

INSTITUT FÜR FILM UND BILD IN WISSENSCHAFT UND UNTERRICHT
HOCHSCHULFILM C 616/1952

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

**Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen
auf Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten)**

Von

Dr. HENRIETTE GÄRTNER

(Mit 2 Abbildungen)

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

Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten)

VON DR. HENRIETTE GÄRTNER

(Mit 2 Abbildungen)

Die Einwirkung von Röntgenstrahlen (Spannung 87 kV) und schnellen Elektronen (Beschleunigung 5 MeV) unter angeglichener Dosisleistung von 1000 r/Min. und einer einmaligen Gesamtdosis von 4000 r wird unmittelbar nach der Bestrahlung an Zellen in Mitose und im Ruhestadium mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens in Zeitrafferaufnahmen dargestellt. Die für den Primäreffekt charakteristischen Abweichungen während der Teilung konnten für beide Strahlenarten als morphologisch gleichwertig festgestellt werden. Sie manifestieren sich am deutlichsten in der Brückenbildung während der Anaphase und Telophase. Im Gegensatz dazu tritt eine verschiedenartige Wirkung im Verhalten der Ruhezellen zutage. Schon während der Zeitspanne des Primäreffekts gehen nach Röntgenbestrahlung Ruhezellen in größerer Anzahl spontan zugrunde, während nach Elektronenbestrahlung die Schädigung in der Interphase weitaus geringer ist.

Der Film ist für den Hochschulunterricht bestimmt. Die Schmalfilmkopie (16 mm-Stummfilm) hat eine Länge von 134 m entsprechend 12½ Minuten Vorföhrdauer bei einer Vorföhrgeschwindigkeit von 24 B/s.

I. Allgemeine Vorbemerkungen

Die Gewebezüchtung wurde, ausgehend von den grundlegenden Versuchen von HARRISON (1907) und CARREL (1911) zu einer biologischen Arbeitsmethode 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. Sie sind zur Analyse von Wachstumsvorgängen sehr geeignet und erlauben, die Einwirkung chemischer und physikalischer Noxen auf die Zellen zu untersuchen.

Für diesen Film dienten Reinkulturen von embryonalen Hühnerherzmuskelzellen, die Herzen von 8—9 Tage bebrüteten Hühnerembryonen entstammten, als Testobjekte. Die Explantate wurden unter Zusatz von Hühnerembryonalextrakt und Hühnerplasma gezüchtet und alle 48 Stunden mit neuem Nährmedium versehen. Die Zeitrafferaufnahmen der bestrahlten und unbestrahlten Kulturen wurden jeweils in der 5. Passage nach 24stündiger Bebrütung begonnen.

Die Beobachtung der lebenden Zellen erfolgte durch das *Phasenkontrastverfahren*. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich alle wesentlichen Formbestandteile der Zelle ohne Färbung darstellen und die Formveränderungen und die Vorgänge bei der Zellteilung laufend beobachten.

Die Zellteilung läuft in charakteristischen Phasen ab. 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. — Unter zusätzlicher Verwendung der Zeitraffermethode lassen sich diese Wachstums- und Teilungsvorgänge unter normalen und abgeänderten Bedingungen über längere Zeiträume verfolgen¹⁾.

Aufgabe des vorliegenden Filmes war es, Unterschiede in der biologischen Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen einer Elektronenschleuder darzustellen.

¹⁾ Vgl. H. GÄRTNER, Zellteilung in Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Hochschulfilm C 615 des Instituts für Film und Bild, Göttingen 1952.

Es ist bekannt, daß kurzwellige Strahlungen eine schädigende Wirkung auf die Zellen ausüben. Auf diesem Effekt beruht die Strahlenbehandlung bösartiger Tumoren mit Röntgenstrahlen und den Gamma-Strahlen des Radiums. Neuerdings eröffnen sich durch die Anwendung der schnellen Elektronen einer Elektronenschleuder neue Wege zu einer wirksamen Karzinombehandlung. Neben der zu vermutenden elektiven Beeinflussung der malignen Zellen ermöglichen diese energiereichen Elektronen infolge ihrer besonderen Absorptionsbedingungen eine gezielte Tiefendosierung und lassen somit eine bessere Schonung des den Tumor umgebenden gesunden Gewebes erhoffen.

