

Histologische und histometrische Untersuchungen am Benzol-geschädigten Rattenknochenmark* **

KLAUS NOESKE und HELMUT MARTENS***

Pathologisches Institut, Lehrstuhl I, der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingegangen am 7. September 1971

Histological and Histometrical Investigations of Benzene-Induced Lesions of Rat Bone Marrow

Summary. 1. Adult rats were given daily benzene injections for up to 3 weeks. After different periods of treatment, groups of animals were killed and the bone marrow of vertebrae and femora was examined in semi-thin sections after embedding in methacrylic methylester without decalcification.

2. Point-counting planimetry was used to obtain quantitative figures on the development of progressing benzene-induced bone marrow lesions.

3. The area of myeloid parenchyma was found to decrease from approx. 80% to 40% during benzene treatment. The corresponding increase of nonparenchymatous structures (blood vessels, fat cells) was unequal in the different bone marrow specimens as far as single components were concerned. The amount of fat cells in the marrow of vertebrae was twice as high as that in the marrow of femora.

4. Intoxication effects in the marrow of vertebrae and femora also differed for various bone marrow cells. The number of erythropoietic, myelopoietic and mast cells in the bone marrow of vertebrae decreased earlier and faster than in the marrow of femora.

5. In untreated control animals the marrow of femora showed greater blood vessel lumina and larger numbers of mast cells and plasma cells per square unit whereas the marrow of vertebrae contained a larger number of megakaryocytes per square unit.

6. Sinus dilatations and sinus wall lesions as well as the resulting hemorrhages and edematous areas in the bone marrow are interpreted as being due to benzene-induced parenchymal damage.

7. The toxic mechanisms of benzene are discussed with regard to impairment of mitoses, DNA synthesis defects and damages to other enzymatic systems in connection with the resulting histological changes.

Zusammenfassung. 1. Die bis 3 Wochen dauernde Benzolintoxikation des Rattenknochenmarks wurde an semidünnen Methacrylatschnitten von Wirbeln und Femur histologisch untersucht und histometrisch ausgewertet.

2. Mit Hilfe der Treffermethode konnte die Entwicklung der Intoxikationsschäden des Knochenmarks quantitativ objektiviert werden.

3. Der (Flächen-)Anteil des myeloischen Parenchyms sinkt während der 3wöchigen Benzolbehandlung der Ratten von rund 80% auf rund 40%. Bei dem korrespondierenden Anstieg der nichtparenchymatösen Strukturen erreicht der Fettzellanteil im Wirbelmark mehr als das Doppelte des Anteils im Femurmark.

4. Die Intoxikationseffekte sind in Wirbel- und Femurmark auch hinsichtlich verschiedener Knochenmarkszellen unterschiedlich: im Wirbelmark nehmen die Zellen der Erythropoese und der Granulocytopoese sowie die Mastzellen früher und stärker ab als im Femurmark.

* Mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Herrn Prof. Dudeck sei sehr herzlich für die Leitung der statistischen Auswertungen gedankt.

*** Mit technischer Assistenz von Herrn W. Dechert.

5. Bei den unbehandelten Kontrolltieren unterscheiden sich Wirbel- und Femurmark durch einen höheren (Flächen-)Anteil der Blutgefäßanschnitte und durch eine höhere Mastzell- und Plasmazellzahl pro Flächeneinheit im Femurmark sowie durch eine höhere Megakaryocytenzahl pro Flächeneinheit im Wirbelmark.

6. Die Sinusektasie und die Sinuswandläsionen mit den daraus sich entwickelnden Blutungen und Ödemseen werden als Folge des Parenchymschwundes unter Benzolwirkung gedeutet.

7. Die toxischen Wirkungsmechanismen des Benzols im Hinblick auf Mitosestörungen, DNS-Synthesedefekte und Schäden anderer Enzymsysteme werden im Zusammenhang mit den daraus resultierenden histologischen Veränderungen diskutiert.

Benzol gilt als eine der Noxen für die blutzellbildende Knochenmarksfunktion, die noch am ehesten anamnestisch nachweisbar ist (Scott u. Mitarb., 1959). Die Auswirkungen dieser myelotoxischen Substanz auf die hämatologischen Befunde scheinen gemäß zahlreichen klinischen und arbeitsmedizinischen Berichten jedoch sehr uneinheitlich, vielfältig und häufig auch widersprüchlich zu sein (Browning, 1965; Goldwater, 1941; McLean, 1960). Daher erschien die Verlaufsbeobachtung des Intoxikationsgeschehens an Knochenmarksschnitten von Versuchstieren und deren histometrische Auswertung lohnend, zumal systematische histologische Knochenmarksstudien zur Benzolwirkung weitgehend fehlen.

Material und Methoden

24 männliche Albinoratten eines hauseigenen Inzuchtstammes erhielten täglich subcutan *Benzolinjektionen* in einer Dosierung von 1,3 g/kg Körpergewicht. Den bei Versuchsbeginn zwischen 227 und 377 g schweren Tieren wurden somit täglich durchschnittlich 350–500 mg Benzol injiziert, bei abnehmendem Körpergewicht entsprechend weniger. Drei unbehandelte Ratten dienten als Kontrolltiere. Da einige Tiere vorzeitig verendeten oder durch Aufbeißen und Infektion der Injektionsstellen stark abweichende Resultate bei hämatologischen und histologischen Untersuchungen ergaben, kamen nach Eliminieren einzelner weiterer Tiere durch das Los für die vereinheitlichte statistische Endauswertung 14 Ratten in Betracht. Diese Tiergruppe setzt sich aus 2 Kontrolltieren und je 2 Ratten zusammen, die nach 3, 7, 10, 14, 17 und 22 Tagen Benzolbehandlung getötet wurden. Auf dieses Tiermaterial stützen sich die in dieser Arbeit mitgeteilten Hauptbefunde, die statistischen Berechnungen und die graphischen Darstellungen. Die Ratten wurden unter gleichen Bedingungen gehalten. Sie erhielten Trockenfutter (Fa. Hope-Farms) und Wasser nach Bedarf.

Zu Beginn der Behandlung und unmittelbar vor der Tötung der Tiere wurde der Schwanzvene Blut entnommen für *hämatologische Untersuchungen* der Erythrocyten- und Leukocytenzahl, des Hb-Wertes und des Differentialblutbildes. Für die Knochenmarkshistologie wurden ein 1 cm langes subtrochanteres Stück des linken Femurschaftes und die beiden ersten Lendenwirbel entnommen, zur histologischen Bearbeitung an Paraffinschnitten Milz, Leber, Niere, Lunge und Herzmuskel. Knochenmarksausstriche wurden aus dem rechten Femur gewonnen.

Die *Präparation der Knochenmarksschnitte* erfolgte nach der Methode von Burkhardt (1966a, b): Fixierung in Schaffers Gemisch, Einbettung in Methacrylsäuremethylester, Anfertigung der 2–4 μ dicken Schnitte mit dem Serienschnittmikrotom 1130 der Fa. Jung, Heidelberg, mit speziellem Messerhalter und Spezialmikrotommessern (Widia-Klingen) vom Compur-Werk, München. An den Methacrylatschnitten wurden folgende Färbungen durchgeführt: Hämatoxylin, Eosin-Goldner, Giemsa, Giemsa in der Modifikation nach Burkhardt, Faserversilberung nach Gomori, Turnbullblau-Reaktion.

