

Regeneration und Zellproliferation des Thymus nach Cyclophosphamid

H. Hauk, G. Günther und H. Göing

Senckenbergisches Zentrum der Pathologie (Direktor: Prof. Dr. W. Rotter), Abteilung III
(Leiter: Prof. Dr. K. Hübner), Universität Frankfurt a.M. und Paul-Ehrlich-Institut,
Staatliche Anstalt für experimentelle Therapie, Frankfurt a.M.
(Komm. Direktor: Prof. Dr. G. Heymann)

Eingegangen am 1. Dezember 1972

Regeneration and Cell Proliferation of the Thymus after Cyclophosphamide

Summary. The histological changes in the thymus of specific pathogen-free (SPF) Sprague-Dawley rats, the mitotic index in the thymic cortex and the thymic weight were investigated over a period of 29 days after treatment with high doses of cyclophosphamide. The following findings were noted:

(1) Thymic weight decreases rapidly after cyclophosphamide administration and there is a marked depletion of lymphoid cells in the thymic cortex.

(2) Regeneration of the thymus takes place in spasms, with maxima of the mitotic index on day 9 and day 16.

(3) Thymic weight reaches normal levels on day 21. Thereafter a second drop in thymic weight may be found, probably due to increased emigration of thymic lymphoid cells to other lymphatic tissues.

(4) The thymus is regenerated more quickly than the splenic lymphatic tissue. Normal values for lymphocytes in blood and full immune response are not regained until regeneration of the thymus is complete.

Zusammenfassung. Am Thymus spezifisch pathogenfreier (SPF) Sprague-Dawley-Ratten wurden die histologischen Veränderungen, die Mitosehäufigkeit in der Thymusrinde und das Thymusgewicht nach Cyclophosphamid-Stoß über einen Zeitraum von 29 Tagen untersucht. Folgende Befunde konnten dabei erhoben werden:

1. Der Thymus erfährt eine rasche Gewichtsabnahme und einer starke Zellverarmung seiner Rinde.

2. Die anschließende Regeneration des Thymus nimmt einen schubweisen Verlauf mit Mitosemaxima am 9. und 16. Tag.

3. Das normale Thymusgewicht wird am 20. Tag wieder erreicht. Danach nimmt das Thymusgewicht wieder ab, wahrscheinlich infolge vermehrter Abgabe von Thymuslymphocyten an das übrige lymphatische Gewebe.

4. Die Regeneration des Thymus erfolgt schneller als die Regeneration des lymphatischen Gewebes der Milz. Erst nach Abschluß der Thymusregeneration erreicht die Zahl der Lymphocyten im peripheren Blut den Normalwert und wird die volle Immunansprechbarkeit zurückgewonnen.

Die unspezifische Unterdrückung von Immunreaktionen durch Cytostatica gewinnt in den letzten Jahren an praktischer Bedeutung, z. B. bei Transplantationen und bei Autoimmunkrankheiten. Ziel einer immunsuppressiven Therapie ist die Erzeugung einer Immuntoleranz gegen krankmachende Antigene. Göing *et al.* (1970) konnten zeigen, daß nach zweimaliger Injektion von 80 mg/kg Cyclophos-

phamid in 24stündigem Abstand bei Ratten eine vollständige Immunsuppression für 14 Tage eintritt. Während dieser Phase kann mit geringen Antigendosen eine Immuntoleranz erzeugt werden. Die Lymphocyten im Blut und das lymphatische Gewebe der Milz werden durch diesen Cyclophosphamid-Stoß fast vollständig zerstört; sie regenerieren anschließend in einem Zeitraum von 4 Wochen (Günther und Göing, 1970).

Der Thymus spielt bei der Regeneration des Immunsystems auch beim erwachsenen Tier eine wesentliche Rolle. Wurde vor der Cyclophosphamid-Gabe eine Thymektomie durchgeführt, so waren zum Zeitpunkt der Wiederkehr der Immunansprechbarkeit die Knötchenrandzonen in der Milz verkleinert und nach abgeschlossener Regeneration des Immunsystems die Immunreaktionen verzögert (Göing *et al.*, 1972). Ähnliche Folgen hat die Thymektomie sonst nur beim neugeborenen Tier.

Da der Thymus selbst von einer immunsuppressiven Therapie ebenfalls getroffen wird, interessierte uns die Frage, welche morphologischen Veränderungen im Thymus nach einem Cyclophosphamid-Stoß auftreten und in welchem zeitlichen Ablauf die Regeneration und Zellproliferation des Thymus dabei erfolgen.

Methodik

1. Tierversuche

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 145 weiblichen spezifisch pathogenfreien (SPF) Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, die in keimarmen Räumen in Gemeinschaftskäfigen gehalten wurden.

