>-15</sup>
29.4.	(48 <sup>h</sup> n. B.)	670 ± 171	22 7,541 ± 1,714 x 10 <sup>-14</sup>	19 ± 3	0,8 2,563 ± 0,386 x 10 <sup>-15</sup>	24 ± 12	1,3 2,672 ± 0,939 x 10 <sup>-15</sup>	475 ± 97	11 5,303 ± 1,170 x 10 <sup>-14</sup>
3.5.	(6 <sup>d</sup> n. B.)	23864 ± 2610	127 2,583 ± 0,279 x 10 <sup>-12</sup>	9428 ± 900	126 1,106 ± 0,246 x 10 <sup>-13</sup>	8840 ± 1898	164 9,582 ± 2,057 x 10 <sup>-13</sup>	18764 ± 1539	293 2,03 ± 0,16 x 10 <sup>-12</sup>

Tab. 7: Stimulationsfähigkeit von Schweinelymphozyten in Gegenwart von Con A  
(Konzentration: 100 µg/ml). Angegeben ist der Durchschnitt von 10  
Messungen.

Datum	Schwein	3445 cpm	S.I.	Aufnahme in Mol	3365 cpm	S.I.	Aufnahme in Mol	3416 cpm	S.I.	Aufnahme in Mol	3374 cpm	S.I.	Aufnahme in Mol
22.4.	(vor Bestr.)	31932 ± 1344	109	3,582 ± 0,166 x 10 <sup>-12</sup>	23980 ± 1373	183	2,605 ± 0,163 x 10 <sup>-12</sup>	32073 ± 626	117	3,531 ± 0,138 x 10 <sup>-12</sup>	23655 ± 464	32	2,575 ± 0,215 x 10 <sup>-12</sup>
26.4.	(vor Bestr.)	34101 ± 1832	202	3,697 ± 0,229 x 10 <sup>-12</sup>	31564 ± 1639	205	3,431 ± 0,233 x 10 <sup>-12</sup>	20747 ± 8877	210	2,206 ± 1,079 x 10 <sup>-12</sup>	32420 ± 830	244	3,522 ± 0,136 x 10 <sup>-12</sup>
28.4.	(24 <sup>h</sup> n. B.)	2295 ± 1367	32	2,497 ± 1,480 x 10 <sup>-13</sup>	25 ± 13	1,3	3,055 ± 1,638 x 10 <sup>-15</sup>	23 ± 4	1,2	3,618 ± 1,310 x 10 <sup>-15</sup>	31 ± 17	1,4	4,553 ± 1,901 x 10 <sup>-15</sup>
29.4.	(48 <sup>h</sup> n. B.)	2429 ± 194	78	2,659 ± 0,196 x 10 <sup>-13</sup>	20 ± 5	0,8	3,255 ± 1,946 x 10 <sup>-15</sup>	16 ± 5	0,9	2,269 ± 0,731 x 10 <sup>-15</sup>	1819 ± 192	43	2,017 ± 0,223 x 10 <sup>-13</sup>
3.5.	(6 <sup>d</sup> n. B.)	16410 ± 1579	87	1,785 ± 0,169 x 10 <sup>-12</sup>	9461 ± 360	126	1,033 ± 0,059 x 10 <sup>-12</sup>	5279 ± 841	98	5,751 ± 0,935 x 10 <sup>-13</sup>	9080 ± 1753	142	0,988 ± 0,191 x 10 <sup>-12</sup>

Tab. 8: Stimulationsfähigkeit von Schweinelymphozyten in Gegenwart von Pokeweed Mitogen (Konzentration: 100 µg/ml). Angegeben sind Durchschnittswerte von 10 Messungen.

Datum	Schwein	cpm	S.I.	Aufnahme in Mol									
			3445		3365		3416		3374				
22.4.	(vor Bestr.)	30330 ± 2964	103	3,264 ± 0,384 x 10 <sup>-12</sup>	19391 ± 1575	148	2,085 ± 0,258 x 10 <sup>-12</sup>	27495 ± 517	100	2,987 ± 0,137 x 10 <sup>-12</sup>	6196 ± 345	8,5	6,845 ± 0,596 x 10 <sup>-13</sup>
26.4.	(vor Bestr.)	36396 ± 2364	215	3,914 ± 0,308 x 10 <sup>-12</sup>	32194 ± 2382	209	3,467 ± 0,312 x 10 <sup>-12</sup>	31028 ± 1740	313	3,031 ± 1,064 x 10 <sup>-12</sup>	25652 ± 1675	193	2,758 ± 0,217 x 10 <sup>-12</sup>
28.4.	(24 <sup>h</sup> n. B. )	7305 ± 232	103	7,918 ± 1,331 x 10 <sup>-13</sup>	30 ± 26	1,5	1,794 ± 1,181 x 10 <sup>-15</sup>	55 ± 10	2,7	7,743 ± 5,606 x 10 <sup>-15</sup>	605 ± 125	27	6,911 ± 1,758 x 10 <sup>-14</sup>
29.4.	(48 <sup>h</sup> n. B. )	5145 ± 279	166	5,577 ± 0,306 x 10 <sup>-13</sup>	29 ± 2	1,2	4,705 ± 1,268 x 10 <sup>-15</sup>	74 ± 13	4,1	9,272 ± 0,817 x 10 <sup>-15</sup>	3727 ± 447	89	4,086 ± 0,483 x 10 <sup>-13</sup>
3.5.	(6 <sup>d</sup> n. B. )	19284 ± 912	103	2,09 ± 0,098 x 10 <sup>-12</sup>	10474 ± 156	140	1,148 ± 0,031 x 10 <sup>-12</sup>	5331 ± 629	99	5,803 ± 0,669 x 10 <sup>-13</sup>	2397 ± 163	37	2,615 ± 0,177 x 10 <sup>-13</sup>

Tab. 9: Stimulationsfähigkeit von Schweineleukozyten in Gegenwart von bakteriellem Lipopolysaccharid (S. typhosa) (Konzentration: 2 mg/ml). Angegeben sind Durchschnittswerte von 10 Messungen.

Datum	Schwein	3445 cpm	3445 S.I.	Aufnahme in Mol	cpm	3365 S.I.	Aufnahme in Mol	cpm	3416 S.I.	Aufnahme in Mol	cpm	3374 S.I.	Aufnahme in Mol
22.4.	(vor Bestr.)	3883 ± 1564	13,2	5,779 ± 3,940 x 10 <sup>-13</sup>	299 ± 17	2,3	3,689 ± 0,794 x 10 <sup>-14</sup>	2595 ± 453	9,5	2,877 ± 0,651 x 10 <sup>-13</sup>	14103 ± 7324	19	1,381 ± 0,848 x 10 <sup>-12</sup>
26.4.	(vor Bestr.)	1940 ± 302	11,5	2,088 ± 0,789 x 10 <sup>-13</sup>	1011 ± 232	6,6	10,52 ± 2,841 x 10 <sup>-14</sup>	598 ± 83	6	6,52 ± 1,27 x 10 <sup>-14</sup>	744 ± 27	5,6	8,285 ± 0,553 x 10 <sup>-14</sup>
28.4.	(24 <sup>h</sup> n. B.)	53 ± 5	<1	5,889 ± 1,405 x 10 <sup>-15</sup>	26 ± 22	1,3	2,909 ± 1,892 x 10 <sup>-15</sup>	21 ± 5	1	2,726 ± 0,832 x 10 <sup>-15</sup>	32 ± 11	1,4	4,249 ± 1,626 x 10 <sup>-15</sup>
29.4.	(48 <sup>h</sup> n. B.)	37 ± 6	1,2	4,696 ± 1,092 x 10 <sup>-15</sup>	16 ± 2	0,7	2,121 ± 0,380 x 10 <sup>-15</sup>	15 ± 4	0,8	2,138 ± 0,367 x 10 <sup>-15</sup>	32 ± 7	<1	4,166 ± 0,794 x 10 <sup>-15</sup>
3.5.	(6 <sup>d</sup> n. B.)	3032 ± 1928	16	3,307 ± 2,082 x 10 <sup>-13</sup>	194 ± 19	2,6	2,182 ± 0,346 x 10 <sup>-14</sup>	82 ± 15	1,5	9,294 ± 1,507 x 10 <sup>-15</sup>	147 ± 22	2,3	1,612 ± 0,228 x 10 <sup>-14</sup>

Wie aus den Tab. 6 - 9 hervorgeht, kommt es unter dem Einfluß einer Bestrahlung zu einer starken Reduktion der Lymphozytenstimulation, besonders deutlich bei PHA und LPS, ebenfalls signifikant auch bei PWM und Con A. Nach 6 Tagen ist im allgemeinen wieder eine Erholung eingetreten. Das Tier 3445 verhält sich besonders resistent gegenüber einem Strahlenschaden bezüglich der Stimulierbarkeit seiner Lymphozyten durch Con A und PWM. Im Verhalten der Lymphozyten der übrigen Tiere ergeben sich keine auffälligen Unterschiede.

#### 5. Antikörperbildungsvermögen gegenüber Tetanus und Ovalbumin

Zur Überprüfung des Antikörperbildungsvermögens erhielten alle Schweine 5 mg Ovalbumin + inkompl. Freund Adjuvans und 150 E. Tetanus-Adsorbat-Impfstoff ca. 2 Stunden nach der Bestrahlung am 27.4.. Am 7.5. wurde die primäre Antikörperbildung im Serum gemessen, gleichzeitig wurden die Tiere mit 5 mg Ovalbumin (ohne Adjuvans) und 150 E. Tetanus-Adsorbat-Impfstoff revacciniert. Am 11.5. erfolgte erneut eine Blutentnahme zur Messung des sekundären Antikörperbildungsvermögens.

Der Antikörpernachweis erfolgte mittels passiver Hämagglutination und mittels ELISA-Test.

Bei sämtlichen Tieren waren in der passiven Hämagglutination keine Seruntiter - weder nach der Erststimulierung noch nach der Zweitstimulierung - gegenüber Tetanus feststellbar. Bei zwei nichtbestrahlten Kontrolltieren war der Seruntiter nach der Erststimulierung jeweils 1:8, nach der Zweitstimulierung bei einem Tier 1:128 und beim anderen Tier 1:512.

Im ELISA-Test war bei sämtlichen Tieren keine Primärreaktion gegen Tetanusantigen feststellbar. Nach der Reimmunisierung stieg der Antikörpertiter beim Tier 3445 um eine Titerstufe, beim Tier 3365 ebenfalls um eine Titerstufe, beim Tier 3416 ebenfalls um eine Titerstufe und beim Tier 3374 um drei Titerstufen.

Gegenüber Ovalbumin waren im Hämagglutinationstest bei allen Tieren keine Primärreaktionen feststellbar. Zu einer schwachen Sekundärreaktion kam es bei den Tieren 3416 und 3374 (Titer jeweils 1:4). Beim Tier 3365 war ein Sekundärtiter von 1:8 zu beobachten. Bei nichtbestrahlten Vergleichstieren (n = 3) waren primäre Ovalbumintiter von 1:1024 bis 1:4096 und sekundäre Ovalbumintiter von 1:2048 bis 1:4096 feststellbar.

Im ELISA-Test waren bei allen Tieren ebenfalls keine deutlichen Primärreaktionen zu beobachten. Es konnten jedoch schwache Sekundärreaktionen nachgewiesen werden: Beim Schwein 3445 bis zu einem Titer von 1:64, beim Schwein 3365 bis zu einem Titer von 1:128, beim Tier 3416 bis zu einem Titer von 1:128 und beim Tier 3374 bis zu einem Titer von 1:128.

Insgesamt geht aus diesen Versuchen hervor, daß sowohl das primäre als auch das sekundäre Antikörperbildungsvermögen bei allen bestrahlten Schweinen stark vermindert war. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren ergaben sich nicht.

#### 6. Klinische und pathologisch-anatomische Beobachtungen

Am 7.5., d.h. 10 Tage nach der Bestrahlung, wurde bei den Schweinen 3445, 3374 und 3365 ein starkes Hauterythem festgestellt. Die Tiere kränkelten, fraßen nicht und waren sehr matt. Das Tier 3416 war klinisch gesund, hatte keine Hautveränderungen und hatte normalen Appetit. Das Tier 3445 verendete am 10.5., das Tier 3374 am 11.5. und das Tier 3365 am 15.5.. Eine vorherige Antibiotikabehandlung blieb wirkungslos. Das Tier 3416 überlebte symptomlos und konnte zur Mast abgegeben werden.

Bei der Sektion des Tieres 3445 fanden sich folgende Veränderungen: Kollaterale Anämie, Hydrämie, Hämothorax, Blutungen im präkardialen Mediastinum, multiple, flächenhafte subseröse Blutungen; katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie der Lungenspitzenlappen; multiple, punktförmige Darmwandblutungen; Blutungen im Pankreasbereich; ausgedehnte Blutungen in der Zwerchfellmuskulatur; Nierenrindenpetechien; Harnblasenschleimhautblutungen; multiple Petechien und Ecchymosen der Haut, flächenhafte Unterhautblutungen; Blutungen und Blutresorption in allen Körperlymphknoten. Die bakteriologische Untersuchung ergab das Vorhandensein von hämolysierenden E.coli Bakterien in Niere, Darm, Leber, Milz und in den Darmlymphknoten.

Der Befund spricht für eine hämorrhagische Diathese aufgrund einer durch hämolysierende E.coli Stämme hervorgerufenen Colienterotoxämie.

## Besprechung der Ergebnisse

Von den untersuchten Substanzen erwies sich Stärke III der Dil.Nr. 29 f+k und 71 als wirksam bei der Prophylaxe und Behandlung eines **Strahlenschadens**. Als einziges der mit 300 rad ganzkörperbestrahlten Schweine überlebte das Tier 3416, das mit Stärke III vorbehandelt worden war. Alle übrigen Tiere überlebten die im Gefolge der Bestrahlung auftretende Coli-Enterotoxämie nicht. Im vorliegenden Versuch konnte erneut gezeigt werden, wie wichtig die Bekämpfung von Spätschäden, die im Gefolge von Infektionen auftreten, bei der Abwehr eines Strahlenschadens ist. Auch im vorliegenden Versuch handelte es sich um eine Infektion, die von an und für sich "normalen" Keimen der Darmflora ausging und schließlich zum Tode von drei der vier untersuchten Tiere führte. Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, wie stark die Durchlässigkeit der Darmwand für Keime und Toxine unter dem Einfluß einer Bestrahlung verändert wird.

Bei den untersuchten immunologischen Parametern fällt auf, daß bei dem überlebenden Tier 3416 der Lymphozytensturz im Gefolge der Ganzkörperbestrahlung am geringsten war. Auch zeigte dieses Tier die schnellste Erholung bei der Regeneration der für die Antikörperbildung so wichtigen B-Zellen (Lymphozyten mit oberflächlichem Immunglobulin). Die übrigen untersuchten immunologischen Parameter korrelieren nicht mit dem Ausgang des Experimentes; im Phagozytosevermögen der Blutgranulozyten trat unter dem Einfluß der Bestrahlung keine signifikante Veränderung auf, soweit dies aus dem Glukosestoffwechsel der Leukozyten während der Phagozytose zu ersehen war. Die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten durch die verschiedenen untersuchten Mitogene war zwar stark beeinflusst, es ergaben sich jedoch nur geringe Variationen zwischen den einzelnen Tieren, insbesondere war keine Korrelation zur späteren Überlebensfähigkeit abzuleiten. Ähnliches gilt für das primäre und sekundäre Antikörperbildungsvermögen gegenüber den beiden untersuchten Antigenen Ovalbumin und Tetanustoxoid.

Di skussion

AUDITORIUM: Haben Sie die Tiere zunächst behandelt und dann erst strahlenexponiert?

Herr BUSCHMANN: Ja!

AUDITORIUM: Es gibt meines Wissens keine strahlenschützende Substanz, die erst nach der Strahlenexposition gegeben wird. Aber genau das wäre ja im Falle einer therapeutischen Anwendung wünschenswert. In der Realität, bei einem GAU oder ähnlichen Vorkommnissen erfolgt immer zuerst die Strahlenbelastung, und anschließend wird man dann zu behandeln versuchen.

Herr THEURER sen.: Vor 20 Jahren wurden auf meine Anregung von Prof. GRAUL und Mitarbeitern schon therapeutische Versuche durchgeführt. Ich bin mit Ihnen der Meinung, daß die Prophylaxe vor dem Strahlenschaden nichts bringt, denn wir kennen ja nicht den Zeitpunkt x. Es geht eigentlich nur um die Therapie. Herr SCHICK wird anschließend darüber referieren.

Herr KRAFT: In der Medizinischen Tierklinik in München wurden von Prof. ULLRICH auch schon vor ungefähr 15-20 Jahren Versuche in dieser Richtung durchgeführt, allerdings noch nicht mit NEYTHYUN, sondern mit anderen zytoplasmatischen Substanzen. Bei diesen Versuchen wurden die Präparate auch erst nach der Strahlenbelastung appliziert, weil dieser Versuchsansatz am ehesten der Realität entspricht. Zytoplasmatische Substanzen zeigten in diesen Versuchen einen ausgeprägten positiven Einfluß auf das Knochenmark.

Herr BUSCHMANN: Man muß hier vielleicht unterscheiden zwischen diesen sog. typischen Strahlenschutz-Substanzen auf der Basis des Sulfhydryls, die bisher nur prophylaktisch eingesetzt werden und den zytoplasmatischen Substanzen, die offensichtlich auch noch nach der Strahlenbelastung eingesetzt werden können.

Herr THEURER sen.: Die damaligen Versuche wurden mit dem maternalen Anteil der Plazenta, also adultem Gewebe, durchgeführt. Bei dem damaligen Versuchsansatz waren diese Dezidua-Extrakte offensichtlich wirksamer. Bei den Versuchen von Herrn BUSCHMANN haben wir wegen der früher experimentell nachgewiesenen hohen Repair-Raten durch Präparate aus foetalem Plazenta-Anteil (Chorion) diese in den Testreihen verwendet.

Herr BUSCHMANN: Wir haben natürlich auch in unseren Versuchen andere Strahlenschutzsubstanzen getestet, so u.a. WR 2721 aus Amerika. Betrachtet man jedoch

die Wirkung dieser Substanzen auf die immunologischen Parameter, so ist das Ergebnis durchaus enttäuschend. Zwar erhöht sich dadurch die Lebensrate dieser Tiere, die LD 50 wird herabgesetzt. Unter Berücksichtigung der immunologischen Parameter, und diese sind ja hier sehr wichtig, ist das Gesamtergebnis doch recht enttäuschend.

