

The author is greatly indebted to Dr. M. L. BHATIA, for providing the necessary facilities to carry out this investigation and to Dr. REECE I. SAILER, National Museum, Washington, D. C., for kindly identifying the specimen. Sincere thanks are due to Dr. M. K. DUTT for guidance and helpful criticism.

P. S. MENON

Department of Zoology, University of Delhi, India, September 3, 1955.

Résumé

Oxycaremus hyalinipennis (Costa) possède vraisemblablement des chromosomes sexuels multiples du type $X_1 X_2 Y$. Les métaphases diploïdes renferment, soit 17, soit 19 éléments. Les 2 éléments supplémentaires des cinèses à 19, bien que comparables aux *m*-chromosomes des autres *Lygèides*, diffèrent de ces derniers en certains points de leur comportement qui évoque celui des « surnuméraires » trouvés chez d'autres insectes. La méiose est du type habituel chez les Hétéroptères.

Die Wirkung energiereicher Strahlen auf die Atmungsfermentkette

In früheren Mitteilungen haben wir gezeigt, dass isoliertes Cytochrom *c* in 10^{-4} molarer wässriger Lösung relativ leicht durch Röntgenstrahlen oxydiert werden kann. Dabei wird wahrscheinlich die Struktur des Cytochrom-Moleküls irreversibel verändert¹. Die Möglichkeit, dass in einer lebenden Zelle einzelne Cytochrome oder andere Glieder der Atmungsfermentkette durch eine Bestrahlung ähnlichen Veränderungen unterworfen sind, musste in Betracht gezogen werden. Da die Cytochrome relativ leicht durch Spektroskopie nachzuweisen sind, lag es nahe, zu untersuchen, ob sie auch in der lebenden Zelle durch eine Bestrahlung oxydiert werden, bzw. ob das Gleichgewicht zwischen oxydiertem und reduziertem Cytochrom auf die oxydierte Seite verlagert wird.

Eine Störung der Sauerstoffaufnahme der bestrahlten Zellen hat sich bisher nicht sicher nachweisen lassen; die von BARRON und seinen Mitarbeitern² beobachtete Atmungshemmung konnten andere Beobachter nicht bestätigen³. Doch lässt sich aus der Grösse des Sauerstoffverbrauches noch nicht unbedingt auf einzelne Reaktionsschritte der Atmungsfermentkette schliessen.

Material und Methode

Zellsuspensionen. Wir verwendeten Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und *Escherichia coli*. Die Hefe war Bäckerhefe der Hefefabrik Oberkotzau, sie wurde 2mal in kalkarmem Leitungswasser gewaschen und 15%ig in $m/30$ KH_2PO_4 suspendiert. Bei *E. coli* handelte es sich um Stamm B. Beimpfte Bouillon-Agar-Platten wurden 24–48 h bei 37° b brütet und die Keime mit einem Spatel abgeschabt. Im allgemeinen liessen sich von einer

¹ U. HAGEN, Z. Naturforsch. 10b, 210 (1955); Naturwissenschaften 42, 185 (1955). – E. S. G. BARRON und V. FLOOD, Arch. Biochem. Biophys. 41, 203 (1952).

² E. S. G. BARRON, B. GASVODA und V. FLOOD, Biol. Bull. 97, 51, 144 (1949). – E. S. G. BARRON und I. SEKI, J. gen. Physiol. 35, 865 (1952).

³ E. J. BOELL, J. cell. comparat. Physiol. [39. Suppl.] 2, 19 (1952). – D. BILLEN, G. E. STAPLETON und A. HOLLAENDER, J. Bacteriol. 65, 131 (1953). – M. LE MAY, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 77, 337 (1951). – H. LASER, Nature 174, 753 (1954).

Agarplatte 40–50 mg frische Colibakterien gewinnen. Die Bakterien wurden einmal mit Leitungswasser gewaschen, zentrifugiert (10 min, 5000 U./min) und 8%ig in $m/30$ Phosphatpuffer, pH 6,2 suspendiert. Da wir eine Oxydation des gelösten Cytochroms vor allem im sauren Bereich gesehen hatten, wählten wir die beschriebenen pH-Werte von 6,2 bei *E. coli* und 4,7 (KH_2PO_4) bei Hefe.

Spektroskopie. Ihre Methodik wurde bereits in unserer früheren Mitteilung¹ beschrieben. Vor jeder elektrischen Messung betrachteten wir die Zellsuspensionen mit dem Handspektroskop nach der Methode von WARBURG². Bei der elektrischen Messung wurde das Licht einer Xenonlampe durch einen Monochromator zerlegt und die Intensität dieses monochromatischen Lichtes durch einen empfindlichen Multiplier gemessen. Der Küvettenhalter zwischen Lichtquelle und Multiplier fasste 2 Küvetten. Durch eine einfache Schiebvorrichtung konnte man rasch die eine oder andere Küvette in den Strahlengang bringen. Die Zellsuspensionen wurden während der Messung mit Sauerstoff oder Stickstoff durchströmt, ihre Schichtdicke betrug 2,0 cm.

