

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Wissenschaftlicher Film C 634/1953

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen

(Prof. Dr. W. BICKENBACH)

**Wirkung der ultraharten Röntgenstrahlen
eines 15-MeV-Betatrons auf Gewebekulturen**

Von

Dozentin Dr. HENRIETTE GÄRTNER

Mit 2 Abbildungen

GÖTTINGEN 1955

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
(Prof. Dr. W. BICKENBACH)

Wirkung der ultraharten Röntgenstrahlen eines 15-MeV-Betatrons auf Gewebekulturen

Von Dozentin Dr. HENRIETTE GÄRTNER

Die Wirkung von 500 r ultraharter Röntgenstrahlen (15 MeV) einer Dosisleistung von 40 r/Min. auf Hühnerherzfibroblasten wird während und nach der Bestrahlung an Zellen in Mitose und im Ruhestadium mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens in Zeitrafferaufnahmen dargestellt (Aufnahmefrequenz 30—15 B/Min., d.h. Zeitraffung auf $1/50$ — $1/100$.) Der Zellteilungsvorgang zeigt die typischen Abweichungen, die für den Primär- und Sekundäreffekt allgemein, d.h. auch nach Röntgenstrahlen normaler Härte und nach schnellen Elektronen, charakteristisch sind. Am häufigsten ist eine Verklebung und Verklumpung der Chromosomen zu beobachten. Hinsichtlich ihrer Wirkung auf Ruhezellen unterscheiden sich die ultraharten Röntgenstrahlen dagegen eindeutig von den normalen, bisher in der Therapie üblichen Röntgenstrahlen. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß ein spontaner Untergang von Ruhezellen während der Dauer des Primäreffektes nicht eintritt. Die Wirkungsweise von ultraharten Röntgenstrahlen kommt demnach der von schnellen Elektronen gleich.

I. Allgemeine Vorbemerkungen

Die Gewebezüchtung wurde um die Jahrhundertwende, ausgehend von den grundlegenden Versuchen von LOEB, HARRISON, CARREL und BURROWS, zu einer biologischen Forschungsmethode entwickelt, die es ermöglicht, Gewebe in vitro am Leben zu erhalten und ihre Zellen zur Vermehrung zu bringen. Derartige Gewebekulturen wachsen unter vereinfachten, kontrollierbaren Bedingungen und stellen nach einigen Passagen Reinkulturen der verwendeten Grundzellart dar.

Die Zellen sind sämtlich als potentiell teilungsfähig anzusehen. Die Zellteilung erfolgt gewöhnlich mitotisch und ist von einer Periode der Teilungsruhe gefolgt, die sehr verschieden lang sein kann. Bei den für diesen Film verwendeten embryonalen Hühnerherzzellen, die den

Herzen von 8—9 Tage bebrüteten Hühnerembryonen entstammten, variiert die Dauer der Interphase zwischen 7 und 21 Stunden. Dadurch kommt es, daß immer nur ein Teil der Zellen, nie mehr als 5⁰/₀, in Teilung angetroffen werden. Die Gewebekultur repräsentiert somit eine Population von Ruhezellen, zwischen denen die mitotischen Zellen verstreut liegen.

Neben der Fähigkeit zur fortgesetzten mitotischen Teilung besitzen die Zellen in der Gewebekultur noch die der aktiven Bewegung. Durch Aussenden amöboider Fortsätze, der Pseudopodien, wandern sie in radiärer Richtung vom Zentrum zur Peripherie der Kultur und bilden dort den sogenannten Randschleier, der nur aus einer einschichtigen Zelllage besteht.

Jede Zelle der Kultur kann als ein Individuum bzw. als ein weitgehend unabhängiges Lebewesen angesehen werden, das außerhalb des Organismus die Fähigkeit der amöboiden Fortbewegung, der mitotischen Teilung und der Rekonstruktion in zwei gleichartige Tochterzellen bewahrt hat. Ebenso kann die Gesamtkultur als eine Zellkolonie betrachtet werden, in der die Einzelzellen der Gruppe als Ganzes untergeordnet sind und in gegenseitiger Abhängigkeit existieren.

Diese Eigenschaften ließen die Gewebekulturen als Testobjekte zur Analyse der Strahlenwirkung auf lebendes Gewebe im Rahmen der strahlenbiologischen Grundlagenforschung besonders geeignet erscheinen.

Neben der cytologisch-statistischen Auswertung strahlenbedingter Veränderungen bietet die Gewebezüchtungsmethode als besonderen Vorteil die Möglichkeit der Lebendbeobachtung. Mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens in Verbindung mit Zeitraffer-Filmaufnahmen lassen sich alle wesentlichen Formbestandteile der Zelle ohne Färbung darstellen und die funktionellen und morphologischen Veränderungen der Einzelzelle während der Mitose und in der Interphase der laufenden Beobachtung sowie einer vergleichenden und messenden Untersuchung zugänglich machen.