Man rechnet heute, daß im Zentrum einer Katastrophe, einer atomaren Katastrophe, jede Behandlung oder jede Prophylaxe sinnlos ist. Gerade die Spätschäden jedoch, die bei unseren subletal bestrahlten Versuchstieren aufgetreten sind, können wir kaum experimentell steuern, und es bieten sich deshalb interessante Aspekte. Von Hiroshima und Nagasaki weiß man heute, daß es zu diesen Spätschäden verbreitet gekommen ist, weil die Darmwand durch die Bestrahlung geschädigt wurde; anschließend kommt es dann zu einer Invasion von Bakterien aus dem Darminhalt, die zu septicämischen Erscheinungen führen. Daran beteiligt sind nicht nur Coli-stämme, sondern auch Pseudomonas, häufig auch verschiedene andere Bakterien. Man ist heute der Meinung, daß Antibiotika therapeutisch hier erfolgreich eingesetzt werden können und betroffene Patienten dadurch immer noch eine Chance haben.

Herr THEURER sen: Strahlenschäden erfordern in aller Regel eine Substitution über längere Zeit. Durch die Ganzkörper-Bestrahlung wird auch die immunologische Reaktionstendenz des Organismus zunächst vernichtet. Um endgültige Aussagen machen zu können, müßte man längere Zeit substituieren.

Neuere klinische Erkenntnisse  
mit zytoplasmatischen Substanzen bei myogenen und  
neuromuskulären Erkrankungen, insbesondere bei der Muskeldystrophie,  
Typ DUCHENNE

R. BECKMANN

Abteilung Pädiatrische Muskelerkrankungen  
Universitätskinderklinik Freiburg

Myogene Erkrankungen betreffen primär oder sekundär die Skelettmuskulatur, sie beruhen auf einer gestörten Ontogenese oder auf einem degenerativ und/oder entzündlich bedingten Zerfall bzw. Substanzverlust mit Ersatz durch funktionsuntüchtiges Fett- und Bindegewebe. Zu ihnen gehören die erblichen Muskeldystrophien, Myopathien infolge Strukturanomalien oder -atypien der Skelettmuskelfasern, die entzündlichen virogenen, parasitär, bakteriell bedingten und auf Autoimmunprozessen beruhenden Muskelerkrankungen sowie solche infolge endokriner, metabolischer, exogen, bzw. toxisch bedingter Störung.

Bei den neuromuskulären Erkrankungen handelt es sich um Systematrophien der Skelettmuskulatur. Ursache sind Störungen des zentralen und/oder peripher motorischen Neurons bzw. Untergang von Nervenzellen in den spinalen Ganglien, Degeneration der Leitungsbahnen und peripherer Nerven. Gennant seien die spinalen Muskelatrophien vom Typ WERDNIG-HOFFMANN und KUGELBERG-WELANDER sowie die neuralen Muskelatrophien, z.B. vom Typ CHARCOT-MARIE-TOOTH.

Myogene und neuromuskuläre Erkrankungen sind gekennzeichnet durch einen meist schmerzlosen, schleichend zunehmenden Verlust der Bewegungsfunktion, schließlich völlige Invalidität und Hilflosigkeit. Vielfach kommt es zu folgenschweren Skelettdeformitäten und Gelenkkontrakturen. Die Frühdiagnose ist nicht immer leicht, bei Kindern müssen verzögerte statomotorische Entwicklung, zunehmende Kraftlosigkeit, Gangstörungen, Stolpern, häufiges Fallen, gestörte Feinmotorik und weitere, wohl bekannte Symptome, zumal bei

heredofamiliärer Belastung, an eine myogene Erkrankung denken lassen.

In therapeutischer Hinsicht stellen verschiedene dieser Erkrankungen uns noch vor größte Probleme, sie sind bisher unheilbar. "Unheilbar" bedeutet aber nicht "unbehandelbar". Mit anderen Worten: Ein begrenztes Eingreifen in die pathogenetischen Vorgänge aufgrund moderner biochemischer Befunde und Erkenntnisse kann insofern gelingen, als der Verlauf vorübergehend verlangsamt oder eine Zeitlang stabilisiert wird.

Auch gewisse funktionelle Besserungen können günstigenfalls zur Beobachtung kommen, ehe, im Einzelfall unvorhersehbar, das Leiden erneut, geradezu einem unbekanntem Gesetz folgend, fortschreitet und bei einigen Formen, z.B. der DUCHENNE-Muskeldystrophie, einen fatalen, leider nur zeitlich verzögerten Ausgang nimmt.

Die schon verfügbaren, als "symptomatisch" anzusehenden Maßnahmen - ein Versagen ist möglich und keine Ausnahme - sollten eine ausbaufähige Basis für die klinisch-therapeutische Forschung darstellen, andererseits verfolgen diese das Ziel, - im Wettlauf mit den Anstrengungen um eine "sicher wirksame" Behandlung oder wenigstens einen "sicheren Stillstand" -, die Patienten, darunter überwiegend Kinder jeder Altersstufe, in einem möglichst guten Funktionszustand zu halten, weil einmal zur Ausbildung gekommene Muskelschäden als irreversibel anzusehen sind.

Bedeutung für schon mögliche therapeutische Maßnahmen, die wenigstens eine bescheidene Beeinflussung erwarten lassen können, haben folgende Fragen:

1. Liegt eine primär myogene Erkrankung vor?
2. Ist diese Krankheit progressiv dystrophisch, entzündlich, kongenital und stationär, metabolisch, exogen bzw. toxisch verursacht?
3. Kann es sich um eine neuromuskuläre Erkrankung handeln, ist diese spinal oder neural bedingt?
4. Besteht eine funktionelle Myopathie?

Es kann nur von "schon möglichen therapeutische Maßnahmen" gesprochen werden, weil es für die große Mehrzahl dieser, mit etwa 500 zu beziffernden myogenen und neuromuskulären Erkrankungen noch keine durchschlagende Therapie gibt, also lediglich "symptomatische",

leider unsichere, durch bereits eingetretene irreversible Schäden von vornherein begrenzte medikamentöse Hilfen gibt. Diese aber wahrzunehmen, um den Betroffenen Erleichterung, eine Verbesserung der Lebensqualität, Selbstwertgefühl durch, wenngleich bescheidene, Leistungserfolge zu vermitteln, ist ärztliches Gebot. Doppelblindversuche bzw. randomisierte Studien bei diesen Erkrankungen, insbesondere bei der in ihrem fatalen Ablauf so gut dokumentierten Erkrankung wie der DUCHENNE- Muskeldystrophie sind - nicht nur nach meiner Auffassung - ethisch ungerechtfertigt, so lange keine beweisbaren Effekte zu erwarten sind.

Der therapeutischen Kausalvorstellung, Bestandteile aus gesunden Zellen, also "zytoplasmatische Substanzen" einzusetzen, um mögliche Repairmechanismen in den betroffenen Geweben bei myogenen und neuromuskulären Erkrankungen auszulösen, sind wir aufgeschlossen, freilich kritisch, zunächst skeptisch gefolgt. Dies um so mehr, da sich radiochemisch und immunologisch zeigen ließ, daß isolierte homologe und heterologe Zellfraktionen aus phylogenetisch nahe stehenden Tierspezies einem sog. Tropismus folgend nach dem Selbsterkennungsprinzip des Organismus integriert werden und physiologisch bzw. normalisierend auf den Zellstoffwechsel wirken.

Die normale Muskulatur zeigt im histologischen Bild uniforme Muskelfaserkaliber mit subsarkolemmal gelegenen Kernen und polygonal konturierter Faserperipherie.

Bei spinal atrophischen Prozessen sieht man felderförmige Verschmälerungen der Muskelfasern, sie erscheinen kantig und elongiert, die subsarkolemmal gelegenen Kerne sind vermehrt. Ursache ist die Degeneration der Ganglienzellen im Rückenmark, des peripher motorischen Neurons.

Entzündliche Vorgänge können im Muskel nicht nur zur Infiltration von Leukozyten, Lymphozyten und Histiozyten führen, sondern, wie bei der pseudomyopathischen Polymyositis, die Formen der Muskeldystrophie und der proximalen spinalen Muskelatrophie völlig imitieren kann, auch zu degenerativen Veränderungen.

Degenerative Muskelschäden, wie sie für die Muskeldystrophie typisch sind, bestehen in der Unterschiedlichkeit der Muskelfaserkaliber, die teils atrophisch, teils hypertrophisch, teils normal/ je nach Schweregrad des jeweiligen Krankheitsstadiums, zu dem die

muskelbiopsische Untersuchung erfolgte. Die Muskelzellen zeigen zentral gelagerte Kerne, Spaltbildungen und Ersatz zugrundegegangener Muskelfasern. Wenn mehr als 50% der Skelettmuskelfasern dystrophisch zerfallen sind, kommt es zur Manifestation klinischer Symptome.

Wie schon auf der vorigen Jahrestagung ausgeführt werden konnte, verfügen wir bei 620 von jetzt annähernd 800 Knaben mit DUCHENNE Muskeldystrophie über Erfahrung mit medikamentösen Behandlungsversuchen, die in den vergangenen 25-26 Jahren gesammelt und katamnestisch ausgewertet wurden. Dabei handelt es sich nicht um eine gezielte und randomisiert angelegte Studie, es sind Befunde die aus unterschiedlich langen, ambulanten, z.T. klinischen Beobachtungsperioden stammen und miteinander verglichen wurden.

Es ist verständlich, daß eine möglich Beeinflussung, wie schon be tont, immer nur vorübergehend sein kann, begrenzt durch bereits eingetretene Muskelläsionen und dadurch, daß der fatale Ausgang leider nicht verhindert wird. Es bestand aber die Hoffnung, den Verlauf wenigstens eine Zeitlang zu stabilisieren und die Lebensqualität durch funktionelle Beeinflussung zu verbessern. Von diesen Patienten wurden bis zum Jahre 1981 85 Knaben mit der Revit-Organ-Dilution Nr. 22 im Wechsel mit NEYTROPH (Nr. 96) versuchsweise behandelt. Nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse.

**Cytoposmotische Substanzen im Therapieversuch bei DMD**

Therapie- Stadium	Pat. n=95	mittleres Alter (Jahre)	mittlere Therapiedauer (Monate)	Dauer (Mon.) der durch- schnittlichen Gefähig- keit seit Therapiebeginn	Enzym-Index (E.I.)		n
					während Therapie	Gesamt- kollektive	
IX	2	12,5	30	kein Einfluß	4,0 ↑	3,7	25
VIII	11	11,9	18	kein Einfluß	4,5	4,5	67
VII	6	10,5	17	Gefähigkeit wurde nicht wieder erreicht	7,0 ↑	6,0	71
VI	12	10,0	12	9,1	7,4 ↑	7,1	46
V	18	9,9	11	10,2	9,6 ↑	8,9	86
IV	26	8,4	17	24	10,25 ↑	9,7	137
III	10	7,5	21	28	13,5 ↑	12,5	172
II	10	5,7	34	51,4	16,5 ↑	13,9	76

Das jeweilige Krankheitsstadium mit dem Therapiebeginn, das mittlere Alter der Knaben mit der Dauer der Therapieversuche in Monaten wurde eingetragen sowie das klinische Resultat, bezogen auf die Erhaltung der Gehfähigkeit. In den zwei vorletzten Spalten ist der Enzymindex vermerkt, bezogen auf das gesamte Kollektiv der DUCHENNE-Knaben in vergleichbaren Krankheitsstadien. Die Pfeile charakterisieren die Besserung und Verschlechterung. Je höher der Enzymindex, um so besser, "relativ besser", sind die Bewegungsfunktionen.

Unter der Einwirkung der zytoplasmatischen Substanzen liegen die Werte des Enzymindex als Ausdruck für eine Stabilisierung höher als im Gesamtkollektiv. Dazu korrespondierend tritt unter dieser Therapie der Verlust der Gehfähigkeit durchschnittlich um 1 Jahr später auf.

Die Ergebnisse mit diesen symptomatischen Maßnahmen wurden verglichen mit denen von Therapieversuchen, in denen energiereiche Phosphate, menschliches Wachstumshormon, Vitamin E-haltige Präparate, z.T. mit Inosit, Flavonoide und ein standardisierter Muskelextrakt eingesetzt wurden.

Die Gesamtheit aller positiven Ergebnisse - bezogen auf eine unbehandelte Gruppe von DUCHENNE-Knaben - weist darauf hin, daß 60% von 253, d.h. 152 Knaben, zwischen dem 8. und 12. Lebensjahr gehunfähig geworden sind. Das Durchschnittsalter bei Verlust der Gehfähigkeit beträgt 9,9 Jahre. Jenseits des 12. Lebensjahres wurde bei den symptomatisch behandelten Knaben eine, im Durchschnitt um 15 Monate längere Gehfähigkeit, bisweilen um 2, 3 und 4 Jahre festgestellt.

Die Tatsache, daß die Mittelwerte für die längere Gehfähigkeit bei verschiedenen medikamentösen Maßnahmen unterschiedlich höher liegen als bei nur krankengymnastischer Behandlung, schließt aus, daß eine Besserung oder Stabilisierung allein durch Krankengymnastik, die alle Patienten in Form der Isometrie und des sog. Klopf-Drucks (nach Dr. TEIRICH-LEUBE) erfahren haben, erreicht wurde. Bei völliger Wirkungslosigkeit der medikamentösen Behandlungsmaßnahmen würde man gleiche Mittelwerte erwarten müssen. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 1 ‰ haben zytoplasmatische Substanzen und einige andere der geprüften Agentien einen positiven, zeitlich begrenzten Einfluß auf die Gehfähigkeit.

Diese geringe, wenngleich nur passagere Verlängerung der Gehfähigkeit bedeutet für den Patienten mit der chronischen Progressivität der Muskeldystrophie sehr viel. Sie kann in Anbetracht des kontinuierlich progressiven Verlaufes als Erfolg dieser adjuvanten Therapieversuche gewertet werden. Eine Heilung ist beim jetzigen Stand der Wissenschaft nicht zu erreichen. Die Lebensqualität der Patienten hingegen wird in vielen Fällen verbessert. Dies schließt nicht nur eine längere Stabilisierung oder Erhaltung der Gehfähigkeit ein, sondern auch andere Funktionen. Beispielsweise erfahren die Armbeweglichkeit und Körperhaltung gleichzeitig eine gewisse Besserung.

Die Wirkung der Organextrakte ist, wie Befunde an Zellkulturen eindeutig demonstrieren, mit einer Stimulation der DNA- und RNA-Synthese durch die zytoplasmatischen Substanzen, also Extrakte aus fetaler Muskulatur, Rückenmark, fetalem Plazentaanteil und aus der Hypophyse, zu erklären.

Seit drei Jahren konnten wir auch bei Patienten mit spinalen und neuralen Muskelatrophien zytoplasmatische Substanzen im therapeutischen Versuch einsetzen. So wurde die Kombination von Medulla spinalis und oblongata in Kombination mit fetalem Thymus, cerebralen und cerebellaren Anteilen mit Plazenta sowie Muskulatur eingesetzt.

Die Beurteilung der Wirksamkeit kann sich leider nur auf rein klinische Erfahrungen bei diesen meist sehr langsam, eher schleichend über viele Jahre und Jahrzehnte progressiv verlaufenden neuromuskulären Erkrankungen beziehen, da objektive Kriterien nicht verfügbar sind. Bei einem 42jährigen Patienten mit spinaler Muskelatrophie ist der Zustand während 5 Jahren nahezu unverändert geblieben. Bei einem 6jährigen Mädchen mit dieser Krankheit ist nach etwa 6monatiger Behandlung ein kräftigeres Gangbild mit aufrechter Körperhaltung zu beobachten, die PSR sind schwach positiv auslösbar geworden.

Bei einem 22jährigen Patienten mit neuraler Muskelatrophie wurde unter der Behandlung eine vorübergehende kräftigere Bewegungsfunktion festgestellt, nach Absetzen kehrte jedoch schnell die Ausgangssituation zurück und eine erneute Progression führte zum Gehverlust. Bisher nutzlos blieb der Therapieversuch bei einem 10jährigen Knaben mit neuraler Muskelatrophie.

In Einzelfällen erwies sich die Gegensensibilisierung von Nutzen, indem die Patienten erneut, allerdings auch wieder begrenzt, auf die gleichen Therapieversuche ansprachen, d.h. es kam zu funktionellen Besserungen.

Es ist beabsichtigt, nach diesen Pilotstudien die Wirksamkeit einem größeren Patientenkollektiv mit neuromuskulären Erkrankungen nutzbar zu machen.

Auf die ätiologisch und pathogenetisch problematischen bzw. unzulänglichen Kenntnisse bei den beispielsweise genannten myogenen und neuromuskulären Erkrankungen bin ich nicht eingegangen und damit auch nicht detailliert auf die in diesem Gremium bekannten Grundlagen für das therapeutische Konzept mit zytoplasmatischen Substanzen. Abschließend möchte ich nach diesen Erfahrungen feststellen, daß mit den zytoplasmatischen Substanzen ein ausbaufähiger und aussichtsvoller Fortschritt in den Bemühungen um eine wirksame Therapie bei den myogenen und neuromuskulären Erkrankungen zu verzeichnen ist. Selbst in Anbetracht der Tatsache, daß diese Erkrankungen genetisch bedingt sind, besteht berechtigte Hoffnung - und dieses kam für die DUCHENNE-Muskeldystrophie auf der Tagung der EAMDA im September dieses Jahres in Freiburg zum Ausdruck - eine wirksame Behandlungsweise zu finden, die nicht auf einer genetischen Manipulation beruht, sondern darin, daß über eine Beeinflussung der metabolischen Störung wenigstens ein Stillstand und im präklinischen Stadium eine Verhütung mancher Krankheitsformen möglich wird.

#### Literatur

BECKMANN, R.: Klinik und Therapie der Muskeldystrophie.

Internist U, 108-117 (1972)

BECKMANN, R.: Duchenne-Muskeldystrophie: Probleme, Frühdiagnose, Frühbehandlung. Klin. Pädiat. J\_90, 531-539 (1978)

BECKMANN, R.: Dystrophische Myopathien. In: Neurologische und psychiatrische Therapie (FLÜGEL, K.A., Hrsg.), Verlag Dr. med. D. Straube, Erlangen, 1978

BECKMANN, R.: Die Muskeldystrophien: Klinik, Differentialdiagnose und Therapieversuche. Krankengymnastik 32^, 678-691 (1980)

BECKMANN, R.: Results from long term Observation in about 620 boys with Duchenne muscular dystrophy, 12th World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, September, 20.-25., 1981. Hrsg.: Excerpta Medica, Amsterdam - Oxford - Princeton 1981

BECKMANN, R.: Ergebnisse von Langzeitbeobachtungen bei 620 Knaben mit Duchenne Muskeldystrophie. In: Organo- und Immunotherapie als neue Denkweise in der Medizin. (Hrsg.: THEURER, K., DOMAGK, G.F., KRAFT, H.), Enke-Verlag, Stuttgart 1981

BECKMANN, R.: Aktuelle therapeutische Möglichkeiten bei myogenen und neuromuskulären Erkrankungen - Wege der Erforschung. In: Biometik als Chance: Ein neues therapeutisches Prinzip. Forschung und Praxis im Dialog. (Hrsg.: PORCHER, H., THEURER, K.), Enke-Verlag, Stuttgart 1980

BECKMANN, R.: Aktuelle therapeutische Möglichkeiten bei myogenen und neuromuskulären Erkrankungen. Therapiewoche 1982, im Druck.

