

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM
Wissenschaftlicher Film C 875/1964

**Strahlenschädigung menschlicher Krebszellen
in der Kultur
Portio-Carcinom, Stamm HeLa**

Begleitveröffentlichung von

Prof. Dr. HENRIETTE GÄRTNER und Priv.-Doz. Dr. K. PETERS,
Tübingen

Mit 1 Abbildung

GÖTTINGEN 1974

**Strahlenschädigung menschlicher Krebszellen
in der Kultur
Portio-Carcinom, Stamm HeLa**

HENRIETTE GÄRTNER und K. PETERS, Tübingen

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Wenn ionisierende Strahlen auf ein so exakt funktionierendes und wohlorganisiertes System wie die Zelle einwirken, so wird es vom Grad der strahleninduzierten Desorganisation abhängen, welche morphologischen und biochemischen Veränderungen manifest werden. In der einzelnen Zelle entwickelt sich ein kompliziertes Strahlensyndrom, von dem bisher nur einzelne Stadien bekannt und erfaßbar sind. Die zytologischen Nachweismethoden geben jeweils nur über einzelne Symptome Aufschluß, die in das vielfältige Reaktionsbild eingeordnet werden müssen, will man die Synopse nicht verlieren.

Zur synoptischen Betrachtung gehört auch die Kenntnis der Beziehungen zwischen der Strahlenreaktion *in vivo* und *in vitro*. Der Status *in vitro* ist als experimentelle Situation der Zellen zu verstehen und macht die Abgrenzung gegenüber den Verhältnissen *in vivo* notwendig.

Als wesentlichen Vorteil bieten Gewebekulturen dem Untersucher strahlenbiologischer Fragestellungen kontinuierlich ein hinreichend identisches Material für detaillierte Informationen, so daß fortlaufende, miteinander vergleichbare und jederzeit reproduzierbare Versuche vorgenommen werden können. Bei der Vielzahl der Kriterien kann jedes einzelne Experiment zytomorphologisch oder biochemisch einer mehrfachen und kombinierten Auswertung unterzogen werden, so daß in ein und demselben Versuch die Möglichkeit von Test und Gegentest gegeben ist (GÄRTNER [16], [17]).

Es ist das Ziel der Strahlentherapie, die Elektivität der Strahlenwirkung zu erhöhen und dadurch den Tumor stärker zu schädigen als das gesunde

¹ Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 16 u. 17.

Gewebe der Umgebung. Die Erreichung dieses Zieles hängt im wesentlichen von zwei Voraussetzungen ab: 1. von den strahlenphysikalischen Bedingungen der therapeutischen Technik, und 2. von den biologischen Eigenschaften des Tumors.

So erfordert der optimale Einsatz der Supervoltbestrahlungen, über deren Vorteile in physikalisch-technischer Hinsicht keine Zweifel bestehen, eine möglichst genaue Kenntnis ihrer biologischen Wirkungsmechanismen.

Für den quantitativen Vergleich gegenüber den konventionellen Strahlen hat sich die RBW (relative biologische Wirksamkeit) als praktisch brauchbare Größe erwiesen. Für den qualitativen Vergleich existiert jedoch eine meßbare Größe nicht! Somit sind alle Aussagen über Strahlensensibilität oder Strahlenelektivität bezüglich der exakten Definition von vornherein problematisch.

Schon allein im zellulären Bereich ist das Phänomen der Strahlenempfindlichkeit durch die Vielzahl der nebeneinander ablaufenden biochemischen und morphologischen Prozesse außerordentlich komplex.

Bei dieser Situation kommt es zunächst darauf an, alle beobachteten Phänomene — ganz gleich, ob sie die Ursache oder nur ein Symptom der Strahlenempfindlichkeit darstellen — zu erfassen.

Es ist bekannt, daß die strahlenbiologische Reaktion durch die differentiale Ionisation der verwendeten Strahlenart maßgeblich bestimmt wird. Mit steigendem LET¹ ist mit einer Verstärkung der Strahlenreaktion bis auf das Dreifache zu rechnen, eine Tatsache, die auf Grund der unterschiedlichen Energieabgabe für verschiedene Treffbereiche bzw. für eine unterschiedliche chemische oder strukturelle Natur der Treffbereiche spricht (ALPER [8], BARENDSEN [10], GRAY [19]).

Untersuchungen über den Einfluß der Strahlenqualität auf die biologische Reaktion sind von besonderem Interesse für die klinische Radiologie und die aktuellen Fragen der allgemeinen Strahlengefährdung durch Freisetzung atomarer Energien. Eigene Befunde an Gewebekulturen von Hühnerherz-Fibroblasten (GÄRTNER [17]) und HeLa-Zellen deuten darauf hin, daß quantitative Reaktionsunterschiede zwischen konventionellen Röntgenstrahlen und den weniger dicht ionisierenden Elektronenstrahlen einer Erzeugungsspannung von 15,8 MeV sicher existieren und daß auch qualitative Reaktionsunterschiede diskutiert werden müssen.

Die anzuwendende Strahlenart und Strahlendosis lassen sich entsprechend den gültigen Meßmethoden beim Experimentieren mit Gewebekulturen mit ausreichender physikalischer Genauigkeit applizieren.

Die zytomorphologischen Informationsmöglichkeiten sind durch die Lebendbeobachtung mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops und der

¹ Linear energy transfer.