In Teilung befindliche Zellen sind besonders strahlenempfindlich. Die Einwirkung der kurzwelligen Strahlungen führt im Falle eines oder mehrerer Treffereignisse im strahlenempfindlichen Bereich der mitotischen Zelle zu typischen Veränderungen, die als Primäreffekt bezeichnet werden. Schon in der frühen Metaphase kommt es zu Verklebungen und Verklumpungen der Chromosomen, die in der Anaphase und Telophase als sogenannte *Brückenbildung* in Erscheinung treten.

Über die strahlenbiologische Reaktion der Ruhezellen ist bisher wenig bekannt. Es stand zwar außer Zweifel, daß auch Interphasezellen durch die genannten Strahlenarten geschädigt werden. Man neigte jedoch zu der Auffassung, daß diese primäre Strahlenschädigung der Ruhekerne bis zum Beginn der Zellteilung latent bliebe.

In den diesem Film vorausgehenden cytologischen Untersuchungen am fixierten und gefärbten Präparat ließ sich der statistische Nachweis erbringen, daß nach einer Dosis von 4000 r Röntgenstrahlen (Dosisleistung 1000 r/Min.) auch Zellen in der Interphase spontan zugrunde gehen. Nach Einwirkung der gleichen Dosis schneller Elektronen ist dies jedoch nicht der Fall. Die nekrobiotischen Zellvorgänge spielen sich hier vorwiegend an den während der Teilung tödlich geschädigten Zellen ab. Diese Untersuchungen deuteten damit auf einen qualitativen Wirkungsunterschied beider Strahlenarten hin und ließen eine Überprüfung mit Hilfe der Zeitraffermethode wünschenswert erscheinen.

Die Arbeiten wurden an der SIEMENS-6 MeV-Elektronenschleuder in der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen (Dir.: Prof. Dr. K. MATTHES)

unter Mitarbeit von Priv.-Doz. Dr. F. WACHSMANN durchgeführt. Für die Forschungsaufnahmen fand das LEITZ-Forschungsmikroskop *Ortholux* mit Phasenkontrasteinrichtung Verwendung. Herrn Prof. Dr. GOTTSCHESKI (Firma E. LEITZ G.m.b.H., Wetzlar) sei für die freundliche Unterstützung besonders gedankt. Bei der Herstellung des Films stand ein finanzieller Beitrag der Deutsch-Schweizerischen Gemeinschaftsproduktion des Instituts für Wissenschaftliche Filme Erlangen und der Kern-Film AG. Basel zur Verfügung.

II. Erläuterungen zum Film

Zellteilung nach Röntgenbestrahlung¹⁾

Nach Einstrahlung einer Einzeldosis von 4000 r Röntgenstrahlen bei einer Dosisleistung von 1000 r/Min. lassen sich die verschiedenen für den Formenkreis des Primäreffektes charakteristischen Schädigungen beobachten.

Zunächst werden 2 Zellen während der Teilung gezeigt. Die rechte der beiden Mitosen befand sich während der Bestrahlung bereits im Stadium der späten Metaphase und vermag die begonnene Teilung anscheinend unbeeinflusst zu beenden. Die Nachbarzelle weist jedoch einen schweren Strahlenschaden auf. Die zu beobachtende Verklumpung der Chromosomen führt zur Brückenbildung in der Anaphase (s. Abb. 1) und zur ungleichen Verteilung der