Die *Auswertung der Knochenmarksschnitte* erfolgte zunächst rein deskriptiv mit besonderer Beachtung regressiver Einzelzellveränderungen, der Gefäßwand- und Faserverhältnisse sowie der Topographie der einzelnen Zellformen. Mit Hilfe des Leitz-Universal-Zähloculars (Blaschke, 1967; dort auch ausführliche Daten über die mathematischen Grundlagen des Verfahrens) (Abb. 1) wurde der prozentuale Flächenanteil (pFA) des myeloischen Parenchyms und der

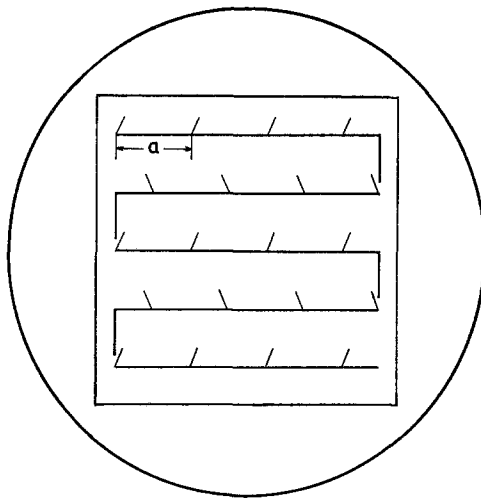


Abb. 1. Die Strichplatte des Leitz-Universal-Zähloculars, bestehend aus einem hexagonalen Zählpunktnetz mit 20 Zählpunkten und dem Zählpunktabstand a , dem rechteckigen Zählfeld ($= 17,32a^2$) und der Zählkreislinie ($= 20a$)

nicht parenchymatösen Strukturen ermittelt; im einzelnen der pFA der Erythrone, der Nester eosinophiler Granulocyten, der Megakaryocyten, des nichterythropoetischen Parenchyms, der Fettzellmenge, der Blutgefäße, der Erythrocytenextravasate (Blutungen) und Ödeme. Das Zählfeld diente außerdem der Bestimmung der Gesamtzelldicke kernhaltiger Zellen und der Dichte eosinophiler Granulocyten, der Mastzellen und Megakaryocyten.

Zur Ermittlung des pFA der oben angeführten Gewebekomponenten wurden nach den Grundsätzen der Treffermethode (Haug, 1955) pro Gesichtsfeld bei $24\times$ -Objektiv die durch das Leitz-Zählocular markierten 20 Punkte ausgewertet und registriert. In jedem Präparat — von jedem Tier wurden von Femur- und Wirbelmark je 4 Schnitte bearbeitet — wurden 5 verschiedene Gesichtsfelder aus dem Bereich des Markraumes nach diesem Prinzip durchmustert. Nach der Theorie der Treffermethode ist das Verhältnis der Trefferzahl für ein bestimmtes Strukturelement zur Gesamtzahl der Zählpunkte dem Flächenanteil der jeweiligen histologischen Elemente proportional. Die Ergebnisse dieser Treffermethode werden demgemäß im folgenden als prozentuale Flächenanteile = pFA aufgeführt und graphisch dargestellt. Die Fehlerbreite bei der Treffermethode beträgt für die hierbei angewandte Zähltechnik (Blaschke-Zählocular, 400 Zählpunkte pro Tier und Markgebiet) maximal $\pm 1,6\%$ (für das Blaschke-Ocular berechneter Tabellenwert der Fa. Leitz, Wetzlar). — Die Werte dieser pFA von 2 Tieren jeder Versuchsgruppe wurden mit Hilfe der Varianzanalyse statistisch bearbeitet.

Ergebnisse

1. Hämatologische Befunde

Geringer Rückgang der Erythrocytenzahl von durchschnittlich $8,7 \text{ Mill./mm}^3$ bei Kontrolltieren auf $6,2 \text{ Mill./mm}^3$ bei den am stärksten vergifteten Tieren nach 3 Wochen. Ähnlich geringes Abfallen der Hämoglobinwerte von durchschnittlich $14,2 \text{ g-\%}$ auf $10,4 \text{ g-\%}$.

Die normalerweise zwischen 7600 und 15900 stark schwankenden Leukocytenzahlen pro mm^3 sanken nach 3tägiger Benzolbehandlung auf $5000\text{—}6000/\text{mm}^3$, nach 1wöchiger Benzolbehandlung auf $1300\text{—}1400/\text{mm}^3$ und bis zum Ende des Versuchs — 3wöchige Benzolanwendung — bei dem am stärksten geschädigten

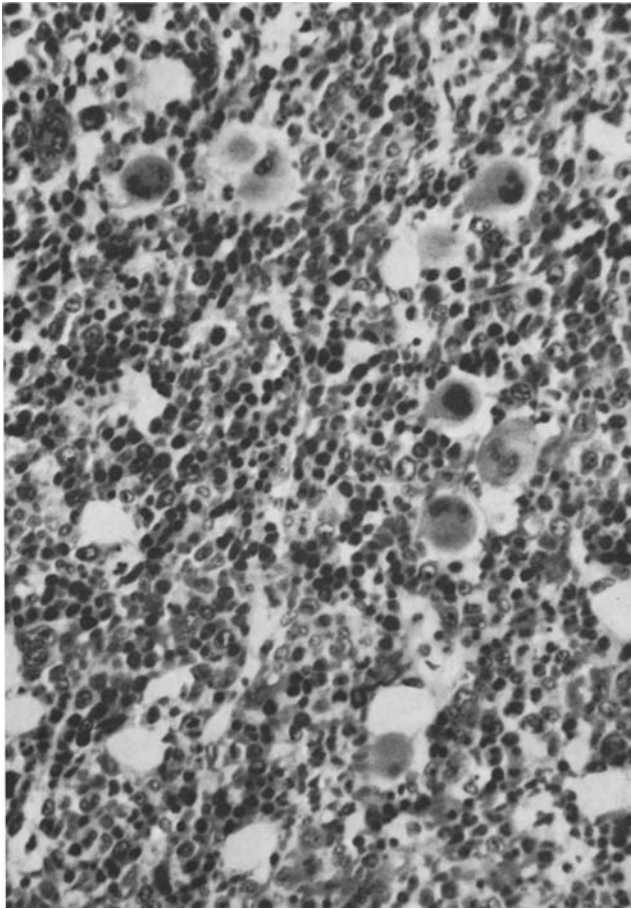


Abb. 2. Normales zeldichtes Femurmark einer nicht mit Benzol behandelten Ratte. Färbung: Goldner. Vergr. $320\times$

Tier auf $120/\text{mm}^3$. Nach dem Differentialblutbild nehmen die Lymphocyten am meisten ab: Mittelwert von Kontrolltieren 77%, am Ende des Versuchs 10%. Dem stehen die segmentkernigen Granulocyten bei den unbehandelten Tieren mit durchschnittlich 18,5%, am Ende des Versuchs mit 80% gegenüber. Die eosinophilen Granulocyten verschwinden völlig aus dem Blut. Unreife Blutzellvorstufen treten während des Versuchs im peripheren Blut nicht auf.