Kinematographie wesentlich erweitert. Insbesondere die Lebendbeobachtung vor, während und nach der Bestrahlung gestattet es, morphologische und funktionelle Störungen zu verfolgen, die bei der zytologischen Betrachtungsweise an fixierten und gefärbten Präparaten nur ungenügend oder überhaupt nicht erfaßt werden können. Die Beobachtung der dynamischen Entwicklung der strahleninduzierten Zellprozesse bis zur endgültigen morphologischen Manifestation erlaubt eine Gegenkontrolle der stationären Befunde und außerdem die Bestimmung der Zeitdauer zwischen dem Strahleninsult und dem Sichtbarwerden einzelner Strahlenschäden (GÄRTNER [40] bis [43], GÄRTNER u. PETERS [44] bis [47]).

Bei den im Film verwendeten HeLa-Zellen handelt es sich um Explantate eines sehr unreifen, nicht verhornenden Plattenepithel-Carcinoms der Portio uteri, welches 1951 von GEY u. Mitarb. [18] explantiert wurde. Der maligne Charakter kommt in einer erheblichen Teilungsaktivität und zahlreichen Mitosestörungen in Form von mehrpolaren Mitosen und Riesenzellen zum Ausdruck. Die pathologischen Zellteilungen treten in einer Frequenz bis zu 25% auf (PETERS [31]), eine Tatsache, die bei der Beurteilung der Strahleneffekte von vornherein berücksichtigt werden muß.

Die Zytologie und die spezielle Zytopathologie dieses Tumors sind in dem Film C 874 erläutert [48], um den Betrachter mit diesem Testobjekt, das gleichsam ein Modell des Tumorwachstums darstellt, vertraut zu machen. Bei morphologischer Betrachtung stehen einige Phänomene im Vordergrund der Strahlenreaktion. Es kommt stets zu einer Zellteilungshemmung, die je nach Dosis, Dosisleistung und Strahlenqualität quantitativ unterschiedlich ausgeprägt in Erscheinung tritt. Die Blockierung der Mitose kann transitorisch, also reversibel oder irreversibel, mit destruktiven Folgeprozessen einschließlich des sofortigen oder latenten Zelltodes einhergehen (GÄRTNER [4], MOORHEAD u. HSU [28]). Das Ausmaß und die Dauer der Mitosehemmung werden zweifellos durch die verwendete Zellart und ihre Mitoseaktivität *in vitro* mitbestimmt. Auch der Zellzyklus und die individuelle Zyklusphase zur Zeit der Bestrahlung spielen eine Rolle. Die Bestrahlung zu Beginn der Prophase führt zur Verzögerung des Zellteilungsbeginns (SPEAR [38], ERRERA [14]). Erfolgt die Strahlenapplikation bereits während der Teilung, z.B. in der Prometa- oder Metaphase, so verläuft die Mitose verlangsamt ab (GÄRTNER [41] bis [43], STROUD u. BRUES [39]). Dabei finden sich vermehrt abnorme Kernteilungsfiguren und Zytoplasmaschädigungen mit konsekutiven Zellteilungsstörungen und Anomalien der Tochterzellen. Die Veränderungen der Kernsubstanz, vor allem die Chromosomenalterationen, bedeuten im Falle der erhaltenen Teilungsaktivität der betroffenen Zelle eine Veränderung des genetischen Materials. Unterbleiben die reparativen Vorgänge ganz oder sind die Er-

holungsvorgänge nur unvollkommen möglich, so ist der unmittelbare oder verzögerte Tod der betroffenen Zellen und ihrer Tochtergenerationen die Folge.

Nekrobiotische Zellvorgänge lassen sich jedoch auch unmittelbar p. irr. feststellen. Eine strahleninduzierte Zunahme der nukleolären Vakuolen (PETERS [30]) und Zytoplasmavakuolen läßt sich sowohl bei der Lebendbeobachtung als auch an fixierten und gefärbten Präparaten von Gewebekulturen feststellen.

Die Lebendbeobachtung mit Hilfe des Phasenkontrast-Verfahrens und der Kinematographie gestattet es, p. irr. auftretende funktionelle Störungen, d.h. Änderungen in der normalen Verhaltensweise von Zellen, zu erfassen, die transitorisch oder als Vorstufen einer irreversiblen morphologischen Strukturveränderung auftreten können.

Die Kernrotation, ein normales Zellphänomen, häufig praemitotisch, manchmal auch während der Spindelformation zu beobachten (MOORHEAD u. HSU [28]), wird als aktiver Bewegungsvorgang gedeutet und scheint mit der Synthese und Austauschvorgängen zwischen Kern- und Zytoplasma in Zusammenhang zu stehen (LEONE, HSU u. POMERAT [26]). Sie tritt p. irr. vermehrt auf (GÄRTNER u. PETERS [45], [46], STROUD u. BRUES [39]). Häufig finden sich gleichzeitig schon Anzeichen pathologischer Kernveränderungen (GÄRTNER u. PETERS [45], [46], POMERAT [33]). Motilitätsstörungen des Zytoplasmas sind häufig zu beobachten, insbesondere asynchrone, irreguläre Durchschnürungsbewegungen mit nachfolgender ungleicher Verteilung der zytoplasmatischen Substanz auf die Tochterzellen (GÄRTNER [41] bis [43], GÄRTNER u. PETERS [45], [46]). Oft werden dabei zytoplasmatische Fragmente abgesprengt, die noch über längere Zeit lebhaftere Eigenbeweglichkeit besitzen. Während der Interphase treten p. irr. vielfach arhythmische Propulsionen (Blisters) auf, ein Phänomen, das auch nach Einwirkung chemischer Noxen festzustellen ist (LETTRE, ALBRECHT u. LETTRE [27]) und strahleninduziert entweder transitorisch oder unmittelbar mit dem akuten Interphasezelltod verknüpft sein kann (GÄRTNER [41], [42]).