125 Tieren (Gewicht 190—220 g, Durchschnittsgewicht 201 g) wurde zweimal im Abstand von 24 Std je 80 mg/kg Cyclophosphamid (Endoxan®, Asta-Werke) um 14 Uhr intraperitoneal injiziert. Die Gesamtdosis von 160 mg/kg Cyclophosphamid entspricht der DL_{50} von Ratten, die nicht spezifisch pathogenfrei sind (Brock und Wilmanns, 1958). Bis zum 28. Tag nach der zweiten Cyclophosphamid-Gabe töteten wir täglich jeweils um 14 Uhr 2 oder mehr Tiere in Äthernarkose durch Dekapitation und entnahmen den Thymus. Jedem Tier wurde 3 Std vor der Tötung 0,4 mg des mitosearretierenden Demecolcin (Colcemide®, Ciba) intraperitoneal injiziert. Von den 125 Ratten starben 13 spontan in den ersten 2 Wochen nach dem Cyclophosphamid-Stoß.

20 Tiere (Gewicht 192—215 g, Durchschnittsgewicht 200 g) erhielten kein Cyclophosphamid und dienten als Kontrollen. Jeweils 4 dieser Tiere wurden am Versuchsbeginn, sowie am 8., 16., 22. und 29. Tag nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe getötet, nachdem sie 3 Std vorher 0,4 mg Demecolcin erhalten hatten.

2. Mikroskopische Untersuchungen

Die Thymi wurden 24 Std in Bouinscher Lösung fixiert und über die aufsteigende Alkoholreihe sowie Methylbenzoat und Benzol in Paraffin eingebettet. Stufenschnitte von 5 μ m Dicke wurden mit Hämatoxylin und Eosin sowie nach Giemsa gefärbt.

Die Mitosehäufigkeit ist in den verschiedenen Schichten von Mark und Rinde des Thymus unterschiedlich. Es erschien uns deswegen zweckmäßig, die Mitosen nur in einer bestimmten Schicht der Rinde zu zählen. Wir benutzten für die Mitosezählung eine Ocularstrichplatte („Ocularstrichplatte zur Reticulocytenzählung“, Zeiss), die im Zentrum eines 8 \times 8 mm großen Quadrates ein kleineres Quadrat enthielt, dessen Fläche $\frac{1}{10}$ der Fläche des größeren Quadrates betrug. Bei der gewählten Vergrößerung ($1562,5\times$, Ölimmersion 100, Okular 12,5, Zwischenvergrößerung durch Binokulartubus 1,25) entsprach der Abstand zwischen den benachbarten Seiten des äußeren und inneren Quadrates 29 μ m, die Seitenlänge des kleineren Quadrates 27 μ m (Flächeninhalt 729 μ m²).

Zur Mitosezählung stellten wir eine Seite des äußeren Quadrates auf die Grenze zwischen Rinde und bindegewebiger Kapsel des Thymuslappchens ein und zählten alle Mitosen und alle Ruhezellkerne innerhalb des kleineren Quadrates mit Ausnahme der Mitosen und Zellkerne von Fibrocyten und Gefäßendothelien. Eine nähere Differenzierung der ausgezählten Ruhezellen erschien unzweckmäßig, weil die in Mitose befindlichen Zellen kaum differenziert werden konnten. Von jedem Tier zählten wir mindestens 2000 Zellkerne in verschiedenen Stufenschnitten und berechneten den Mitoseindex (Verhältnis der Zahl der Mitosen zur Gesamtzahl) pro 1000 Zellkerne.

Zur statistischen Prüfung benutzten wir den verteilungsfreien Rangtest von Wilcoxon für unabhängige Stichproben (Pfanzagl, 1966; Geigy, 1969).

Ergebnisse

1. *Histologische Befunde*

In den ersten 4 Tagen nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe wurden die Lymphocyten der Thymusrinde fast vollständig zerstört. Neben zahlreichen pyknotischen Lymphocyten und Zelldetritus sahen wir vermehrt gespeicherte Kerntrümmer in Makrophagen. Die reticuloepithelialen Zellen waren vergrößert und enthielten kleine Vacuolen. Die Mastzellen in der Thymuskapsel und in den Bindegewebssepten waren vermehrt. Am 4. Tage nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe erreichte die Lymphocytenverarmung der Rinde ihren Höhepunkt. Zwischen den hellen reticuloepithelialen Zellen fanden sich nur noch einzelne meist kleine, zum Teil pyknotische Lymphocyten und Kerntrümmerphagen. Das Thymusmark blieb dagegen so zellreich wie bei den Kontrolltieren, so daß das Mark zellreicher als die Rinde war (Abb. 1). Dadurch entstand das Bild des "inverted thymus". Mitosen waren zu diesem Zeitpunkt sehr selten und lagen ausschließlich in der subcapsulären Rindenschicht.

Die Regeneration des Thymus begann um den 5. Tag nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe. In der Rinde traten in zunehmender Zahl lymphoide Zellen und große Lymphocyten auf. Daneben fanden sich weiterhin pyknotische Lymphocyten und Kerntrümmerphagen. In den folgenden Tagen kam es zu einer zunehmenden Neubesiedlung der Thymusrinde mit zunächst großen, nach dem 8. Tag jedoch überwiegend kleinen Lymphocyten, so daß nach dem 14. Tage das histologische Bild wieder dem der Kontrolltiere entsprach. Nach dem 21. Tag schien der Zellgehalt der Thymusrinde wieder etwas abzunehmen, ohne daß sich Zeichen eines erneuten Zelluntergangs nachweisen ließen.