2. Histologische Befunde

Das Knochenmark der Ratte ist bei den unbehandelten Kontrolltieren sehr zeldicht, kaum von Fettzellen durchsetzt. Die Sinus sind eng und können vielfach erst bei stärkerer Vergrößerung ausgemacht werden. Das Zellbild wird beherrscht von den zahlreichen, durch starke Färbbarkeit der Zellkerne prominenten Erythronen und den sehr reichlichen eosinophilen Granulocyten, Mastzellen und Megakaryocyten (Abb. 2). Der Gitterfasergehalt ist spärlich und zart. In ein-

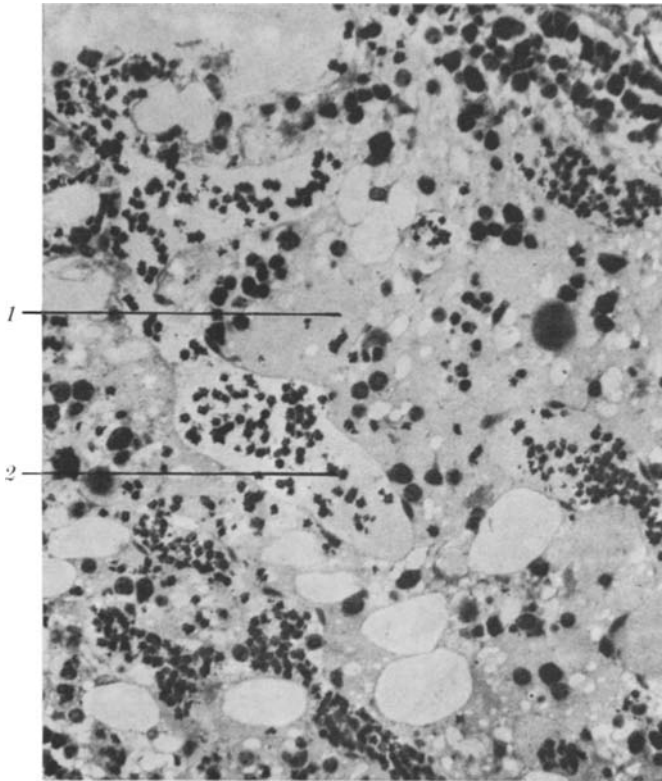


Abb. 3. Zellarmes Femurmark einer 22 Tage lang mit Benzol behandelten Ratte mit Blutungen und Ödemseen. Färbung: Giemsa, nach Burkhardt modifiziert. Vergr. $320\times$. 1 Ödemseen. 2 Sinusektasie

zelen Reticulumzellen ist etwa Eisenpigment nachzuweisen. — Im Verlauf der kontinuierlichen Benzolintoxikation verschwinden die Mastzellen sehr bald, die eosinophilen Granulocyten erst am Ende des Versuchs, während der Bestand an Megakaryocyten sowie an Reticulumzellen weitgehend konstant bleibt. Die Zellen der Granulocytopoese und der Erythropoese nehmen mehr oder weniger kontinuierlich ab. Die durch den geschilderten Zellschwund frei werdenden Räume werden zunehmend von den in größerer Zahl auftretenden Fettzellen, von den sich erweiternden Sinus sowie von Blutungen und Ödemseen eingenommen (Abb. 3). An vielen Zellen entwickeln sich unter der Benzoleinwirkung degenerative Veränderungen in Form stark kondensierter, verkleinerter und hyperchromatischer Kerne, in Form von Karyorhexis, Hämatoxylinkörperchen (Abb. 4), Aufblähung und Aufhellung der Zellkerne, von atypischen Kernteilungsfiguren und megaloblastären Zellformen. Die Eisenpigmentablagerungen in den Phagocyten nehmen im Verlauf des Versuchs mäßig stark zu. Eine Gitterfaservermehrung tritt nicht auf.

3. Histometrische Befunde

Die bereits deskriptiv behandelten Veränderungen des Rattenknochenmarks unter Benzoleinwirkung stellen sich aufgrund histometrischer Auswertung folgendermaßen dar:

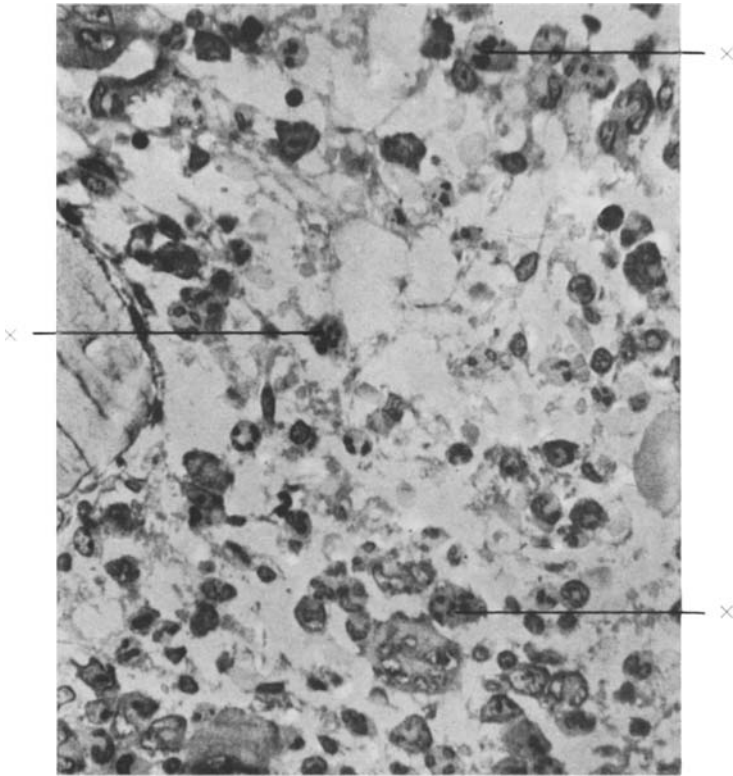


Abb. 4. Zellarmes Femurmark einer 22 Tage lang mit Benzol behandelten Ratte mit degenerativen Zellkernveränderungen (sog. Hämatoxylinkörperchen). Färbung: Giemsa, nach Burkhardt modifiziert. Vergr. 500 \times . \times Hämatoxylin-Körperchen

a) *Ergebnisse der Treffermethode* (Tabelle 1 und 2). Das myeloische Parenchym umfaßt beim unbehandelten Tier im Markraum des Femur einen durchschnittlichen prozentualen Flächenanteil (pFA) von 78%, im Markraum der Wirbelkörper 86%. Während der Benzolbehandlung reduziert sich der pFA im Femur um 54% des Ausgangswertes auf 36% bzw. im Wirbelmark um 71% des Ausgangswertes auf 25% (Abb. 5). Die korrespondierenden Werte für die nicht-parenchymatösen Strukturen steigen entsprechend von pFA 22% (Femur) bzw. 14% (Wirbelmark ohne Berücksichtigung der Spongiosa) auf 64 bzw. 75%.

Im einzelnen geht der pFA der *Erythrone* im Femurmark gleichmäßig von 9,4 auf 0,5% zurück, im Wirbelmark von 8,5 bereits nach 3 tägiger Benzolbehandlung auf 3%, schließlich auf 0% (Abb. 6).

Die Differenzen der Mittelwerte der beiden untersuchten Markgebiete Femur und Wirbel sind untereinander ($p < 0,01$) und hinsichtlich der einzelnen zeitlichen Intoxikationsabschnitte ($p < 0,05$) statistisch signifikant. Das bedeutet, daß die Erythropoese im Wirbelmark — schon beim unbehandelten Tier anteilmäßig weniger stark ausgeprägt — durch Benzol stärker als im Femurmark geschädigt wird.