Besondere Bedeutung verdient die radiogen vermehrte Bildung von Riesenzellen in Gewebekulturen. In unbestrahlten HeLa-Kulturen findet man durchschnittlich 1 bis 2% Riesenzellen (PETERS [31]). In einem Dosisbereich von 50 bis 1000R Röntgenstrahlen steigt die Frequenz der Riesenzellen auf 6,7%, und bei weiterer Steigerung der Strahlendosis nimmt die Frequenz weiter zu. Nach 10000R Röntgenstrahlen besteht die Kultur nach dem Ablauf einer gewissen Zeit nur noch aus Riesenzellen.

Die strahleninduzierte Entwicklung von Riesenzellen ist noch keineswegs geklärt. Es handelt sich dabei um Zellen, bei denen die Teilungsaktivität unterbunden, die Syntheseleistungen in Kern und Zytoplasma jedoch offenbar voranschreiten. Einen bedeutenden Faktor in der Stoff-

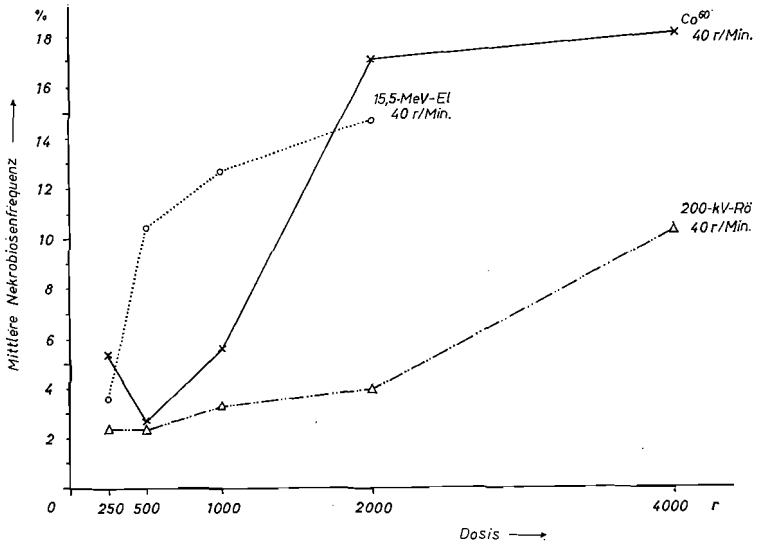
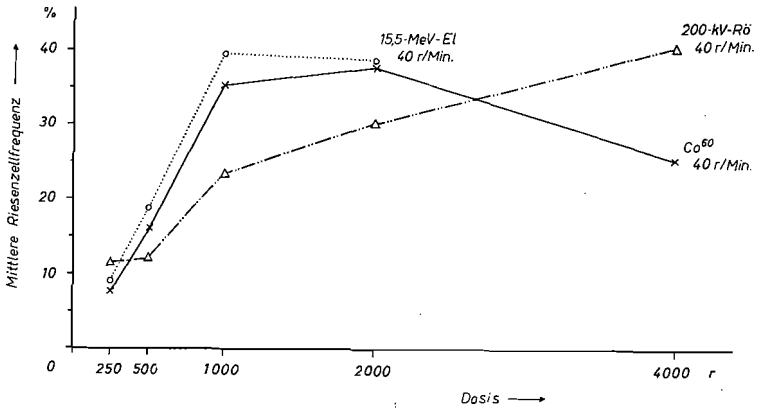
wechselaktivität der Riesenzellen stellt offenbar die Pinozytose dar (HAYWARD [21]). Eine echte mitotische Teilung der Riesenzellen wurde bisher nicht beobachtet (PUCK u. MARCUS [35]), sicher dagegen die Endoreduplikation (GÄRTNER u. PETERS [44], Film E 561). Die Riesenzellen stellen ein Phänomen der potentiellen Letalschädigung dar, wobei zunächst der Weg über die Endoreduplikation beschritten wird. Dafür spricht auch die enge Korrelation zwischen der Frequenz von Riesenzellen und den nekrobiotischen Zellformen, die bei zytologisch-statistischen Untersuchungen stets festgestellt werden konnten.

In dem vorliegenden Aufnahmematerial finden sich die „klassischen“ Mitosestörungen: Verklumpung der Chromosomen, Chromosomenaberrationen und Brückenbildungen in der Ana- und Telophase. Beachtung verdienen die Aufnahmen über die Entstehung und das Schicksal von Tumor-Riesenzellen, da sie als ein wichtiges Kriterium für die Strahlenschädigung des Carcinoms anzusehen sind. Nach Ablauf der Zeitspanne des Primäreffektes (2 bis 4 Stunden p. irr.) werden selbst nach langer Beobachtungsdauer bis zu 12 Tagen p. irr. Mitosen nur noch sehr selten angetroffen. Sie verlaufen entweder rückläufig oder gestört. Ein weiterer Test für die Strahlenempfindlichkeit ist das Verhalten der Interphasezellen, die bei hohen Dosen überwiegend irreversible Schädigungsformen zeigen. Der Film liefert einen Überblick über die Strahlenreaktionen des Carcinoms *in vitro* und ist darüber hinaus geeignet, zum allgemeinen Verständnis der vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten der Zelle auf den insult beizutragen.

Bezüglich der Mitosehemmung erweisen sich die energiereichen Strahlen insgesamt weniger wirksam als konventionelle Röntgenstrahlen. Anders liegen die Verhältnisse jedoch, wenn man zur Austestung die Riesenzellfrequenz heranzieht. Die energiereichen Strahlenarten induzieren signifikant häufiger Riesenzellen bei den HeLa-Zellen als 200-kV-Röntgenstrahlen.