2. *Mitosehäufigkeit* (Abb. 2a)

Am 2. Tag nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe fanden wir keine Mitosen. Vom 3.—9. Tag nahm die Mitosehäufigkeit stetig zu, überschritt dabei am 6. Tag den Kontrolltierwert und erreichte am 9. Tag ein Maximum mit einem durchschnittlichen Mitoseindex von $103,3^0_{00}$ ($s=8,9^0_{00}$). Nach dem 9. Tag nahm die Mitosehäufigkeit wieder ab und erreichte am 13. Tag ein Minimum von 20^0_{00} , welches deutlich unter dem Kontrolltierwert lag. Eine zweite Mitosewelle erreichte am 16. Tag ihr Maximum mit einem durchschnittlichen Mitoseindex von $67,4^0_{00}$ ($s=9,6^0_{00}$). Danach ging die Mitosehäufigkeit wieder auf die Werte der Kontrolltiere zurück. Eine angedeutete weitere Mitosewelle fand sich am 24. und 25. Tage.

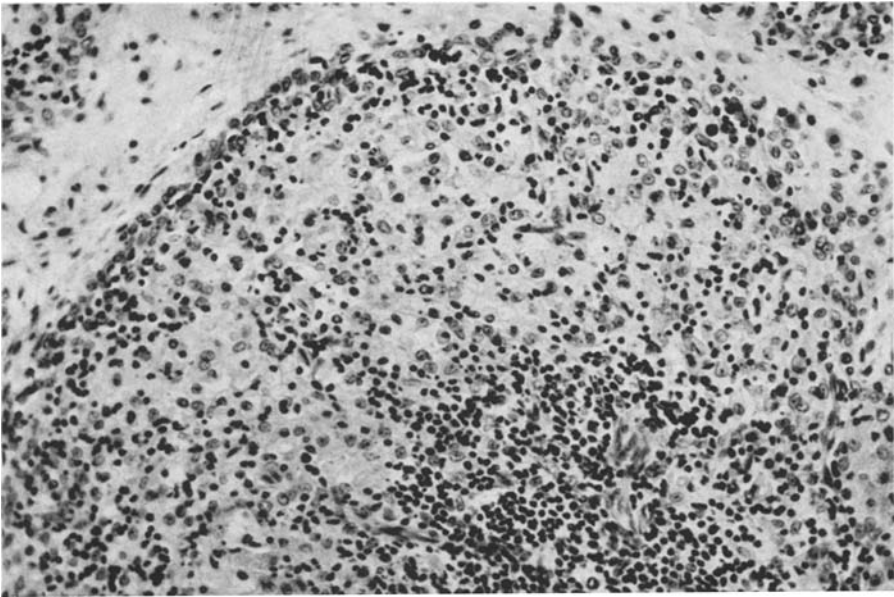


Abb. 1. Ein Thymusläppchen am 4.Tag nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe. Die Rinde ist sehr zellarm. H. E., Vergr. etwa 160fach

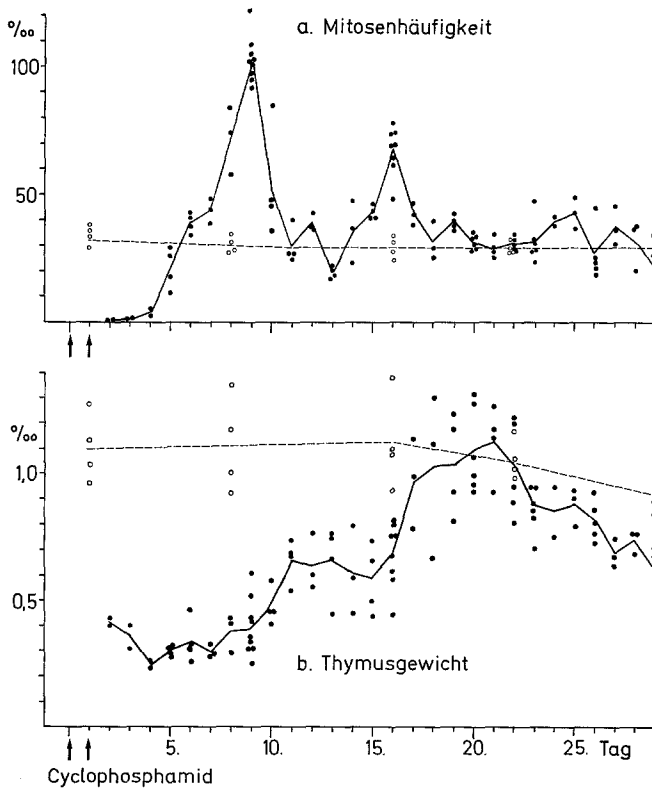


Abb. 2. a) Mitosehäufigkeit der Thymusrinde in Promille der Zahl der Zellkerne. b) Thymusgewicht in Promille des Körpergewichtes. (Die gestrichelten Kurven stellen die Kontrolltierreisultate dar)

Die Erhöhung der Mitosehäufigkeit am 9. Tag ist im Vergleich zu den 5 vorhergehenden und den 5 folgenden Tagen statistisch signifikant ($p < 0,005$), ebenso die Erhöhung der Mitosehäufigkeit am 16. Tag im Vergleich zu den 5 vorhergehenden und 5 folgenden Tagen ($p < 0,005$).

