

## Untersuchungen über die therapeutische Wirkung von fetalem Mesenchym bei akuter Strahlenkrankheit von Mäusen

A. L. Gerbes, E. Haen, P. Schick, O. Messerschmidt

Labor für experimentelle Radiologie (Leiter: Prof. Dr. O. Messerschmidt) Neuherberg bei München

Fetales Mesenchym (Resistocell<sup>®</sup>) wurde auf seine Wirksamkeit bei akutem Strahlenschaden von Mäusen untersucht. Im therapie-relevanten mittelletalen Dosisbereich (LD<sub>70/30</sub> bei 635 cGy) konnte mit einmaliger i. m. Applikation einer Dosis von 80 mg/kg Körpergewicht 1 Tag nach Bestrahlung ein signifikanter therapeutischer Erfolg erzielt werden. Weitere Versuche zur Optimierung und Erklärung des Behandlungsergebnisses werden empfohlen.

### Experimental therapy of radiation injury in mice with fetal mesenchym

The effects of an intramuscular application of fetal mesenchym (Resistocell<sup>®</sup>) in mice with acute radiation injury was investigated. A single dose of 80 mg/kg body weight one day after radiation exposure (LD<sub>70/30</sub>, 635 cGy) showed significant therapeutic effects. Further experiments are recommended in order to improve and explain the reported results.

### Expériences sur l'action thérapeutique du mésenchyme fœtal lors de la radiopathie aiguë de la souris

On a étudié l'action du mésenchyme fœtal (Resistocell<sup>®</sup>) sur la lésion radiogène aiguë de la souris. Avec une application intramusculaire unique d'une dose de 80 mg/kg de poids corporel (DL<sub>70/30</sub>, 635 cGy) administrée un jour après l'irradiation, on a obtenu un succès thérapeutique significatif. On recommande d'effectuer d'autres expériences pour améliorer et expliquer les résultats thérapeutiques.

### Einleitung

Nach Strahlenunfällen gelang es in spezialisierten Behandlungszentren bereits, Patienten mit einer Ganzkörperexposition von über 10 Gy durch eine Intensivtherapie zu retten [7]. Bei einem größeren Anfall von Strahlengeschädigten in kurzer Zeit jedoch wären erfolversprechende Behandlungsmethoden wie Knochenmarkstransfusion und Lagerung im Sterilbereich kaum zu gewährleisten.

Gerade in einer solchen Situation wären leicht zu applizierende, haltbare und gut verträgliche Therapiesubstanzen von unschätzbarem Wert, wie sie auch eine Bereicherung der konventionellen Behandlung der Strahlenkrankheit bei unvorhersehbaren oder iatrogenen Strahlenexpositionen darstellen würden. Auf der Suche nach einer derartigen Substanz richtet sich das Augenmerk auf Möglichkeiten zur Reduzierung oder Kompensierung der strahlenbedingten Knochenmarksschädigung. Somit stellt sich die Frage nach Methoden zur Restauration oder Stimulation des Immunsystems.

Die immunstimulierende Wirkung xenogener fetaler Gewebe wurde mehrfach berichtet [5, 6, 8, 9, 11]. Die genannten Untersuchungen konnten eine Steigerung der Lymphozytentransformation, der Migrations-Inhibitions-Faktoren, des Interferonspiegels und der Zahl von Natural-Killer-Zellen nach Applikation fetaler Zellen nachweisen. Eine beschleunigte Graft-versus-host-Reaktion bei behandelten immunsupprimierten Tieren konnte als Hinweis auf Knochenmarksstimulation durch xenogene fetale Gewebe

gewertet werden. Des Weiteren wurde von einer weitgehend nebenwirkungsfreien Verträglichkeit der Präparate berichtet. Die anerkannten Vorstellungen über die Pathogenese des Strahlenschadens [4] legten bei Berücksichtigung der oben angeführten Untersuchungen nahe, mit ersten Versuchen zu klären, ob fetale Gewebe für die Therapie der akuten Strahlenkrankheit geeignet sein könnten.

### Material und Methoden

**Versuchstiere:** Es wurden männliche C3H-Mäuse aus der Tierzucht der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München, verwendet. Je 5 Tiere wurden in einem Makrolon<sup>®</sup>-Käfig Typ 2 mit Hobelspaneinstreu gehalten. Zur Nahrung dienten Altromin<sup>®</sup> und Leitungswasser ad libitum. Im Versuchstierstall betrug die Temperatur zirka 24 °C, die Luftfeuchtigkeit zirka 65%. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung wiesen die Mäuse ein Alter von ungefähr 8 Wochen und ein Gewicht von etwa 22 g auf. Das Gewicht jedes Tieres wurde täglich im Zeitraum von 4 Tagen vor bis 30 Tagen nach der Bestrahlung registriert.