Wegen ihrer großen Menge und teils flächenhaften Lagerung konnten die *eosinophilen Granulocyten* auch mit der Treffermethode ausgewertet werden. Ihr pFA geht von durch-

Tabelle 1. *Prozentuale Flächenanteile der mit der Treffermethode quantifizierten Komponenten des myeloischen Parenchyms von Femurmark (F) und Wirbelmark (W) einzelner Ratten nach verschieden langer Benzolintoxikation (VD= Versuchsdauer in Tagen)*

Tier Nr.	VD Tage	Erythropoese		Nicht-erythropoese		Eosinophile		Megakaryocyten		Parenchym	
		F	W	F	W	F	W	F	W	F	W
26	0	9,5	8,75	59,0	61,75	6,5	9,5	3,5	4,25	78,5	84,25
22		9,25	8,25	57,25	65,75	9,75	8,75	1,5	5,25	77,75	88,0
1	3	5,5	1,5	60,75	58,75	3,5	4,75	3,75	5,75	73,5	70,75
3		9,75	4,5	64,75	64,25	3,25	7,25	4,75	3,5	82,5	79,5
4	7	7,25	2,5	61,25	49,75	5,0	7,75	3,5	5,0	77,0	65,0
21		4,0	3,0	67,25	65,0	1,75	2,0	5,5	5,75	78,5	75,75
6	10	7,0	0,25	49,5	59,0	0,5	0,25	2,5	2,0	59,5	41,5
24		5,5	0,25	63,0	43,25	0,75	0,5	3,5	3,75	72,75	47,75
18	14	2,0	0,0	57,25	45,0	2,25	1,25	2,75	4,25	64,25	50,5
19		4,0	1,75	46,5	36,0	0,75	0,25	5,0	2,0	54,25	40,0
13	17	7,75	4,5	54,0	54,75	1,0	0,75	1,75	3,0	64,5	63,0
15		4,0	1,75	54,0	43,25	0,75	0,25	2,5	2,5	61,25	47,75
7	22	0,5	0,0	41,25	23,0	0,25	0,0	1,75	2,75	43,75	25,25
9		0,5	0,0	25,5	21,25	0,0	0,0	3,0	3,5	29,0	24,75

Tabelle 2. *Prozentuale Flächenanteile der mit der Treffermethode quantifizierten Komponenten der nicht parenchymatösen Strukturen von Femurmark (F) und Wirbelmark (W) einzelner Ratten nach verschieden langer Benzolintoxikation. (VD= Versuchsdauer). Die Werte beziehen sich auf den Markraum, da die Spongiosa bei der histometrischen Auswertung unberücksichtigt bleibt*

Tier Nr.	VD Tage	Fettzellen		Gefäße		Blutungen		Ödeme		Nichtparench. Strukturen	
		F	W	F	W	F	W	F	W	F	W
26	0	3,25	2,75	18,75	12,25	0,0	0,75	0,0	0,0	21,5	15,75
22		5,75	3,5	16,5	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	22,25	12,0
1	3	1,75	5,5	24,75	17,75	0,0	4,75	0,0	1,25	26,5	29,25
3		0,5	6,5	16,5	11,0	0,0	2,75	0,5	0,25	17,5	20,5
4	7	1,25	13,5	20,0	13,0	1,0	7,25	0,75	1,25	23,0	35,0
21		3,5	10,25	16,75	10,0	0,5	3,5	0,75	0,5	21,5	24,25
6	10	5,25	16,25	19,25	15,0	15,25	26,0	0,75	1,25	40,5	58,5
24		4,25	25,0	11,75	14,0	11,0	10,0	0,25	3,25	27,25	52,25
18	14	5,25	23,25	16,5	14,25	13,25	10,75	0,75	1,25	35,75	49,05
19		17,75	29,0	18,25	14,5	8,25	14,0	0,5	2,5	45,75	60,0
13	17	7,0	21,25	21,0	10,25	7,25	3,25	0,25	2,25	35,5	37,0
15		5,5	25,0	17,5	11,5	13,0	15,0	2,5	0,75	38,75	52,25
7	22	13,25	32,0	22,25	10,25	20,75	29,25	0,0	2,75	56,25	74,25
9		7,75	20,25	8,25	3,75	52,5	45,5	2,5	5,75	71,0	75,25

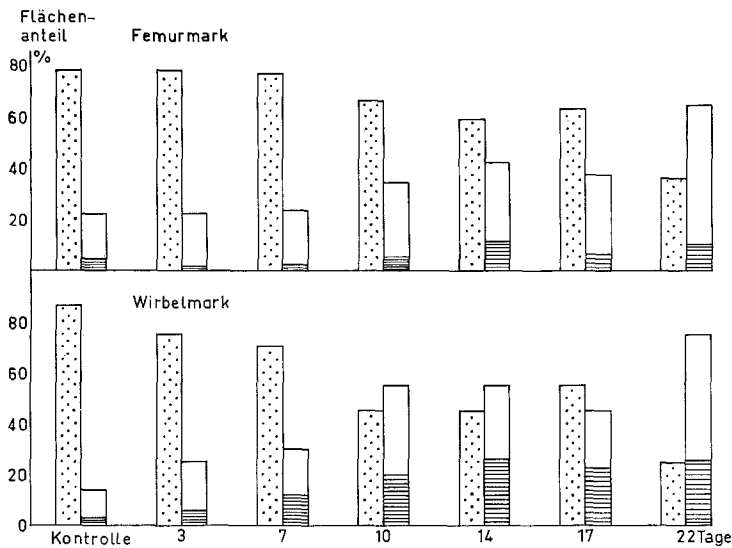


Abb. 5. Graphische Gegenüberstellung der prozentualen Flächenanteile von myeloischem Parenchym und nichtparenchymatösen Strukturen von Femurmark und Wirbelmark der Ratte mit besonderer Berücksichtigung des Fettgewebsanteils bei verschiedenen langer Benzolintoxikation. Myeloisches Parenchym, nichtparenchymatöse Strukturen, Fettgewebsanteil

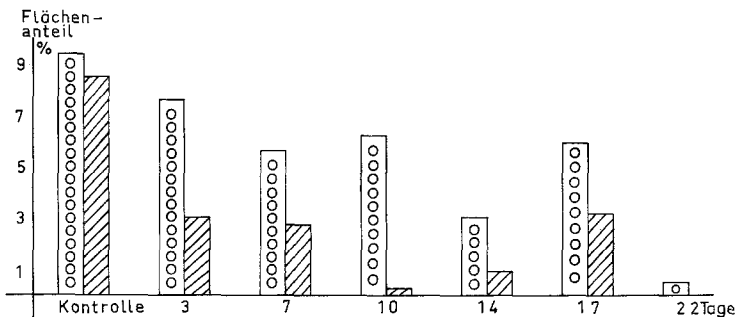


Abb. 6. Graphische Gegenüberstellung der prozentualen Flächenanteile der Erythropoese in Femurmark und Wirbelmark der Ratte bei verschiedenen langer Benzolintoxikation. Femurmark, Wirbelmark

schnittlich 8,6% (die beiden Markgebiete sind statistisch nicht signifikant different) nach 3tägiger Benzolbehandlung auf durchschnittlich 4,7%, nach 10 Tagen Benzol auf weniger als 1% zurück. Am Ende des Versuchs sind nahezu keine eosinophilen Granulocyten mehr nachweisbar (Abb. 7). Die Differenzen der Mittelwerte der einzelnen Vergiftungsstufen sind statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Auch der prozentuale Flächenanteil der *Megakaryocyten* wurde mit der Treffermethode ausgewertet. Der pFA von 3,6% ohne statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Markgebieten sinkt bis zum Ende des Versuchs auf 2,4%. Diese Abnahme ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Alle mit den bisher besprochenen Zellformen nicht erfaßten Anteile des myeloischen Parenchyms wurden unter der Bezeichnung „*Nichterythropoetisches*