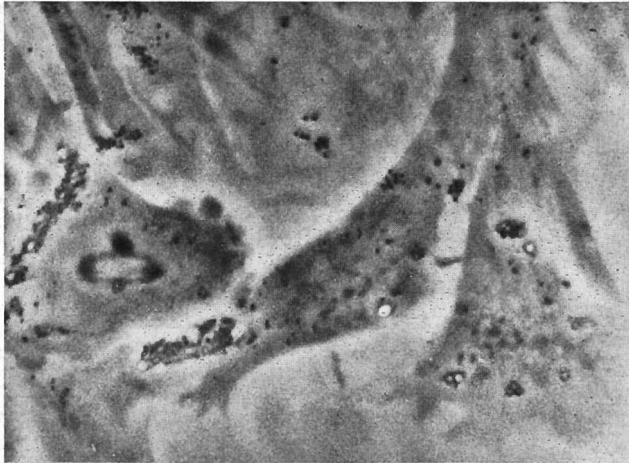


Abb. 1. Brückenbildung in der Anaphase

Die Teilung der rechten Zelle ist nahezu beendet; sie verläuft morphologisch normal

¹⁾ Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

Kernsubstanz auf die Tochterzellen. Die Durchschnürung des Cytoplasmas vollzieht sich regelrecht, jedoch bleibt die Chromatinbrücke zwischen beiden Tochterzellen bis in die Rekonstruktionsphase hinein bestehen. (Mikroskopische Vergrößerung 250fach; Aufnahmedauer 32 Minuten; Aufnahme mit 1 Bild pro Sekunde, d.h. Zeitraffung auf $\frac{1}{24}$.)

Die nächste Aufnahme wurde 2 Minuten nach Einstrahlung von 4000 r Röntgenstrahlen begonnen. Wiederum sind schwerwiegende morphologische Veränderungen mit Verklumpung und Brückenbildung zu beobachten. Die Mitose läuft verzögert ab. Zur Polwanderung während der Anaphase wird die doppelte Zeit benötigt. (Vergr. 380fach; Dauer 24 Min.; Zeitraffung auf $\frac{1}{24}$.)

Auch die nun folgende Zelle zeigt die charakteristischen Schädigungsbilder. Über die zunehmende Verklumpung und Brückenbildung kommt es zwar zur Teilung, als zusätzliches Phänomen läßt sich jedoch eine Mehrkernbildung in den Tochterzellen feststellen. In jeder Tochterzelle werden mehrere kleine Kerne ungleicher Größe sichtbar, meist nur mit einem Kernkörperchen. Die fortlaufende Beobachtung ergab, daß derartige Zellen nicht lebensfähig sind und durch Chromatolyse zugrundegehen. (Vergr. 380fach; Dauer 61 Min.; Aufnahme mit 30 B/Min., d.h. Zeitraffung auf $\frac{1}{48}$.)

Die nächste Aufnahme wurde 5 Minuten nach der Bestrahlung begonnen. Neben der zunehmenden Ansammlung von Fetttropfen läßt sich eine Verklumpung der Chromosomen in der frühen Metaphase nachweisen. Die nunmehr notwendige Einordnung in die Äquatorialebene unterbleibt. Statt dessen wird erneut eine Kernmembran sichtbar. Man ist zunächst geneigt, eine Rückbildung nach begonnener Teilung anzunehmen. Ein zweiter kleinerer Kern links deutet jedoch darauf hin, daß es sich um eine *Amitose* mit ungleicher Verteilung der Kernsubstanz unter Ausbleiben der Plasmateilung handelt. (Vergr. 300fach; Dauer 120 Min.; Aufnahme mit 15 B/Min., d.h. Zeitraffung auf $\frac{1}{96}$.)

¹⁾ Die angegebenen Werte für die Vergrößerung beziehen sich auf die mikroskopische Abbildung bei der Aufnahme, nicht auf den Maßstab des Schmalfilmbilds. — Die Zeitraffung gilt für die normale Vorführgeschwindigkeit von 24 B/s. Die Vorführdauer dieser Aufnahme beträgt demnach 80 Sekunden.