Bei den Kontrolltieren war die Zahl der Mitosen relativ konstant. Der durchschnittliche Mitoseindex betrug $30,90/_{00}$ ($s = 3,50/_{00}$).

3. Thymusgewicht (Abb. 2b)

Nach dem Cyclophosphamid-Stoß wurde der Thymus erheblich kleiner. Sein Gewicht erreichte am 4. Tag nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe ein Minimum mit ca. 20 % des Kontrolltierwertes. Vom 4. bis zum 9. Tage nahm das Thymusgewicht nur wenig zu, am 10. und 11. Tag jedoch sprunghaft um ca. 70 %. Eine zweite ebenfalls sprunghafte Gewichtszunahme um ca. 65 % erfolgte am 16. und 17. Tag. Um den 21. Tag übertraf das Thymusgewicht der behandelten Tiere das der Kontrolltiere. Danach kam es zu einer erneuten Abnahme des Thymusgewichtes unter den Kontrolltierwert, die bis zum 29. Versuchstag anhielt. Bei den Kontrolltieren wurde der Thymus nach dem 16. Tag deutlich kleiner, wahrscheinlich infolge der physiologischen Thymusinvolution.

Diskussion

Eine Stoßbehandlung mit hohen Dosen von Cyclophosphamid führt zu einer raschen Verkleinerung des Thymus und zu einer starken Zellverarmung der Thymusrinde, die am 4. Tag nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe unter dem Bild des „inverted thymus“ ihren Höhepunkt erreicht. Gleichartige Veränderungen des Thymus wurden nach Ganzkörperbestrahlung beobachtet (Murray, 1948; Kaplan und Brown, 1957). Bereits wenige Tage nach dieser Involution findet sich eine gesteigerte Proliferationstätigkeit in der Thymusrinde. Das normale histologische Bild des Thymus ist nach etwa 2 Wochen weitgehend wiederhergestellt. Auch dieses Verhalten entspricht der Regeneration des Thymus nach Ganzkörperbestrahlung.

Die Steuerung der Regeneration des Thymus und der Thymuslymphopoese ist bisher nicht geklärt. Das autonome Wachstumsverhalten von Thymustransplantaten (Metcalf, 1963, 1966; Matsuyama *et al.*, 1966) und das Ausbleiben jeglicher Regeneration nach partieller Thymektomie (Metcalf, 1964; Borum, 1969) lassen vermuten, daß der Proliferationsreiz für die Thymuslymphocyten vom Thymus selbst ausgeht. Neuere Befunde sprechen dagegen für eine Beeinflussung des Thymus und seiner Lymphopoese durch Wachstumshormone (Pierpaoli und Sorkin, 1967, 1969; Baroni *et al.*, 1969; Fabris *et al.*, 1970; Pandian und Talwar, 1971).

Smith und Kiefer (1957) sowie Takada *et al.* (1969) beobachteten nach Ganzkörperbestrahlung im Thymus ein Maximum der Mitosehäufigkeit am 5. Tag. Über den 10. Tag hinausgehende Untersuchungen der Mitosehäufigkeit wurden jedoch nicht oder nur lückenhaft durchgeführt. Nach unseren Ergebnissen erfolgt die Zellvermehrung und die Gewichtszunahme des Thymus bei der Regeneration nach Cyclophosphamid-Stoß nicht stetig und gleichmäßig. Sie nimmt vielmehr einen schubweisen Verlauf. Die Mitoseaktivität der Thymusrinde setzte am 3. Tag nach der ersten Cyclophosphamid-Gabe wieder ein, nahm dann ständig zu und erreichte am 8. Tag ein Maximum. Anschließend nahm die Mitosehäufigkeit wieder ab und

erreichte am 12. Tag ein Minimum mit subnormalen Werten. Danach entwickelte sich eine zweite Mitosewelle, die am 16. Tage ihr Maximum erreichte. Der zweite Mitosegipfel war deutlich niedriger als der erste. Gleichzeitig mit beiden Mitosewellen stieg das Thymusgewicht jeweils sprunghaft an. Die Kurve des Thymusgewichtes verläuft deswegen treppenförmig.

Wachstumsschübe mit Intervallen von mehreren Tagen wurden bereits bei verschiedenen Wachstumsvorgängen beobachtet. Hübner fand einen Wachstumsgipfel 2 Tage nach Setzen des Wachstumsreizes, dem weitere Wachstumsgipfel im Abstand von je etwa 7 Tagen folgten, und zwar beim kompensatorischen Wachstum der Niere nach einseitiger Nephrektomie (Hübner, 1967), bei der Nierenregeneration nach temporärer Ischämie (Hübner, 1964) und nach Sublimatvergiftung (Hübner und Kempf, 1968). Mehrtägige Wachstumsrhythmen wurden ferner bei der Leberregeneration nach Teilhepatektomie (Günther, Hübner und Paul, 1968) und nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung (Hübner und Voigt, 1972) nachgewiesen, schließlich auch bei der Epidermishypertrophie nach Methylcholanthrenpinselung (Hübner, Zöllner und Löser, 1968) sowie beim physiologischen Wachstum der Niere (Hübner, 1971). An lymphoretikulären Organen, z. B. der Milz, sind bisher nur tageszeitliche Schwankungen der DNS-Synthese und der Mitosehäufigkeit beobachtet worden (Pilgrim *et al.*, 1965).