FIEHN, W., PETER, J.P., SEILER, D., KUHN, E.: Abnormalities of the sarkolemma in myopathies. In: Structure and function of normal and diseased muscle and peripheral nerve (Hausmanowa-Petrusewicz und Jedrzejowska, Hrsg.: Polish Medical Publishers, 1974, Warschau, Polen

IOANESCU, V., ZELLWEGER, H., CONWAY, T.W.: Ribosomal protein synthesis in Duchenne muscular dystrophy. Arch. Biochem. Biophys. 144, 51 (1971)

MOKRI, B., ENGEL, A.G.: Duchenne dystrophy: Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fibre. Neurology (Minneapolis) 25<sup>^</sup>, 1111 (1975)

PFAFFENHOLZ, V., THEURER, K.: Morbus Duchenne. Die Beeinflussung zytoplasmatischer Enzyme in Zellkulturen von Patienten mit Muskeldystrophie. Therapeutische Berichte (Sonderdruck "Der Kassenarzt"), 20 (1980), Heft 12

Diskussion

Herr DERBOLOWSKY: Die von Herrn BECKMANN beschriebenen Fälle gehören zu jenen Menschen, mit denen ich ständig in dem von mir betreuten Jugendhilfswerk Homburg/Saar Umgang habe. Unter den behinderten jungen Menschen, die dort ihre berufliche Erstausbildung erhalten, befinden sich auch eine ganze Reihe Patienten mit muskeldystrophischen Erkrankungen. Durch die Ergebnisse von Herrn BECKMANN mit der zytoplasmatischen Organotherapie fühle ich mich immer wieder ermutigt und angeregt, in dieser Richtung weiterzuarbeiten.

Zytoplasmatische Behandlung und Gegensensibilisierung  
bei atopischen Erkrankungen (Pollinose, Asthma,  
endogenes Ekzem)

E. BONNET  
Reutlingen

Seit 1969 wurde bei ausgeprägten allergischen Erkrankungen nach ausführlicher Anamneseerhebung und Allergentestung eine sog. spezifische Hyposensibilisierung durchgeführt. Die Behandlungsdauer erstreckte sich in der Regel über drei Jahre. Bei Monoallergien waren die Therapieerfolge zufriedenstellend. Waren jedoch mehrere Allergene an der Symptomatik beteiligt, so brachte die spezifische Hyposensibilisierung in vielen Fällen keinen anhaltenden Erfolg. Bei zahlreichen Patienten mußte - nach erneuter Allergentestung - eine zweite oder dritte Behandlung, durchgeführt werden.

Wegen dieser unbefriedigenden Ergebnisse wurde 1977 versuchsweise mit der zytoplasmatischen Behandlung und der Gegensensibilisierung begonnen. Diese kombinierte Behandlung löste schrittweise die spezifische Hyposensibilisierung fast vollständig ab.

Im Mittelpunkt stand zunächst die Behandlung von Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie Pollinose, Asthma und endogenes Ekzem. Später habe ich diese Therapie auf Erkrankungen mit Immundefekten (Infektanfälligkeit, Sinubronchitiden, Harnwegsinfekte) und auf Autoaggressionskrankheiten (rheumatischer Formenkreis, PCP, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa,) ausgedehnt.

Weitere Einsatzmöglichkeiten für die zytoplasmatische Therapie ergaben sich bei Kindern mit zerebralen Defekten wie psychomotorische Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung, zerebrales Dysfunktionssyndrom und Down-Syndrom.

**Folgende Präparate wurden routinemäßig eingesetzt:**

Pollinose: NEYDESIB (Nr. 78), NEYNORMIN (Nr. 65 oder 65N),  
Dil Nr. 55, Trockensubstanz Nr. 47,  
zusätzlich GS.

Asthma: NEYDESIB (Nr. 78), NEYNORMIN (Nr. 65 oder 65N),  
Dil Nr. 55 und Nr. 2, Trockensubstanz Nr. 47,  
zusätzlich GS.

Atopische

Dermatitis: NEYDESIB (Nr. 78), NEYNORMIN (Nr. 65 oder Nr. 65N),  
Dil Nr. 5, zusätzlich GS.

Die Präparate wurden nach dem vorliegenden Krankheitsbild zusammengestellt und individuell ergänzt. In der Mehrzahl der Fälle begann die Therapie mit der Injektion der Dilutionen. Anschließend erfolgte die Injektion der Trockensubstanz. Die Blutentnahme zur Gegsensensibilisierung wurde immer zum Zeitpunkt ausgeprägter Beschwerden vorgenommen.

Bei den meisten Patienten wurde die GS als Quaddelbehandlung durch-

geführt, . Ausgehend von einer hohen Verdünnung ( $10^{-12}$ ) werden 0.2.ml in Form von vier Quaddeln paravertebral intracutan injiziert. Von derselben Verdünnungsstufe werden bei der nächsten Sitzung 0,4 ml injiziert. Anschließend erfolgt derselbe Vorgang mit der Verdünnung  $10^{-10}$  usw. bis zu einer Verdünnung von  $10^{-4}$ . Zu Beginn der Behandlung wurde im Abstand von 1-3 Tagen gequaddelt. Später wird der Abstand auf 3-7 Tage ausgedehnt. Die höchste Dosis wird in wöchentlichem Abstand insgesamt viermal injiziert.

Bei Nebenwirkungen (Rötung, Juckreiz) oder bei Zunahme der Symptomatik geht man ein bis zwei Stufen zurück und steigert in Schritten von 0,1 ml.

Neben der GS als Quaddelbehandlung hat sich auch die perlinguale Behandlung (Auflecken der Lösungstropfen vom Handrücken) und die Inhalationsbehandlung bewährt.

Zur Inhalation wird ein Mikroinhalator verordnet und mit Emser Sole verdünnt. Inhaliert wird täglich. Wir beginnen mit 5 Tropfen

der Stärke  $10^{-6}$  oder  $10^{-8}$  und ergänzen mit Emser Sole jeweils auf 2 ml. Endziel ist die Inhalation der reinen GS-Lösung. Die Vorteile der aufgeführten Behandlungsmethode sind folgende:

1. Die sensibilisierenden Allergene müssen nicht bekannt sein. Trotzdem wird eine gezielte Desensibilisierung durchgeführt.
2. Die "pathogenen" Antikörper (Ig E) stellen nach der Transformation durch den Serumaktivator den "immunogenen" Reiz dar.

3. Durch den Wegfall der Allergentestung wird sehr viel Zeit gewonnen und es kommt nicht zu einer Behandlung auf der Basis von unvollständigen oder falsch interpretierten Ergebnissen.
4. Die Therapiedauer ist relativ kurz (2-4 Monate).
5. Es besteht keine Gefahr von ernsthaften Zwischenfällen.

Von Anfang an wurde über jeden Patienten ein kurzes Protokoll geführt. Ausgewertet wurden diejenigen Protokolle, bei denen die Behandlung spätestens 1981 abgeschlossen war.

Die Therapieergebnisse sind in vier Gruppen unterteilt und die einzelnen Gruppen wie folgt definiert.

- sehr gut: beschwerdefrei, keine weitere Therapie notwendig;  
 gut : nur noch geringe Symptome, sporadischer Einsatz von Medikamenten;  
 mäßig : Besserung, bedarf jedoch noch weiterer Behandlung;  
 erfolglos: keine feststellbare oder dauerhafte Besserung.

Die einzelnen Gruppen sind unterteilt nach der Art der Behandlung.

GS = Gegensensibilisierung

D/L = Zytoplasmatische Behandlung mit Dilutionen und Lingualpräparaten

D/L/GS = Dilutionen +Lingualpräparate + GS

D/L/GS/T= wie D/L/GS und zusätzlich Trockensubstanz

Krankheit	Erfolg	Anzahl	GS	D/L	D/L/GS	D/L/GS/T	D/T
Pollinose Rhinitis		91	19	18	35	8	1
	sehr gut	50	9	11	3	6	1
	gut	21	5	7	7	2	-
	mäßig	7	4	-	3	-	-
	erfolglos	3	1	-	2	-	-
Asthma		54	16	5	26	5	2
	sehr gut	29	10	3	10	4	2
	gut	19	4	2	12	1	-
	mäßig	5	1	-	4	-	-
	erfolglos	1	1	-	-	-	-

Krankheit	Erfolg	Anzahl	GS	D/L	D/L/GS	D/L/GS/T	D/T
Atopische Dermatitis		11	-	3	8	-	-
	sehr gut	4	-	1	3	-	-
	gut	3	-	2	1	-	-
	mäßig	3	-	-	3		
	erfolglos	1	-	-	1	-	-

Bei den atopischen Erkrankungen wurden die zytoplasmatische Behandlung und GS nur bei mittelschweren und schweren Fällen durchgeführt.

Erfasst sind auch diejenigen Patienten, bei denen wegen Erkrankung, Wohnortwechsel oder Therapieabbruch (Angst vor Injektionen) nur eine unvollständige Behandlung durchgeführt wurde.

Andererseits habe ich von einigen Patienten, bei denen das Behandlungsende schon einige Jahre zurückliegt, keine Meldungen über das weitere Ergehen.

Ergänzende Maßnahmen, welche vor, während und nach der zytoplasmatischen Behandlung und GS verordnet wurden, sind folgende: Allergenkarrenz, Körperhygiene und Körperpflege, vollwertige Ernährung, roborierende Maßnahmen, Phytotherapie, Symbioselenkung, Inhalationen, Krankengymnastik, Atemgymnastik, autogenes Training.

Welche dieser Maßnahmen zum Einsatz kamen und der Umfang derselben richtete sich nach dem Krankheitsbild und der Mitarbeitsbereitschaft des Patienten oder der Patientenelementern.

#### Diskussion

Herr DERBOLOWSKY : Die von Herrn Kollegen BONNET vorgetraaenen Ergebnisse stimmen weitgehend mit meinen eigenen Erfahrunaen überein. Nur sind meine Erfolge bei Bronchialasthma nicht ganz so aut; möglicherweise liegt das daran, daß ich beim Bronchialasthma unterscheide zwischen einer überwiegend immunologischen Ätiooathogenese und solchen Formen, bei denen mehr eine psychocrene Komponente im Vordergrund steht und eine immunoIonisch ausaerichtete Therapie weniger Angriffspunkte hat.

## Dynamik der Gehirnentwicklung

INGEBORG BRANDT

Universitäts-Kinderklinik Bonn

## 1. Bedeutung der Kopfumfangsmessung

Das Wachstum des Kopfumfanges steht beim normal wachsenden Kind in enger Beziehung zur Gehirnentwicklung im ersten Lebensjahr, wie in vielen Studien nachgewiesen worden ist. Postnatale regelmäßige Messungen des Kopfumfanges sind von prognostischem Wert, weil ein Absinken von seinem Wachstumskanal auf eine verzögerte Hirnentwicklung hinweisen kann. Bei unterernährten Kindern spiegelt der verminderte Kopfumfang die Schwere der Hirnentwicklungsverzögerung wider (WINICK 1973). Hieran erkennt man, daß der Kopfumfang ein "empfindlicher Wachstumsparameter" z.B. bei Mangelernährung im frühen Säuglingsalter ist. Beim Wachstum des Kopfumfanges machen die genetischen Faktoren ca. 50 % aus. Zusätzlich spielen Umgebungsfaktoren wie Ernährung und geistige Anregungen eine Rolle.

Die säkulare Akzeleration, d.h. die Zunahme innerhalb eines Jahrhunderts, ist beim Kopfumfang im Vergleich zur Körperhöhe nur gering (MEREDITH 1946). Es besteht zwar ein Trend zu einem größeren Kopfumfang, aber der Anstieg von 3 bis 4 mm macht weniger als ein Zehntel der Körperhöhe-Akzeleration aus.

## 2. Kopfumfangswachstum

Am normalen Geburtstermin sind bereits 63 % des Erwachsenenkopfumfanges erreicht. Im Vergleich dazu sind es bei der Körperhöhe nur 30 %.

Geschlechtsunterschied: Bei Geburt haben Jungen bereits einen um 0,8 cm signifikant größeren Kopfumfang als Mädchen (35,4 cm versus 34,6 cm). Bis zum Alter von 6 Monaten erhöht sich dieser Unterschied auf 1,4 cm und bleibt dann so bis ins Erwachsenenalter bestehen (BRANDT 1981).

Wachstumsgeschwindigkeit (Velocity): In Ermangelung longitudinaler intrauteriner Kopfumfangsmessungen werden die postnatalen Meßergebnisse Frühgeborener, deren extrauterines Kopfumfangswachstum bis zum errechneten Geburtstermin mit der intrauterinen Entwicklung

Reifgeborener im entsprechenden Zeitabschnitt übereinstimmt, herangezogen. Im Rahmen der Bonner Studie ist es gelungen, durch regelmäßige Messungen normaler Frühgeborener, die durchschnittlich zwei Monate vor dem errechneten Geburtstermin geboren sind, erstmalig Geschwindigkeitskurven auch für die Perinatalperiode aufzustellen (BRANDT 1976, 1978, 1979). Eine solche Geschwindigkeitskurve für die Perinatalperiode und die anschließende Zeit bis zu 3 1/2 Jahren zeigt Abb. 1. In dieser Computerzeichnung ist die Zunahme des Kopfumfanges in cm pro Monat berechnet und mit Mittelwert und ein und zwei Standardabweichungen angegeben. In den letzten 10 postmenstruellen Wochen wächst der Kopf bedeutend schneller als nach dem regulären Geburtstermin. In der 34. Woche ergibt sich ein Gipfelpunkt (Peak) von 4,3 cm/Monat. Anschließend vermindert sich die Wachstumsgeschwindigkeit ganz erheblich, mit 4 Jahren macht sie nur noch ein Hundertstel des Geschwindigkeitsgipfels aus (0,04 cm/Monat).

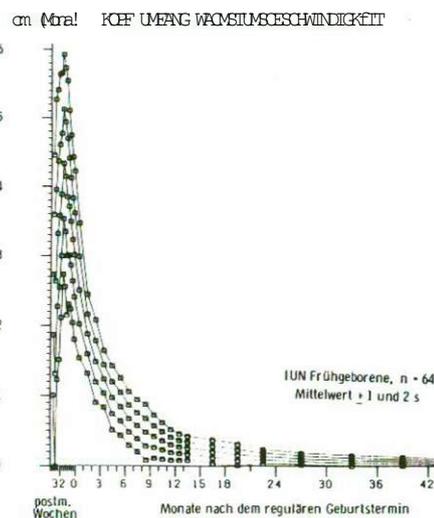


Abb. 1 : Wachstumsgeschwindigkeit des Kopfumfanges bei Frühgeborenen, berechnet in cm/Monat, von 30 postmenstruellen Wochen bis zu 42 Monaten nach dem regulären Geburtstermin, Mittelwert mit ein und zwei Standardabweichungen, ungeglättete Ergebnisse in einer Computerzeichnung.

Der enorme Wachstumsschub des Kopfumfanges in der Perinatalperiode und in den ersten Lebensmonaten spiegelt eine Phase schneller Gehirnentwicklung wider mit entsprechend hohem Energiebedarf.

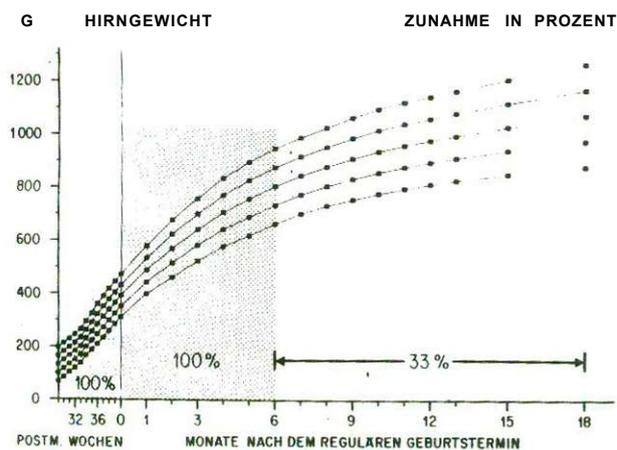
### 3. Kopfumfang und Gehirnentwicklung

Für die in vielen Studien bestätigte enge Beziehung zwischen Kopfumfangwachstum und Gehirnentwicklung ist kürzlich von DOBBING und SANDS (1978) eine Approximationsgleichung aufgestellt worden.

$$\text{Hirngewicht} = \frac{\text{Kopfumfang}^3 - 3000}{2 \times \text{Kopfumfang}}$$

Die Gleichung gilt für den Zeitraum letztes Schwangerschaftsdrittel bis zum Alter von zwei Jahren. Damit ist es möglich gewesen, aus den Ergebnissen regelmäßig wiederholter Kopfumfangsmessungen eines Kindes das Wachstum des Gehirns zu berechnen.

Gehirngewicht: Abb. 2 zeigt eine solche Wachstumskurve des Gehirngewichts bis zu 18 Monaten; es handelt sich wieder um einen Computer-Plot. Das Gehirngewicht verdoppelt sich zwischen 32 und 39 postmenstruellen Wochen - also binnen 7 Wochen - von 183 g (s=31)



**Abb. 2:** Wachstumskurve des Gehirngewichts von 29 postmenstruellen Wochen bis zu 18 Monaten nach dem regulären Geburtstermin, ermittelt aus longitudinalen Kopfumfangsmessungen mit der Approximationsgleichung von DOBBING und SANDS (1978), Mittelwert mit ein und zwei Standardabweichungen (Computerzeichnung, ungeglättete Ergebnisse). Die schattierten Bereiche kennzeichnen eine Zunahme um jeweils 100 %.

auf 365 g (s=40). Nach dem regulären Geburtstermin geschieht dies erst wieder nach 6 Monaten; das Gehirngewicht steigt von 392 g (s=40) auf 807 g (s=70) an. Anschließend verlangsamt sich die Gewichtszunahme ganz beträchtlich: zwischen 6 und 18 Monaten erhöht sich das Gehirngewicht lediglich um 33 %.

Lebewesen werden zu völlig verschiedenen Reifegraden ihres Gehirns geboren (Tab. 1). Beim Affen sind beispielsweise 76 %, beim Menschen ca. 30 % und bei der Ratte erst 12 % des Erwachsenengehirngewichts erreicht. Auch die besonders vulnerable Phase des Hirnwachstumsspurts liegt bei jeder Spezies in einem anderen Alter. Jede Extrapolation von Tierversuchen auf die menschliche Gehirnentwicklung muß das berücksichtigen (DOBBING und SANDS 1979). Beim Menschen sind mit knapp 5 Monaten (4 Monate 22 Tage) 50 % und im Alter von 3 1/2 Jahren bereits 95 % des Erwachsenengehirngewichts erreicht (BRANDT 1981).