Zellteilung nach Elektronenbestrahlung

Die Kernschädigungen des Primäreffektes manifestieren sich nach Einstrahlung von 4000 r schneller Elektronen bei einer Dosisleistung von 1000 r/Min., wie an den beiden folgenden Teilungsaufnahmen zu sehen ist, morphologisch in derselben Weise. (Vergr. 170- u. 250fach; Dauer 25 bzw. 97 Min.; Zeitraffung auf $\frac{1}{48}$ bzw. $\frac{1}{96}$.)

Bei der nächsten Aufnahme ist die Verklumpung der Chromosomen bereits in der frühen Metaphase erfaßt. Die nunmehr notwendige Bildung der Äquatorialebene unterbleibt, der Spindelapparat erscheint gestört. Das Vibrieren der Zelle zeigt, daß die Koordination der Bewegungen von Chromosomen und Zelleib aufgehoben ist. Mit heftigen Bewegungen werden verzweifelte Anstrengungen unternommen, gleichsam die Teilung noch zu erzwingen. Die Durchschnürung ist jedoch unmöglich. Es kommt lediglich zu einer vielfachen und völlig unregelmäßigen Trennung der Chromosomen mit Bildung mehrerer Kerne. Diese Zelle geht später durch Chromatolyse zugrunde. (Vergr. 250fach; Aufnahmedauer der versuchten Teilung 47 Min.; Zeitraffung auf $\frac{1}{96}$ u. $\frac{1}{48}$ ¹⁾; Dauer der weiteren Entwicklung mit Bildung mehrerer Kerne 36 Min.; Zeitraffung auf $\frac{1}{180}$.)

Ruhezellen nach Röntgenbestrahlung

Wesentlich sind die Beobachtungen an Ruhezellen, da sie wichtige Unterschiede in der biologischen Wirkung der beiden Strahlenarten im verwendeten Dosisbereich aufzeigen.

Die röntgenbestrahlten Kulturen zeigen ein völlig ungerichtetes Wachstum. Die rasch zunehmende grobe Verfettung der Zellen ist Ausdruck einer Störung des Zellstoffwechsels. Die Fibroblasten werden außerdem schlanker und dunkler und bewegen sich schließlich wirr und aufgereggt durcheinander. (Vergr. 170- u. 250fach; Zeitraffung auf $\frac{1}{360}$ u. $\frac{1}{180}$.) Neben diesen Schädigungen leichterer und zum Teil zumindest reversibler Art läßt sich häufig ein Zelluntergang in der Interphase beobachten, der zeitlich mit dem Primäreffekt zusammenfällt. Eine zunächst noch intakt scheinende Zelle be-

1) Der Übergang zur geringeren Zeitraffung ist durch eine sogenannte Schiebelende kenntlich gemacht (senkrechte unscharfe Linie, die von links nach rechts über das Bild wandert).

ginnt plötzlich heftige Plasmabewegungen auszuführen, die schließlich zur Herausschleuderung des Zellkernes führen (Abb. 2). Der Tod der Zelle wird an der völligen Erstarrung des Zellgefüges sichtbar. Dieser Vorgang ließ sich zwanglos mehrfach filmen. Die Plasmabewegungen setzen spontan ein, und der Zellkern wird ruckartig eliminiert. Bei der oft nachfolgenden Blasenbildung handelt es sich möglicherweise um freigewordenes Wasser. (Vergr. 250 fach; Zeitraffung auf $\frac{1}{96}$.)