Bestrahlungstechnik. Apparatur der Firma C. H. F. Müller, Hamburg, Modell M G 150, 150 kV, 15 mA, ohne Filter, HWS 0,4 mm Cu. Dosiszufluss 500–2000 r/min. Die Bestrahlung wurde in den Messküvetten vorgenommen, die vorgekühlten Gefässe standen dabei im Eiswasser, die Temperatur des Küvetteninhaltes betrug während der Bestrahlung etwa + 2°.

Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität nach LINDENMANN³. Es wird die Menge Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) bestimmt, die von einer bestimmten Menge Bakterien reduziert wird. Ansatz: etwa 10^9 Bakterien (2 cm³ einer 0,1%igen Suspension) in $m/15$ Phosphatpuffer pH 6,2; 2,0 mg Glukose; 1,0 mg TTC; 37,0°C; Versuchsdauer 30 min. Das normale Reduktionsvermögen dieses Ansatzes betrug bei $n = 20$

$$400 \pm 4 \gamma \text{ TTC.}$$

Messung der Cytochrombanden in den lebenden Zellen. Betrachtet man mit dem Handspektroskop eine 15%ige Suspension gewaschener Hefe, so kann man folgende Absorptionsbande erkennen (Abb. 1a):

605 m μ , ziemlich schmal	Bande a_α
563 m μ , stark	Bande b_α
550 m μ , stark	Bande c_α
520 m μ , schwach, oft nicht erkennbar	Bande $(b + c)_\beta$

Die Doppelbande 563/550 m μ ist fürs Auge gut trennbar. Die Banden werden beobachtet in einer ruhenden Suspension, sowie bei Durchströmung mit N_2 . Leitet man Sauerstoff durch die Küvetten, verblassen die Banden, wie es bereits 1885 von McMUNN und später von WARBURG und KEILIN⁴ ausführlich beschrieben worden ist. Voraussetzung ist allerdings, dass die Zellsuspension gut gewaschen ist, also wenig Substrat zur Verfügung hat. Betrachtet man nämlich ungewaschene Hefe oder fügt noch ein wenig Glukose zur Suspension, verblassen die Bande bei O_2 -Durchströmung fast gar nicht. Die Abnahme der Intensität betrifft vor allem die Bande a_α und c_α . Die Bande b_α bleibt dagegen selbst bei starker O_2 -Zufuhr fast unverändert (Abb. 1b). *E. coli* besitzt

¹ U. HAGEN, Z. Naturforsch. 10b, 210 (1955); Naturwissenschaften 42, 185 (1955).

² O. WARBURG, *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten* (Editio Cantor, Aulendorf i. Wttbg. 1949).

³ J. LINDENMANN, Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 17, 311 (1954).

⁴ D. KEILIN und E. F. HARTREE, Proc. roy. Soc. London [B] 127, 167 (1939).

kein Cytochrom *c* (KEILIN¹), man sieht zwei Banden bei 630 m μ und 563 m μ (Abb. 1c). Nach dem Keilinschen Nomenklaturschema (Abb. 1d) erhalten sie die Bezeichnung a_1 und b_α . Nach Zufuhr von O₂ verschwinden beide Banden.

Die absolute Intensität der Cytochrombanden ergibt sich, wenn man die beiden Absorptionsspektren einer O₂-durchströmten und einer N₂-durchströmten Zellsuspension miteinander vergleicht. Nach einem Minimum der Absorption im gelben Bereich steigen die Extinktionswerte einer Colisuspension im blauen und violetten Bereich stetig an. Gegenüber der «Sauerstoffkurve» besitzt die «Stickstoffkurve» zusätzliche Gipfel bei 630 m μ und 563 m μ . Die Extinktion der Cytochrombanden ergibt sich aus der Differenz der beiden Kurven: $E_{Cyt.} = E_{N_2} - E_{O_2}$. *E. coli*-Suspensionen zeigen Gipfel bei 630 und 563 m μ ; Hefesuspensionen bei 606 und 550 m μ . Die handspektroskopisch in Hefesuspensionen gut sichtbare Bande b_α (563 m μ) kommt in der gemessenen Kurve nicht zum Ausdruck, da sie nach O₂-Zufuhr nicht verschwindet.