Die Ursache dieser mehrtägigen Wachstumsrhythmen ist bis heute noch nicht bekannt. Schon Hübner, Zöllner und Löser (1968) sowie Hübner und Bergmann (1972) hatten darauf hingewiesen, daß die Generationszeit der Zellen für das rhythmische Gewebswachstum nicht verantwortlich sein kann. Dies trifft auch für die Thymuslymphocyten zu, deren Generationszeit (Michalke *et al.*, 1969) dafür zu kurz ist; auch ist der Zellumsatz der Thymusrinde (Metcalf und Wiadrowski, 1966; Borum, 1968) dafür zu groß.

Hübner konnte zeigen, daß es sich bei diesen mehrtägigen Wachstumsrhythmen wahrscheinlich um die Folge einer zellunabhängigen übergeordneten Wachstumssteuerung handelt. Darüber hinaus konnten Hübner und Usadel (1972) nachweisen, daß der 7-Tage-Rhythmus bei der Regeneration der Niere nach temporärer Ischämie nicht vom Wachstumshormon gesteuert wird.

Die zeitliche Übereinstimmung der sprunghaften Gewichtszunahmen des Thymus mit den Maxima der Mitosehäufigkeit spricht dafür, daß die Gewichtszunahme des Thymus eher durch eine verstärkte örtliche Zellvermehrung als durch Einwanderung von Zellen verursacht wird. Unsere Ergebnisse geben aber keine eindeutige Aussage, welche Zellen die Regeneration des Thymus einleiten und von welchen Zellen die Mitosegipfel gebildet werden. Bekanntlich wird der Thymus während der Embryogenese (Moore und Owen, 1967) und auch später von Vorläuferzellen der Thymuslymphocyten besiedelt, die wahrscheinlich aus dem Knochenmark stammen (Ford und Micklem, 1963; Harris *et al.*, 1964; Metcalf und Wakonig-Vaartaja, 1964; Dukor *et al.*, 1965; Ford, 1966; Micklem *et al.*, 1966; Brumby und Metcalf, 1967; Wu *et al.*, 1968; Takada *et al.*, 1969). Takada *et al.* (1969) fanden nach Ganzkörperbestrahlung und anschließender Injektion von Knochenmarkszellen mit einem Markierchromosom nach 5 Tagen im Thymus ausschließlich Mitosen von Wirtszellen, nach 15 Tagen dagegen überwiegend solche von Spenderzellen. Danach scheint die Regeneration zunächst von überlebenden Zellen des Thymus auszugehen und später von eingewanderten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark unterhalten zu werden. Diese Befunde legen den Schluß

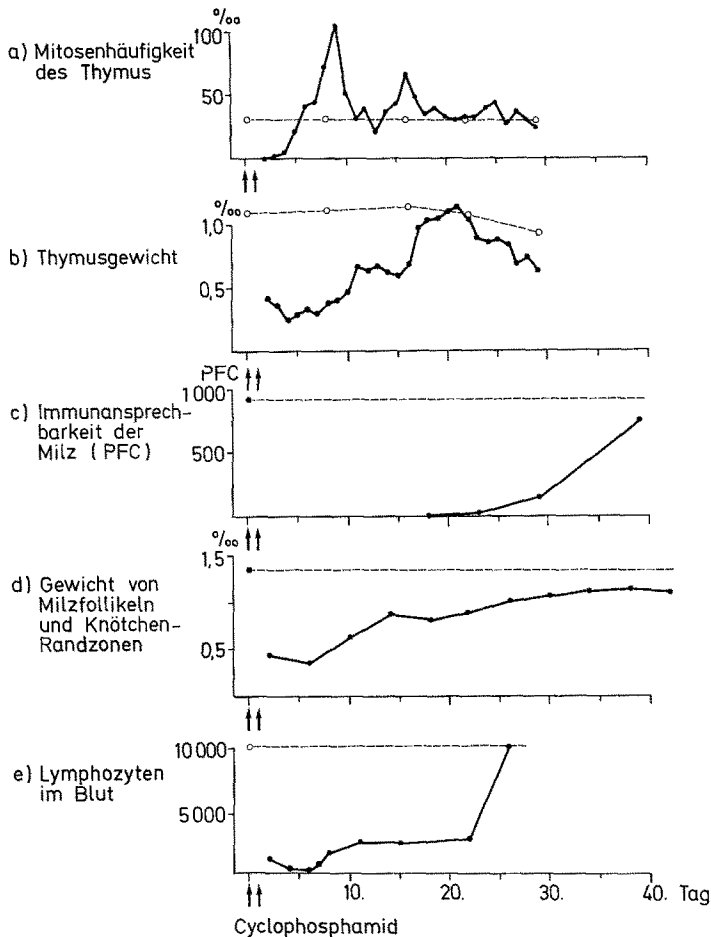


Abb. 3. a) Mitosehäufigkeit der Thymusrinde in Promille der Zahl der Zellkerne. b) Thymusgewicht in Promille des Körpergewichtes. c) Immunansprechbarkeit der Milz, gemessen mit der Agar-Plaques-Technik nach Jerne. d) Gewicht von Milzfollikeln und Knötchen-Randzonen der Milz in Promille des Körpergewichtes. e) Zahl der Lymphocyten im Blut pro mm^3 . (Die gestrichelten Kurven stellen die Kontrolltierwerte dar. Die Kurven c, d und e sind zitiert nach Günther und Göing, 1970)