Tab. 1: Prozentsatz des Erwachsenen-Gehirngewichts bei Geburt

Spezies		Prozent des Erwachsenen-Gehirn- gewichts bei Geburt
Affe	(CHEEK 1975)	76
Meerschweinchen	(DOBBING & SANDS 1970)	61
Schaf	(RICHARDSON & HEBERT 1978)	53
Mensch	(DOBBING & SANDS 1973)	27
Schwein	(DICKERSON & DOBBING 1967)	25
Kaninchen	(HAREL, WATANABE et al. 1972)	15
Ratte	(DOBBING & SANDS 1971)	12

Wachstumsgeschwindigkeit des Gehirngewichts: Aufschlußreicher als das absolute Wachstum ist die Wachstumsgeschwindigkeit; hieraus sind wichtige Rückschlüsse auf die Vulnerabilität möglich.

In Abb. 3 ist die Wachstumsgeschwindigkeit des Hirngewichts, berechnet in g/Monat, dargestellt - wiederum in einer Computerzeichnung. In der Zeit vor dem errechneten Geburtstermin ist die Geschwindigkeit besonders hoch; zwischen der 34. und 37. postmenstruellen Woche erreicht sie einen Gipfel von 121 bis 124 g/Monat. Mit fortschreitendem Alter verlangsamt sie sich ständig.

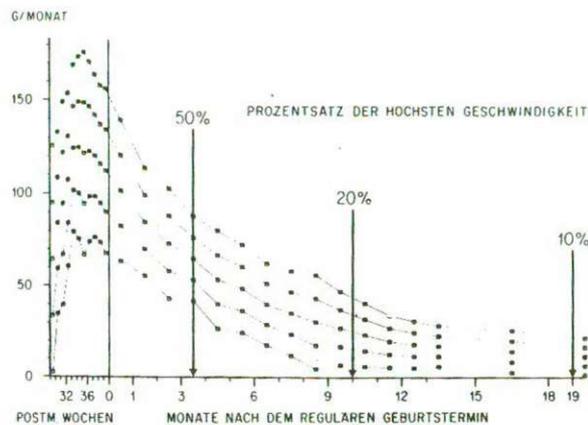


Abb. 3: Wachstumsgeschwindigkeit des Gehirngewichts in g/Monat, von 29,5 postmenstruellen Wochen bis 19,5 Monate nach dem regulären Geburtstermin, errechnet aus den Distanzwerten, Mittelwert mit ein und zwei Standardabweichungen, die Pfeile kennzeichnen die Etappen der Geschwindigkeitsverminderung.

Diese Daten stimmen mit DOBBINGS Ergebnissen zur quantitativen Hirnentwicklung überein, wonach der Hirnwachstumsspurts "von der Schwangerschaftsmittle bis in das zweite postnatale Jahr" reicht (DOBBING und SANDS 1973; DOBBING 1974).

#### 4. Komponenten des Hirnwachstumsspurts

Bei Beginn des Hirnwachstumsspurts - etwa in der Mitte der Schwangerschaft - ist die Zahl der Neuronen des Erwachsenen Gehirns bereits weitgehend erreicht, mit Ausnahme einiger sich später teilender Körperzellen des Kleinhirns.

Während des Hirnwachstumsspurts erfolgen Gliazellvermehrung, Myelinisierung, Dendritenwachstum mit Ausbildung des Dendritenbaums und Einrichtung zahlloser synaptischer Verbindungen (DOBBING 1974, 1979).

**Myelinisierung:** Myelin trägt zu mehr als 25 % zum Hirngewicht bei. Es wird in einem relativ kurzen Zeitraum in der frühen Kindheit gebildet; beispielsweise über 50 % zwischen 12 und 24 Monaten. In den einzelnen Hirnregionen vollzieht sich die Myelinisierung ganz unterschiedlich im Hinblick auf Ausmaß und Geschwindigkeit (YAKOVLEV und LECOURE 1967).

In einigen Jahren werden mit Hilfe verfeinerter diagnostischer Verfahren, wie z.B. der Elektro-Magnet-Resonanz-Tomographie, vielleicht längsschnittliche Einblicke in die Myelinisierungsvorgänge während des Hirnwachstumsspurts möglich sein; in myelinisierten und noch nicht myelinisierten Bereichen finden sich unterschiedliche Kern-Spin- und Relaxationszeiten und damit unterschiedliche Kontrastierungen.

Entwicklung von Dendriten und Axonen: Das Wachstum der Dendriten und Axone ist besonders wichtig für die Hirnfunktion; sie sind der Hauptort synaptischer Verbindungen der Neuronen untereinander. Ein Beispiel für Dendritenwachstum zeigt ein Vergleich der beiden mikroskopischen Ausschnitte mit großen Pyramidenzellen aus dem Gyrus praecentralis, dem motorischen Rindenfeld, links bei einem Neugeborenen und rechts bei einem Kind von 15 Monaten (Abb. 4). Binnen 15 Monaten haben Anzahl, Größe und Länge der Dendriten und Axone deutlich zugenommen (CONEL 1939, 1955).

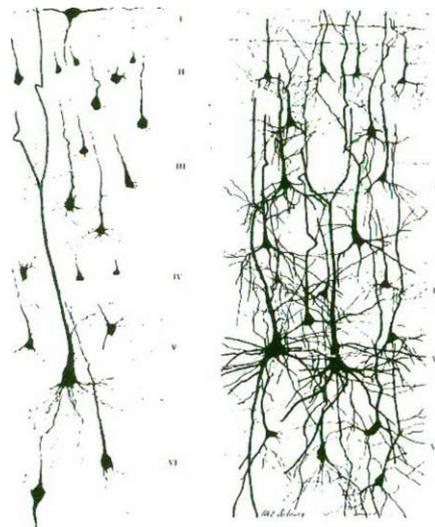
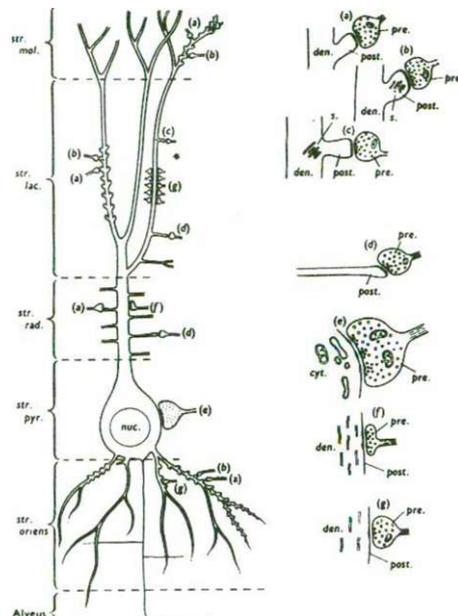


Abb. 4: Ganglienzellen vom Typ der großen Pyramidenzellen im primären motorischen Rindenfeld (Gyrus praecentralis, Region für Hand- und Fingermotorik); Zeichnungen von Golgi-Cox Präparaten, links bei einem Neugeborenen (CONEL 1939) und rechts bei einem Kind von 15 Monaten (CONEL 1955).

Synapsenbildung: Das menschliche Gehirn besteht aus etwa 10 Milliarden Nervenzellen (ECCLES 1979). Jede Nervenzelle lebt unabhängig ihr eigenes biologisches Leben und steht mit den anderen nur durch Synapsen in Verbindung (von synapto: sich vereinigen, verbinden), die durch einen äußerst schmalen Spalt, den Synapsenspalt, vollständig voneinander getrennt sind. Die Informationsübertragung geschieht durch Neurotransmitter, die Schlüsselemente der Synapsenfunktion (BARCHAS et al. 1978). Abb. 5 zeigt links eine Pyramidenzelle mit ihren apicalen und basalen Dendriten und dem Axon mit den vielfältigen Synapsen, gezeichnet nach einem elektronenoptischen Bild von HAMLIN (1963). Rechts im Bild sind die verschiedenen Synapsen, bezeichnet mit a - g, im Detail dargestellt.



**Abb. 5:** Links: Zeichnung einer Pyramidenzelle aus dem Ammon<sup>1</sup>s Horn mit ihren apicalen und basalen Dendriten und dem Axon mit den vielfältigen Synapsen, nach einem elektronenoptischen Bild von HAMLIN (1963).  
Rechts: Die verschiedenen Synapsentypen, bezeichnet mit a - g, im Detail.

Mit Hilfe neuentwickelter elektronenmikroskopisch-histochemischer Methoden konnte vor kurzem gezeigt werden (HUTTENLOCHER 1979), daß die Synapsen in den ersten zwölf Monaten nach der Geburt etwa um das Zehnfache zunehmen und daß die Nervenzelle mit einem Jahr bereits ihre volle Synapsenzahl erreicht. Anschließend - bis zu zwei Jahren - kommt es wieder zu einem geringfügigen Abbau, da während der frühen Entwicklung eine "Überproduktion" wie bei vielen anderen neuronalen Strukturen stattgefunden hat.

Neurotransmitter-Synthese: Neurotransmitter sind chemische Überträgerstoffe, die den Nervenreiz an den Synapsen im Zentralnervensystem (ZNS) und peripheren Nerven auf chemischem Wege weiterleiten. Das Neuron enthält die zur Synthese seines Transmitters notwendigen Enzyme und spezielle Vesikel zu seiner Speicherung.

Beispiele für Neurotransmitter: Zur Zeit sind ca. 40 Substanzen bekannt, denen Neurotransmitter- und Neuromodulator-Funktion zugeschrieben wird.

Tab. 2 zeigt eine Gruppeneinteilung nach JOHNSTON und SINGER (1982) mit einigen Beispielen.

Tab. 2: Mutmaßliche Neurotransmitter und Neuromodulatoren im ZNS (nach JOHNSTON und SINGER 1982) .

- |                |   |
|----------------|---|
| 1. Amine       | (z.B. Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin, Acetylcholin).   |
| 2. Aminosäuren | (z.B. Gamma-Aminobuttersäure, Glyzin, Taurin, Glutamat).  |
| 3. Peptide     | (z.B. Enkephalin, Beta-Endorphin, Oxytocin, Somatostatin, adrenokortikotropes Hormon ACTH, thyreotropes releasing Hormon) |

Als vierte, in der Tab. nicht aufgeführte Gruppe, werden als "sonstige Substanzen" Prostaglandin, Corticosteroide, Östrogene, Testosteron und Adenosin diskutiert.

Für die Hirnfunktion spielen neben den Neurotransmittern die Neuromodulatoren eine wichtige Rolle. Das Konzept der Neuromodulation ist erst unvollkommen entwickelt. Fest steht bisher nur, daß Neuromodulatoren die Neurotransmitterwirkung zu modifizieren vermögen. Einige Substanzen können sowohl Neurotransmitter- als auch Neuromodulator-Funktion übernehmen. Neuromodulatoren stellen das molekulare Bindeglied zwischen nervöser und hormonaler Regulation dar.

Definitionskriterien: Für die Klassifizierung einer Substanz als Neurotransmitter sind umfangreiche Definitionskriterien erarbeitet worden; beispielsweise, daß die Substanz im präsynaptischen Bereich der Nervenzelle vorhanden und auch speicherbar sein soll in speziellen synaptischen Vesikeln, die dabei ihre strukturelle Integrität bewahren. Außerdem sollte durch eine Stimulation die Freisetzung der Substanz in den Synapsenspalt bewirkt werden und die anschließende Aufnahme über spezifische Inaktivierungsmechanismen vorhanden sein, entweder ein Enzym oder Wiederaufnahme-Mechanismen (Re-uptake).

Die Neurotransmitter-Übertragung an Synapsen zeigt Abb. 6.

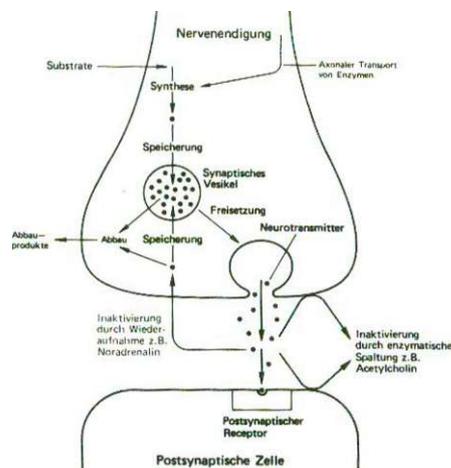


Abb. 6 : Schematische Darstellung der Neurotransmitter-Übertragung an Synapsen nach JUNGERMANN und MÖHLER (1980) . Oben: Präsynaptische Zelle mit einem Vesikel, in dem Neurotransmittersubstanz gespeichert ist (Granula). Mitte: Vesikel, das gerade seinen Inhalt in den Synapsenspalt abgibt, Aufnahme des Neurotransmitters über einen postsynaptischen Rezeptor in die postsynaptische Zelle.

Oben sieht man die präsynaptische Zelle (Neuron I) mit einem Vesikel, in dem Neurotransmittersubstanz gespeichert ist (Granula); ferner sieht man ein Vesikel, das gerade seinen Inhalt in den Synapsenspalt abgibt sowie die Aufnahme des Neurotransmitters über einen postsynaptischen Rezeptor in die postsynaptische Zelle (Neuron II) . Gleichzeitig ist die aktive Wiederaufnahme (Re-uptake) des Neurotransmitters in Neuron I angedeutet, d.h. Inaktivierung durch Re-uptake (links im Bild), und eine andere Art der Inaktivierung (rechts **im** Bild) durch Spaltung.

Bedeutung: Noch vor ein paar Jahren wurde die Biochemie der Neurotransmitter völlig isoliert von der Neuroanatomie betrachtet. Anatomie des Gehirns und Neurotransmitterfunktion sind jedoch nicht voneinander zu trennen. Die alleinige Betrachtung der Morphologie des Gehirns, selbst elektronenoptisch, hat häufig bei geistiger Behinderung und vielen Erkrankungen des Zentralnervensystems zu keiner Klärung der Ätiologie geführt. Nach einem Überblick der American Academy of Pediatrics (COURSIN 1975) nehmen unter allen Erkrankungen im Kindesalter die Erkrankungen des Nervensystems an Häufigkeit und Bedeutung ständig zu und werden bald zu den Hauptproblemen der Pädiatrie werden. Die weitere Erforschung der Neurotransmittersubstanzen und ihres faszinierenden Stoffwechsels wird zweifellos einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese einiger Erkrankungen und Funktionsstörungen des ZNS liefern. Beispielsweise könnten Enzymdefekte im ZNS als Ursache bisher nicht geklärter und/oder nicht behandelbarer Behinderungen in Frage kommen.

Eines Tages wird es möglich sein, Neurotransmittersubstanzen im Liquor routinemäßig nachzuweisen und dadurch spezielle Stoffwechselstörungen zu diagnostizieren und möglicherweise auch eine gezielte Therapie zu überwachen.

Es ist bekannt, daß die Neurotransmittersynthese im Gehirn durch die Nahrungszusammensetzung beeinflusst wird (GROWDON und WURTMAN 1978; COHEN und WURTMAN 1979). So fluktuiert die Konzentration von Tryptophan, einer Vorstufe von Serotonin, und der meisten anderen Aminosäuren in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme. Über die Funktion des Serotonin herrscht noch Unklarheit; es scheint an der Regulation des Schlafes beteiligt zu sein (HUCHO 1982). Der Tryptophanspiegel im Gehirn erhöht sich beispielsweise nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit. Das ist zum Teil dadurch bedingt, daß Insulin nicht nur den Blutzucker erniedrigt, sondern auch die Plasmakonzentration der meisten Aminosäuren, jedoch nicht des Tryptophan. Eine eiweißreiche Mahlzeit (das Eiweiß in fast allen Nahrungsmitteln enthält durchschnittlich weniger als 1 % Tryptophan nach Gewicht) erhöht die Plasmakonzentration anderer neutraler Aminosäuren wie Tyrosin und Leuzin; diese konkurrieren mit Tryptophan bei dem Übertritt in das Gehirn. Je höher also der Eiweißgehalt einer Nahrung, um so schwieriger ist es für das Tryptophan, in das Gehirn überzutreten. Deshalb überrascht es nicht, daß **Nahrungsmanipulationen** bestimmte neurologische oder geistige Störungen beeinflussen (GROWDON und WURTMAN 1978).

Kürzlich berichtete SCHNEIDER-HELMERT (1982) von einer erfolgreichen Behandlung chronifizierter Insomnien mit Tryptophan, einer Vorstufe des Serotonins. Dabei handelt es sich um eine Langzeittherapie zur Korrektur gestörter Regulationen von kausalem Charakter.

Über die Funktionsreifung der komplizierten Neurotransmittersysteme ist bisher erst wenig bekannt. Wann beginnt eine effektive Neurotransmission im Verlaufe der Hirnentwicklung? Hierüber sind die Forschungen beim Menschen noch im Anfangsstadium. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von BROOKSBANK et al. (1981) interessant, die unter anderem die Entwicklung des Gamma-Aminobuttersäure (GABA)ergen Systems in der Großhirnrinde und im Kleinhirn beim Feten und Säugling untersuchten. Sie fanden eine altersabhängige Zunahme der GABA-Spiegel im Gehirn, die die Dichte der GABAergischen Innervation widerspiegeln. Die GABA-Rezeptorkonzentration, ermittelt anhand der Muscimol-Bindungskapazität, stieg ebenfalls mit zunehmendem Alter an; sie zeigte am normalen Geburtstermin in der Großhirnrinde ca. 45 % und mit etwa 20 Wochen die vollen Erwachsenenwerte.

Vielleicht werden künftig neue bildgebende Verfahren, wie z.B. die Nuklear-Magnet-Resonanz-Tomographie (NMR), auch Informationen über die Stoffwechselfvorgänge im Gehirn liefern und damit über die rein morphologische Diagnose hinausgehen. Die NMR ist eine nichtinvasive Methode, die auf der Wechselwirkung von Atomkernen mit Hochfrequenzstrahlen in einem Magnetfeld beruht (HABERMEHL und GRAUL 1982; WINKLER 1982). Sie ermöglicht räumlich differenzierte Informationen über die Magnetresonanz körpereigener Atomkerne in vivo und deren bildliche Darstellung.

##### 5. Intrauterine Wachstumsretardierung des Kopfumfanges als Ausdruck einer Entwicklungsverzögerung des Gehirns bei Mangelversorgung des Feten

In den heutigen Industrienationen, in denen die Mangelernährung der Schwangeren oder des Säuglings praktisch keine große Rolle mehr spielt, stehen dafür die Mangelversorgung des Feten infolge unzureichender Nährstoffzufuhr bei Mehrlingsschwangerschaft oder bei gestörter Plazentafunktion sowie bei hohem Zigarettenkonsum der Mutter im Vordergrund. Insgesamt kommt ein Drittel aller Kinder

mit einem Geburtsgewicht unter 2500 g als Mangelgeborene - d.h. mit einem bezogen auf die jeweilige Schwangerschaftsdauer zu niedrigen Geburtsgewicht - auf die Welt. Die Meinung, daß Mangelernährung in einem frühen Alter das Gehirn verschont, ist noch immer überraschend weit verbreitet in unserer heutigen Lehre. Allerdings wird das Gehirn von Mangelernährung in einem geringeren Ausmaß betroffen als andere Organe. Die Ernährung zur Zeit des Hirnwachstumsspurts spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Funktion des ZNS. Mangelernährung kann sich nachteilig auf die Entwicklung und die Funktion des ZNS auswirken. Das hohe Vorkommen zerebraler Bewegungsstörungen und geistiger Behinderung bei Frühgeborenen in den 50 -er Jahren wird u.a. auf die damals übliche spät einsetzende und niederkalorische Ernährung nach der Geburt zurückgeführt (DRILLIEN 1964).