Bei der Beurteilung der Zellteilungsvorgänge sind die gültigen Zellteilungsphasen zu berücksichtigen. In der *Prophase* kommt es zur Spiralisierung der von diesem Zeitpunkt ab gut sichtbaren Chromosomen bei gleichzeitiger Auflösung der Kernkörperchen. In der darauffolgenden *Metaphase* erfolgt die Ordnung der Chromosomen bis zur teilungsgerechten Lagerung in der Äquatorialebene mit gleichzeitiger Ausbildung der Tochterpole und der Zugfasern. In der *Anaphase* werden die Chromosomen zu den Tochterpolen auseinandergeführt. In der *Telophase* erfolgt die Abschnürung des Zelleibes. Damit sind zwei Tochterzellen entstanden, die während der nun anschließenden *Rekonstruktionsphase* durch Entspiralisierung der Chromosomen, Bildung der Kernmembran und der Kernkörperchen den Charakter der Ruhezellen annehmen. Während die Zellen sich in der Mitose abkugeln, senden sie in der Interphase amöboide Fortsätze aus und wandern entlang der Haftunterlage, die durch das feine, im Medium vorgebildete Fibrinnetz gegeben ist.

Der vorliegende Film wurde aus Forschungsaufnahmen zusammengestellt, die einer weiteren Klärung der biologischen Wirkungsweise der energiereichen Strahlenarten dienen¹⁾.

Die Anwendung der schnellen Elektronen und ultraharten Röntgenstrahlen bietet neue Möglichkeiten zu einer Verbesserung der Heilerfolge bei der Strahlentherapie maligner Tumoren. Der wesentliche Vorteil dieser energiereichen Strahlenarten besteht in ihrer besonders für die Tiefentherapie günstigen räumlichen Dosisverteilung. Das Dosismaximum kann in eine dem Sitz des Tumors entsprechende Tiefe verlegt werden und beträgt je nach Höhe der Erzeugungsspannung und Größe des Bestrahlungsfeldes das Mehrfache der Oberflächendosis (GUND, WACHSMANN). Zusammen mit der für beide Strahlenarten charakteristischen geringen Seitenstreuung wird eine gezielte konzentrierte Bestrahlung des erkrankten Herdes mit weitgehender Entlastung der Körperoberfläche und der den Tumor umgebenden gesunden Gewebepartien ermöglicht. Der Ausdehnung des Karzinoms kann durch die Auswahl entsprechender Feldgrößen Rechnung getragen werden. Die Konstruktionsart des für die Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellten 15-MeV-Betatron der SIEMENS-REINIGER-Werke gestattet außerdem erstmalig die Verabfolgung der energiereichen Strahlen nach dem Prinzip der Bewegungsbestrahlung. Dadurch wird die besonders bei Verwendung von ultraharten Röntgenstrahlen notwendige Entlastung der Strahlenaustrittsstellen erreicht.

Im Hinblick auf die praktische Bedeutung der 15-MeV-Elektronenschleuder für die Karzinomtherapie erschien es notwendig, die biologische Wirkungsweise der ultraharten Röntgenstrahlen zu untersuchen. Dabei sollte die Frage der elektiven Wirksamkeit auf Zellen in der Mitose besonders berücksichtigt werden. Vorausgegangene cytologisch-statistische Auswertungen fixierter und gefärbter Präparate ließen vermuten, daß auch ultraharte Röntgenstrahlen ähnlich wie schnelle Elektronen Zellen im Stadium der Interphase nicht irreversibel zu schädigen vermögen. Der Beweis konnte jedoch erst mit den vorliegenden Aufnahmen erbracht werden.

II. Erläuterungen zum Film

Der Film demonstriert zuerst an mehreren Beispielen die Wirkung der Bestrahlung mit ultraharten Röntgenstrahlen auf den Zellteilungsvorgang. Die erste Aufnahme, die eine Zellteilung vom Stadium der

¹⁾ Die Forschungsarbeiten wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. GUND (†) an dem 15-MeV-Betatron der SIEMENS-REINIGER-A. G. in Erlangen durchgeführt. Für die Filmaufnahmen fand das LEITZ-Forschungsmikroskop *Ortholux* mit Phasenkontrasteinrichtung Verwendung. Den SIEMENS-REINIGER-Werken sowie Herrn Prof. Dr. GOTTSCHIEWSKI (Fa. E. LEITZ, Wetzlar) sei an dieser Stelle besonders für die freundliche Unterstützung gedankt.

Prophase an zeigt, beginnt mit Einsetzen der Bestrahlung¹⁾. Die Teilungsbewegungen laufen ohne morphologisch erkennbare Veränderungen ab. Damit läßt sich zeigen, daß einzelne Zellen den Strahleninsult unbeeinflusst überstehen können, oder daß es nicht zu einem Trefferereignis gekommen ist.