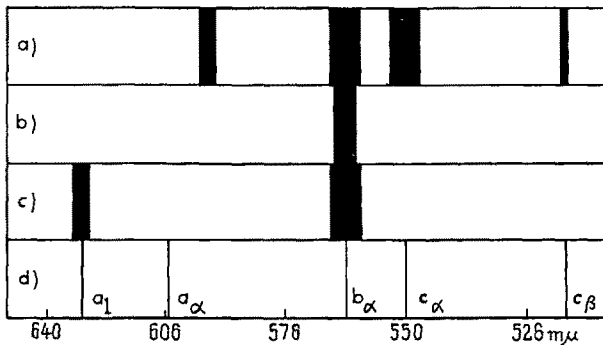


Abb. 1. Cytochrombanden in Suspensionen von Hefe und *E. coli*. a Hefe, Durchströmung mit N₂; b Hefe, Durchströmung mit O₂; c *E. coli*, Durchströmung mit N₂; d Schema der Cytochrombande nach D. KEILIN und C. H. HARPLEY, Biochem. J. 35, 688 (1941).

Praktisch gingen wir so vor, dass wir bei jeder Wellenlänge (Abstand der Messpunkte 5 m μ) eine O₂-durchströmte und eine N₂-durchströmte Küvette mittels der Schiebervorrichtung im Küvettenhalter verglichen. Es war dann:

$$E_{Cyt.} = \log \frac{I_{O_2}}{I_{N_2}}$$

Es erwies sich im Laufe unserer Untersuchungen als günstig, die Zellen in der Sauerstoffküvette leicht mit Äthylurethan (m/10) zu narkotisieren; die Cytochrome werden viel leichter oxydiert, da ja die reduzierenden Systeme der Zelle gehemmt werden.

Die Grösse der Absorption bei 563 m μ (bei *E. coli*) oder 550 m μ (bei Hefe) gegenüber der um 576 m μ war uns das Mass für die Menge an reduziertem Cytochrom *b* bzw. *c*. Bildet man von 3 Ablesungen der gleichen Suspension die Mittelwerte, so erhält man Extinktionswerte, die von Versuch zu Versuch nur wenig Schwankungen zeigen. Für die α -Bande des Cytochrom *b* von *E. coli* (563 m μ) ergab sich bei $n = 22$ die Extinktion $E_{b_\alpha} = 0,1524 \pm 0,0066$; also ein mittlerer Fehler (σ_M) von 4,3%. E_{c_α} von Bäckerhefe betrug $0,154 \pm 0,002$ bei $n = 10$. Nach Zugabe von Äthylurethan (0,82 m), KCN (2×10^{-5} m) oder Natriumdithionit (0,3 m) zeigte sich keine wesentliche Änderung der Intensität der

Cytochrombanden. Im N₂-Strom liegen also die Cytochrome vorwiegend in reduzierter Form vor.

Voraussetzungen für die Beobachtung einer oxydierenden Wirkung der Bestrahlung auf die Cytochrome in der lebenden Zelle. Bei normalem Stoffwechsel werden die Cytochrome in der Zelle ständig oxydiert und wieder reduziert. Dieser Umsatz geht sehr rasch, Cytochrom *c* wechselt etwa 1400mal in der Minute zwischen seiner oxydierten und seiner reduzierten Form². Um eine oxydierende Wirkung der Bestrahlung nachweisen zu können, mussten Versuchsbedingungen geschaffen werden, die die Reduktion der Cytochrome durch die Zelle weitgehend verhindern. Dies ist am schonendsten möglich, indem man den gesamten Stoffwechsel senkt, etwa durch Unterkühlung oder durch Äthylurethanarkose. Im Handspektroskop lassen sich diese Vorgänge relativ einfach verfolgen. Leitet man etwa 30 s lang in eine Hefesuspension Sauerstoff ein, so bleiben nach dem Abschalten des O₂-Stromes die Cytochrome zunächst oxydiert. Nach einer bestimmten Zeit, wenn aller Sauerstoff in der Lösung verbraucht ist, erscheinen plötzlich innerhalb von 1 bis 2 s die Banden der reduzierten Cytochrome. Fügt man sofort nach dem Ende der O₂-Zufuhr 10^{-4} m KCN hinzu (Hemmung der Cytochromoxydase), kann der gelöste Sauerstoff nicht mehr veratmet werden. Es erscheinen die Banden nach 1–2 s, also nach derselben Zeit wie zuvor.

Diese Zeit, in der die Cytochrombanden sichtbar werden, kann als ungefähres Mass für die Dauer gelten, in der das gesamte Cytochrom in der Zelle einmal umgesetzt wird. Sie ist abhängig von der Geschwindigkeit der Cytochromreduktion und verlängert sich beträchtlich bei Unterkühlung und Narkose (Tabelle).