Es ergab sich ferner, daß die Riesenzellvermehrung stets mit einer erhöhten Nekrobiosenfrequenz gekoppelt ist. Diese offenbar für Tumorzellen typische Reaktionskette — Entgleisung zu Tumor-Riesenzellen mit nachfolgendem Zelltod — wird, wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, durch drei strahlenphysikalische Faktoren beeinflusst: 1. Die eingestrahelte Dosis, 2. die verwendete Dosisleistung, und 3. die Strahlenqualität.

Insgesamt betrachtet ist, verglichen mit den Röntgenstrahlen, die stärkere strahlenbiologische Reaktion nach der Einwirkung von schnellen Elektronen einer Erzeugungsspannung von 15,8 MeV unverkennbar. Bezüglich der relativen biologischen Wirksamkeit der differenten Strahlungen ergab die statistische Analyse eine signifikante Überlegenheit der Cobalt⁶⁰-Gammastrahlen gegenüber den konventionellen Röntgenstrahlen. Die stärkere Wirkung der kontinuierlichen Cobalt⁶⁰-Gamma-



Mittlere Riesenzell- und Nekrobiosenfrequenz von HeLa-Kulturen nach Bestrahlung mit steigenden Einzeldosen konventioneller Röntgenstrahlen (200 kV), 15,5-MeV-Elektronen und Cobalt⁶⁰-Gammastrahlen im Beobachtungszeitraum von 3 Stunden bis 12 Tagen p. irr.

Strahlung kommt u. a. darin zum Ausdruck, daß die hier stets beobachtete Korrelation zwischen der Strahleninduktion von Tumor-Riesenzellen und derjenigen von Nekrobiosen in höheren Dosisbereichen aufgehoben wird.

Es erhebt sich abschließend die Frage, ob die an Gewebekulturen erhaltenen Resultate nur im Rahmen der allgemeinen strahlenbiologischen Grundlagenforschung Gültigkeit besitzen oder ob sie richtungweisend für die Verhältnisse in vivo und die Belange der klinischen Radiologie herangezogen werden dürfen.

Der Vorteil, die Strahlenreaktion direkt an Krebszellen unter vereinfachten Lebensbedingungen und unabhängig von den komplexen Regulationsmechanismen des Gesamtorganismus zu studieren, liegt klar auf der Hand. Die indirekten Effekte der in vivo-Bestrahlung sind eliminiert, und die vielfältigen morphologischen und biochemischen Strahleneffekte können unter variierenden experimentellen Bedingungen analysiert werden. So sehr auf der einen Seite diese in vitro vereinfachte histologische Struktur das Experimentieren erleichtert, so erschwert auf der anderen Seite eben diese Vereinfachung den direkten Vergleich mit den Strahlenreaktionen in vivo und verleiht der Gewebekultur den Charakter eines biologischen Modells.

Der größte Vorteil, nämlich die unmittelbare Betrachtung von strahleninduzierten Zellreaktionen, bildet somit zugleich die stärkste Einschränkung der Aussage und verbietet die direkte Übertragung der Befunde auf die Verhältnisse des bestrahlten Organismus.

Unter dieser Einschränkung sind Experimente in vitro durchaus geeignet, wertvolle Informationen und Anhaltspunkte für die in vivo zu erwartende Strahlenreaktion zu vermitteln.

Die Lebendbeobachtung der Zellen mit Hilfe von Phasenkontrast-Verfahren und Zeitrafferaufnahmen gewährt einen Einblick in die Entwicklung und Dynamik der strahlenbiologischen Reaktionen der Zellen und erlaubt vor allem eine Kontrolle der statistisch gewonnenen Ergebnisse. Abgesehen davon, daß nun die chronologische Betrachtung an Stelle der stationären tritt, gestatten Filmaufnahmen oft die Entscheidung über Richtigkeit oder Unrichtigkeit der Aussage.

Erläuterungen zum Film¹

Schädigung durch Röntgenstrahlen (180 kV)

Dosisleistung 100 R/min — Dosis 500 R bis 1500 R

Aufnahmefrequenz 8 bis 1 B/min

Diese einschichtig gewachsene HeLa-Kultur wurde der Einwirkung von konventionellen Röntgenstrahlen ausgesetzt. Bestrahlt wurde mit einer Dosis von 1000 R, 2½ Stunden vor Beginn der Filmaufnahme. Als Folge der Bestrahlung ist zu diesem Zeitpunkt die rege Teilungsaktivität, die für Carcinom-

¹ Wortlaut des im Film gesprochenen Kommentars. Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

zellen — besonders in vitro — charakteristisch ist, zum Erliegen gekommen. Man sieht in dieser Übersicht keine Mitosen mehr. Ferner treten Formveränderungen der Nukleoli, vermehrte Kernrotationen und eine zunehmende Verfettung des Cytoplasmas auf.

Wie verhalten sich Zellen, die während der Mitose bestrahlt wurden? Diese Zelle erhielt in der frühen Metaphase 500 R Röntgenstrahlen. In der Anaphase ist kurz eine Chromosomenbrücke sichtbar. Nach dem Versuch einer tripolaren Teilung entstehen zwei Tochterzellen, von denen jedoch eine mehrere Kerne bildet. Die in der Rekonstruktionsphase noch vorhandene Chromosomenbrücke, an der Verformung der Tochterkerne erkennbar, und die ungleiche Verteilung des Kernmaterials, sind als Strahlenschäden anzusehen.

Die Bestrahlung dieser HeLa-Zelle erfolgte in der Metaphase mit einer Dosis von 500 R unmittelbar vor Beginn der Filmaufnahme. Eine multipolare Anlage und ein Einschlußkörper erschweren und verzögern die reguläre Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialebene. Allmählich ordnen sich die Chromosomen zu einer tripolaren Metaphase.