Als Folge schwerer Mangelernährung wird beispielsweise eine gestörte Dendritenbildung angesehen und damit die gestörte Ausbildung von Synapsen, dem Sitz der Neurotransmittermoleküle (COHEN und WURTMAN 1979). Nach DOBBING (1979) kann durch Mangelernährung beispielsweise die Anzahl der Synapsen pro Neuron bis zu 40 % vermindert sein. Mangelernährung kann sich auch auf die Neurotransmittersynthese auswirken (COHEN und WURTMAN 1979). Schwankungen in der Verfügbarkeit von Neurotransmitter-Precursoren für Neuronen können dramatische Folgen für die Synthese und Spiegel dieser Neurotransmitter haben. Vieles weist darauf hin, daß Mangelernährung in einem frühen Alter ein sehr wichtiger nichtgenetischer Faktor ist, der die Entwicklung des Zentralnervensystems und damit die intellektuelle Leistungsfähigkeit beeinflusst (BALÄ'ZS 1979) .

#### 6. Aufholwachstum des Kopfumfanges nach intrauteriner Mangelernährung

Bis in die Mitte der siebziger Jahre ist über das Aufholwachstum des Kopfumfanges Früh-Mangelgeborener in der Literatur nichts bekannt gewesen. Noch vor wenigen Jahren hat man es sogar für unmöglich gehalten. 1974 ist mir bei der Auswertung der seit 1967 durchgeführten Bonner Longitudinalstudie eine Gruppe von **Mangelgeborenen** aufgefallen, die erstmals postnatales Aufholwachstum des Kopfumfanges, begünstigt durch früheinsetzende und energiereiche Ernährung, zeigte (BRANDT und SCHRÖDER 1974). Diese erste Beobachtung hat sich

inzwischen in weiteren Fällen bestätigt (BRANDT 1975, 1981). Es gelingt heute, die Entwicklung von solchen im Mutterleib mangel ernährten Kindern durch angemessene Ernährung unmittelbar nach der Geburt und durch günstige Umweltbedingungen wie liebevolle Zuwendung und reichliche Anregungen durchaus so weit zu fördern, daß sie regelrecht verläuft.

#### 7. Schlußfolgerungen

Unsere Kenntnisse der Entwicklungsvorgänge im Gehirn und ihrer Abweichungen - insbesondere während des Wachstumsspurts - werden künftig durch verfeinerte neuro-biochemische Techniken erweitert werden können. Aus diesen Erkenntnissen können sich therapeutische Konsequenzen ergeben.

Die Anwendung neuer bildgebender Verfahren, beispielsweise der Nuklear-Magnet-Resonanz-Tomographie (NMR), wird nicht nur Informationen über die Morphologie, sondern auch über Biochemie und Stoff **Wechsel** im Gehirn liefern. Solche nichtinvasiven Methoden, mit denen keinerlei Strahlenbelastung verbunden ist, ermöglichen auch wiederholte Untersuchungen zur Beurteilung der Entwicklungsvorgänge. Nach dem derzeitigen Wissensstand ist das Risiko nicht größer als bei der Ultraschall-Diagnostik.

Auf jeden Fall stehen wir erst am Anfang tieferer Einblicke in die faszinierenden Funktionsmechanismen des Zentralnervensystems, die uns auch neue diagnostische und therapeutische Wege weisen. In diesem Zusammenhang sind auch die aufsehenerregenden Tierexperimente von FREED et al. (1980) zu erwähnen, in denen es zum ersten Mal gelungen ist, bei Ratten fetale, den Neurotransmitter Dopamin produzierende Neuronen aus der Substantia nigra erfolgreich auf die Gehirne erwachsener Tiere zu transplantieren, in denen der entsprechende Funktionsbereich zerstört war. Die transplantierten spezifischen Neurotransmitter-Neuronen wuchsen an, überlebten bis zur Tötung der Tiere und führten zu einer Wiederherstellung der dopaminergischen Funktion. Man bedenke nur, welche Bedeutung eines Tages vielleicht Transplantationen bei Menschen mit funktionslos gewordenen Hirnteilen haben können. Auf jeden Fall stehen wir erst am Anfang einer Zeit, in der neue Erkenntnisse über die Entwicklung und Funktionsreifeung des kindlichen Nervensystems gewonnen werden mit Konsequenzen für die Diagnostik und Therapie ihrer Störungen.

Literatur bei der Verfasserin

Diskussion

Herr PORCHER: Welche begleitenden medikamentösen Maßnahmen wurden bei dieser Übertragung dopaminerger Systeme, dieser Art Gehirntransplantation im Mikromaßstab, durchgeführt? Gibt es hier keine Abstoßungsreaktionen, Nekrosen o.a.?

Frau BRANDT: Das Gehirn ist ein immunologisch privilegierter Transplantationsort, da es keine Lymphbahnen besitzt und Abstoßungsreaktionen damit selten sind. Bei diesen Ratten hat man im Alter von 4-5 Monaten die betreffenden Hirnregionen in der Substantia nigra zerstört und anschließend mit speziellen Tests nachgeprüft, ob die Funktion wirklich aufgehört hat. Anschließend wurden embryonalen Ratten im Alter von 17-18 Tagen die entsprechenden Dopamin-produzierenden Neuronen entnommen und in die Ventrikel-Region jener Tiere injiziert, denen man zuvor die Substantia nigra zerstört hatte. Diese fetalen Neuronen wuchsen an und sandten Sprossen zum Nucleus caudatus aus; in der Umgebung des Transplantates fand man sogar ein Übermaß an Dopamin, weil diese Zellen wahrscheinlich überschießend gesproßt haben. Als die Ratten im Alter von 10-12 Monaten getötet wurden, sah das transplantierte Gewebe jünger aus.

Herr BECKMANN: Was verstehen Sie unter energiereicher Ernährung? Ist das nur eine hochkalorische Ernährung oder stellen Sie da bestimmte Anforderungen?

Frau BRANDT: Unter energiereicher Ernährung verstehe ich eine hochkalorische Ernährung. Der englische Professor TISSARD hat sich 1972 auf einem Schweizer Kongreß dafür eingesetzt, daß man Frühgeborene und besonders Mangelgeborene frühzeitig und reichlich ernähren sollte.

Herr BECKMANN: Die Ernährung müßte wohl überwiegend aus Fetten bestehen, da sonst wohl kaum die kalorischen Werte erreicht werden könnten.

Frau BRANDT: Diese Kinder sind mit einer an die Frauenmilch adaptierten Kuhmilch ernährt worden, die besonders den erhöhten Eiweißbedürfnissen Frühgeborener entspricht. Zusätzlich erhalten diese Kinder ein orales Dextrosepräparat. Wichtig ist nur, daß den Risiken in der Perinatalperiode, wie beispielsweise der Hypoglykämie, mit einer früh einsetzenden energiereichen Ernährung begegnet wird.

Herr BECKMANN: Ihre Untersuchungen finden z.T. eine sehr gute Bestätigung durch Ergebnisse, die der Ernährungswissenschaftler KREMER in Gießen vor Jahren in Kolumbien herausgefunden hat. Desweiteren erwähnten Sie MÖBIUS aus dem Jahre 1923. Dieser hat sich ja nicht nur auf den kleineren Kopfumfang der Frau bezogen, sondern auch auf das niedrigere Hirngewicht und die flachen Hirnwindungen. Glücklicherweise fanden diese Vorstellungen keine Bestätigung. Das nur zur Rehabilitation vieler tüchtiger Kolleginnen.

Frau BRANDT: Ich danke Ihnen sehr, Herr BECKMANN. Diese Ansichten von MÖBIUS wurden in zahlreichen Publikationen widerlegt.

Herr THEURER: Die Stimulierbarkeit der Eiweiß-Synthese im Gehirn mit zytoplasmatischen Faktoren ist experimentell bewiesen. Ebenso liegen Ergebnisse über die Differenzierungsmöglichkeiten von Zellen vor. Meine Anregung zielt deshalb dahin, in der Perinatalperiode noch zusätzlich medikamentöse Impulse zu setzen. Richtige Ernährung ist selbstverständlich unabdingbar für normales Wachstum. Ich hatte deswegen schon vor Jahren in München vorgeschlagen, bei entwicklungs-gestörten Kindern mit chromosomalen Aberrationen oder genetischen Defekten, insbesondere beim DOWN-Syndrom, gleich nach der Geburt eine derartige Organotherapie mit Stimulierungsfaktoren durchzuführen.

Frau BRANDT: Ich verfüge zwar über keine eigenen Erfahrungen, habe mich aber vorhin mit Herrn WEINMANN darüber unterhalten. Ich kann nur sagen, daß die Stimulation sich günstig auf die Hirnentwicklung auswirkt. Förderung auf allen Gebieten ist sicher von Nutzen. Von DOBBING in Manchester wird über die "heilende Wirkung" einer an Anregungen reichen Umgebung auf die Entwicklungsverzögerung durch zu schlechte Ernährung berichtet.

Herr THEURER: Unsere zytoplasmatische Therapie wirkt im Grunde genommen nur bei Erkrankungen mit Defekten. Bei normaler genetischer Tendenz für die Entwicklung bedarf es keiner Behandlung. Mehr, als der gesunde Organismus zu leisten vermag, ist unnatürlich. Das wäre eine Überfunktion und damit ins Pathologische einzuordnen. Wir wollen Normalisierung und keine Überfunktion. Aber gerade in jenen Fällen, wo das durch Ernährung allein nicht mehr zu schaffen ist, beispielsweise bei den genetisch und chromosomal bedingten Defekten, sind weitere therapeutische Möglichkeiten gefordert. Inwieweit hier Verbesserungen der Situation eintreten können, ist allerdings nur durch große statistische Vergleiche zu erfassen.

AUDITORIUM: Genügt es nicht, die Dilutionen auch oral zu verabreichen?

Herr THEURER: Die orale Anwendung ist eine therapeutische Möglichkeit, weil es nicht angenehm ist, diese kleinen Kinder dauernd zu spritzen. Andererseits führen wir bei diesen Säuglingen sowieso Infusionen durch und können der Infusionsflüssigkeit auch zytoplasmatische organspezifische Faktoren zusetzen.

AUDITORIUM: Noch ein Hinweis zu dem Thema der Differenzierungsanregung: Wir haben im vergangenen Jahr einen Wirkstoff synthetisiert, der ursprünglich aus der "Grünen Hydra", jenem kleinen Organismus, der im Süßwasser lebt, isoliert wurde. Dieser Faktor bewirkt die Differenzierung des Kopfteiles in die Tentakeln.

Dieser Stoff ist ein Peptid aus 9 Aminosäuren und führt schon in einer  $10^{-13}$  molaren Konzentration zu dieser Tentakelbildung, über monoklonale Antikörper wurde dieser sog. Kopfaktivator in den verschiedenen Organismen bis hinauf zum Menschen identifiziert. Die Wahrscheinlichkeit ist groß, daß dieser Kopfaktivator generell ein Differenzierungsprinzip der Nervenzellen ist und die Evolution von den niedersten Organismen bis hinauf zum Menschen mitgemacht hat und damit von fundamentaler Bedeutung ist.

Frau BRANDT: Ich habe den Vortrag "über den Kopfaktivator bei der grünen Hydra von Frau SCHALLER in Hamburg vor zwei Jahren gehört. Bisher ist es unklar, welche Funktion dieser "Kopfaktivator" in Säugetieren hat; Aminosäure-Zusammensetzung und Sequenz sind mit keinem bisher bekannten Neuropeptid identisch.

Herr BONNET: Wird das Hirnwachstum auch dann ungünstig beeinflusst, wenn die Mutter z.B. in der Schwangerschaft längere Bettruhe einhalten muß? In einem Ihrer Dias hatten Sie gezeigt, daß die Myelinisierung, z.B. vom Stato-acusticus System, sehr früh erfolgt. Ich könnte mir vorstellen, wenn das vestibuläre System nicht angeregt wird, daß dann auch die Hirnmasse kleiner bleibt, als wenn die Mutter auf sein kann, sich normal bewegt und körperlich aktiv ist.

Frau BRANDT: Das ist eine sehr wichtige Frage. Die Bettruhe spielt gerade bei Schwangerschaftsstörungen eine sehr große Rolle. Gott sei Dank bewegt sich der Fetus im Uterus recht lebhaft, wie man heute von Längsschnitt-Untersuchungen mit hochleistungsfähigen Ultraschall-Geräten weiß. Der kleine Kerl übt seine Muskeln im Mutterleib, auch wenn die Mutter ruhig liegt. Dagegen wird die körperliche Aktivität des Feten durch Zigarettenrauchen der Mutter nachweislich beeinträchtigt. HANSMANN in Bonn hat Müttern Bettruhe verordnet, bei denen der Fetus im Wachstum retardiert war. Mit 30 postmenstruellen Wochen beispielsweise will man eben noch nicht so gern entbinden. Im Ultraschall konnte nun nachgewiesen werden, daß sich in einigen Fällen das intrauterine Wachstum wieder normalisierte, d.h. der Fetus Aufholwachstum zeigte. Selbst Mütter, die 4-5 Monate im Bett verbringen mußten, weil die Schwangerschaft bedroht war, haben gesunde Kinder zur Welt gebracht.

Herr DERBOLOWSKY: Aus meinem eigenen Bereich habe ich noch anzumerken, daß unter den Behinderten, die sog. seelischen Behinderungen mit Verhaltensstörungen und Lernbehinderungen eine große Rolle spielen, vor allem bei den prognostischen Erhebungen, überhaupt habe ich den Eindruck, daß diese Untersuchungsergebnisse auf die noch immer bestehenden Hypothesen bei der Neurose- und Psychoseentstehung und deren therapeutischer Beeinflussbarkeit einen großen Einfluß ausüben werden. Man muß eben wahrscheinlich nicht nur die genetische Komponente betrachten -

was ja schicksalhaft sein kann -, sondern man muß auch solche peristatischen Ereignisse in der Frühkindheit mit berücksichtigen. Bei der prognostischen Beurteilung für die Therapie ist es sicher wesentlich, daß die Schäden, die man behandelt, alle erst später entstanden sind und im Grunde genommen nicht als irreversibel betrachtet werden müßten, wenn ich das richtig verstanden habe. Ich halte diese Erkenntnisse jedenfalls für überaus wesentlich für die Psychiatrie oder die dynamische Psychiatrie und bin deshalb über Ihre Ausführungen, Frau BRANDT, sehr dankbar.

## Biologische Alternativen in der Veterinärmedizin

H. KRAFT, München; D. MARHOLDT, Leverkusen;  
H. BURGHARD, St. Ingbert/Saar;  
G. KNECHT, München-Grünwald.

Zusammengestellt von H. KRAFT, München.

Beunruhigungszustände, Angst und Störungen am vegetativen Nervensystem sind auch beim Tier häufige "Krankheitsursachen". Sie zu erkennen ist nicht immer einfach. Oft sind sie auch mit Organschäden vergemeinschaftet oder von deren Symptomatik verschleiert. Bleiben sie unbeachtet und werden nicht therapiert, so können andere Erkrankungen oft nicht geheilt werden, und die Tiere bleiben ihr Leben lang "Angstbeißer" oder haben Untugenden, wie der Mensch das gern nennt. In vielen Fällen kann aber gerade hier mit der zytoplasmatischen Therapie geholfen werden, wie KRAFT, München, vorträgt.

Als Grundtherapie, unabhängig von einer gezielten Organtherapie, zur "Beruhigung" des Patienten, sind die Präparate NEYTHROPH und NEYCALM zu empfehlen. Von der Zusammensetzung her das erstere mehr für die Behandlung peripherer Nerven- und Muskelschwächen geeignet, kann man das zweite eher zur Dämpfung vegetativer Prozesse verwenden. Beide Präparate enthalten Epiphyse, die auch als Einzelpräparat verwendbar ist. Aber die Kombination ist praktischer. Nur sollte man, worauf auch WIRSAM beim Menschen hinweist, darauf achten, daß nicht "eine gewisse Agitiertheit" durch NEYTROPH ausgelöst wird, dann ist NEYCALM vorzuziehen. Man kann bei zu intensiver Wirkung auch die einzelnen Organe auswählend verwenden und den Anteil des ZNS bzw. Epiphyse dadurch reduzieren. Das Verfahren ist abhängig von der Situation, in der der Patient sich befindet. Wenn als Ursache eine Funktionsstörung eines Organes erkannt wurde, so erscheint es sinnvoll, das Organ gezielt zu behandeln und dazu z.B. Epiphyse (Dil.Nr. 23) zu geben. Auch die Einzelverwendung oder Kombination von Gehirnrinde-Großhirn (Dil.Nr. 11), Zwischenhirn (Dil.Nr. 12, 36), Hypophyse-Zwischenhirn (Dil.Nr. 51) hat sich bewährt. Letzteres z.B. beim Fellfressen bei Chinchilla.

Von den Kombinationspräparaten zeigten je nach Indikation NEYGERONT, NEYNORMIN, NEYGLUC, ANTIFOCAL oder NEYTHYMUN sehr gute Heilungserfolge. Es ist aber bei der Anwendung grundsätzlich die Zusammensetzung zu berücksichtigen, da die einen Präparate mehr in Richtung "vegetative Dystonie", die anderen in Richtung "Dämpfung sympathikotoner Übererregbarkeit" oder mehr "endokriner Störung" wirken.

Bei den sog. Untugenden, z.B. Zungenspielen beim Rind, Weben der Pferde, haben sich Epiphysen-Präparate bewährt. Man kann Dil.Nr. 23, aber auch NEYCALM oder NEYTROPH geben. Es ist daran zu denken, daß meist eine lange Behandlung erfolgen muß, bzw. wiederholte "Kuren" notwendig sind. Da es keine chemischen Arzneimittel mit dieser Wirkungsrichtung gibt, ist die Anwendung der zytoplasmatischen Therapie das Mittel der Wahl.

Die Erfahrung hat gezeigt, daß sich die parallellaufende Applikation von Plazenta (z.B. Dil.Nr. 70) - als Gleitschiene, wie es ULLRICH einmal nannte - sehr bewährt hat.

In den Fällen, wo entsprechende Symptome darauf hinweisen, daß eine Sensibilisierung zumindest mitverursachend für die Erkrankung ist, sollte man die Gegensensibilisierung (GS) zusätzlich durchführen. Dies gilt ganz besonders bei Juckreiz unklarer Genese. Es sei aber hier wieder, wie schon früher, darauf hingewiesen, daß die GS nur wirkt, wenn keinerlei Organerkrankungen Mitverursacher des Juckreizes sind, bzw. die Organschäden gleichlaufend behandelt werden.