Behandlung der Zellsuspension	Zeit bis zum Auftreten der Cytochrombande nach 30 s Sauerstoffzufuhr, in Minuten	
	a) Bäckerhefe $n = 20$	b) <i>E. coli</i> $n = 5$
Phosphatpuffer, pH 6,2; 0,067 m, 25°	0,4	15,0
0,82 m Äthylurethan in Puffer, 25°	$2,1 \pm 0,03$	—
0,82 m Äthylurethan in Puffer, 25° nach 15000 r.	$1,9 \pm 0,1$	—
Phosphatpuffer, 25°, 10^{-4} m KCN	0,03	—
Phosphatpuffer, + 2°, 10^{-4} m KCN	1,5	45,0
0,82 m Äthylurethan in Puffer, + 2°, 10^{-4} m KCN	9,0	>120

Bei *E. coli* kann man dadurch den Stoffwechsel soweit senken, dass selbst 2 h nach dem Sauerstoffstoss und dem Zufügen der KCN-Lösung die Cytochrombanden noch nicht wieder in ihrer vollen Stärke sichtbar sind. Die Cytochromreduktion ist also weitgehend gehemmt.

Um eine «Röntgenoxydation» der Cytochrome nachweisen zu können, musste die dazu nötige Dosis innerhalb von 2 h unter den angegebenen Bedingungen (+ 2°, 0,82 m Äthylurethan) verabreicht werden. Bei längerer Bestrahlung würde sonst die Bestrahlungswirkung wieder durch die Zelle selbst aufgehoben. Bei Hefe mit ihrem viel intensiveren Stoffwechsel lagen die Verhältnisse viel ungünstiger; zum Nachweis einer Oxydationswirkung standen nur 9 min zur Verfügung.

Beobachtung der Cytochrombanden in bestrahlten Zellen. Bestrahlt man eine Hefe- oder Colisuspension in Äthyl-

¹ D. KEILIN und C. H. HARPLEY, Biochem. J. 35, 688 (1941).

² B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ, Physiologische Chemie, Bd. 1 (Berlin 1951), S. 1186, Tab. 191.

urethannarkose mit einem Dosiszufluss von 500 r/min und beobachtet gleichzeitig hinter einem Bleiglas das Spektrum dieser Suspension mit dem Handspektroskop, so sieht man auch nach längerer Zeit (30 min = 15 000 r) keine Änderung des Spektrums. Eine elektrische Messung während der Bestrahlung war wegen der starken Fluoreszenz der Küvette sowie der Streustrahlung auf den Multiplier nicht möglich.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von MARTIN¹ fanden wir die Zeit bis zum Auftreten der Cytochrombanden nach einem Sauerstoffstoss nicht verlängert (siehe Tab.). MARTIN bestrahlte Hefe mit 10 000 r und beobachtete, dass darauf die Zeit bis zum Wiedererscheinen der Bande 130 s statt 90 s betrug. Er erschliesst daraus eine Hemmung der Cytochromreduktase durch die Bestrahlung.

Um eine mögliche Oxydation des Cytochroms *c* in der Hefe mit Sicherheit ausschliessen zu können, bestrahlten wir 15%ige Suspensionen in 0,82 *m* Äthylurethan + *m*/30 KH_2PO_4 bei + 2°C 10 min lang mit einer Dosis von 2000 r/min, also mit 20 000 r. Unmittelbar anschliessend wurde E_{c_α} gemessen und mit der Intensität vor der Bestrahlung verglichen. In 21 gleichartigen Versuchen ergab sich im Mittel eine Abnahme der Extinktion um 3,5%. Der mittlere Fehler des Mittelwertes (σ_M) betrug ebenso 3,5%; die Bestrahlung bewirkte also weder eine Oxydation noch Reduktion des Cytochroms *c*.

Hefe ist gegen Röntgenstrahlen wenig empfindlich, ihre Halbwertsdosis (HWD) beträgt etwa 50 000 r². (HWD: Die Hälfte der Zellen wird nach dieser Dosis an weiterer Zellteilung gehindert, ist aber noch nicht völlig letalgeschädigt.) Es war möglich, dass sich mit einem empfindlicheren Organismus deutlichere Befunde zeigten. Wir verwendeten *E. coli*, Stamm B mit der HWD von 1000 r³ und bestrahlten 8%ige Suspensionen in 0,82 *m* Äthylurethannarkose bei + 2° mit einer Dosis von 500 r/min. Abbildung 2 gibt die Ergebnisse dieser Untersuchung wieder.