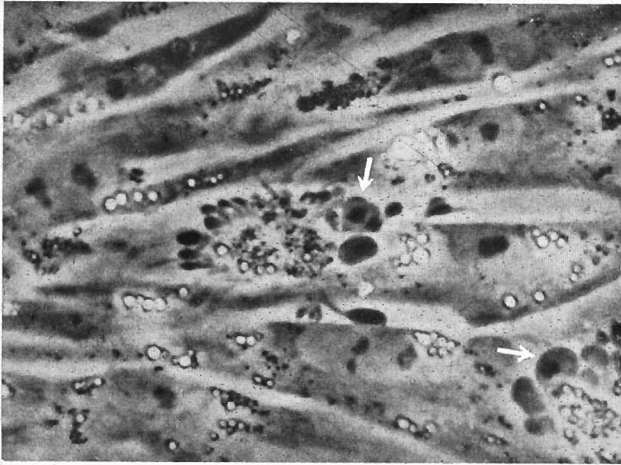


Abb. 2. Untergehende Ruhezellen

Die mit Pfeilen bezeichneten Zellkerne sind aus dem Zellgefüge eliminiert
Die Ruhezelle rechts von der Bildmitte geht später auf gleiche Weise zugrunde

Eine spätere Übersichtsaufnahme zeigt die nunmehr frei flotierenden Zelltrümmer inmitten der turbulenten wirren Zellbewegungen. (Vergr. 170 fach; Aufnahme mit 4 B/Min., d. h. Zeitraffung auf $\frac{1}{360}$.)

Ruhezellen nach Elektronenbestrahlung

Nach Einstrahlung der gewählten Versuchsdosis von 4000 r schneller Elektronen und einer Dosisleistung von 1000 r/Min. konnte ein derartiger Zelluntergang von Ruhezellen weder am gefärbten Präparat noch mit Hilfe der Zeitraffermethode beobachtet werden. Es setzen zwar Störungen ein; die Zellen werden auch nach Elektronenbestrahlung schlanker und dunkler und zeigen zunehmende Lipoidanreicherung. Neben dieser geringen und reversiblen Schädigung lassen sich sogar Teilungen feststellen, die ohne gröbere

morphologische Veränderungen ablaufen. (Vergr. 130fach; Zeitraffung auf $\frac{1}{360}$.)

Das wesentliche Ergebnis der Forschungsaufnahmen ist also: Schnelle Elektronen verursachen in der Interphase geringere Schädigungen als Röntgenstrahlen gleicher Dosis und Dosisleistung. Die Erklärung dieses Wirkungsunterschiedes dürfte in der verschiedenen Ionisationsdichte beider Strahlungen zu suchen sein.

Schlußbemerkung

Der Zeitrafferfilm hat sich hier in Verbindung mit dem Phasenkontrastverfahren als eine wissenschaftliche Untersuchungsmethode erwiesen, die geeignet ist, cytologisch-statistisch gewonnene Versuchsergebnisse zu überprüfen. Er stellt überdies das einzige Verfahren dar, das Einblick in die Dynamik des mikrobiologischen Geschehens zu gewinnen erlaubt.

Literatur

Gewebezüchtung:

1. CAMERON, G., Tissue Culture Technique. New York 1950.
2. FISCHER, A., Gewebezüchtung. Müller & 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. **82** (1950), S. 539.
5. GÄRTNER, H., Weitere Untersuchungen über die strahlenbiologische Wirksamkeit von schnellen Elektronen und Röntgenstrahlen auf Gewebekulturen. Str. Ther. **86** (1952), S. 217. (Dort weitere Literaturangaben.)
6. GÄRTNER, H., Vergleichende Untersuchungen über den Primäreffekt nach Einwirkung von schnellen Elektronen und Röntgenstrahlen auf Gewebekulturen. Str. Ther. (1952, im Druck).
7. KEPP, R. K., Grundlagen der Strahlentherapie. G. Thieme, Stuttgart 1952.

(Eingegangen am 17. 4. 1952)

Die Herstellung des Films erfolgte im Jahre 1951
durch das
Institut für Film und Bild in Wissenschaft und Unterricht
Abteilung Hochschule und Forschung, Göttingen (Dir.: Dr.-Ing. G. WOLF)
Sachbearbeitung: G. BEKOW — Aufnahme: E. HEYSE