**Bestrahlung:** In einer Röntgenapparatur, Typ MG 300, Fa. C. H. F. Müller, Hamburg, wurden die Tiere bei einem Fokusbstand von 40 cm bei 250 KV, 12 mA bestrahlt. Filter 0,77 mm Cu, Eigenfilterung der Röhre 6 mm Al, Halbwertsdicke der Strahlung 1,9 mm Cu, mittlere Dosisleistung 88 cGy/min. Während der Bestrahlung befanden sich die nicht narkotisierten Tiere in einem Plastik Käfig, in dem die Dosisleistung kontinuierlich mit einem Duplex-Dosimeter, Fa. PTW, Freiburg, gemessen wurde.

**Testsubstanz:** Das Präparat Resistocell<sup>®</sup>, F. Cybila, Heidelberg, besteht aus lyophilisiertem Mesenchym von Schafsfeten des letzten Gestationsviertels. 100 mg Lyophilisat entsprechen 1,25 g frischem Gewebe (Angaben des Herstellers). Zur i. m. Injektion wurden je 2 mg in 2 ml modifizierter isotoner Pannett-Compton-Lösung, Fa. Cybila, aufgeschwemmt. Der Gruppe V der Mäuse wurde das Präparat 3 Tage vor, der Gruppe N 1 Tag nach Bestrahlung appliziert (80 mg/kg Körpergewicht); die Kontrollgruppe K erhielt eine Injektion des entsprechenden Volumens isotoner Kochsalzlösung.

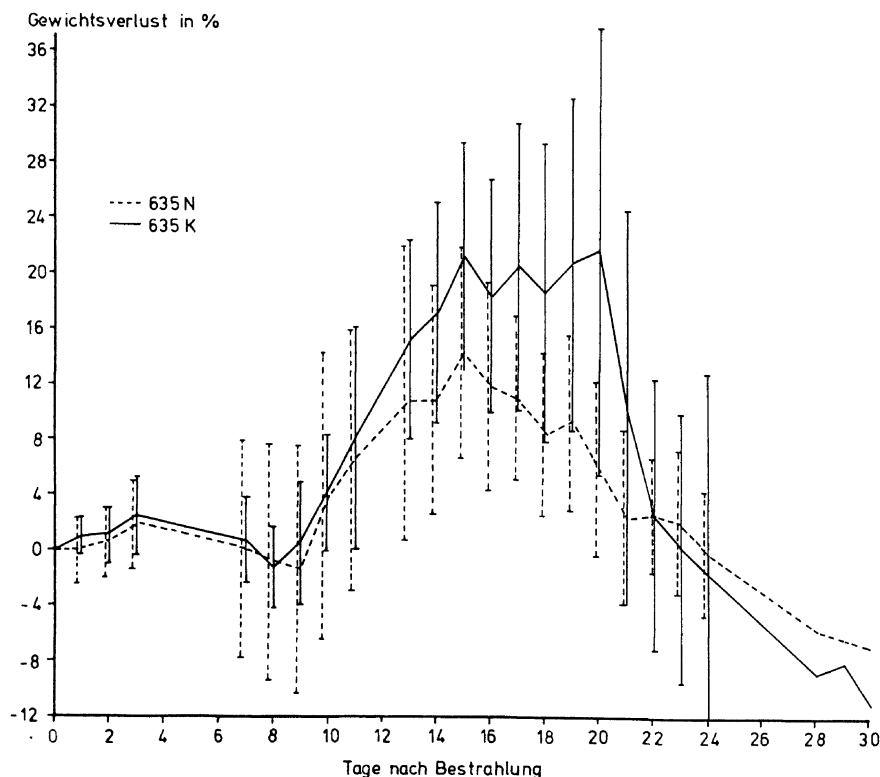


Abbildung 1. Mittlerer Gewichtsverlust (mit Standardabweichung) der therapierten Gruppe N und der Kontrollgruppe K nach Bestrahlung mit 635 cGy (in Prozent des anfänglichen Körpergewichtes, n = 20 pro Meßpunkt).

**Statistik:** Gruppenunterschiede in der Letalität wurden mit dem  $\chi^2$ -Test, Mittelwerte und deren Standardabweichung mit dem T-Test auf Signifikanz überprüft.