1. Beispiel; Behandlungsplan beim Hund mit allgemeinem Juckreiz (ohne Organerkrankung)

1.	Gründliche klinische Untersuchung (cave Aujeszky'sche Krankheit!), einschließlich Untersuchung der Analbeutel.		
	Labor: Blutbild, Hautabstrich, Kot. Ca : P - Verhältnis, Harnstatus.		
2.	Therapie:		
	Dil.Nr. 5 (Haut)	Dil.Nr. 70 (Plazenta)	GS
1. Tag	2 ml s.k.		Blutentnahme
2. Tag		2 ml	
3. Tag	2 ml		
4. Tag		2 ml	0,2 ml $10^{-12}$ i.k.
5. Tag	2 ml		
6. Tag		2 ml	0,2 ml $10^{-12}$

7. Tag ab hier können die Dilutionen  
auch oral weiter gegeben werden.

8. und 10. Tag GS: je 0,2 ml  $10^{-10}$   
12. und 13. Tag je 0,2 ml  $10^{-8}$   
-3

usw. bis 10 , dieser Rest könnte auch 3 mal täglich oral je  
1 bis 2 ml verabreicht werden.

Nach Abschluß der Behandlung mit Haut (Dil.Nr. 5) kann noch  
Trockensubstanz Nr. 5 gegeben werden.

2. Beispiel: Behandlungsplan "innere Unruhe", Unrast, vegetative  
Dystonie, Schreckhaftigkeit, mangelnde Schußfestig-  
keit u.ä. bei Hund und Pferd.

1. Gründliche Anamneseerhebung auch in Richtung Unfall.
2. Gründliche klinische Untersuchung einschl. neurologischer Un-  
tersuchung; EKG. Labor: Blutbild, Blutzucker, Gesamteiweiß,  
Ca : P - Verhältnis, Harnstatus, Kot.
3. Therapie: Dil.Nr. 96 (NEYTROPH) und/oder nur Dil.Nr. 98  
(NEYCALKM)  
in zweitägigem Intervall je 2 ml s.k. 5 bis 10 Ampullen. Nach  
der 3. Injektion kann auch oral weiter behandelt werden. Falls  
Symptome einer gewissen Aggression auftreten (einmal bei einem  
Hund nach der 3. Injektion der obigen Kombination beobachtet),  
NEYTROPH absetzen und mit NEYCALKM allein bzw. mit NEYCALKM und  
den entsprechenden Organanteilen ohne ZNS und Epiphyse, also  
nur mit Dil.Nr. 3, 6, 29 behandeln.

MARHOLDT, Leverkusen, berichtet über die Behandlung einer 27jähri-  
gen Eisbärin mit seit 7 Jahren bestehendem und therapieresistentem  
Juckreiz am Kopf, an der Brust und an den Vordergliedmaßen. Infol-  
ge ständigen Kratzens sind die befallenen Körperpartien fast haar-  
los geworden, stellenweise mit grau-braunen Borken bedeckt, und  
die durchschimmernde dunkel pigmentierte Haut läßt den sonst gelb-  
lich-weißen Bären am Vorderteil dunkelgrau erscheinen. Die Unver-  
sehrtheit der übrigen, in ständigem engem Kontakt mit dem erkrank-  
ten Tier lebenden Eisbären und der negative Befund mehrfach unter-  
suchter Proben von Hautgeschabsel ließ eine parasitäre und myko-  
tische Genese ausschließen.

Der Verdacht auf Trichinose konnte ebensowenig bestätigt werden, wie der Nachweis einer beim Eisbär 1980 erstmalig von FOWLER beschriebenen Milbenart (*Ursicoptes americanus* aus der neuen Familie *Audycoptidae*).

Der Bärin wurden in 3tägigem Abstand 5 mal Dil.Nr. 5 N II per Blasrohr (miniject) verabreicht. Zu einer nochmaligen, und wie sich zeigen sollte, negativen Untersuchung der Haut auf Parasiten, wurde das Tier dann mit IMMOBILON, einem in geringster Dosis (1,2 ml für 350 kg KGW) tief narkotisierenden Morphinabkömmling - Etorphin - immobilisiert und dabei 15 ml Blut zur GS aus der Unterzungenvene entnommen. Anschließend ließ sich die Narkose mit dem Antidot REVIVON schnell wieder aufheben.

Gegensensibilisierung wurde an 8 aufeinander folgenden Tagen, beginnend mit der schwächsten Lösung, durchgeführt. Das übliche Setzen intrakutaner Quaddeln läßt sich verständlicherweise am unseidierten Bären nicht durchführen. Deshalb wurden jeweils 2 ml Verdünnung per Blasrohr am Hals oder an der Vorbrust vermutlich subkutan, möglicherweise auch intramuskulär verabreicht. Der Eisbär besitzt ein dickes Unterhaut-Fettpolster, in das die seitlich gelegene Austrittsöffnung an der Kanüle des miniject-Projektils ca. 20 mm tief eindringt, so daß nicht genau gesagt werden kann, ob die Injektionsflüssigkeit s.k. oder i.m. deponiert wird; sicher nicht i.k.. Nach Beendigung der Gegensensibilisierung wurden mit der gleichen Methode Revitorgan Trockensubstanzen Nr. 5, 65 und 71 injiziert. Glücklicherweise ist die Teilchengröße der Aufschwemmung noch so klein, daß sie das Lumen der 1,2 x 50 mm starken Kanüle für das miniject-Projektil ungehindert passiert und zu einer ausreichend schnellen Entleerung des Spritzenkörpers führt.

Zwei Monate nach Abschluß der Behandlung begannen die Haare nachzuwachsen, das nur noch geringgradige Kratzen hörte ganz auf, die Bärin zeigte Brunsterscheinungen, wurde zweimal gedeckt und läßt auf Nachwuchs hoffen.

Der gleiche Autor berichtet noch über die Behandlung der sog. Tigerkrankheit - einer chronischen Gastro-Enteritis - bei zwei sibirischen Tigern mit Revitorgan Dil. Nrn. 14, 31, 47, 64 N und 71, jeweils Stärke II. Die GS erfolgte nach der gleichen Methode wie beim Eisbären beschrieben. Außerdem wurde Trockensubstanz Nr. 31,

33, 47 und 65 gegeben. Der Allgemeinzustand der beiden Tiere hatte sich bis zur Berichterstattung gebessert.

BURGHARD, St. Ingbert/Saar, macht umfassende Ausführungen über die Genese und Therapie von Hauterkrankungen beim Hund. Der Autor weist darauf hin, daß nur eine "gezielte Polypragmasie" in den meisten Fällen zum Ziel führt. Diätetische Maßnahmen, Homöopathie, Neuraltherapie, Akupunktur, die GS und die Anwendung von zytoplasmatischen Substanzen haben sich in seiner Praxis bewährt.

Zunächst wird das für die Gegensensibilisierung benötigte Blut entnommen. Anschließend bekommt der Patient eine Dosis Sulfur C 30 und sofern eine allopathische Vorbehandlung erfolgte, auch eine Dosis Nux vomica C 30. Anschließend wird mit der zytoplasmatischen Therapie begonnen. Im Wechsel werden NEYNORMIN (Dil.Nr. 65) und Dil.Nr. 5 (Haut) im Abstand von 3 Tagen je 5 ml injiziert. An den injektionsfreien Tagen erhalten die Patienten die Lingualpräparate FEGACOREN (Dil.Nr. 61) und NEYNORMIN (Dil.Nr. 65) im Wechsel. Hündinnen bei Bedarf NEYFAM (Dil.Nr. 60), Rüden NEYMAN (Dil.Nr. 35) dazu. Zur Normalisierung der Immunreaktion wird auch der Einsatz von NEYTHYMUN f + k (Dil.Nr. 29 f + k) und bei alten Hunden NEYGERONT (Dil.Nr. 64) erwogen. Bei Atopien und immunpathologischen Autoaggressionskrankheiten kommt Dil. NEYDESIB (Nr. 78) hinzu. Danach beginnt die Gegensensibilisierung, die wie beschrieben durchgeführt wird. Falls am Ende dieser Kur alle pathologischen Hauterscheinungen verschwunden sind, wird auf die Verabreichung der Trockensubstanzen verzichtet. Sie haben sich beim Hund in den meisten Fällen als entbehrlich erwiesen. Sollten sie dennoch benötigt werden, kommen die Dil.Nrn. 5 (Haut), 20 (Nebenniere), NEYNORMIN und evtl. auch FEGACOREN oder NEYTHYMUN in die Wahl.

KNECHT, München-Grünwald, berichtet über die Behandlung inoperabler Tumoren beim Hund mit der zytoplasmatischen Therapie.

Die Behandlung wird eingeleitet mit täglich wechselnden Gaben aus maternem Plazentaanteil in Dilutionsform Stärke III, 2 bis 5 ml je nach Patientengröße sowie um das Immunsystem zu stimulieren mit Thymusextrakten als Dilutionen der Stärken II und III je 2 ml sowie mit gemischten Dilutionen aus Knochenmark und Milz, jeweils 2 ml der Stärke II. Dabei fiel auf, daß die i.v. Applikation der genannten Dilutionen in diesen Fällen einen besseren und **rascheren**

therapeutischen Effekt erbrachte, als die sonst geübte intrakutane und subkutane Injektion. Bereits nach 10 bis 12-tägiger Behandlung mit solchen i.v. Injektionen ging man dazu über, die genannten Organsubstrate in Form der sogenannten Trockensubstanzen in meist nur 2 bis 3 Sitzungen i.m. zu injizieren. Der dabei anfänglich aus Gründen eventueller anaphylaktischer Zwischenfälle eingehaltene Abstand von drei Tagen wurde bald als unnötige Vorsichtsmaßnahme wieder aufgegeben. Diese Behandlung wurde wiederholt in 3 bis 4-wöchigen Abständen bei Besserung des Allgemeinzustandes. Einen Teil der Patienten mit sehr guten Resultaten konnte inzwischen nach 4 bis 7 Behandlungen auf einen vierteljährlichen Behandlungszyklus gebracht werden. Reduktion der Leukozytenzahlen sowie die Steigerung der RFC-Zellen - nachweisbar im Rosettentest - sind objektive Anhaltspunkte. So wurden 148 Patienten im Laufe von 8 Jahren einer zytoplasmatischen Behandlung der oben genannten Art unterzogen. Bei allen Patienten wurde außerdem eine Kostumstellung auf rein pflanzlicher Basis durchgeführt und von einem Großteil der Patientenbesitzer auch mitgetragen. Als allgemein roborierende Therapie wurde zusätzlich mehrmals ein Mischpräparat appliziert, bestehend aus den Vitaminen A, D<sub>3</sub>, E, B<sup>1</sup>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sup>12</sup>-Cyanokomplex, Acethyl-Methionin, Lysin-Monohydrochlorid, Nicotinsäureamid, Natriumpantothenat und Cholinchlorid.

Zusammenfassende Darstellung der Behandlungsergebnisse:

Tumorart	Zahl d. Fälle	Überlebenszeit	Euthanasie	Tod durch and. Ursachen
Mammatumor	72	39 (54,16%) länger als 1,2 Jahre	25 (34,7%)	8 (11,1%)
Mammatumor + Metastasen Lunge u./od. Leber	29	11 (37,9%) 8 Monate 4 (13,8%) 4 Monate	14 (48,27%)	-
Prostata Ca + Metast. in Leber	10	6, davon 5 mehr als 1 J., Besserung 2-3 Wo.	3	1
Leber-Ca	10	6 5-9 Monate	1 2,8 J.	3

Die Behandlung im wesentlichen wie oben beschrieben, doch zusätzlich Dil. Leber von Feten und Jungtieren, Stärke I und II jeweils 0,5 bis 1 ml. Dies allerdings erst, nachdem aufgrund der Behandlung

eine Besserung des Allgemeinzustandes eingetreten war.

Osteosarkom	7	4	1	2	-
		-6 Mon. 1 J.			
Milzsarkome kamen relativ rasch ad exitum					
Fibrosarkom d. Haut	4	2	4 - 7 Mon	2	-
general. Lungentumore	4	2	kurzfr. Bess.	2	-
Pankreas-Ca	1	1	bisher 16 Mon.	-	-

Das Befinden von drei Melanosarkompatienten konnte deutlich gebessert werden mit zusätzlichen Präparaten aus fetaler Leber, die einen hohen zytostatischen Effekt, ähnlich den Deziduaextrakten haben. Nach Besserung und nunmehr immerhin 6 Monaten, 8 Monaten und 9 Monaten Überleben bei subjektiven Wohlbefinden wurden die drei Patienten auf die Behandlung mit einem Mischpräparat aus Diencephalon, Plac. mat., Funic. umbilic., Thymus juven., Gland. pinealis, Test. juv., Gland. supraren., Thyreoidea, Medull. oss., Pulmo, Hepar, Pankreas, Ren, Lien und Muc. intestinal., das als NEYTUMORIN auf dem Markt ist, umgestellt.

Drei Patienten mit Hodenkrebs überlebten alle um 2 Jahre und mehr. Auch bei ihnen wurde das Präparat NEYTUMORIN zusätzlich zur Standardbehandlung angewendet. Zwei von ihnen konnten sogar inzwischen einer Kastration unterzogen werden.

In acht Jahren wurden 141 Patienten mit inoperablen, malignen Tumorerkrankungen einer Behandlung mit zytoplasmatischen Substanzen unterzogen. Im Vergleich mit einer annähernd gleichen Zahl von unbehandelten Patienten konnte festgestellt werden, daß die mit zytoplasmatischen Substanzen behandelten Tumorerkrankten eine deutlich höhere Lebenserwartung haben und in dieser Zeit meist relativ beschwerdefrei sind.

### Diskussion

Herr BARTHOLD: Herr KNECHT, auch in meiner Praxis werden NEYTUMORIN Dilutionen postoperativ eingesetzt. Sollte die Konzentration nicht ganz ausreichen, insbesondere bei malignen Tumoren, nehme ich gern Ihre Empfehlung auf, das höher konzentrierte NEYTUMORIN-Sol einzusetzen.

AUDITORIUM: Herr BURGHARD, wird diese Diätkur, bestehend aus einer Hälfte Reis und einer Hälfte Sojaschrot, gekocht, gequollen oder gebrüht?

Herr BURGHARD: Die Diät wird roh verabreicht.

AUDITORIUM: Nun ist in der Dosennahrung, das habe ich selber auch schon festgestellt, ein sehr hoher Salzanteil. Trotzdem hat man den Eindruck, daß der Organismus noch salzbedürftig ist, denn der ausgeschiedene Kot ist "bockelhart" und weiß. Was meinen Sie?

Herr BURGHARD: Ich glaube, die Hunde trinken einfach zu wenig, um das Zeug richtig auflösen zu können. Feuchtfutter wäre hier besser.

Herr LEITENBERG: Ich möchte Herrn BURGHARD eigentlich zu seinem Mut beglückwünschen, Trockenfutter oder generell Fertigfutter nicht als das Mittel der Wahl zu bezeichnen. Seit Jahren möchte man uns glauben lassen, daß der Hund nur mit Trockenfutter leben kann. Ich frage mich immer wieder, wie der Hund überhaupt ins 20. Jahrhundert gekommen ist, ohne diese Segnung. Ganz sicher beschere uns diese Fertigfutter unendlich viele Probleme, nicht nur Hautprobleme, sondern auch intestinale Probleme, die sich ohne jede weitere Behandlung wieder zurückbilden, sobald man die Tiere nur auf eine angemessene Nahrung umstellt. Es ist ebenso sicher, daß man sowohl bei Hauterkrankungen, als auch bei intestinalen Erkrankungen homöopathisch und zytoplasmatisch sehr viel erreichen kann. Vielleicht noch ein Wort zur Analbeutel-Exstirpation. Gott sei Dank beantwortet der Hund die Exstirpation der Analbeutel nicht immer mit der Provokation einer Otitis. Das wäre schlimm! Aber in sehr vielen Fällen schafft man dem Hund große Erleichterung, wenn die chronisch infizierten Analbeutel chirurgisch entfernt werden.

Herr AMBRONN. Herr Kollege BURGHARD, die Behandlung der Dermatose mit der zytoplasmatischen Therapie und der Gegensensibilisierung nimmt nach meinen Erfahrungen viel weniger Zeit in Anspruch und damit auch Kosten. Es genügt, wenn man das Blut abgenommen hat, ein- oder zweimal mit Dilutionen zu behandeln und dann die Gegensensibilisierung durchzuführen. Sofern erforderlich, kann dieser Behandlungszyklus auch wiederholt werden.

Herr Kollege KNECHT, ich behandle schon sehr lange mit sehr gutem Erfolg Mamma tumoren nur konservativ mit NEYTUMORIN. In der Zwischenzeit habe ich versuchsweise durch Ligaturen die Geschwülste beseitigen wollen. Die Ergebnisse waren beinahe so schlecht wie nur operativ. Das hat mich veranlaßt, wieder zur konservativen Therapie überzugehen und seitdem habe ich wieder genau die gleich guten Erfolge, wie sie hier schon vorgetragen wurden. Ich bin deshalb mehr denn je der Meinung: Tumoren sollten so wenig als möglich traumatisiert werden

Optimierung von  
Behandlungsvorschlägen durch EDV

Th. STIEFEL  
Forschungslaboratorien K. THEURER  
für Organo- und Immunotherapie  
Ostfildern

Zur Erstellung möglichst individueller Therapievorschläge wurde von dem wissenschaftlichen Beratungsdienst der vitOrgan Arzneimittel GmbH ein Fragebogen\* entwickelt, der sich in drei Abschnitte unterteilt:

1. Fragen, die der Patient beantwortet.
2. Fragen, die vom Arzt zu beantworten sind.
3. Ausgewählte Indikationen.

Individuelle Therapievorschläge

Als Minimalbeantwortung sind Angaben über Geschlecht, Alter des Patienten und Diagnose erforderlich. Die vollständige Beantwortung der Abschnitte 1 und 2 führt zu individuelleren Therapievorschlägen. Auswertung und Erstellung eines individuellen Therapievorschlages erfolgen mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung. Dabei werden neueste klinische Daten und Therapieschemata sowie auch 25jährige Praxiserfahrung mit den speziellen Angaben des Patienten in Relation gesetzt. Das Ergebnis ist ein für den individuellen Fall optimierter Therapievorschlag, der dem behandelndem Arzt nach Kontrolle durch den wissenschaftlichen Beratungsdienst zugeschickt wird. Die Vorteile des neuen Verfahrens sind:

1. Berücksichtigung einer Vielzahl individueller Parameter.
2. Anamnestische Vorinformationen für den Arzt, da der Fragebogen vom Patienten im Wartezimmer ausgefüllt werden kann.
3. Eignung zur Dokumentation in der Praxis.