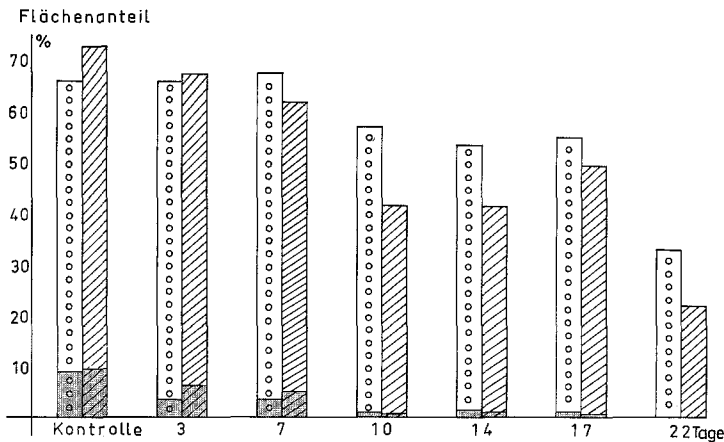


Abb. 7. Graphische Gegenüberstellung der prozentualen Flächenanteile der Granulocytopenie in Femurmark und Wirbelmark der Ratte nach verschieden langer Benzolintoxikation mit besonderer Berücksichtigung der eosinophilen Granulozyten. □ Femurmark, ▨ Wirbelmark, ■ eosinophile Granulozyten

Parenchym“ zusammengefaßt. Sein pFA beträgt bei unbehandelten Ratten im Femurmark durchschnittlich 58%, im Markraum der Wirbelkörper 63%. Erst nach 10tägiger Benzoleinwirkung setzt im Femurmark die Reduktion dieses Anteils ein, während sich im Wirbelmark — ähnlich wie bei der Erythropoese — schon etwas eher ein Intoxikationseffekt bemerkbar macht. Nach 3wöchiger Benzolbehandlung liegt der pFA für Femurmark durchschnittlich bei 33%, der für Wirbelmark bei 22% (Abb. 7). Die Differenzen der Mittelwerte der beiden Markgebiete untereinander und die Differenzen der Mittelwerte der einzelnen zeitlichen Vergiftungsstufen sind statistisch signifikant different ($p < 0,01$).

Die *nichtparenchymatösen Strukturen* umfassen die Gesamtheit der jeweils angeschnittenen Fettzellen, Blutgefäße, Blutungen und Ödemseen. Ihr pFA beträgt insgesamt beim unbehandelten Tier im Femur durchschnittlich 22%, im Wirbelmark ohne Spongiosa 14%. Diese Werte steigen mit fortschreitender Vergiftung kontinuierlich auf 64% bzw. 75% an (Abb. 5).

Im einzelnen nimmt der *Fettzellanteil* (pFA) von durchschnittlich 4,5% im Femurmark bzw. 3,0% im Wirbelmark der Kontrolltiere weitgehend kontinuierlich zu und erreicht am Ende des Versuchs 11,5% (Femurmark) bzw. 26,0% (Wirbelmark) (Abb. 5). Die Differenzen der Mittelwerte der beiden Markgebiete untereinander und die Differenzen der Mittelwerte der einzelnen zeitlichen Vergiftungsstufen bei den beiden Markgebieten sind statistisch signifikant different ($p < 0,01$).

Blutgefäße und Blutungsherde sind einer getrennten quantitativen Auswertung schwer zugänglich, weil gerade bei den länger mit Benzol behandelten Tieren Sinuserweiterung, Sinuswanddissoziation und Blutung vielfach nicht scharf abgrenzbar sind. Da bei der histometrischen Bearbeitung nur solche Gefäße gewertet wurden, bei denen eine sichere Endothelabgrenzung erkennbar war, dürften z.B. Sinus mit Wanddefekten und unscharf angrenzender Blutung in

der Rubrik „Blutgefäße“ weniger stark vertreten sein als ihrer Anzahl und Weite anteilmäßig entspricht. Mit dieser Einschränkung seien die folgenden Zahlen genannt. Der pFA der Kontrolltiere für Blutgefäße beträgt durchschnittlich im Femurmark 17,4%, im Wirbelmark 10,4%. Der Anstieg ist aus den genannten Gründen uneinheitlich, z.T. sind die Werte auch rückläufig, vgl. Tabelle 1. Als statistisch signifikant ($p < 0,01$) kann nur die Differenz der Mittelwerte der beiden verschiedenen Markgebiete angesehen werden.

Die *Blutungsherde*, deren pFA von durchschnittlich 0,2% ohne signifikante Differenz in den beiden Markgebieten mit großer Wahrscheinlichkeit artefiziell bedingt sein dürfte, ergeben nach 10tägiger Benzolbehandlung einen sprunghaften Anstieg des pFA auf 15%, maximal auf 37% (Tabelle 2). Die Differenz der Mittelwerte der jeweils verschieden lange mit Benzol behandelten Tiergruppen ist statistisch signifikant ($p < 0,05$), nicht jedoch die Differenz der beiden Markgebiete.

Ödemseen im Knochenmark kommen bei den Kontrolltieren nicht vor. Bei zunehmender Vergiftungsdauer erreicht ihr pFA im Femurmark durchschnittlich 1,4%, im Wirbelmark 4,3% (Tabelle 2). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Vergiftungsgruppen sind sehr gering und daher statistisch nicht signifikant. Signifikante Differenzen ($p < 0,05$) bestehen nur zwischen den beiden untersuchten Markgebieten.

b) *Ergebnisse der Zellzählung pro Flächeneinheit* (Tabelle 3). Die *Gesamt-Zelldichte* aller kernhaltigen Elemente des normalen Rattenknochenmarkes beträgt im Femurschnitt 18000—20000/mm², im Wirbelschnitt 20000—21000/mm². Die Zelldichte nimmt im Wirbelmark früher und stärker ab als im Femurmark und erreicht am Ende des Versuchs 3900 Zellen/mm² im Wirbelmark und 4500 Zellen/mm² im Femurmark.

Die *Plasmazellen* sind im Femurmark pro Flächeneinheit doppelt so häufig (74/mm²) wie im Wirbelmark (39/mm²). Unter der Benzoleinwirkung gehen diese Zahlen in beiden Markgebieten auf die Hälfte dieser durchschnittlichen normalen Ausgangswerte zurück. Die Differenzen der Mittelwerte der beiden Markgebiete und der verschiedenen Intoxikationsstufen sind statistisch signifikant ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$).