nahe, daß die erste von uns beobachtete Mitosewelle von im Thymus überlebenden Zellen, die zweite Mitosewelle aber durch eingewanderte Vorläuferzellen gebildet wird. Interessant erscheint es uns, daß bei unserer Versuchsanordnung zum Zeitpunkt des zweiten Mitosegipfels im Thymus auch die extramedulläre Blutbildung in der Milz ihren Höhepunkt erreicht (Günther und Göing, 1970). Offenbar werden auch die Blutbildungszellen zu diesem Zeitpunkt zur Vermehrung angeregt.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit früheren Ergebnissen am gleichen Versuchsmodell (Abb. 3) verdeutlicht die zeitliche Zuordnung der Regeneration des Thymus zur funktionellen und morphologischen Regeneration anderer Teile des Immunsystems. Die Regeneration des Thymus erfolgte fast ausschließlich in dem Zeitraum, in dem die Immunansprechbarkeit der Milz, gemessen mit der Agar-

Plaque-Technik nach Jerne (1963), noch unterdrückt war. Auch die morphologische Regeneration des lymphatischen Milzgewebes, dargestellt durch das Gewicht von Follikeln und Knötchenrandzonen, dauerte erheblich länger als die Regeneration des Thymus. Die erste Vermehrung der Lymphocyten und lymphoiden Zellen im peripheren Blut erfolgte gleichzeitig mit der ersten Mitosewelle im Thymus. Eine zweite, erheblich stärkere Vermehrung der Lymphocyten im Blut fand statt, nachdem das Thymusgewicht den Kontrolltierwert wieder erreicht hatte.

Nach dem 21. Versuchstag, nachdem das Thymusgewicht der Kontrolltiere bereits wieder erreicht worden war, sahen wir eine erneute Abnahme des Thymusgewichtes, die bis zum Versuchsende am 29. Tag anhielt. Der Gewichtsabfall war deutlich stärker als der während der physiologischen Thymusinvolutions der Kontrolltiere. Histologisch schien in dieser Zeit der Zellgehalt der Thymusrinde vermindert, ohne daß sich Zeichen eines erneuten Zellunterganges fanden. Eine derartige späte Gewichtsabnahme des Thymus wurde auch nach Ganzkörperbestrahlung mehrfach beobachtet (Brecher *et al.*, 1948; Harris, 1958; Kaplan und Brown, 1957; Cross *et al.*, 1964; Järplid, 1967; Takada *et al.*, 1969). Wie Cross *et al.* (1964) nachweisen konnten, erfolgte die zweite Gewichtsabnahme des Thymus nach der Ganzkörperbestrahlung gleichzeitig mit der zunehmenden Wiederansprechbarkeit des Immunsystems. Die von uns beobachtete zweite Gewichtsabnahme des Thymus stand ebenfalls mit der wieder beginnenden Immunansprechbarkeit in zeitlicher Übereinstimmung, ferner mit einer Zunahme des Gewichtes des lymphatischen Milzgewebes und einer starken Vermehrung der Lymphocyten im peripheren Blut. Die Mitosehäufigkeit des Thymus dagegen war in dieser Zeit eher erhöht.

In der Neugeborenenperiode ist die Gewichtszunahme des Thymus geringer, als es der Produktionsrate lymphoider Zellen entspricht (Hess *et al.*, 1967, 1971; Michalke *et al.*, 1969). Als Ursache dafür wird eine vermehrte Auswanderung von Thymuslymphocyten angenommen, weil in der Neugeborenenperiode die Entwicklung des lymphatischen Gewebes von der Einwanderung von Thymuslymphocyten abhängig ist (Raff und Owen, 1971). Wahrscheinlich werden nach der Immunsuppression ebenfalls vermehrt Thymuslymphocyten zur Besiedlung der lymphatischen Organe in den Kreislauf abgegeben, wie es von Ernström und Nordlind (1971) beschrieben worden ist. Der Rückgang des Thymusgewichtes nach dem 21. Versuchstage fände damit eine einleuchtende Erklärung.

Wir danken Frau E. Benn, Frau W. Zeller und Herrn T. Fuss für ihre sorgfältige technische Assistenz.