-

Copyright vitOrgan Arzneimittel GmbH, Ostfildern

vitOrgan Arzneimittel GmbH · 7302 Ostfildern 1 (Ruhr) · Telefon 07141 2997 + 41 29 98

**vitOrgan**  
Arzneimittel

Ursachen behandeln,  
nicht nur Symptome  
Gewünschte Behandlung  
 Kurzbehandlung  
 Ausführliche Behandlung  
**Fragebogen-Nr.**

**Bitte beachten Sie:**  
 Sofortige Zusendung der vorgeschlagenen Präparate  
 erwünscht  
 nicht erwünscht  
 Zusendung von weiteren Fragebögen  
 erwünscht (Zurücksenden bitte nicht vergessen)

Zur Erstellung eines Behandlungsvorschlags  
 Name (oder Deckname) des Patienten:  
 Alter:  
 Wichtiger Hinweis!

Dieser Fragebogen wird mit Hilfe unseres Therapie-Computers bearbeitet. Er ist in 3 Abschnitte unterteilt:

1. Fragen, die zweckmäßig vom Patienten beantwortet werden sollen
2. Fragen, die vom Arzt beantwortet werden sollen
3. ausgewählte Indikationen (vom Arzt auszufüllen)

Als Minimalbeantwortung sind Angaben über Geschlecht, Alter des Patienten (Abschnitt 1) und die in Abschnitt 3 aufgeführten ausgewählten Indikationen anzukreuzen. Die vollständige Beantwortung von Abschnitt 1 und 2 führt zu individualisierten Therapieempfehlungen. Bitte nur die weißen Kästchen ankreuzen, die unterlegte Nummerierung unbedingt freilassen. Beschränken Sie sich bei der Beantwortung auf Fragen, die für das Krankheitsbild kennzeichnend und von entscheidender Bedeutung sind. Die Zahl der angekreuzten Fragen sollte 15 bis max. 20 nicht überschreiten. Zur Kontrolle der Behandlungsvorschläge durch unseren wissenschaftlichen Beratungsdienst bitten wir am Ende des Fragebogens um kurze diagnostische Hinweise. Den ausgefüllten Fragebogen bitte an den Wissenschaftlichen Beratungsdienst, vitOrgan Arzneimittel GmbH, Postfach 42 40, 7302 Ostfildern 1 (Ruhr) schicken. Sie erhalten dann umgehend den ausgearbeiteten Behandlungsvorschlag mit dem Fragebogen für Ihre Unterlagen zurück.

**Beispiel:**

Überempfindlichkeit	
<input type="checkbox"/> A018	zu hoch
<input type="checkbox"/> A019	zu gering

**1. Abschnitt**  
(kann zweckmäßig vom Patienten ausgefüllt werden)

<b>Lebensalter weiblich</b>	
<input type="checkbox"/> A001	Alter 0-10 Jahre
<input type="checkbox"/> A002	10-15 Jahre
<input type="checkbox"/> A003	15-45 Jahre
<input type="checkbox"/> A004	45-55 Jahre
<input type="checkbox"/> A005	über 55 Jahre
<input type="checkbox"/> A006	größer als normal
<input type="checkbox"/> A007	kleiner als normal
<b>Lebensalter männlich</b>	
<input type="checkbox"/> A008	Alter 0-10 Jahre
<input type="checkbox"/> A009	10-15 Jahre
<input type="checkbox"/> A010	15-45 Jahre
<input type="checkbox"/> A011	45-55 Jahre
<input type="checkbox"/> A012	über 55 Jahre
<input type="checkbox"/> A013	größer als normal
<input type="checkbox"/> A014	kleiner als normal
<b>Körperbau</b>	
<input type="checkbox"/> A015	schmalbrüstig
<input type="checkbox"/> A016	athletisch-muskulos
<input type="checkbox"/> A017	untersetzt m. Bauchneigung
<b>Körpergewicht</b>	
<input type="checkbox"/> A018	zu hoch
<input type="checkbox"/> A019	zu gering
<input type="checkbox"/> A020	ungewollte Gewichtsabnahme
<input type="checkbox"/> A021	Ähnliche Erkrankung i. d. Familie
<b>Leber</b>	
<input type="checkbox"/> A022	Überempfindlichkeiten
<input type="checkbox"/> A023	Erkältungen und Katarrhe der oberen Luftwege
<input type="checkbox"/> A024	der Augenbindehäute
<input type="checkbox"/> A025	Bronchialasthma
<input type="checkbox"/> A026	Hauterkrankungen
<input type="checkbox"/> A027	Herz- u. Kreislaufstörungen
<input type="checkbox"/> A028	Krämpfen
<input type="checkbox"/> A029	rheumatischen Erkrankungen
<input type="checkbox"/> A030	Schwindel
<input type="checkbox"/> A031	Überbelastung körperlich
<input type="checkbox"/> A032	Überbelastung geistig-psychisch
<input type="checkbox"/> A033	Müdigkeit, Schläfrigkeit
<input type="checkbox"/> A034	Schlechter Schlaf

<input type="checkbox"/> A033 verringert	<input type="checkbox"/> A083 Blasenbeschwerden	<input type="checkbox"/> A113 Blutzucker erhöht	<input type="checkbox"/> A156 anogen normomale (Mittels)	<input type="checkbox"/> A199 vergrößert - Samenbläschen	<input type="checkbox"/> A241 Uterus - Coliformruhr
<input type="checkbox"/> A034 verleiht	<input type="checkbox"/> A084 Blasenentzündung	<input type="checkbox"/> A114 erniedrigt	<input type="checkbox"/> A157 anogen normale (Hoch)	<input type="checkbox"/> A200 Gering - Zahnliefisch	<input type="checkbox"/> A242 Vasa sanguinea (Ahnruhr u. Werra)
<input type="checkbox"/> A037 sexuelle Impotenz	<input type="checkbox"/> A085 Maligne Blasenentzündung	<input type="checkbox"/> A115 Cholesterin erhöht	<input type="checkbox"/> A158 metastasierend	<input type="checkbox"/> A201 Glukosa - Zunge	<input type="checkbox"/> A243 Lymph - Lymphogefäße
<input type="checkbox"/> A038 sexuelle Frigidität	<input type="checkbox"/> A086 Hämorrhoiden	<input type="checkbox"/> A116 Triglyceride erhöht	<input type="checkbox"/> A159 in Regression	<input type="checkbox"/> A202 Infarktium catarrh. - Dickdarm	<input type="checkbox"/> A244 Venenkrampf - Magen
<input type="checkbox"/> A039 weichtalig	<input type="checkbox"/> A087 Heringzungen u. Hämorrhoiden	<input type="checkbox"/> A117 Calcium erhöht	<input type="checkbox"/> A160 CEA 19A positiv	<input type="checkbox"/> A203 Tenue - Darmwand	<input type="checkbox"/> A245 Vesico-fellia - Gallenblase
<input type="checkbox"/> A040 depressiv niedergedrückt	<input type="checkbox"/> A088 muskelschwacher Dickdarm	<input type="checkbox"/> A118 Prostatakarzinom erhöht	<input type="checkbox"/> A161 Hämoglobin im Urin	<input type="checkbox"/> A204 Labrynthitis - Innenohr	<input type="checkbox"/> A246 Uterus - Harnblase
<input type="checkbox"/> A041 hoch überschwänglich	<input type="checkbox"/> A089 Gicht	<input type="checkbox"/> A119 Hämaturie erhöht	<input type="checkbox"/> A162 Behandlung mit Zytostatika	<input type="checkbox"/> A205 Larynx - Kehlkopf	
<input type="checkbox"/> A042 nachts	<input type="checkbox"/> A090 Hauterkrankung	<input type="checkbox"/> A120 Kreatinin erhöht	<input type="checkbox"/> A163 Adjuvante Tumortherapie	<input type="checkbox"/> A206 Leber cerebrale spinalis - Gehirnhäutentzündung	
<input type="checkbox"/> A043 trockener	<input type="checkbox"/> A091 Rheumatischer positiv	<input type="checkbox"/> A121 Transaminasen erhöht	<input type="checkbox"/> A164 Nebenwirkung (Blut/Prostata)	<input type="checkbox"/> A207 Metastasen - Rückenmark	
<input type="checkbox"/> A044 trockener	<input type="checkbox"/> A092 Rheumatischer negativ	<input type="checkbox"/> A122 Rheumatischer positiv	<input type="checkbox"/> A165 Anorexia nervosa	<input type="checkbox"/> A208 Metastasen - Knochenmark	
<input type="checkbox"/> A045 verleiht	<input type="checkbox"/> A093 Abszesse von Mollat, Nektin, Drogen	<input type="checkbox"/> A123 Abszesse von Mollat, Nektin, Drogen	<input type="checkbox"/> A166 Acuta - Hautschlagader	<input type="checkbox"/> A209 Meningeum - Hirn - Rückenmark	
<input type="checkbox"/> A046 durchfallig	<input type="checkbox"/> A094 Allergische Stühle	<input type="checkbox"/> A124 Allergische Stühle	<input type="checkbox"/> A167 Anorexia - Gehirn	<input type="checkbox"/> A210 Meningeum - Gehirn	
<input type="checkbox"/> A047 Mundgeruch	<input type="checkbox"/> A095 Immunglobulin Autoantibildung	<input type="checkbox"/> A125 Immunglobulin Autoantibildung	<input type="checkbox"/> A168 Anorexia - Samenblase (Gut)	<input type="checkbox"/> A211 Meningeum - Kollagen - Blutgefäße	
<input type="checkbox"/> A048 im Kopf	<input type="checkbox"/> A096 Stuhlveränderungen	<input type="checkbox"/> A126 Stuhlveränderungen	<input type="checkbox"/> A169 Articul - Gelenke	<input type="checkbox"/> A212 Meningeum - Schädelhaut	
<input type="checkbox"/> A049 im Hals	<input type="checkbox"/> A097 operative Vorgänge - vorwiegend Atem	<input type="checkbox"/> A127 operative Vorgänge - vorwiegend Atem	<input type="checkbox"/> A170 Caputula - Kopf	<input type="checkbox"/> A213 Menstruatio - Genitalerkrankung	
<input type="checkbox"/> A050 im Brustkorb	<input type="checkbox"/> A098 Infektionen bakteriell, parasitär	<input type="checkbox"/> A128 Infektionen bakteriell, parasitär	<input type="checkbox"/> A171 Carillago - Körper	<input type="checkbox"/> A214 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A051 im Oberbauch	<input type="checkbox"/> A099 viral	<input type="checkbox"/> A129 viral	<input type="checkbox"/> A172 Bronchus - Bronchien	<input type="checkbox"/> A215 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A052 im Unterbauch	<input type="checkbox"/> A100 Neutrophilie (medikamentös)	<input type="checkbox"/> A130 Neutrophilie (medikamentös)	<input type="checkbox"/> A173 Corpus - Herz	<input type="checkbox"/> A216 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A053 Kälte Händen u. Füßen	<input type="checkbox"/> A101 Trauma physikalisch, Strahlen	<input type="checkbox"/> A131 Trauma physikalisch, Strahlen	<input type="checkbox"/> A174 Cor - Herz	<input type="checkbox"/> A217 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A054 zum Frieren	<input type="checkbox"/> A102 chemisch	<input type="checkbox"/> A132 chemisch	<input type="checkbox"/> A175 Reibungssystem	<input type="checkbox"/> A218 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A057 Heißgefühl	<input type="checkbox"/> A103 Entwicklungsförderung geistig	<input type="checkbox"/> A133 Entwicklungsförderung geistig	<input type="checkbox"/> A176 Myocard - Herzmuskel	<input type="checkbox"/> A219 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A058 Wärgen	<input type="checkbox"/> A104 psychosomatisch, funktionell	<input type="checkbox"/> A134 psychosomatisch, funktionell	<input type="checkbox"/> A177 Poicard - Herzbeutel	<input type="checkbox"/> A220 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A059 Schwellen	<input type="checkbox"/> A105 Involuntär geistig	<input type="checkbox"/> A135 Involuntär geistig	<input type="checkbox"/> A178 Endocard - Herzinnenhaut	<input type="checkbox"/> A221 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A060 Ubelkeit, Brechreiz	<input type="checkbox"/> A106 Plus beschleunigt	<input type="checkbox"/> A136 Plus beschleunigt	<input type="checkbox"/> A179 Corona coronaria - Schwann	<input type="checkbox"/> A222 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A061 Weinstenigkeit	<input type="checkbox"/> A107 BKS erhöht	<input type="checkbox"/> A137 BKS erhöht	<input type="checkbox"/> A180 Collis - Haut	<input type="checkbox"/> A223 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A062 Sehstörungen trotz Brillen	<input type="checkbox"/> A108 atrophierend	<input type="checkbox"/> A138 atrophierend	<input type="checkbox"/> A181 Entzündung	<input type="checkbox"/> A224 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A063 Gedächtnisstörungen	<input type="checkbox"/> A109 Bluthit Eosinophilie	<input type="checkbox"/> A139 Bluthit Eosinophilie	<input type="checkbox"/> A182 Entzündung	<input type="checkbox"/> A225 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A064 Nachtschweiß	<input type="checkbox"/> A110 Leukozytose	<input type="checkbox"/> A140 Leukozytose	<input type="checkbox"/> A183 Entzündung	<input type="checkbox"/> A226 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A065 Nüchternsteife u. häufiger Erbrechen	<input type="checkbox"/> A111 Leukopenie	<input type="checkbox"/> A141 Leukopenie	<input type="checkbox"/> A184 Entzündung	<input type="checkbox"/> A227 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A066 vorher	<input type="checkbox"/> A112 Albuminurie	<input type="checkbox"/> A142 Albuminurie	<input type="checkbox"/> A185 Entzündung	<input type="checkbox"/> A228 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A067 während	<input type="checkbox"/> A113 Hb erhöht	<input type="checkbox"/> A143 Hb erhöht	<input type="checkbox"/> A186 Entzündung	<input type="checkbox"/> A229 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A068 zerschmerzlicht	<input type="checkbox"/> A114 Hb erniedrigt	<input type="checkbox"/> A144 Hb erniedrigt	<input type="checkbox"/> A187 Entzündung	<input type="checkbox"/> A230 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A069 Juckreiz	<input type="checkbox"/> A115 Ery erhöht	<input type="checkbox"/> A145 Ery erhöht	<input type="checkbox"/> A188 Entzündung	<input type="checkbox"/> A231 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A070 mentaler Kinderwunsch	<input type="checkbox"/> A116 Ery erniedrigt	<input type="checkbox"/> A146 Ery erniedrigt	<input type="checkbox"/> A189 Entzündung	<input type="checkbox"/> A232 Menstruatio - Menstruation	
<input type="checkbox"/> A071 Abnorme Fuß- u. Fingerglieder	<input type="checkbox"/> A117 Ery erniedrigt	<input type="checkbox"/> A147 Ery erniedrigt	<input type="checkbox"/> A190 Entzündung	<input type="checkbox"/> A233 Menstruatio - Menstruation	