Die *Mastzellen* kommen im Femurmark der unbehandelten Tiere sehr zahlreich vor (244—395/mm²), im Wirbelmark weniger häufig (42—53/mm²). Ihre Zahl geht unter Benzolbehandlung auf 0 zurück; im Wirbelmark bereits nach 14tägiger, im Femurmark nach 22tägiger Benzoleinwirkung. Die Differenzen der Mittelwerte der beiden Markgebiete und der verschiedenen Intoxikationsstufen sind statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Die Auswertung der Zelldichte *eosinophiler Granulocyten* stimmt mit den Resultaten der Treffermethode (s. o.) gut überein. In beiden Markgebieten liegt ihre Anzahl pro mm² zwischen 1200 und 2000 ohne statistisch signifikante Differenz. Schon nach 10tägiger Benzolbehandlung ist die Menge der eosinophilen Granulocyten auf rund 5% der normalen Ausgangswerte reduziert. Am Ende des Versuchs liegt ihre Zahl zwischen 7/mm² und 140/mm².

Die Differenzen, die sich durch Abnahme der eosinophilen Granulocyten zwischen den Mittelwerten der einzelnen Intoxikationsstufen ergeben, sind statistisch in gleichem Grade mit $p < 0,01$ signifikant wie bei den Resultaten der Treffermethode.

Bei den *Megakaryocyten* ergibt sich gegenüber den Resultaten der Treffermethode insofern ein Unterschied, als ihre Anzahl pro mm² in den beiden untersuchten Markgebieten statistisch signifikant different ist ($p < 0,01$): im Femurmark 60—70/mm², im Wirbelmark 100/mm². Bei der relativ geringen Abnahme dieser Megakaryocyten-dichte unter der Benzol-

Tabelle 3. Zellzahl pro mm² und Zellhäufigkeit pro mm² für einige ausgewählte Zellformen von Femurmark (F) und Wirbelmark (W) einzelner Ratten nach verschieden langer Benzolintoxikation. (VD = Versuchsdauer)

Tier Nr.	VD Tage	Gesamt- zellzahl		Megakaryo- cyten		Eosino- phile		Mast- zellen		Plasma- zellen		Mitosen	
		F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W
26	0	18816	20136	60	103	1190	1250	244	49	69	33	63	35
22		20250	21024	68	100	2050	1945	76	42	79	46	56	70
1	3	17496	16224	64	117	495	420	395	53	81	45	59	46
3		20736	12736	76	104	650	522	267	23	73	30	94	63
4	7	18336	10416	59	86	704	667	251	3	74	32	53	40
21		19104	12032	64	114	310	425	165	3	78	33	30	40
6	10	9552	6624	64	92	49	49	13	16	35	25	81	30
24		17448	7536	64	84	53	99	46	7	38	22	55	27
18	14	15456	8032	78	110	386	158	36	0	87	20	35	25
19		8704	6384	57	30	73	26	23	0	61	23	30	27
13	17	10400	10064	63	61	33	59	16	0	50	20	27	35
15		9792	7664	46	26	7	3	10	0	28	18	22	33
7	22	4520	4112	56	60	139	49	10	0	26	17	2	8
9		4592	3952	30	35	7	7	0	0	56	18	12	8

einwirkung gleichen sich die Unterschiede der Markgebiete völlig aus. Am Versuchsende beträgt die Megakaryocyten-dichte in beiden Markgebieten 35–60/mm². Die Differenzen der Mittelwerte der einzelnen Vergiftungsstufen sind statistisch in gleichem Grade mit $p < 0,05$ signifikant wie bei den Resultaten der Treffermethode.

Die Zahl der Mitosen pro mm² von durchschnittlich 61 im Femurmark und 52 im Wirbelmark ergibt eine mit $p < 0,05$ statistisch signifikante Differenz. Unter der Benzolintoxikation gehen diese Zahlen bis zum Ende des Versuchs auf durchschnittlich 7 im Femurmark und 8 im Wirbelmark zurück. Die Mittelwertdifferenzen der einzelnen Intoxikationsstufen sind mit $p < 0,05$ statistisch signifikant. Eine Zuordnung der ausgezählten Mitosen zu bestimmten Zelltypen des Knochenmarks wurde nicht vorgenommen.

Diskussion

Die von Burkhardt (1966a, b) entwickelte Methode der histotechnischen Präparation unentkalkten Knochenmarksmaterials wurde für das Studium der histologischen Veränderungen des Knochenmarks nach experimenteller Intoxikation mit Benzol angewandt. Weil bei dieser Art der histologischen Präparation nur sehr geringfügige Schrumpfungen auftreten (Burkhardt, 1966a), konnte an einem solchen Material die objektive quantitative Auswertung von histologischen Knochenmarksveränderungen durchgeführt werden, während dieses komplexe, zellreiche und gemäß seinem Zellbestand sehr inhomogene Gewebe bisher nur einer unvollkommenen deskriptiven Bearbeitung zugänglich war.

Die myelotoxische Wirkung des Benzols führt aufgrund der dargestellten histologischen und histometrischen Befunde zu einer hochgradigen Reduktion des Knochenmarkszellbestandes sowie zu erheblichen Änderungen der histologi-

schen Grundstruktur. Diese Veränderungen bestehen bei starker und ausreichend langer Benzoleinwirkung in einer hochgradigen Sinusektasie sowie in einer hämorrhagischen und ödematösen Durchsetzung des lockeren und an Blutzellvorstufen weitgehend leeren Netzes von Reticulumzellen. Derartige Schädigungen treten trotz der angewandten hohen Dosierung nicht schlagartig ein, sondern sie entwickeln sich allmählich. Diese Beobachtung läßt sich gut mit der Deutung vereinbaren, daß das Benzol nicht so sehr cytotoxisch wirkt, sondern an der gerade im blutzellbildenden Knochenmark lebhaften Zellregeneration bzw. den ihr zugrunde liegenden biochemischen Prozessen angreift.

Der biochemische Wirkungsmechanismus des Benzols ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine ganze Reihe von Einzelaspekten ist in der Literatur bereits publiziert worden. Rondanelli (1961) wies auf die dem Colchicintyp entsprechenden Mitoseschädigungen durch Benzol hin. Er erwähnte die Blockierung der Meta- und Anaphase, ferner die Chromosomenbrüche zwischen Tochtersternen und die heterotopen Chromosomengruppen, die zur Bildung atypischer Kerne führen. Matsushita (1966) deutet die von ihm gefundenen Mitosestörungen und Chromosomenbrüche als Benzoleffekt vom radiomimetischen Typ. Im Rahmen der eigenen histologischen Untersuchungen konnten in guter Übereinstimmung hiermit ebenfalls verschiedenartige Atypien von Kernteilungsfiguren beobachtet werden.