Während der Anaphase wird der Strahlenschaden durch die zahlreichen Chromosomenbrücken morphologisch sichtbar.

Die Cytoplasmabewegungen erscheinen merklich verlangsamt und unkoordiniert und lassen eine zusätzliche Schädigung des Teilungsmechanismus vermuten.

Der Einschlußkörper ist in die rechte Tochterzelle gelangt. Die völlige Trennung der Tochterzellen wird durch die Chromosomenbrücken verhindert; dadurch bleibt das Kernmaterial auch im Verlauf der Rekonstruktionsphase verbunden.

Im unteren Bildteil liegt eine Interphasezelle, in deren Cytoplasma die fädigen Mitochondrien deutlich zu sehen sind. Sie sind relativ unbeweglich und lassen sich dadurch leicht von den wellenartigen Cytoplasmabewegungen der Zelloberfläche unterscheiden. Der Kern dieser Zelle enthält in dem zentralgelegenen Nukleolus eine Vakuole, wie sie nach Bestrahlung vermehrt auftreten.

Oben hat sich mittlerweile zwischen die beiden bisher sichtbaren Tochterzellen eine dritte, sehr kleine Tochterzelle in die Bildebene geschoben. Sie führt lebhaft cytoplasmatische Bewegungen aus. Die drei Zellen besitzen völlig ungleiche Kern- und Cytoplasmaanteile. Die beiden größeren sind vielkernig, und durch die strahleninduzierten Chromosomenbrücken sind die Kerne eng zusammengezogen und deformiert.

Diese Zelle wurde zu Beginn der Mitose mit 1000 R bestrahlt. Die Anaphasebewegungen lassen auf eine multipolare Teilungsanlage schließen. Die Durchschnürung unterbleibt jedoch. Die Zelle kugelt sich wieder ab und verharrt in diesem Zustand über 12 Stunden.

Nach dieser Zeit breitet sich das Cytoplasma aus, und man kann nun die Entstehung einer Riesenzelle mit vielen Kernen unterschiedlicher Größe verfolgen. Riesenzellen treten nach Bestrahlung vermehrt auf. Die normal großen Zellen in der Umgebung machen den Größenunterschied deutlich.

Diese Zelle, die gleichfalls zu Beginn der Mitose — und zwar mit 1500 R — bestrahlt wurde, vermag die Anaphase und Telophase scheinbar regulär

durchzuführen. Eine Strahlenschädigung ist noch nicht zu erkennen, zumal der Teilungsvorgang zeitweilig außerhalb der optischen Ebene verläuft. Allmählich breitet sich die untere Tochterzelle aus, während die Rekonstruktion der oberen verzögert ist.

Nun ordnet sich auch die obere Tochterzelle in die optische Ebene ein. Wir sehen die Entstehung eines Kernes, der deutlich größer ist als die Kerne der umgebenden Zellen. Die untere Zelle weist dagegen — bis auf ein Fragment — keinerlei Kernstruktur auf. Demnach ist das Kernmaterial fast vollständig in die obere Tochterzelle gelangt.

Etwa 7 Stunden sind bisher seit der Bestrahlung vergangen.

20 Stunden später bietet sich — jetzt in stärkerer Zeitraffung — noch etwa das gleiche Bild.

An der unteren Tochterzelle setzen aber allmählich Veränderungen ein. Die Zelle verliert den Kontakt zu den benachbarten Zellen, und als Symptom des bevorstehenden Zelltodes wird das Cytoplasma kontrastreicher und starrer.

Während dieser Prozesse, die sich über viele Stunden erstrecken, wird zeitweise das Gerüst einer Kernstruktur mit angedeuteten Nukleolen sichtbar.

Etwa $2\frac{1}{2}$ Tage nach der Bestrahlung geht die Zelle zugrunde. Dieser Vorgang, der hier in wenigen Sekunden abläuft, dauert etwa eine Stunde.

Auch die Geschwisterzelle mit dem vermehrten Kernmaterial ist nicht länger existenzfähig.

Schädigung durch Gammastrahlen (Cobalt 60)

Dosisleistung 100 R/min — Dosis 500 R bis 4000 R

Aufnahmefrequenz 8 B/min bis 30 B/h

Nach Bestrahlung mit einem Telecobaltgerät bietet sich ein ähnliches Bild wie nach Röntgenbestrahlung. Diese Kultur erhielt eine Dosis von 4000 R. Aus Vergleichsgründen wurde wiederum eine Dosisleistung von 100 R/min angewendet.

Die Mitoseaktivität ist erloschen. Im Bildfeld sind neben normal großen Zellen zwei Riesenzellen zu sehen. Auch hier beobachten wir eine zunehmende Verfettung aller Zellen als Folge der Bestrahlung.

Diese Zelle zeigt eine deutliche Chromosomenbrücke in der Anaphase und läßt damit eine Strahlenschädigung erkennen.

Die Bestrahlung erfolgte im Stadium der Metaphase mit 500 R. Die Chromosomenbrücke bleibt während des weiteren Teilungsablaufes bestehen und hemmt die Individualisierung der Tochterzellen.

Diese Schädigungsbilder gleichen denen nach konventioneller Röntgenbestrahlung. Obwohl Cobalt-Gammastrahlen und Röntgenstrahlen eine unterschiedliche Energie und Ionisationsdichte aufweisen, rufen sie im mikroskopischen Bereich morphologisch gleichartige Schäden hervor.

Die weiter bestehende Verbindung des Kernmaterials der beiden Tochterzellen ist hier an der Verformung der Zellkerne gut zu erkennen. Das Cytoplasma hat sich ausgebreitet, und beide Zellen zeigen lebhafte Pinocytose.