Erst nach 60 min (30 000 r) wird das Cytochrom ein wenig oxydiert, jedoch ist die Abnahme der Extinktion der Bande b_α erst nach 45 000 r so stark, dass ihr Mittelwert (81,2%) zum unbestrahlten Kontrollwert (102,4%) signifikant wird ($p < 0,01$). Dieser Befund bedeutet also: Erst nach Verabreichung der 45fachen Dosis, die ausreicht, die Hälfte der Zellen an weiterer Vermehrung zu hindern, beginnt eine Oxydation der Cytochrome durch die Röntgenstrahlen. Es ergibt sich die Frage, ob nach diesen hohen Dosen überhaupt noch von «lebenden Zellen» gesprochen werden kann. Wenn auch die Vermehrung dieser hochbestrahlten Colibakterien durch 45 000 r nahezu vollständig gehemmt ist (HOLLÄNDER⁴ fand mit dem Plattenzählverfahren bei *E. coli*, Stamm B, nach 45 000 r nur 0,06% Überlebende), so ist doch unmittelbar nach der Bestrahlung die Zelltätigkeit nur wenig herabgesetzt; es findet sich bei den verschiedensten Einzellern selbst nach Dosen von 26 000 r ein ungestörter Gassstoffwechsel, wie LASER⁵ erst kürzlich zeigen konnte.

Nach einigen Vorversuchen wählten wir als «Vitalitätsprobe» die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität nach LINDENMANN¹, gemessen am Reduktionsvermögen von TTC. Gibt man Glukose als Substrat, werden alle Dehydrogenasen des Energiestoffwechsels erfasst; ihre Gesamtaktivität darf als Mass der allgemeinen Vitalität gelten, ähnlich wie etwa bei der Vitalitätsprobe mit Metylenblau.

Die Vitalität der Colibakterien nimmt nun während einer Bestrahlung etwa in demselben Mass ab, wie die Extinktion der Cytochrombanden (Abb. 2). Es ist wahrscheinlich, dass die Röntgenbestrahlung nicht eine Oxydation des Cytochroms *b* bewirkt, sondern lediglich eine allgemeine, irreversible Zellschädigung hervorruft, die sekundär erst zu einer Zerstörung des Cytochrommoleküls führt. Dass eine allgemeine Zerstörung der Zellstruktur die Cytochrombande verschwinden lässt, kann man beobachten, wenn man Coli- oder Hefesuspensionen mit Trichloressigsäure fällt oder bei KCN-Gegenwart mit Hitze inaktiviert. In beiden Fällen verblassen die Banden.

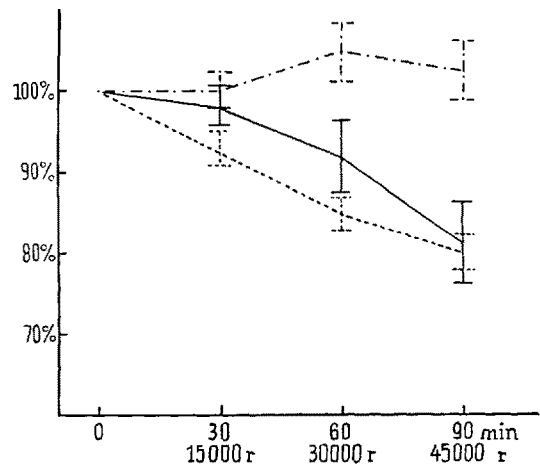


Abb. 2. *E. coli*, Bestrahlung mit 500 r/min.

— Intensität der Cytochrombande b_α (8% *E. coli*, 0,82 *m* Äthylurethan, *m*/30 Phosphatpuffer, pH = 6,2, Ausgangswert vor der Bestrahlung = 100%, $n = 11$).
 - - - Intensität der Cytochrombande b_α bei unbestrahlten Kontroll Suspensionen ($n = 14$).
 ····· Vitalität der Zellen, gemessen am Reduktionsvermögen von Triphenyltetrazoliumchlorid bei Glukose als Substrat ($n = 30$).
 Mittelwerte mit ihrem mittleren Fehler σ_M .

In einer lebenden Zelle werden also die Cytochrome durch Röntgenstrahlen nicht oxydiert. Erst wenn es nach hohen Dosen zum Erliegen jeder Zelltätigkeit gekommen ist, verschwinden die Banden der reduzierten Cytochrome. Dabei kann nicht sicher entschieden werden, ob es sich um eine einfache Oxydation oder eine irreversible Zerstörung des ganzen Moleküls handelt.

Ebenso wie wir keine Oxydation der Cytochrome gesehen hatten, zeigte sich auch keine Reduktion durch die Röntgenstrahlen: Mit Äthylurethan (0,82 *m*) narkotisierte Colibakterien wurden kurze Zeit mit Sauerstoff gesättigt, das Cytochrom *b* lag dann in oxydierter Form vor. In Unterkühlung (+ 2°) und mit 10^{-4} *m* KCN in der Suspension – um einen störenden Einfluss der Cytochromoxydase auszuschalten – wurde bestrahlt. Der pH-Wert der Suspension war 8,5, weil wir bei unseren

¹ J. LINDENMANN, Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 17, 311 (1954).