### Ergebnisse

Die Letalität der Versuchstiere innerhalb von 30 Tagen wird üblicherweise als erster Parameter der Wirksamkeit einer

Strahlendosis (cGy)	Gruppe V	Gruppe K	Gruppe N
605	20	30	25
635	55	70	30
690	100	100	100

Tabelle 1. Letalität der Versuchstiere innerhalb von 30 Tagen nach Bestrahlung (n = 20 pro Gruppe und Bestrahlungsdosis, also n gesamt = 180).

	Gruppe V	Gruppe K	Gruppe N
Maximaler Gewichtsverlust (Prozent vom Anfangsgewicht)	23,9 ± 6,7	26,8 ± 10,2	17,9 ± 9,3
Minimalgewicht (Gramm)	17,7 ± 1,8	16,5 ± 2,6	18,6 ± 2,9
Überlebenszeit (Tage)	21,5 ± 9,0	20,3 ± 7,7	25,6 ± 8,8

Tabelle 2. Parameter zur Beurteilung der Therapiewirkung bei Bestrahlung mit 635 cGy (Mittelwerte ± Standardabweichung der Mittelwerte, n = 20 je Gruppe, Beobachtungszeitraum 30 Tage).

Behandlungsmethode bei Strahlenschaden betrachtet. Aus Tabelle 1 ist deutlich ersichtlich, daß das Gewebelyophilisat im Bereich der mittleren Strahlendosis ( $LD_{70/30}$  bei 635 cGy, d. h. 70% Letalität der Kontrollgruppe in 30 Tagen) eine therapeutische Wirkung entfaltet (Signifikanz 95%).

Das Körpergewicht stellt ebenfalls einen guten Indikator für den Allgemeinzustand von Mäusen dar und kann daher auch zur Beurteilung von Therapieergebnissen herangezogen werden. Die Verlaufsbeobachtung des mittleren Körpergewichtes in Abbildung 1 zeigt überwiegend geringere Gewichtsverluste für die therapierte Gruppe N bei 635 cGy, vor allem im kritischen Zeitraum zwischen 10 und 20 Tagen nach Bestrahlung.

Der maximale relative Gewichtsverlust der therapierten Gruppe war (95%) signifikant geringer als der der Kontrollgruppe. Auch die anderen, in Tabelle 2 zusammengefaßten, Parameter wie Minimalgewicht und mittlere Überlebenszeit nach Exposition ergaben im mittletalen Dosisbereich (90%) signifikante Vorteile bei den therapierten Tieren.

Die Summenletalitätskurve (Abbildung 2) mit leichten Erfolgen in der prophylaktisch behandelten Gruppe und signifikanten Verbesserungen in der Therapiegruppe steht in Einklang mit den schon erwähnten anderen Ergebnissen.

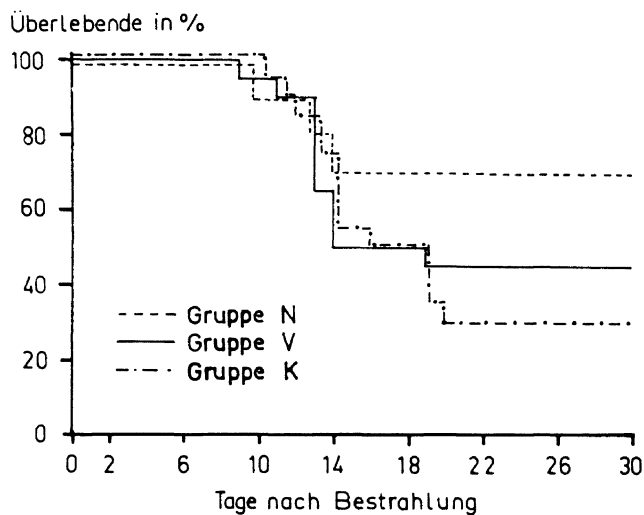


Abbildung 2. Summenletalitätskurve der prophylaktisch behandelten Gruppe V, der therapierten Gruppe N und der Kontrollgruppe K nach Bestrahlung mit 635 cGy (in Prozent der anfänglichen Tierzahl, n = 20 je Gruppe).