Nun ein größerer Ausschnitt einer Kultur nach Bestrahlung mit 4000 R Gammastrahlen. Sämtliche Zellen befinden sich in der Interphase. Als Folge der Bestrahlung werden keine Mitosen mehr eingeleitet.

Das Rotieren des Zellkerns tritt vermehrt auf. Nach einiger Zeit lösen die Zellen ihren Kontakt untereinander. Das Cytoplasma wird kontrastreicher, und die Zellen schrumpfen mehr und mehr. Schließlich gehen sie nacheinander zugrunde. Das Endstadium ist 24 Stunden nach der Bestrahlung erreicht.

Schädigung durch Elektronen (17 MeV)

Dosisleistung 100 R/min — Dosis 500 R bis 3000 R

Aufnahmefrequenz 8 bis 1 B/min

Zuerst eine Zelle nach Bestrahlung mit 500 R Elektronen. Ein Kranz kondensierter Mitochondrien umgibt den heller erscheinenden Spindelapparat. Als Strahleneffekt sind Chromosomenbrücken während der Anaphase deutlich erkennbar.

Die Brückenbildung des Kernmaterials dürfte eine der Ursachen für die stark verlängerte Rekonstruktionsphase der beiden Tochterzellen sein.

Einige Zeit später setzt die Pinocytose ein.

Die Bestrahlung dieser Zelle erfolgte während der Metaphase mit einer Dosis von 1500 R. Die Chromosomen bleiben während der Anaphase längere Zeit triangulär angeordnet. Starke cytoplasmatische Bewegungen weisen auf veränderte Viskositätsverhältnisse hin.

Die Koordination der Teilungsvorgänge ist gestört. Zunächst sind drei Tochterzellen angelegt, jedoch findet kurz nach der Durchschnürung zwischen den beiden linken eine Fusion statt.

Auch mit der kleineren Tochterzelle bleibt durch Chromosomenbrücken eine so enge Verbindung bestehen, daß kurz danach eine Verschmelzung zu einer einzigen großen Zelle mit mehreren Zellkernen stattfindet. Dies ist ein Beweis dafür, daß vielkernige Riesenzellen aus der Fusion mehrerer Tochterzellen entstehen können.

Noch während des Fusionsvorganges hat die Pinocytose wieder begonnen. Diese Zelle erhielt während der Metaphase ebenfalls 1500 R Elektronen. Die Zelle macht den Versuch einer Teilung.

Nach kurzer Zeit beginnen jedoch die angelegten Tochterzellen wieder zu verschmelzen. Dann breitet sich das Cytoplasma langsam aus.

In diesem Fall entsteht also die mehrkernige Riesenzelle als Folge einer nicht-vollzogenen Plasmateilung.

In der Rekonstruktionsphase werden die Kerne mit ihren Nukleoli sichtbar; sie sind deutlich vom Cytoplasma abgegrenzt.

Derartige Riesenzellbildungen können *in vitro* also auch nach Elektronenbestrahlung beobachtet werden.

In einem späteren Stadium — jetzt mit stärkerer Zeitraffung — ist die Rekonstruktion der einzigen Zellkerne weiter fortgeschritten. Die Kerne liegen eng beieinander, vermutlich auf Grund von Chromosomenbrücken, die auch in der Interphase noch wirksam sind.

Abschließend verfolgen wir eine Kultur über 2 ½ Tage, nachdem sie 22 Stunden vor Beginn der Filmaufnahme bestrahlt wurde. Die Dosis betrug 3000 R Elektronen. Wir beobachten auch hier keine Mitosen mehr. Die Pinocytose ist jedoch zunächst nicht beeinträchtigt.

Nach einiger Zeit lösen sich allmählich im rechten Mittelfeld des Bildes die Zellkontakte.

Von oben und von links sind zwei Riesenzellen in das Bildfeld gewandert. Die zwischen ihnen liegende Zelle zieht langsam ihren Plasmafortsatz ein.

Die Schädigung der Zellen wird allmählich immer deutlicher: Die cytoplasmatische Schrumpfung nimmt zu und damit auch der Phasenkontrast des Cytoplasmas. Das Auftreten intrazellulärer Fetttröpfchen weist darauf hin, daß auch hier der Stoffwechsel der Zellen gestört ist.

Es bilden sich kleine Zellkomplexe, deren Kerne eng beieinander liegen, wodurch der Eindruck von mehrkernigen Zellen entsteht.

Mit fortschreitender Schrumpfung lösen sich die Zellen mehr und mehr voneinander.

Später beschränken sich die Kontakte auf nur wenige Plasmafortsätze, bis sich auch diese Verbindungen lösen und die Zellen sich abkugeln. Diese Vorgänge führen allmählich zum Zelltod.

Vergleicht man die Effekte der drei untersuchten Strahlenarten miteinander, so zeigt der Film, daß die optisch erfaßten Strahlenschäden bei HeLa-Zellen sich qualitativ kaum unterscheiden. Die tatsächlich bestehenden Unterschiede sind statistischer Natur.

Literatur und Filmveröffentlichungen

Allgemeine Literatur zur Gewebezüchtung und Strahlenbiologie:

- [1] CAMERON, G.: Tissue Culture Technique. New York 1950.
- [2] FISCHER, A.: Gewebezüchtung. Müller u. Steinicke, München 1930.
- [3] FISCHER, I.: Grundriß der Gewebezüchtung. S. Fischer, Jena 1942.
- [4] GÄRTNER, H.: Untersuchungen an der Gewebekultur. In: Strahlenpathologie der Zelle. Ed. E. SCHERER u. H. St. STENDER. Thieme, Stuttgart 1963.
- [5] HAGEN, U.: Biochemie der biologischen Strahlenwirkungen. In: Ergebnisse der med. Strahlenforschung, Bd. I. Thieme, Stuttgart 1964.
- [6] DE HEVESEY, G. K., A. G. FORSSBERG and J. D. ABATT: Advances in Radiobiology. Oliver & Boyd, London 1957.
- [7] HOLLAENDER, A.: Radiation Biology I u. II. McGraw-Hill Book Inc. 1954.