Boje u. Mitarb. (1970) haben dagegen die Störung der Mitose nicht für den primären und ausschlaggebenden Effekt des Benzols gehalten. Sie sahen den Angriffspunkt des Benzols eher in einer Störung der Thymidylatsynthese und bzw. oder in einer Störung des Einbaus von Thymidin in die DNS und in einer damit zusammenhängenden Veränderung des Thymidinpools. Ob auch andere für die Nucleotidsynthese erforderliche Purinkörper in ähnlicher Weise betroffen sind, ist bisher nicht geklärt. Eine Störung der DNS-Synthese wurde aufgrund von DNS-Kettenbrüchen von Philip und Jensen (1970) angenommen sowie von Speck u. Mitarb. (1966) mit Hilfe der ^3H -Thymidinmarkierung nachgewiesen. Der daraus resultierende signifikante Rückgang der Mitosenhäufigkeit konnte mit den hier vorgelegten eigenen Untersuchungen objektiviert werden. Er ist etwa doppelt so stark wie der Rückgang der Gesamtzellzahl pro Flächeneinheit. Die Parallele zum verwandten pathogenetischen Mechanismus des Folsäure- und Vitamin B_{12} -Mangels äußert sich im Auftreten megaloblastärer Zellelemente in den ersten Phasen des Intoxikationsversuches. Die Benzolwirkung auf die Bausteine der genetischen Informationsträger könnte ein Hinweis für das Verständnis der häufig beobachteten Benzolleukosen sein (de Gowin, 1963; Galinelli u. Mitarb. 1963; Kähler u. Mitarb., 1961; Ludwig und Werthemann, 1962; Tarceff u. Mitarb., 1963; Vigliani, 1964). Im eigenen Untersuchungsmaterial traten keine Leukosen auf.

Aber auch andere Schädigungen im Intermediärstoffwechsel, z.B. toxische Einflüsse auf spezielle Enzymsysteme durch Benzol wurden beschrieben. Browning (1965) fand einen Aktivitätsverlust der alkalischen Leukocytenphosphatase sowie der Phosphatasen in Leber und Niere; Jonek u. Mitarb. (1966, 1967) beobachteten unter Benzoleinwirkung einen Aktivitätsverlust der Pyruvatdehydrogenase, der ATPase und alkalischen Phosphatase in Mäuseleber und -niere, während die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase und der sauren Phosphatase zunahm. Die bei den eigenen Untersuchungen in einzelnen Stichproben nachgewiesene, gegen-

über der Norm geringergradige Reaktion der Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase ist als ein gleichartiges Schädigungsphänomen anzusehen. Es läßt sich jedoch nicht entscheiden, ob die Bildung dieser Enzyme durch Benzol gestört wird oder ob das Benzol einen erhöhten Verbrauch, eine Zerstörung oder eine Funktionsbehinderung solcher Enzyme bewirkt.

Dieses ungelöste Problem steht auch einer vollständigen Erklärung der auffällig starken Abnahme von eosinophilen Granulocyten und Mastzellen in den eigenen Versuchen im Wege. Es ist schwer vorstellbar, daß diese beiden Zelltypen aufgrund einer allgemein zellschädigenden Benzolwirkung aus dem Knochenmarkszellbestand verschwinden. Wahrscheinlicher ist im Zusammenhang mit der angeführten Literatur die Annahme, daß diese Zelltypen unter dem Benzoleinfluß eine Degranulierung erleiden. Die an ihren auffälligen Granula gewöhnlich leicht zu erkennenden Zellformen scheinen dadurch sehr rasch abzunehmen. Als weiterer ursächlicher Faktor der Verminderung dieser speziellen Zellformen wird — wie bei allen übrigen Knochenmarkszellen — die Störung der Ausreifung von Bedeutung sein (Speck u. Mitarb., 1966).

Die hämatologischen Auswirkungen der Benzolintoxikation stimmen nach den verschiedenen Mitteilungen der Literatur nicht immer überein. Nach den eigenen Befunden an Ratten und Merkers Beobachtungen (1962) am Menschen resultiert eine besonders starke Schädigung der Erythropoese, während Speck u. Mitarb. (1966) am Kaninchen eine überwiegende Schädigung der Granulocytopoese bei weitgehend erhaltener Erythropoese fanden. Angesichts gleicher Benzoldosierung ist bei der Erklärung dieser Differenz neben einer evtl. vorliegenden unterschiedlichen Art disposition auch die besondere histometrische Auswertungstechnik zu berücksichtigen. Der unter der Bezeichnung „nichterythropoetisches myeloisches Parenchym“ zusammengefaßte Markanteil enthält auch andere als nur granulocytopoetische Elemente. Dagegen kann aber von einer weitgehend erhaltenen Erythropoese unter Benzoleinwirkung bei der Ratte im eigenen Material nicht gesprochen werden.

Hinsichtlich der starken Granulocytenabnahme im peripheren Blut besteht bei allen Untersuchern der Benzolwirkung Übereinstimmung, wozu auch Ito (1965) und Matsushita (1966) zitiert werden müssen. Wegen der nur relativ kurzen Dauer der eigenen und der gleichartigen Versuche in der Literatur ist bei der längeren Lebensdauer der Erythrocyten — bei Ratten durchschnittlich 60 Tage (Ganzoni, 1970) — hinsichtlich ihrer Zahl und des Hämoglobingehaltes im peripheren Blut nur ein geringer Rückgang zu verzeichnen. Zum Teil ist die Verschlechterung des roten Blutbildes Folge einer hämolytischen Benzolwirkung (Browning, 1965).

Die geringe Abnahme der Megakaryocyten im Rattenknochenmark nach längerer Versuchsdauer, die mit den Befunden von Wirtschaftler und Bischel (1960) gut übereinstimmt, dürfte ebenso wie bei den zahlenmäßig sich ähnlich verhaltenden Plasmazellen Ausdruck einer längeren Lebensdauer sein. Die wahrscheinlich auch gestörte Megakaryocytopoese und Plasmazellneubildung macht sich daher bei diesen Populationen nicht so stark bemerkbar.

Der Reduktion des myeloischen Parenchyms steht eine ganz erhebliche histomorphologische Umgestaltung der nichtparenchymatösen Strukturen gegenüber.

Mit schwindendem Parenchym erweitern sich die Sinus, und anscheinend capilläre Gefäße erreichen Sinuskaliber. Diese aus der Leberpathologie bekannte Entlastungshyperämie ist mit den veränderten Druckverhältnissen gut zu erklären. In fortgeschrittenen Intoxikationsstadien treten Sinuswanddefekte und Blutungen hinzu, für die außer mechanischen auch toxische Momente verantwortlich sein dürften, zumal bei der durch Sinusektasie verlangsamten Blutströmung mit einer weiteren Benzolanreicherung gerechnet werden kann. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Benzolkonzentration im Knochenmark nach Schrenk (1941) und Moeschlin (1936) 20mal höher sein soll als im peripheren Blut. Es ist bemerkenswert, daß in allen übrigen untersuchten Organen keine solchen Gefäßwanddefekte und Blutungen aufgetreten waren. Die Beobachtung von Gefäßveränderungen als Folge der Schäden am myeloiden Parenchym soll hiermit den von Stodtmeister (1957) und Flidner (1957) beschriebenen Befunden gegenübergestellt werden, wonach bei Röntgenbestrahlung den Gefäßschäden im Knochenmark eine primäre Bedeutung zukommt.

Ektatische, mit Erythrocyten reichlich angefüllte und defekte Sinus kommunizieren mit den Erythrocyten- und Ödemextravasaten, so daß bei der histometrischen Auswertung dieser schweren Folgen der toxischen Schädigungen keine scharfen Grenzen zwischen den verschiedenen Kompartimenten gezogen werden konnten. Der prozentuale Flächenanteil der Gefäßlumina und der Blutungen war somit nicht exakt zu bestimmen. Nur die Zunahme des Knochenmarködems konnte zuverlässig erfaßt werden und erschien bei statistischer Auswertung signifikant. Abgesehen von dieser im Material begründeten Einschränkung hat sich die histometrische Auswertung der Knochenmarksschnitte mit Hilfe der Treffermethode bewährt, weil sich hiermit zuverlässige objektive Kriterien für die Beurteilung histologischer Strukturveränderungen an diesem Organ gewinnen lassen. Dies geht auch hervor aus den statistisch gut übereinstimmenden Daten der mit zwei verschiedenen Techniken ermittelten Mengenänderungen der eosinophilen Granulocyten und Megakaryocyten.