¹ L. MARTIN und J. BRACHET, C. r. Soc. Biol. 1946, 1201. – L. MARTIN und P. GÉRARD, C. r. Soc. Biol. 1946, 1245.

² R. GLOCKER, H. LANGENDORFF und A. REUSS, Strahlentherapie 46, 517 (1932).

³ H. und M. LANGENDORFF und K. SOMMERMEYER, Z. Naturforsch. 8b, 117 (1953).

⁴ A. HOLLÄNDER, Symp. Radiobiol. Liège 1954.

⁵ E. J. BOELL, J. cell. comp. Physiol. [39. Suppl.] 2, 19 (1952). – D. BILLEN, G. E. STAPLETON und A. HOLLÄNDER, J. Bacteriol. 65, 131 (1953). – M. LE MAY, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 77, 337 (1951). – H. LASER, Nature 174, 753 (1954).

Versuchen an gelöstem Cytochrom hier die stärkste Reduktionswirkung durch die Bestrahlung gesehen hatten. Es liess sich jedoch auch nach einer Dosis von 30 000 r keinerlei reduziertes Cytochrom *b* nachweisen. Nach Zugabe einer kleinen Menge $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ erschienen dagegen sofort die Banden des Ferrocycytochroms *b*.

Diskussion. Zur Erklärung der Vorgänge, die nach dem Durchtritt energiereicher Strahlen in einem Organismus beobachtet werden, zieht man heute zum grossen Teil Vorstellungen heran, die aus Erkenntnissen der Radiochemie gewonnen wurden. Bei der Bestrahlung von Wasser oder wässrigem Medium entstehen neben den Sekundärelektronen Radikale des Wassers, und zwar H-, OH- und HO_2 -Radikale sowie H_2O_2 . Es darf angenommen werden, dass sie auch im Gewebe gebildet werden. Aus radiochemischen Versuchen wissen wir, dass in wässriger Lösung viele Substanzen durch Röntgenstrahlen oxydiert werden, so zum Beispiel Fe^{++} zu Fe^{+++} , Benzol zu Phenol, Cystein zu Cystin oder auch die SH-Gruppe in den «SH-Enzymen» (Bernsteinsäuredehydrogenase, BARRON¹) und Ferrocycytochrom zu Ferricytochrom (BARRON und FLOOD², HAGEN³). Diese oxydierende Fähigkeit wird durch die Entstehung von HO_2 und H_2O_2 erklärt.

Am Beispiel der Cytochrome lässt sich zeigen, dass zwischen der Bestrahlung *in vitro* und *in vivo* doch ein grundsätzlicher Unterschied besteht. 10 000 r oxydieren gelöstes Cytochrom (10^{-5} m) vollständig; *in vivo* treten selbst nach der fünffachen Dosis noch keine Anzeichen einer Oxydation auf. Erst wenn die Zelle durch die Strahlenwirkung so weit geschädigt ist, dass jeder Stoffaustausch unmöglich ist, sie also tot ist, wird ihr Ferrocycytochrom durch die Strahlen oxydiert, bzw. zerstört.

Zur Erklärung dieser Tatsache lässt sich anführen, dass das Cytochrom *c* der Hefe sowie das Cytochrom *b* der Colibakterien fest in die Atmungsfermentkette eingebaut ist. Nach BOELL⁴ sind substratgesättigte Enzyme viel weniger empfindlich als substratfreie. Auch bei niedrigem Stoffwechsel wird man stets einen engen Elektronenaustausch zwischen Cytochrom *c* und der Cytochromreduktase annehmen müssen, so dass das Cytochrom dadurch geschützt ist. Bei Zellen mit stärkerem Stoffwechsel, also ohne Äthylurethannarkose bei normaler Temperatur, ist diese Schutzwirkung der Fermente durch ihr Substrat sicherlich noch grösser.

Die Vorstellungen, die die Radiochemie über die Wirkung energiereicher Strahlen auf einzelne Substanzen entwickelte, dürfen also nicht ohne weiteres für die Deutung der Vorgänge verwendet werden, die sich nach einer Bestrahlung im lebenden Organismus abspielen. Nur die Beobachtung an der möglichst ungeschädigten Zelle gibt die Gewähr, die tatsächlichen Verhältnisse zu erfassen.