Literatur

- Baroni, C. D., Fabris, N., Bertoli, G.: Effects of hormones on development and function of lymphoid tissues. Synergistic action of thyroxin and somatotrophic hormone in pituitary dwarf mice. *Immunology* **17**, 303—314 (1969).
- Borum, K.: Pattern of cell production and cell migration in mouse thymus studied by autoradiography. *Scand. J. Haemat.* **5**, 339—352 (1968).
- Borum, K.: Lack of restoration of thymic tissue following partial surgical thymectomy in the mouse. *Acta path. microbiol. scand.* **76**, 515—519 (1969).
- Brecher, G., Endicott, K. M., Gump, H., Browner, H. P.: Effects of x-ray on lymphoid and hemopoietic tissues of albino mice. *Blood* **3**, 1259—1274 (1948).
- Brock, N., Wilmanns, H.: Wirkung eines zyklischen N-Lost-Phosphamidesters auf experimentell erzeugte Tumoren der Ratte. *Dtsch. med. Wschr.* **83**, 453—458 (1958).
- Brumby, M., Metcalf, D.: Migration of cells to the thymus demonstrated by parabiosis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **124**, 99—103 (1967).

- Cross, A. M., Davies, A. J. S., Doe, B., Leuchars, E.: Time of action of the thymus. *Nature (Lond.)* **203**, 1239—1241 (1964).
- Dukor, P., Miller, J. F. A., House, W., Allman, V.: Regeneration of thymus grafts. I. Histological and cytological aspects. *Transplantation* **3**, 639—668 (1965).
- Ernstström, U., Nordlind, K.: Thymic release of lymphocytes in guinea-pigs treated with 5-fluorodesoxyuridine. *Acta path. microbiol. scand. sect. A* **79**, 658—664 (1971).
- Fabris, N., Pierpaoli, W., Sorkin, E.: Hormones and the immune response. In: *Developmental aspects of antibody formation and structure* (J. Sterzl and I. Riha, eds.), p. 79. New York-London: Academic Press 1970.
- Ford, C. E.: Traffic of lymphoid cells in the body. In: *Ciba Found. Symp. Thymus: Experimental and clinical studies* (G. E. W. Wolstenholme and R. Porter, eds.), p. 131. London: Churchill 1966.
- Ford, C. E., Micklem, H. S.: The thymus and lymph nodes in radiation chimaeras. *Lancet* **1963 I**, 359—362.
- Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl. Basel 1962.
- Göing, H., Günther, G., Gujarathi, S., Kaiser, P.: Experimental models for immune depression. Immuncyte depression in rats induced by cyclophosphamide. *Int. Arch. Allergy* **38**, 420—426 (1970).
- Göing, H., Günther, G., Jenissen, A., Kaiser, P.: Die Bedeutung des Thymus für regenerierende Immunzellen erwachsener Ratten. Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt a.M. Beiträge zur Immunologie und zur Serum- und Impfstoffprüfung 1970—1971. Heft 67, 19—29 (1972).
- Günther, G., Göing, H.: Unterdrückung und Regeneration der Immunansprechbarkeit. — Quantitative und morphologische Untersuchungen an der Rattenmilz nach Cyclophosphamid-Stoß. *Verh. deutsch. Ges. Path.* **54**, 231—324 (1970).
- Günther, G., Hübner, K., Paul, A.: Mitose-Rhythmen der Leber nach Teilhepatektomie. *Virchows Arch. Abt. B* **1**, 69—79 (1968).
- Harris, J. E., Ford, C. E., Barnes, D. W. H., Evans, E. P.: Cellular traffic of the thymus: experiments with chromosome markers. Evidence from parabiosis for an afferent stream of cells. *Nature (Lond.)* **201**, 886—887 (1964).
- Harris, P. F.: Changes in thymus and lymph-node activity and alterations in bone marrow lymphocyte levels during recovery of the guinea pig from whole gamma irradiation. *Brit. J. exp. Path.* **39**, 557—573 (1958).
- Hess, M. W., Schädeli, J., Cottier, H.: Pathogenese und Pathomorphologie kindlicher Immunopathien. *Verh. deutsch. Ges. Path.* **55**, 175—189 (1971).
- Hess, M. W., Stoner, R. D., Cottier, H.: Growth characteristics of mouse thymus in the neonatal period. *Nature (Lond.)* **215**, 426—428 (1967).
- Hübner, K.: Veränderungen der DNS-Synthese in der Niere nach vorausgegangener temporärer Ischämie. *Verh. deutsch. Ges. Path.* **48**, 273—279 (1964).
- Hübner, K.: Kompensatorische Hypertrophie, Wachstum und Regeneration der Rattenniere. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **48**, 1—80 (1967).
- Hübner, K.: Histoautoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese während des physiologischen Größenwachstums. *Verh. deutsch. Ges. Path.* **55**, 624—629 (1971).
- Hübner, K., Bergmann, H.: Histoautoradiographische Untersuchungen über die Generationszeit der Nierentubulusepithelien und ihre Beziehung zur rhythmischen Zellneubildung während der Regeneration nach temporärer Ischämie. *Beitr. Path., im Druck*.
- Hübner, K., Kempf, P.: Histoautoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese der Nieren nach Sublimatvergiftung. *Med. Welt* **19** (N.F.), 2867—2871 (1968).
- Hübner, K., Löser, R., Zöllner, E.: Experimentelle Untersuchungen über die DNS-Synthese der Methylcholanthren-gepinselten Mäusehaut. *Virchows Arch. Abt. B* **1**, 3—14 (1968).
- Hübner, K., Usadel, K. H., Schneider, E.: Histoautoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von Hypophysektomie und STH-Substitution auf die Regeneration der Nierentubulusepithelien nach temporärer Ischämie der Rattenniere. *Verh. deutsch. Ges. Path.* **56**, 1972, im Druck.
- Hübner, K., Voigt, H.: Histoautoradiographische Untersuchungen zur Leberregeneration nach CCl₄-Vergiftung. *Med. Welt* **23** (N.F.), 1348—1351 (1972).
- Järplid, B.: Irradiation induced asymmetry of the thymus in mice. *Acta path. microbiol. scand.* **70**, 561—565 (1967).