Spezielle Literatur:

- [8] ALPER, T.: Effects on Subcellular Units and Free-Living Cells. In: Mechanisms in Radiobiology. Vol. I. Ed. by M. ERRERA, A. FORSSBERG. Academic Press, New York 1961.
- [9] BACQ, Z. M., u. P. ALEXANDER: Grundlagen der Strahlenbiologie. Thieme, Stuttgart 1958.
- [10] BARENDSEN, G. W.: Damage to the Reproductive Capacity of Human Cells in Tissue Culture by Ionizing Radiations of Different Linear Energy Transfer. In: The Initial Effects of Ionizing Radiations on Cells. Ed. by R. J. C. HARRIS. Academic Press, London — New York 1961.
- [11] BRACHET, J., and A. E. MIRSKY: The Cell. Vol. I. Academic Press, New York — London 1959.

- [12] BRAND, G.: Virusimpfstoffe — Zellkulturen — Krebs: Eine bemerkenswerte Querverbindung. *Fortschr. Med.* **81** (1963), 65.
- [13] EDLINGER, E. A.: Die somatische Zelle als Mikroorganismus. *Probleme der Zellkultur*. *Wien. klin. Wschr.* **72** (1960), 633.
- [14] ERRERA, M., and A. FORSSBERG: *Mechanisms in Radiobiology*. Vol. I: *General Principles*. Academic Press, New York — London 1961.
- [15] GÄRTNER, H.: Die biologische Wirksamkeit schneller Elektronen und ultraharter Röntgenstrahlen einer 15 MeV-Elektronenschleuder im Vergleich zu Röntgenstrahlen üblicher Härte. I. u. II. *Strahlentherapie* **96** (1955), 201—378.
- [16] GÄRTNER, H.: Strahlenbiologische Grundlagen für die Anwendung energiereicher Strahlen. *Strahlentherapie* **107** (1958), 619.
- [17] GÄRTNER, H.: Experimentalforschung an Gewebekulturen als Grundlage für die Behandlung mit energiereichen Strahlen. *Strahlentherapie* **114** (1961), 1.
- [18] GEY, G. O., W. D. COFFMAN and M. T. KUBICEK: Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. *Cancer Res.* **12** (1952), 264.
- [19] GRAY, L. H.: Cellular Radiobiology. In: *Proceedings of the International Congress of Radiation Research*. Burlington, Vermont, USA, 1958. Ed. by D. E. SMITH. Academic Press, New York 1959.
- [20] HARRIS, R. J. C.: The Initial Effects of Ionizing Radiations on Cells. A Symposium held in Moscow Oct. 1960. Academic Press, London — New York 1961.
- [21] HAYWARD, A. F.: Increase in the Dense Cytoplasmic Bodies in Radiation induced Giant Cells of the Cultured Fibroblast. *Nature* **192** (1961), 891.
- [22] HSU, T. C.: Cytological Studies on HeLa, a Strain of Human Cervical Cancer. I. Observations on Mitosis and Chromosomes. *Tex. Rep. Biol. Med.* **12** (1954), 833.
- [23] LEIGHTON, J.: Studies on Human Cancer Using Sponge Matrix Tissue Culture. *Tex. Rep. Biol. Med.* **12** (1954), 847.
- [24] LEIGHTON, J., and J. KLINE: Studies on Human Cancer Using Sponge Matrix Tissue Culture. II. Invasion of Connective Tissue by Carcinoma (Strain HeLa). *Tex. Rep. Biol. Med.* **12** (1954), 865.
- [25] LEIGHTON, J., J. KLINE, M. BELKIN and Z. TETENBAUM: Studies on Human Cancer Using Sponge Matrix Tissue Culture. III. The Invasive Properties of a Carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* **16** (1956), 1353.
- [26] LEONE, V., T. C. HSU and C. M. POMERAT: Cytological Studies on HeLa, a Strain of Human Cervical Carcinoma. II. On Rotary Movements of the Nucleus. *Z. Zellforsch.* **41** (1955), 481.
- [27] LETTRÉ, H., M. ALBRECHT u. R. LETTRÉ: Zur Auslösung von Plasmabewegungen an Ruhezellen. *Naturwiss.* **38** (1951), 505.
- [28] MOORHEAD, P. S., and T. C. HSU: Cytologic Studies of HeLa, a Strain of Human Cervical Carcinoma. III. Durations and Characteristics of the Mitotic Phases. *J. Nat. Cancer Inst.* **16** (1956), 1047.