In der Atmungskette bleibt also der Elektronentransport von der Bestrahlung unbeeinflusst. Zwei Beobachtungen machen wahrscheinlich, dass auch der Wasserstofftransport durch die Bestrahlung nicht gestört wird: 1. Bestrahlte und unbestrahlte Hefe reduziert das

Cytochrom *c* mit der gleichen Geschwindigkeit. 2. Die Aktivität der Dehydrogenasen wird erst nach Röntgendosen gehemmt, die ein Vielfaches derer betragen, die zu einer Hemmung der Vermehrungsfähigkeit der Zellen führen.

Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit denen anderer Autoren, die keine Änderung der Sauerstoffaufnahme nach Bestrahlung gesehen haben¹. Im Gegensatz zu der starken Hemmung der Synthese von Desoxyribonukleinsäure, die schon wenige Stunden nach einer Bestrahlung zu beobachten ist (ERRERA², dort weitere Literatur), konnten bisher im Energiestoffwechsel der Zelle keine wesentlichen Störungen beobachtet werden. Eine Ausnahme davon bildet nur die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung, die von verschiedenen Autoren³ an Mitochondrien oder Homogenaten aus Milz und Thymus gefunden wurde. Gleichzeitig wurden aber auch in diesen Organen schwere zelluläre Strukturveränderungen und Mitosestörungen beobachtet (VAN BEKKUM³). Im Gehirn tritt dagegen bei Ratten selbst nach sehr hohen Dosen (19 000 r) keine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung ein⁴.

Es ist zu vermuten, dass, ebenso wie wir es am Beispiel der Cytochrome gesehen haben, die Hemmung der Phosphorylierung erst dann eintritt, wenn eine allgemeine Zellschädigung erfolgt ist, die später zum Schwund des ganzen Organs (Milz, Thymus) führt. Ähnliche Überlegungen werden auch von BILLEN und Mitarbeitern⁵ angestellt. Sie bestrahlten *E. coli* mit einer Dosis von 60 000 r. Der ATP-Gehalt der Zellen wird dadurch nicht verändert, doch zeigen die bestrahlten Zellen in einer Nährlösung rasch einen starken Verlust ihres ATP-Gehaltes. Die Verfasser konnten zeigen, dass dies nicht durch eine mangelhafte ATP-Synthese bedingt ist, sondern durch eine Abgabe von ATP an das Aussenmedium, hervorgerufen durch irreversible Schäden der Zellstruktur.

Die biochemischen Veränderungen, die nach einer Bestrahlung die Störung der Desoxyribonukleinsäuresynthese bedingen und die wahrscheinlich auch die eigentliche Ursache für den Strahlentod eines Organismus sind, dürfen nach dem Gesagten wahrscheinlich nicht durch Störungen im Energiestoffwechsel, also des Substratabbaues erklärt werden. Eher ist eine Aussage über sie möglich durch Beobachtung spezifischer Synthesevorgänge in bestrahlten Zellen.

Die Forschungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft in dankenswerter Weise unterstützt.

H. LANGENDORFF und U. HAGEN

Radiologisches Institut der Universität Freiburg i. Br. und Biophysikalische Abteilung des Heiligenberg-Institutes, Heiligenberg (Baden), den 26. Mai 1955.

¹ E. S. G. BARRON, B. GASVODA und V. FLOOD, Biol. Bull. 97, 51, 144 (1949). - E. S. G. BARRON und L. SEKI, J. gen. Physiol. 35, 865 (1952).

² E. S. G. BARRON und V. FLOOD, Arch. Biochem. Biophys. 41, 203 (1952).

³ U. HAGEN, Z. Naturforsch. 10b, 250 (1955); Naturwissenschaften 42, 185 (1955).

⁴ E. J. BOELL, J. cell. comp. Physiol. [39. Suppl.] 2, 19 (1952). - D. BILLEN, G. E. STAPLETON und A. HOLLÄENDER, J. Bacteriol. 65, 131 (1953). - M. LE MAY, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 77, 337 (1951). - H. LASER, Nature 174, 753 (1954).

¹ E. J. BOELL, J. cell. comp. Physiol., 39. Suppl. 2, 19 (1952). D. BILLEN, G. E. STAPLETON und A. HOLLÄENDER, J. Bacteriol. 65, 131 (1953). - M. LE MAY, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 77, 337 (1951). - H. LASER, Nature 174, 753 (1954).

² M. ERRERA, Symp. Radiobiol. Liège 1954.

³ G. ASHWELL und J. HICKMANN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 80, 407 (1952). - E. MAXWELL und G. ASHWELL, Arch. Biochem. Biophys. 43, 389 (1953). - R. L. POTTER und F. H. BETHELL, Federat. Proc. 11, 270 (1952). - J. F. THOMSON, W. W. TOURTELLOTTE und M. G. CARTAR, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 80, 268 (1952). - D. W. VAN BEKKUM, H. J. JONGEPIER, H. T. M. NIEUWERKERK und J. A. COHEN, Brit. J. Radiol. 27, 127 (1954). - D. W. VAN BEKKUM, Symp. Radiobiol. Liège 1954; Biochim. biophys. Acta 16, 437 (1955).