- Jerne, N. K., Nordin, A. A.: Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science* **140**, 405 (1963).
- Kaplan, H. S., Brown, M. B.: Radiation injury and regeneration in lymphoid tissues. In: Henry Ford Hospital Int. Symp., The Leukemias: etiology, pathophysiology, and treatment (J. W. Rebuck, F. H. Bethell, and R. W. Monto, eds.), p. 163. New York: Academic Press 1957.
- Matsuyama, M., Wiadrowski, M. N., Metcalf, D.: Autoradiographic analysis of lymphopoiesis and lymphocyte migration in mice bearing multiple thymus grafts. *J. exp. Med.* **123**, 559—576 (1966).
- Metcalf, D.: The autonomous behaviour of normal thymus grafts. *Aust. J. exp. Biol.* **41**, 437—448 (1963).
- Metcalf, D.: The thymus and lymphopoiesis. In: The thymus in immunobiology (R. A. Good and A. E. Gabrielsen, eds.), p. 150. New York: Harper and Row 1964.
- Metcalf, D.: The thymus. — Its role in immune responses, leukaemia development and carcinogenesis. *Recent Results in Cancer Research*, vol. 5. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- Metcalf, D., Wakonig-Vaartaja, R.: Stem cell replacement in normal thymus grafts. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **115**, 731—735 (1964).
- Metcalf, D., Wiadrowski, M.: Autoradiographic analysis of lymphocyte proliferation in the thymus and in thymic lymphoma tissue. *Cancer Res.* **26** (I), 483—492 (1966).
- Michalke, W. D., Hess, M. W., Riedwyl, H., Stoner, R. D., Cottier, H.: Thymic lymphopoiesis and cell loss in newborn mice. *Blood* **33**, 541—554 (1969).
- Micklem, H. S., Ford, C. E., Evans, E. P., Gray, J.: Interrelationships of myeloid and lymphoid cells: studies with chromosome-marked cells transfused into lethally irradiated mice. *Proc. roy. Soc. B* **165**, 78—102 (1966).
- Moore, M. A. S., Owen, J. J. T.: Experimental studies on the development of the thymus. *J. exp. Med.* **126**, 715—726 (1967).
- Murray, R. G.: The thymus. In: *Histopathology of irradiation from external and internal sources* (W. Bloom, ed.), p. 446. New York: McGraw-Hill 1948.
- Pandian, M. R., Talwar, G. P.: Effect of growth hormone on the metabolism of thymus and on the immune response against sheep erythrocytes. *J. Exp. Med.* **134**, 1095—1113 (1971).
- Pfanzagl, J.: *Allgemeine Methodenlehre der Statistik*. Berlin: W. de Gruyter 1966.
- Pierpaoli, W., Sorkin, E.: Relationship between thymus and hypophysis. *Nature (Lond.)* **215**, 834—837 (1967).
- Pierpaoli, W., Sorkin, E.: Relationship between developmental hormones, the thymus, and immunological capacity. *Advanc. exp. Med. Biol.* **5**, 397—401 (1969).
- Pilgrim, Ch., Lennartz, K. J., Wegener, K., Hollweg, S., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchung über tageszeitliche Schwankungen des H3-Index und des Mitose-Index bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Ratten-Fetus sowie bei Ascitestumorzellen. *Z. Zellforsch.* **68**, 138—154 (1965).
- Raff, M. C., Owen, J. J. T.: Thymus derived lymphocytes: their distribution and role in the development of peripheral lymphoid tissues in the mouse. *Europ. J. Immunol.* **1**, 27—30 (1971).
- Smith, Ch., Kiefer, D. A.: Studies on the thymus of the mammal. X. Regeneration of irradiated mouse thymus. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* **94**, 601—605 (1957).
- Takada, A., Takada, Y., Huang, C., Ambrus, J.: Biphasic pattern of thymus regeneration after whole-body irradiation. *J. exp. Med.* **129**, 445—457 (1969).
- Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L., McCulloch, A. E.: Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. exp. Med.* **127**, 455—463 (1968).

Dr. H. Hauk
Priv.-Doz. Dr. G. Günther
Senckenbergisches Zentrum
der Pathologie
D-6000 Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7
Bundesrepublik Deutschland

Prof. Dr. H. Göing
Paul-Ehrlich-Institut
D-6000 Frankfurt, Paul-Ehrlich-Straße
Bundesrepublik Deutschland