2. Abschnitt (Lern-Auswahl)

<input type="checkbox"/> A072 seit wenigen Tagen bis Wochen	<input type="checkbox"/> A073 seit mehreren Monaten bis Jahren	<input type="checkbox"/> A074 Krankheit verläuft in Schüben
<input type="checkbox"/> A075	<input type="checkbox"/> A076	<input type="checkbox"/> A077
<input type="checkbox"/> A078	<input type="checkbox"/> A079	<input type="checkbox"/> A080
<input type="checkbox"/> A081	<input type="checkbox"/> A082	<input type="checkbox"/> A083
<input type="checkbox"/> A084	<input type="checkbox"/> A085	<input type="checkbox"/> A086
<input type="checkbox"/> A087	<input type="checkbox"/> A088	<input type="checkbox"/> A089
<input type="checkbox"/> A090	<input type="checkbox"/> A091	<input type="checkbox"/> A092
<input type="checkbox"/> A093	<input type="checkbox"/> A094	<input type="checkbox"/> A095
<input type="checkbox"/> A096	<input type="checkbox"/> A097	<input type="checkbox"/> A098
<input type="checkbox"/> A099	<input type="checkbox"/> A100	<input type="checkbox"/> A101
<input type="checkbox"/> A102	<input type="checkbox"/> A103	<input type="checkbox"/> A104
<input type="checkbox"/> A105	<input type="checkbox"/> A106	<input type="checkbox"/> A107
<input type="checkbox"/> A108	<input type="checkbox"/> A109	<input type="checkbox"/> A110
<input type="checkbox"/> A111	<input type="checkbox"/> A112	<input type="checkbox"/> A113
<input type="checkbox"/> A114	<input type="checkbox"/> A115	<input type="checkbox"/> A116
<input type="checkbox"/> A117	<input type="checkbox"/> A118	<input type="checkbox"/> A119
<input type="checkbox"/> A120	<input type="checkbox"/> A121	<input type="checkbox"/> A122
<input type="checkbox"/> A123	<input type="checkbox"/> A124	<input type="checkbox"/> A125
<input type="checkbox"/> A126	<input type="checkbox"/> A127	<input type="checkbox"/> A128
<input type="checkbox"/> A129	<input type="checkbox"/> A130	<input type="checkbox"/> A131
<input type="checkbox"/> A132	<input type="checkbox"/> A133	<input type="checkbox"/> A134
<input type="checkbox"/> A135	<input type="checkbox"/> A136	<input type="checkbox"/> A137
<input type="checkbox"/> A138	<input type="checkbox"/> A139	<input type="checkbox"/> A140
<input type="checkbox"/> A141	<input type="checkbox"/> A142	<input type="checkbox"/> A143
<input type="checkbox"/> A144	<input type="checkbox"/> A145	<input type="checkbox"/> A146
<input type="checkbox"/> A147	<input type="checkbox"/> A148	<input type="checkbox"/> A149
<input type="checkbox"/> A150	<input type="checkbox"/> A151	<input type="checkbox"/> A152
<input type="checkbox"/> A153	<input type="checkbox"/> A154	<input type="checkbox"/> A155
<input type="checkbox"/> A156	<input type="checkbox"/> A157	<input type="checkbox"/> A158
<input type="checkbox"/> A159	<input type="checkbox"/> A160	<input type="checkbox"/> A161
<input type="checkbox"/> A162	<input type="checkbox"/> A163	<input type="checkbox"/> A164
<input type="checkbox"/> A165	<input type="checkbox"/> A166	<input type="checkbox"/> A167
<input type="checkbox"/> A168	<input type="checkbox"/> A169	<input type="checkbox"/> A170
<input type="checkbox"/> A171	<input type="checkbox"/> A172	<input type="checkbox"/> A173
<input type="checkbox"/> A174	<input type="checkbox"/> A175	<input type="checkbox"/> A176
<input type="checkbox"/> A177	<input type="checkbox"/> A178	<input type="checkbox"/> A179
<input type="checkbox"/> A180	<input type="checkbox"/> A181	<input type="checkbox"/> A182
<input type="checkbox"/> A183	<input type="checkbox"/> A184	<input type="checkbox"/> A185
<input type="checkbox"/> A186	<input type="checkbox"/> A187	<input type="checkbox"/> A188
<input type="checkbox"/> A189	<input type="checkbox"/> A190	<input type="checkbox"/> A191
<input type="checkbox"/> A192	<input type="checkbox"/> A193	<input type="checkbox"/> A194
<input type="checkbox"/> A195	<input type="checkbox"/> A196	<input type="checkbox"/> A197
<input type="checkbox"/> A198	<input type="checkbox"/> A199	<input type="checkbox"/> A200
<input type="checkbox"/> A201	<input type="checkbox"/> A202	<input type="checkbox"/> A203
<input type="checkbox"/> A204	<input type="checkbox"/> A205	<input type="checkbox"/> A206
<input type="checkbox"/> A207	<input type="checkbox"/> A208	<input type="checkbox"/> A209
<input type="checkbox"/> A210	<input type="checkbox"/> A211	<input type="checkbox"/> A212
<input type="checkbox"/> A213	<input type="checkbox"/> A214	<input type="checkbox"/> A215
<input type="checkbox"/> A216	<input type="checkbox"/> A217	<input type="checkbox"/> A218
<input type="checkbox"/> A219	<input type="checkbox"/> A220	<input type="checkbox"/> A221
<input type="checkbox"/> A222	<input type="checkbox"/> A223	<input type="checkbox"/> A224
<input type="checkbox"/> A225	<input type="checkbox"/> A226	<input type="checkbox"/> A227
<input type="checkbox"/> A228	<input type="checkbox"/> A229	<input type="checkbox"/> A230
<input type="checkbox"/> A231	<input type="checkbox"/> A232	<input type="checkbox"/> A233
<input type="checkbox"/> A234	<input type="checkbox"/> A235	<input type="checkbox"/> A236
<input type="checkbox"/> A237	<input type="checkbox"/> A238	<input type="checkbox"/> A239
<input type="checkbox"/> A240	<input type="checkbox"/> A241	<input type="checkbox"/> A242
<input type="checkbox"/> A243	<input type="checkbox"/> A244	<input type="checkbox"/> A245
<input type="checkbox"/> A246	<input type="checkbox"/> A247	<input type="checkbox"/> A248
<input type="checkbox"/> A249	<input type="checkbox"/> A250	<input type="checkbox"/> A251
<input type="checkbox"/> A252	<input type="checkbox"/> A253	<input type="checkbox"/> A254
<input type="checkbox"/> A255	<input type="checkbox"/> A256	<input type="checkbox"/> A257
<input type="checkbox"/> A258	<input type="checkbox"/> A259	<input type="checkbox"/> A260
<input type="checkbox"/> A261	<input type="checkbox"/> A262	<input type="checkbox"/> A263
<input type="checkbox"/> A264	<input type="checkbox"/> A265	<input type="checkbox"/> A266
<input type="checkbox"/> A267	<input type="checkbox"/> A268	<input type="checkbox"/> A269
<input type="checkbox"/> A270	<input type="checkbox"/> A271	<input type="checkbox"/> A272
<input type="checkbox"/> A273	<input type="checkbox"/> A274	<input type="checkbox"/> A275
<input type="checkbox"/> A276	<input type="checkbox"/> A277	<input type="checkbox"/> A278
<input type="checkbox"/> A279	<input type="checkbox"/> A280	<input type="checkbox"/> A281
<input type="checkbox"/> A282	<input type="checkbox"/> A283	<input type="checkbox"/> A284
<input type="checkbox"/> A285	<input type="checkbox"/> A286	<input type="checkbox"/> A287
<input type="checkbox"/> A288	<input type="checkbox"/> A289	<input type="checkbox"/> A290
<input type="checkbox"/> A291	<input type="checkbox"/> A292	<input type="checkbox"/> A293
<input type="checkbox"/> A294	<input type="checkbox"/> A295	<input type="checkbox"/> A296
<input type="checkbox"/> A297	<input type="checkbox"/> A298	<input type="checkbox"/> A299
<input type="checkbox"/> A300	<input type="checkbox"/> A301	<input type="checkbox"/> A302
<input type="checkbox"/> A303	<input type="checkbox"/> A304	<input type="checkbox"/> A305
<input type="checkbox"/> A306	<input type="checkbox"/> A307	<input type="checkbox"/> A308
<input type="checkbox"/> A309	<input type="checkbox"/> A310	<input type="checkbox"/> A311
<input type="checkbox"/> A312	<input type="checkbox"/> A313	<input type="checkbox"/> A314
<input type="checkbox"/> A315	<input type="checkbox"/> A316	<input type="checkbox"/> A317
<input type="checkbox"/> A318	<input type="checkbox"/> A319	<input type="checkbox"/> A320
<input type="checkbox"/> A321	<input type="checkbox"/> A322	<input type="checkbox"/> A323
<input type="checkbox"/> A324	<input type="checkbox"/> A325	<input type="checkbox"/> A326
<input type="checkbox"/> A327	<input type="checkbox"/> A328	<input type="checkbox"/> A329
<input type="checkbox"/> A330	<input type="checkbox"/> A331	<input type="checkbox"/> A332
<input type="checkbox"/> A333	<input type="checkbox"/> A334	<input type="checkbox"/> A335
<input type="checkbox"/> A336	<input type="checkbox"/> A337	<input type="checkbox"/> A338
<input type="checkbox"/> A339	<input type="checkbox"/> A340	<input type="checkbox"/> A341
<input type="checkbox"/> A342	<input type="checkbox"/> A343	<input type="checkbox"/> A344
<input type="checkbox"/> A345	<input type="checkbox"/> A346	<input type="checkbox"/> A347
<input type="checkbox"/> A348	<input type="checkbox"/> A349	<input type="checkbox"/> A350
<input type="checkbox"/> A351	<input type="checkbox"/> A352	<input type="checkbox"/> A353
<input type="checkbox"/> A354	<input type="checkbox"/> A355	<input type="checkbox"/> A356
<input type="checkbox"/> A357	<input type="checkbox"/> A358	<input type="checkbox"/> A359
<input type="checkbox"/> A360	<input type="checkbox"/> A361	<input type="checkbox"/> A362
<input type="checkbox"/> A363	<input type="checkbox"/> A364	<input type="checkbox"/> A365
<input type="checkbox"/> A366	<input type="checkbox"/> A367	<input type="checkbox"/> A368
<input type="checkbox"/> A369	<input type="checkbox"/> A370	<input type="checkbox"/> A371
<input type="checkbox"/> A372	<input type="checkbox"/> A373	<input type="checkbox"/> A374
<input type="checkbox"/> A375	<input type="checkbox"/> A376	<input type="checkbox"/> A377
<input type="checkbox"/> A378	<input type="checkbox"/> A379	<input type="checkbox"/> A380
<input type="checkbox"/> A381	<input type="checkbox"/> A382	<input type="checkbox"/> A383
<input type="checkbox"/> A384	<input type="checkbox"/> A385	<input type="checkbox"/> A386
<input type="checkbox"/> A387	<input type="checkbox"/> A388	<input type="checkbox"/> A389
<input type="checkbox"/> A390	<input type="checkbox"/> A391	<input type="checkbox"/> A392
<input type="checkbox"/> A393	<input type="checkbox"/> A394	<input type="checkbox"/> A395
<input type="checkbox"/> A396	<input type="checkbox"/> A397	<input type="checkbox"/> A398
<input type="checkbox"/> A399	<input type="checkbox"/> A400	<input type="checkbox"/> A401
<input type="checkbox"/> A402	<input type="checkbox"/> A403	<input type="checkbox"/> A404
<input type="checkbox"/> A405	<input type="checkbox"/> A406	<input type="checkbox"/> A407
<input type="checkbox"/> A408	<input type="checkbox"/> A409	<input type="checkbox"/> A410
<input type="checkbox"/> A411	<input type="checkbox"/> A412	<input type="checkbox"/> A413
<input type="checkbox"/> A414	<input type="checkbox"/> A415	<input type="checkbox"/> A416
<input type="checkbox"/> A417	<input type="checkbox"/> A418	<input type="checkbox"/> A419
<input type="checkbox"/> A420	<input type="checkbox"/> A421	<input type="checkbox"/> A422
<input type="checkbox"/> A423	<input type="checkbox"/> A424	<input type="checkbox"/> A425
<input type="checkbox"/> A426	<input type="checkbox"/> A427	<input type="checkbox"/> A428
<input type="checkbox"/> A429	<input type="checkbox"/> A430	<input type="checkbox"/> A431
<input type="checkbox"/> A432	<input type="checkbox"/> A433	<input type="checkbox"/> A434
<input type="checkbox"/> A435	<input type="checkbox"/> A436	<input type="checkbox"/> A437
<input type="checkbox"/> A438	<input type="checkbox"/> A439	<input type="checkbox"/> A440
<input type="checkbox"/> A441	<input type="checkbox"/> A442	<input type="checkbox"/> A443
<input type="checkbox"/> A444	<input type="checkbox"/> A445	<input type="checkbox"/> A446
<input type="checkbox"/> A447	<input type="checkbox"/> A448	<input type="checkbox"/> A449
<input type="checkbox"/> A450	<input type="checkbox"/> A451	<input type="checkbox"/> A452
<input type="checkbox"/> A453	<input type="checkbox"/> A454	<input type="checkbox"/> A455
<input type="checkbox"/> A456	<input type="checkbox"/> A457	<input type="checkbox"/> A458
<input type="checkbox"/> A459	<input type="checkbox"/> A460	<input type="checkbox"/> A461
<input type="checkbox"/> A462	<input type="checkbox"/> A463	<input type="checkbox"/> A464
<input type="checkbox"/> A465	<input type="checkbox"/> A466	<input type="checkbox"/> A467
<input type="checkbox"/> A468	<input type="checkbox"/> A469	<input type="checkbox"/> A470
<input type="checkbox"/> A471	<input type="checkbox"/> A472	<input type="checkbox"/> A473
<input type="checkbox"/> A474	<input type="checkbox"/> A475	<input type="checkbox"/> A476
<input type="checkbox"/> A477	<input type="checkbox"/> A478	<input type="checkbox"/> A479
<input type="checkbox"/> A480	<input type="checkbox"/> A481	<input type="checkbox"/> A482
<input type="checkbox"/> A483	<input type="checkbox"/> A484	<input type="checkbox"/> A485
<input type="checkbox"/> A486	<input type="checkbox"/> A487	<input type="checkbox"/> A488
<input type="checkbox"/> A489	<input type="checkbox"/> A490	<input type="checkbox"/> A491
<input type="checkbox"/> A492	<input type="checkbox"/> A493	<input type="checkbox"/> A494
<input type="checkbox"/> A495	<input type="checkbox"/> A496	<input type="checkbox"/> A497
<input type="checkbox"/> A498	<input type="checkbox"/> A499	<input type="checkbox"/> A500

3. Abschnitt (Lern-Auswahl)

<input type="checkbox"/> A300 Atonie vulgaria	<input type="checkbox"/> A301 Allergien	<input type="checkbox"/> A302 Allergische Dermatitis	<input type="checkbox"/> A303 Asthma bronchiale	<input type="checkbox"/> A304 Autoimmunkrankungen	<input type="checkbox"/> A305 Colinet	<input type="checkbox"/> A306 Colitis ulcerosa	<input type="checkbox"/> A307 Morbus Crohn	<input type="checkbox"/> A308 Depressionen	<input type="checkbox"/> A309 Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/> A310 Gelenksentzündungen	<input type="checkbox"/> A311 Dicht. Hypertension	<input type="checkbox"/> A312 Heuertypen	<input type="checkbox"/> A313 Herz u. Kreislaufstörungen	<input type="checkbox"/> A314 Hingepflichten	<input type="checkbox"/> A315 Hebräer, Aethiops, Araber	<input type="checkbox"/> A316 Impotenz masculi	<input type="checkbox"/> A317 Infus. Kinaketon, Mergarine	<input type="checkbox"/> A318 spates Kinaketon	<input type="checkbox"/> A319 Komplettion, Epilepsie	<input type="checkbox"/> A320 Amyotrophische Lateralsklerose	<input type="checkbox"/> A321 Lebererkrankungen	<input type="checkbox"/> A322 Magare	<input type="checkbox"/> A323 Multiple Sklerose	<input type="checkbox"/> A324 Metakinetose	<input type="checkbox"/> A325 Nephritis	<input type="checkbox"/>
---	---	--	---	---	---------------------------------------	--	--	--	---	---	---	--	--	--	---	--	---	--	--	--	---	--------------------------------------	---	--	---	--------------------------

Sachregister

Abwehrreaktion	267
Acetylcholinrezeptor	224
Affenleber	75
Agrobacterium tumefaciens	5
Akupunktur	196
Akzeleration, säkulare	305
Allergisierung	118, 247
AltersVeränderung	128, 174
Antigen	287
Antikörperbildung	244, 276, 287
Antikörperfragmente	135, 201
Antilymphozytenserum	236
Antitumorwirkung	99
Arthrose	174, 192
Attachment	5, 12
Augenerkrankung	262
Autoantigene	<b>201</b>
Autoimmunkrankheit	190, 219, 256
Auxin	19
Basistherapie	125
BCG-Impfung	106
Biomimetik	202
Biotransformation	57
Blutstatus	149, 171, 278
C-DNA	23
Cortison	190
Cytokinine	<b>18</b>
Dendritenwachstum	310
Derepression	<b>128</b>
DUCHENNE-Muskeldystrophie	293
EAC-Rosetten	141, 280
Eisbär	322

ELISA-Test	<b>288</b>
Enhancement antibodies	134
Enzymindex	296
Erbgutveränderung	22
Fab-Bruchstücke	201, 213, 238
Fc-Fragmente	201, 213, 238
Fibroblastenproliferation	65, 69
Fusionsproteine	<b>212</b>
Gap junctions	89
Gegensensibilisierung	<b>102</b> , 198, 244, 250, 298, 325
Gehirnentwicklung	307
GelenkknorpelSchäden	183
Genetische Kolonisierung	<b>20</b>
Genübertragung	23
Granulozyten-Kapillar-Test	51
Hämagglutinationstest	287
Hauterkrankung	196, 326
Hauttransplantation	239
Hirnreifungsstörungen	306
Hund	322
Hyposensibilisierung	251
Immunisierung	203, 220, 277, 289
Immunisierung gegen Krebs	103, 135
Immunpathologie	247
Immunsuppression	63, 106
Immuntherapie	132
Immuntoleranz	220
Interferon	107
in-vitro-Test	47
Juckreiz	323
Kaninchen	<b>262</b>
Klon	<b>220</b>

Kloniermethode	57
Knochenmark	274
Kontaktlinsen	262
Komplementsystem	<b>168</b>
Kopfaktivator aus Hydra	320
Kopfumfang	305
Leberextrakt	64
Leberschaden	70
Lebertransplantation	63, 75
Lipidmembran	204
Liposom	25, 204, 215
Lymphozyten-Kapillar-Test	51
Lymphozytenkultur	64
Mangelernährung	315
Melanoblast	34
Melanom	33, 111
Membranbindung	<b>82</b>
Membranfusion	205
Methylcholanthren	97
Methyltestosteron	36
Milzzellkultur	<b>101</b>
Multifaktorielle Krebstherapie	132, 137
Multiple Sklerose	206
Muskelbiopsie	295
Muskeldystrophie	292
Myasthenia gravis	219
Myelinisierung	308
Myogene Erkrankungen	292
Nacktmäuse	<b>100</b>
Nebenwirkungen	118, 173
Nephrose	197
Nervensystem, vegetatives	322
Neuromuskuläre Erkrankungen	292
Neuromuskuläre Erregung	223
Neurotransmitter	222, 312
Nierenextrakt	66

Onc-Region	10, 19
Onkotherapie	156
Opine	7
Organotropie	200, 204
Osteosarkom	111
Papillomatose	197
Parasitismus	20
Perinatalperiode	306
Pferd	324
Phagozytose	280
Physostigmin	219
Plasmamembran	86
Plasmid	5
Plazentastoffe	130
Polyarthritits	189
Positionseffekt	11
Psychosen	197
Pseudogene	207
Reifegrad des Gehirns	308
Rekonstitution von Membranen	211
Repetitive Sequenzen	14
Response Modifier	106, 167
Reverse Transkriptase	23
Rheuma	197
Rheumafaktor	167
Rind	323
Schwein	265, 276
Sexualhormone	33
Soforttyp	248
Sportmedizin	183
Steroidhormonbehandlung	35
Strahlenschaden	100, 276
Strahlenschutz	269
Suppressorzellen	220
Synapse	311, 316
Systematrophie	292

T-DNA	5
T-Zellen	144, 239
Testosteron, Tumorwirkung	42
Tetrachlorkohlenstoff	70
Thymidineinbau	48, 64, 81, 101
Thymomimetika	112
Thymusentfernung	231
Thymuspeptide	113, 190
Thymuszellkultur	226
Tiger	325
Toxizitätsprüfung	49
Transformation	6, 26, 80, 129
Transkription	17
Transplantation	239, 317
Transposon	207
Tumor	123, 140, 156, 326
Tumorantigen	133
Tumorgen	34
Tumorinduktion	6
Tumorpromoter	37
Tumorstamm zellentest	53
Tumorvirus	207
Tumorzelle	86, 156
Unruhe, innere	324
Vektor	25
Verträglichkeit	162
Veterinärmedizin	322
Viroid	24
Virus	129
Virusmembran	210
Wärmebehandlung	192
Wehrmedizin	269
Wundheilung	4
Xenogene Organpräparation	115, 143

Zelldifferentierung	43
Zellfraktionen (heterolog, homolog)	294
Zellmembran	79
Zytoplasmatische Substanzen	123, 156, 183, 196, 202, 240, 247, 252, 263, 276, 295, 322,
Zytostatikum	87, 144, 149, <b>160</b>
Zytotoxizität	51

»Die unkalkulierbare Komplexität der Lebensvorgänge macht neue Konzepte notwendig, an deren Endpunkten eine anders orientierte Medizin stehen muß, die wir dann als neue rational begründete, wissenschaftlich fundierte ›Ganzheitsmedizin‹ bezeichnen können. Zu Ihrem Baswissen werden alle diejenigen Maßnahmen gehören, mit deren Hilfe es gelingt, das äußerst feine, sich den wechselnden Situationen präzise anpassende Gefüge der Lebensvorgänge zu unterstützen und so die Lebenskräfte des Kranken zu mobilisieren« (Herbert BEGEMANN).

Unter diesem Motto stand auch die Jahrestagung 1982 über die zytoplasmatische Therapie und die Methoden der Serumdesensibilisierung. Seit 1979 werden die Vorträge dieser Tagungen im Original in Buchform veröffentlicht. Sie zeugen vom Bemühen, die biologischen Grundmechanismen zu erkennen und zu erforschen, um diese Behandlungsmethoden nach den Wirkungsmechanismen zu optimieren und einen Brückenschlag zwischen Naturheilkunde und Naturwissenschaft zu ermöglichen.