Zu den Veränderungen der nichtparenchymatösen Strukturen gehört die Fettzellzunahme, wie sie schon von Ito (1965) am Wirbelmark beobachtet wurde. Bei dem Vergleich von Wirbel- und Femurmark aufgrund der eigenen Versuche zeigt sich eine statistisch signifikant stärkere Fettzellzunahme im Wirbelmark. Dieser in allen Vergiftungsstadien zu erhebende Befund geht einher mit einer stärkeren Schädigung der verschiedenen Parenchymkomponenten im Wirbelmark. Eine stichhaltige Erklärung hierfür ist zur Zeit nicht möglich. Man muß aber daran denken, daß verschiedene Knochenmarksgebiete von vornherein unterschiedlich beschaffen sind, z. B. hinsichtlich der Blutzirkulation, und verschieden reagieren. Dieser Gedanke wird durch einige histometrisch objektivierbare Befunde gestützt. Bereits in unbehandelten Kontrolltieren differieren die Zahlen der Mastzellen, Plasmazellen und Megakaryocyten in den beiden untersuchten Markgebieten in dem Sinne, daß im Wirbelmark die Megakaryocyten häufiger, die Mast- und Plasmazellen weniger zahlreich sind. Ferner ist der prozentuale Flächenanteil der Blutgefäßanschnitte im Femurmark signifikant höher als im Wirbelmark. Diese Unterschiede der Knochenmarkszusammensetzung sollten auch für den Bereich der menschlichen Knochenmarkspathologie an die Beschränktheit der Aussagemöglichkeiten aus einzelnen biopsischen Stichproben erinnern.

Literatur

- Blaschke, R.: Indirekte Volumen-, Oberflächen-, Größen- und Formfunktionsbestimmungen mittels Zählfiguren in Schnittebenen mit dem Leitz-Zählokular. *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn.* **4**, 44—49 (1967).
- Boje, H., Benkel, W., Heiniger, H. J.: Untersuchungen zur Leukopoese im Knochenmark der Ratte nach chronischer Benzolinhaleation. *Blut* **21**, 250—257 (1970).
- Browning, E.: Toxicity and metabolism of industrial solvents. Amsterdam-London-New York: Elsevier Pub. Co. 1965.
- Burkhardt, R.: Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. 1. Mitteilung: *Blut* **13**, 337—357 (1966); 2. Mitteilung: *Blut* **14**, 30—46 (1966).
- Fliedner, Th. M., Sandkühler, St., Stodtmeister, R.: Über die Voraussetzungen der Markregeneration nach Schädigung durch radioaktives Goldkolloid. *Schweiz. med. Wschr.* **39/40**, 1225—1226 (1957).
- Gallinelli, R.: Tre casi di benzolismo cronico di cui due mortati. *Med. d. Lavoro* **54**, 169—182 (1963).
- Ganzoni, U.: Kinetik und Regulation der Erythrozytenproduktion. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.
- Goldwater, L. J.: Disturbances in the blood following exposure to benzene. *J. Lab. clin. Med.* **26**, 957—964 (1941).
- Gowin, R. L. de: Benzene exposure and aplastic anemia followed by leukemia 5 years later. *J. Amer. med. Ass.* **185**, 748—751 (1963).
- Haug, H.: Die Treffermethode. Ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **118**, 302—312 (1955).
- Ito, U.: Electronmicroscopical study on benzene intoxicated rat bone marrow with special references to its reticulo-endothelial structure. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* **12**, 1—29 (1965).
- Jonek, J., Greybek, H., Kaminski, M., Kochanska, D.: Histochemische Lokalisation verschiedener Enzyme in der Mäuseleber bei akuter Benzolvergiftung. *Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* **22**, 133—140 (1966).
- Kaminski, M., Karbowski, A., Greybek, H.: Einfluß subakuter Benzolvergiftungen auf das Verhalten einiger Enzyme in den Nieren von Mäusen. *Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* **24**, 140—147 (1967).
- Kähler, H. J., Merker, H.: Chronisch-myeloische Leukämie bei langjährigem Kontakt mit Benzol. *Dtsch. med. Wschr.* **86**, 1135—1140 (1961).
- Ludwig, H., Werthemann, A.: Benzolmyelopathien. *Schweiz. med. Wschr.* **92**, 378—384 (1962).
- Matsushita, T.: Experimental studies on the disturbance of hematopoietic organs due to benzene intoxication. *Nagoya J. med. Sci.* **28**, 204—234 (1966).
- McLean, J. A.: Blood dyscrasia after contact with petrol containing benzene. *Med. J. Aust.* **47**(II), 845—849 (1960).
- Merker, H.: Benzol und die Früherkennung seiner blutschädigenden Wirkung. *Med. Klin.* **57**, 1254—1262 (1962).
- Moeschlin, S.: Klinik und Therapie der Vergiftungen. Stuttgart: Thieme 1956.
- Philip, P., Jensen, M. K.: Benzene induced chromosome abnormalities in rat bone marrow cells. *Acta path. microbiol. scand. Section A* **78**, 489—490 (1970).
- Rondanelli, E. G., Gorini, P., Pecorari, D., Trotta, N., Colombi, R.: Effets du benzene sur la mitose erythroblastique. Investigations a la microcinematographie en contraste de phase. *Acta haemat. (Basel)* **26**, 282—302 (1961).
- Schrenk, H. H., Yant, W. P., Pearce, S. J., Patty, F. A., Sayers, R. R.: Absorption, distribution and elimination of benzene by body tissues and fluids of dogs exposed to benzene vapor. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* **23**, 20—56 (1941).
- Scott, J. L., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M.: Acquired aplastic anemia. An analysis of 39 cases and review of the pertinent literature. *Medicine (Baltimore)* **38**, 119—171 (1959).

- Speck, B., Schnider, Th., Gerber, U., Moeschlin, S.: Experimental studies on the action mechanism of benzene on bone marrow. Radioautographic studies with ^3H -thymidine. Schweiz. med. Wschr. **96**, 1274—1276 (1966).
- Stodtmeister, R., Sandkühler, St., Fliedner, Th. M.: Über die Beziehungen des Ausschwemmungsmechanismus zur Sinusfunktion im Knochenmark. Schweiz. med. Wschr. **39/40**, 1225 (1957).
- Tarceff, E. M., Konchialovskaya, N. M., Zorina, L. A., Benzene leukemias. Acta Un. int. Cancr. **19**, 751—755 (1963).
- Vigliani, E. C., Saita, G.: Benzene and leukemia. New Engl. J. Med. **271**, 872—876 (1964).
- Wirtschafter, Z. T., Bischel, M. G.: Reticulo endothelial response to benzene. Arch. environm. Hth **1**, 10 (1960).

Prof. Dr. K. Noeske
Pathologisches Institut der Universität
D-63 Gießen
Klinikstr. 32 g
Deutschland