- [29] PAUL, J.: Cell and Tissue Culture. E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh—London 1961.
- [30] PETERS, K.: Variationsstatistische Untersuchungen über das Auftreten von Vakuolen in den Nukleolen von Hühnerherzfibroblasten in vitro nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen, Megaphen und Kälte. Z. Zellforsch. 44 (1956), 14.
- [31] PETERS, K.: Untersuchungen über die Einwirkung von Elektronenstrahlen auf Karzinomzellen (Stamm HeLa) in Gewebekulturen. Fortschr. Röntgenstr. 88 (1958), 50.
- [32] POMERAT, C. M., S. P. KENT and L. C. LOGIE: Irradiation of Cells in Tissue Culture. I. Giant Cell Induction in Strain Cultures versus Elements from Primary Explants. Z. Zellforsch. 47 (1957), 158.
- [33] POMERAT, C. M., S. P. KENT and L. C. LOGIE: Irradiation of Cells in Tissue Culture. II. Cinematographic Analysis of Cell Enlargement and Mitotic Activity Following Gamma Irradiation at 2000 r and 4000 r. Z. Zellforsch. 47 (1957), 175.
- [34] POMERAT, C. M.: Cinematography, Indispensable Tool for Cytology. In: International Review of Cytology. Ed. by G. H. BOURNE, J. F. DANIELLI. Academic Press, New York — London 1961.
- [35] PUCK, T. T., and Ph. J. MARCUS: Action of X-Rays in Mammalian Cells. J. exp. Med. 103 (1956), 653.
- [36] RAJEWSKY, B.: Strahlendosis und Strahlenwirkung. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart 1956.
- [37] SCOTTI, T. M., M. A. WRYK, M. DORSEY jr. and M. SIGEL: Transplantation of Human Malignant Epithel Cells from Tissue Culture to Rat Brains. Cancer Res. 20 (1960), 58.
- [38] SPEAR, F. G.: Radiations and Living Cells. Chapman and Hall Ltd., London 1953.
- [39] STROUD, A. N., and A. M. BRUES: Radiation Effects in Tissue Culture. Tex. Rep. Biol. Med. 12 (1954), 931.

Filmveröffentlichungen:

- [40] GÄRTNER, H.: Zellteilung in Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Film C 615 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1952.
- [41] GÄRTNER, H.: Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Film C 616 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1952.
- [42] GÄRTNER, H.: Zellschädigung durch 184-kV-Röntgenstrahlen und 15-MeV-Elektronen. Film B 633 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1953.
- [43] GÄRTNER, H.: Wirkung der ultraharten Röntgenstrahlen eines 15-MeV-Betatron auf Gewebekulturen. Film C 634 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1953.
- [44] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa—Homo sapiens — Cytomorphologie. Film E 561 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.
- [45] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa—Homo sapiens — Zellschädigung durch Röntgenstrahlen (180 kV). Film E 562 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.

- [46] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa—Homo sapiens — Zellschädigung durch Gammastrahlen (Cobalt 60). Film E 563 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.
- [47] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa—Homo sapiens — Zellschädigung durch Elektronen (17 MeV). Film E 564 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.
- [48] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Menschliche Krebszellen in der Kultur — Portio-Carcinom, Stamm HeLa. Film C 874 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1964.
- [49] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Strahlenschädigung menschlicher Krebszellen in der Kultur — Portio-Carcinom, Stamm HeLa. Film C 875 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1964.

Angaben zum Film

Der Film wurde 1964 veröffentlicht und ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Tonfilm, 16 mm, schwarzweiß, 195 m, 18 min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1961 und wurden 1963 bearbeitet. Veröffentlichung aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen, Prof. Dr. HENRIETTE GÄRTNER, Priv.-Doz. Dr. K. PETERS, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. G. BEKOW; Aufnahme: E. HEYSE.

Inhalt des Films

Unter Verwendung des Phasenkontrast-Verfahrens wurden an HeLa-Zellen die strahleninduzierten Effekte in ihrem Ablauf kinematographisch erfaßt. In Einzelbestrahlungen wurden konventionelle Röntgenstrahlen (180 kV), Elektronenstrahlen einer Erzeugungsenergie von 15,8 MeV und Cobalt⁶⁰-Gammastrahlen einer Quantenenergie von 1,17 und 1,33 MeV verabfolgt. Die Dosis betrug 500 bis 4000 R, die Dosisleistung 100 R/min. Die Zeitrafferaufnahmen zeigen, daß die optisch erfaßbaren Strahlenschäden bei den drei Strahlenarten sich kaum voneinander unterscheiden. Die rege Teilungsaktivität kommt zum Erliegen, die Kulturen gehen allmählich zugrunde. Zellen, die im frühen Mitosestadium bestrahlt wurden, weisen deutliche Schäden auf: Chromosomenbrücken und unvollständige Teilung, vermehrte Riesenzellbildung, spontaner Zelltod.

Summary of the Film

Radiation effects on HeLa cells were recorded cinematographically, using the phase contrast process. Single doses of conventional X-rays (180 kV), high energy electrons (15,8 MeV) and cobalt⁶⁰ gamma rays (1,17 and 1,33 MeV) were administered. Radiation dose ranged from 500 to 4000 R, using a dose rate of 100 R/min. It can be demonstrated that the morphological changes after radiation damage scarcely differ with regard to radiation quality. Cell

proliferation stopped almost immediately and cell death gradually increased after irradiation. Cells which were irradiated in early mitosis showed considerable morphological changes caused by radiation damage: chromosome bridges during anaphase, incomplete cell division, increase formation of multinuclear and giant cells, spontaneous cell death.

Résumé du Film

Les effets radio-induits sur les cellules HeLa furent enregistrés dans leur évolution d'une manière cinématographique par un microscope à contraste de phases. Des doses uniques furent administrées: au moyen de rayons Röntgen conventionnels (180 kV), au moyen d'irradiation par électrons d'une énergie importante (15,8 MeV) et au moyen de rayons gamma engendrés par le cobalt⁶⁰ (1,17 et 1,33 MeV). La dose se situerait entre 500 et 4000 R, la capacité de la dose étant de 100 R/min. Les prises de vues au ralenti démontrent que les dégâts morphologiques dus aux rayons se différencient à peine l'un de l'autre quand on compare la qualité d'irradiation. L'activité importante de division s'arrête, les cultures sont peu à peu détruites. Les cellules qui furent irradiées pendant la mitose révèlent de nets dégâts cellulaires: formation de ponts chromosomiaux, division incomplète, formation accrue de cellules géantes et mort cellulaire spontanée.