Auch die folgende Filmaufnahme wurde schon während der Bestrahlung begonnen. Bei der Einordnung in die Äquatorialebene fällt eine leichte Verdichtung der Chromosomen auf. In der Anaphase läßt sich das „Liegenbleiben“ eines Chromosoms erkennen. Während der nun nachfolgenden Teilungsbewegungen bleibt dieses Chromosom isoliert und bildet in der rechten Tochterzelle einen Nebenkern, der durch einen scharf konturierten hellen Hof deutlich wird.

Es folgen zwei Zellen in Teilung. Hier ist die Bestrahlung bereits beendet. Beide Zellen sind schwer geschädigt, ihre Chromosomen sind zu einer homogenen Masse verklumpt. Die Teilungsbewegungen erfolgen dysreguliert mit einer starken Verlängerung der Phasendauer. Die linke Zelle vermag sich zwar zu teilen. Dabei kommt es aber zu einer ungleichen Aufteilung der chromosomalen und cytoplasmatischen Substanz, die mit der weiteren Existenz dieser Tochterzellen nicht vereinbar ist. Eine von ihnen konnte bis zu ihrem Untergang verfolgt werden²⁾. Auch bei der rechten Zelle setzen Teilungsbewegungen ein, die aber frustan ablaufen. Es kommt lediglich zur Eliminierung von Cytoplasma, dessen Eigenbewegungen beobachtet werden können.

Das Verhalten der Ruhezellen wurde an Hand einer Aufnahme, die einen Ausschnitt aus der Randzone der Gewebekultur wiedergibt, näher untersucht. Die Filmaufnahme begann vor Einsetzen der Bestrahlung und dauerte bis längere Zeit nach deren Ende. Durch planimetrische Auswertung der Einzelbilder (Ausmessen der von Zellen bedeckten Fläche) ließ sich feststellen, daß unmittelbar mit Beginn der Bestrahlung in der Kultur ein Wachstumsstop eintritt (Abb. 1). Dieser Stop bleibt so lange bestehen, wie die Bestrahlung dauert. Gleich danach setzt das Wachstum wieder ein; die Wachstumsgeschwindigkeit ist etwa die gleiche wie vorher.

Der Film bringt als zweiten Abschnitt — nach Ab- und Wiederaufblenden des Bildes — von dieser Aufnahme nur den letzten Teil, der das Verhalten der Ruhezellen nach der Bestrahlung zeigt. Es fällt auf, daß auch hier, nach Einstrahlung von 500 r ultraharter Röntgenstrahlen, die Wanderungsbewegungen im Randschleier der Kultur zunehmend ungerichtet erfolgen. Gegen- und rückläufige Bewegungen sind häufig.

Abb. 2 ist das Ergebnis einer graphischen Auswertung dieser Filmaufnahme. Sie zeigt den Weg der Zellkerne von drei Zellen. Zuerst erfolgt

¹⁾ Soweit während der Aufnahmen bestrahlt wurde, sind im Film Zeitpunkt und Dauer der Strahleneinwirkung durch das in das Bild einkopierte Wort *Bestrahlung* gekennzeichnet.

²⁾ Im Film nicht enthalten.

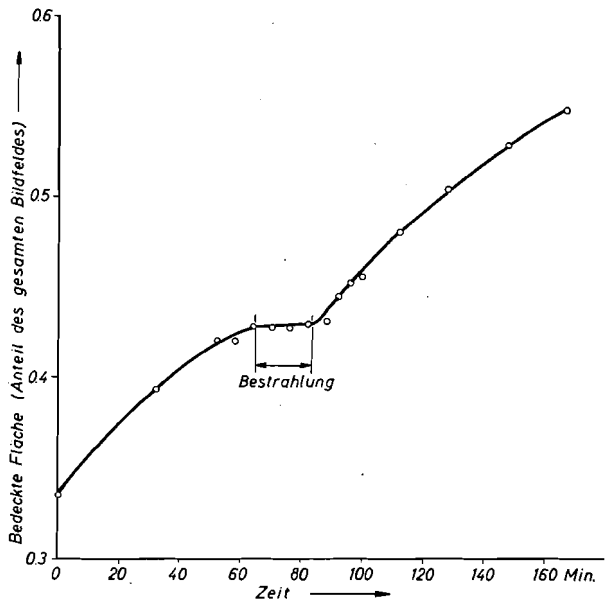


Abb. 1. Wachstumsstop der Gewebekultur
(planimetrisch aus der Filmaufnahme bestimmt)