### Diskussion

Die Schädigung von Organismen durch ionisierende Strahlen kann durch prophylaktische Gabe von sogenannten Schutzsubstanzen in erheblichem Maße vermindert werden. Es bestehen umfangreiche Erfahrungen [1, 2, 10, 13] vor allem mit schwefelhaltigen Substanzen des Typs WR, die bei Bestrahlung entstehende schädliche Radikale binden können. Allerdings muß sich die Substanz zum Zeitpunkt der Exposition bereits im Körper befinden, ist also ausschließlich als Prophylaktikum zu verwenden. Des weiteren ist die Wirkungsdauer auf mehrere Stunden begrenzt, eine wiederholte Einnahme erscheint aber wegen beträchtlicher Nebenwirkungen bedenklich. Diese Überlegungen lassen erkennen, warum ein nach Bestrahlung appliziertes und wirksames Medikament, also ein Therapeutikum, außerordentlich wertvoll wäre. Trotz vielseitiger Bemühungen ist der Durchbruch auf diesem Gebiet bisher ausgeblieben. Erste bescheidene Erfolge aber deuten sich an [3, 12]. Diese Situation verpflichtet dazu, alle aussichtsreichen Ansätze zu verfolgen und auch ungewöhnliche Substanzen in die Therapieüberlegungen mit einzubeziehen.

Im hier dargelegten Pilotversuch konnte ein lyophilisierter Gewebeextrakt (Resistocell®) leichte prophylaktische

Erfolge und eine signifikante therapeutische Wirkung im relevanten mittellatalen Bereich ( $LD_{70/30}$ ) erbringen. Zur Optimierung und Abklärung dieses Ergebnisses empfehlen sich weitere Versuche mit verschiedenen Tierspezies, Variationen in Dosierung und Applikationsmuster und der Untersuchung weiterer Parameter wie peripherem Blutbild und Knochenmarksbefund.

### Danksagung

Frau J. Baumann und Frau C. Meingast möchten wir für ihre Assistenzen danken. Unser Dank gilt auch Herrn Olt Schmitz und Herrn Dr. Mathäus vom DOKZent Bonn sowie Frau Skorczyk und Herrn Lohr, DOKStelle der Sanitätsakademie München für ihre Hilfe bei der Beschaffung von Literatur.

### Literatur

1. Akerfeld, S., C. Rönnbäck, M. Helström, A. Nelson: Radioprotective agents-further results with aminophosphorothioate and related compounds. *Radiat. Res.* 35 (1968), 61-67.
2. Bacq, Z. M., R. Goutier: Mechanisms of action of sulfur-containing radioprotectors. In: Recovery and repair mechanisms in radiobiology. Brookhaven Symp. Biol. 20, Upton, New York 1968.
3. Berdel, W.: Experimental chemotherapy of radiation injury with synthetic lysophospholipid analogs. *Radiat. Res.* (in print).
4. Bond, V. P., T. M. Fliedner, J.O. Archambeau: Mammalian radiation lethality. Academic Press, New York-London 1965.
5. Gianoli, A. C., A. de la Fuente Perucho, S. Perez-Cuadrado: Post-operative Immuntherapie mit Resistocell® bei Patienten mit Tumoren des Magendarmtraktes. *Erfahrungsheilkunde* 30 (1981), 802-808.
6. Hoepke, H.: Stärkung der körpereigenen Abwehr durch Zelltherapie. *Cytobiol. Rev.* 1 (1979), 10-44.
7. Jammet, Mathe, Salmon: *Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.* IV (1959), 210-255.
8. Landsberger, A.: Morphologische Untersuchungen über die Wirkungsaktivität implantierter Zellen. *Zellther.* 40 (1973), 21-24.
9. v. Langendorff, L.: Der Einfluß fetaler Mesenchymzellen auf einem Hodgkin-artigen Lymphom-Zellstamm. *Cytobiol. Rev.* 1 (1978).
10. Messerschmidt, O., B. Betz, M. Fliedner: Medizinische Erstmaßnahmen bei kerntechnischen Unfällen. Thieme, Stuttgart-New York 1981.
11. Renner, H.: Die Lymphozyten-Sensibilisierung als Nachweis zellulärer Immunität nach Therapie mit fetalen Zellen. *Zellther.* 43 (1976).
12. Schick, P.: Strahlenschutzsubstanzen auf zytoplasmatischer Basis (Revitorgan®) im Test mit letalen Strahlendosen. Vortrag Tagung d. Ges. z. Erf. d. Makromol. Organo- u. Immunther. (GEMOI), Stuttgart 1982.
13. Sedlmeier, H., E. Metzger, U. Jentsch, E. Weitzenegger: Schutzeffekt von WR 2721 bei Neutronen-, Gamma- oder Röntgenbestrahlung von Mäusen. *Strahlentherapie* 157 (1981), 685-691.

Für die Verfasser: Dr. A. L. Gerbes, Labor f. experimentelle Radiologie, Ingolstädter Landstr. 2, D-8042 Neuherberg.