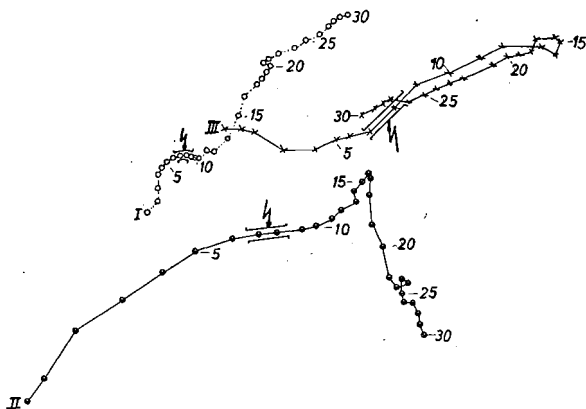


Abb. 2. Zellwanderung nach der Bestrahlung
(aus der Filmaufnahme bestimmt)

Zeitlicher Abstand der Meßpunkte 10 Min.

⚡ Bestrahlung.

die Zellwanderung gerichtet, wie es dem normalen Wachstum der Kultur entspricht (das Zentrum der Kultur lag bei der Aufnahme links unten außerhalb des Bildfeldes). Dies ändert sich auch nach der Bestrahlung zunächst nicht. Später aber ist die Ordnung gestört. Während der Weg der Zelle I seine allgemeine Richtung weiter beibehält, tritt bei II und III nach einiger Zeit eine spontane Richtungsänderung, bei III sogar eine vollständige Richtungsumkehr ein. Bemerkenswert ist, das dies bei beiden Zellen fast genau zum gleichen Zeitpunkt geschieht.

Gelegentlich werden in den bestrahlten Kulturen Protoplasma-bewegungen einzelner Ruhezellen wahrgenommen, wie sie sich sonst nur während der Teilung beobachten lassen. Eine tödliche Schädigung von Zellen während der Interphase konnte jedoch in keiner der Aufnahmen festgestellt werden. Auch die ultraharten Röntgenstrahlen des Betatrons vermögen demnach keine irreversible tödliche Schädigung an den Hühnerherzfibroblasten der Gewebekultur während der Teilungsruhe auszulösen.

Schlußbemerkung

Mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen in Verbindung mit dem Phasenkontrastmikroskop konnte der Nachweis erbracht werden, daß die ultraharten Röntgenstrahlen des 15-MeV-Betatrons die bekannten typischen Schädigungen während der Mitose auszulösen vermögen. Gegenüber Röntgenstrahlen bisheriger therapeutischer Härte besteht jedoch, wie weiter nachgewiesen wurde, in der Wirkungsweise ein qualitativer Unterschied: Ultraharte Röntgenstrahlen vermögen keine irreversible tödliche Schädigung von Ruhezellen während der Zeitspanne des Primäreffektes herbeizuführen. Sie gleichen damit in ihrer biologischen Wirksamkeit weitgehend den schnellen Elektronen. — Damit hat sich zugleich die Zeitraffermethode erneut als wertvolles Forschungsmittel zur Klärung strahlenbiologischer Effekte erwiesen.

Literatur

Gewebezüchtung:

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.

Strahlenbiologie:

4. GÄRTNER, H., Strahlenbiologische Untersuchungen mit schnellen Elektronen und Röntgenstrahlen an Gewebekulturen. Str. Ther. **32,4** (1950), S. 539.
5. GÄRTNER, H., Weitere Untersuchungen über die strahlenbiologische Wirksamkeit von schnellen Elektronen und Röntgenstrahlen auf Gewebekulturen. Str. Ther. **36,2** (1952), S. 217.
6. GÄRTNER, H., Vergleichende Untersuchungen über den Primäreffekt nach Einwirkung von schnellen Elektronen und Röntgenstrahlen auf Gewebekulturen. Str. Ther. **39,1** (1952), S. 26.
7. GÄRTNER, H., Zellteilung in Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Wiss. Film C 615 des Instituts für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen 1952.
8. GÄRTNER, H., Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Wiss. Film C 616 des Instituts für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen 1952.
9. GÄRTNER, H., u. K. PETERS, Einfluß der Dosis und Dosisleistung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf die Mitosehäufigkeit von Gewebekulturen. Str. Ther. **92,4** (1953), S. 555.
10. GÄRTNER, H., Die biologische Wirksamkeit schneller Elektronen und ultraharter Röntgenstrahlen einer 15 MeV-Elektronenschleuder im Vergleich zu Röntgenstrahlen üblicher Härte. (Untersucht an Gewebekulturen). I. Teil: Str. Ther. **96,2** (1955) S. 201. II. Teil: Str. Ther. **96,3** (1955), S. 378. Habilitationsschrift Tübingen 1953.
11. KEPP, R. K., Grundlagen der Strahlentherapie. G. Thieme, Stuttgart 1952. (Dort weitere Literaturangaben.)
12. SPEAR, F. G., Radiations and Living Cells. Chapman and Hall Ltd., London 1953.

(Eingegangen am 16. 3. 1955)