⁴ W. FLORSHEIM, C. DOERNBACH und M. E. MORTON, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 81, 121 (1952).

⁵ D. BILLEN, B. L. STREHLER, G. E. STAPLETON und E. BRIGHAM Arch. Biochem. Biophys. 43, 1 (1953).

Summary

The irradiation sensitivity of the cytochrome system was investigated, using as examples baker's yeast and *E. coli*. A method is described with which the proportion of reduced cytochrome in cell suspensions could be measured spectrometrically. In contrast to isolated cytochrome, which is easily oxydized by Roentgen rays, the cytochrome of living cells is very stable to Roentgen rays. The electrone transport is not influenced by high energy rays. It is probable that the hydrogen transport is also undisturbed. Only if the cell is so damaged by high doses of rays that every exchange of substances is impossible, i.e. if the cell is dead, is the ferrocycytochrome oxydized and perhaps also destroyed. The oxydation is thus a secondary process resulting from death of the cell by rays. It is supposed that the changes in energy metabolism described in the literature, especially the disturbances of oxydative phosphorylation, are also secondary processes.

The concepts developed in radiochemistry on the action of high energy rays on organic compounds must therefore be especially tested in each case for their application in the living cell.

Über eine selektive Mitosehemmung und -schädigung bei jungen Ratten durch Synthalin A

Während zahlreiche Mitteilungen über die experimentelle Beeinflussung der Mitose durch chemische oder aktinische Noxen berichten, ohne dabei eine zellspezifische Schädigung zu erzielen, sollen in der Folge Versuchsergebnisse über die ausschliessliche Mitosehemmung der A-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas nach Gaben von Synthalin A bei jungen Ratten dargelegt werden.

20 junge Ratten vom 1. bis 5. Lebenstag erhielten eine einmalige subkutane Injektion von 10 mg/kg Dekamethylendiguanidindichlorhydrat in 0,1 cm³ wässriger Lösung und verblieben bis zur Tötung 12–18 h beim Muttertier. Fixierung der gesamten Abdominalorgane 6 h in Bouinscher Lösung, Einbettung in Paraffin über Methylbenzolat. 3–5 µ dicke Schnitte wurden mit Chromhämatoxylin-Phloxin gefärbt, um eine genaue Zelldifferenzierung zu erhalten. Die Auszählung der Mitosen in 100 Inselquerschnitten erfolgte unter dem Mikroskop. Die angegebenen Werte entsprechen den Absolutwerten ohne statistische Fehlerkorrektur.

Durch Synthalin A werden die Glucagon (HGF) produzierenden A-Zellen der Langerhansschen Inseln des Kaninchens¹ und des Meerschweinchens² geschädigt, und späterhin konnte ihre Zerstörung bei Ratte und Kaninchen³ gezeigt werden, ohne dass die insulin erzeugenden B-Zellen und die exokrinen Zellen des Pankreas zytologisch geschädigt erscheinen. Die Versuchstiere sterben wahrscheinlich an einer Hypoglykämie durch ihr körpereigenes Insulin, abgesehen von der direkten Toxizität des Pharmakon auf Leber und Niere.

Abb. 1–3. Mitosefrequenz der Inselzellen in 100 Inselnschnitten. Ratte, 1.–5. Lebenstag.

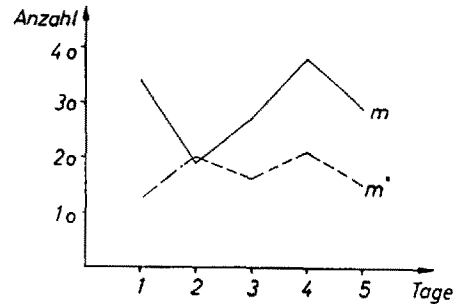


Abb. 1. Gesamtrate.

Kurve m = Normaltiere, Kurve m' = Synthalin-A-Wirkung.

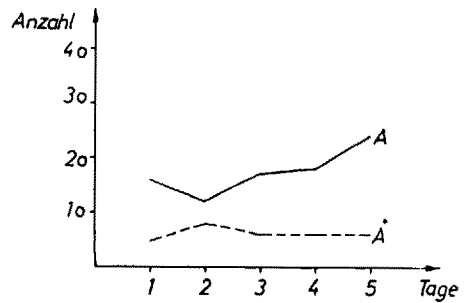


Abb. 2. A-Zellen.

Kurve A = Normaltiere, Kurve A' = Synthalin-A-Wirkung.

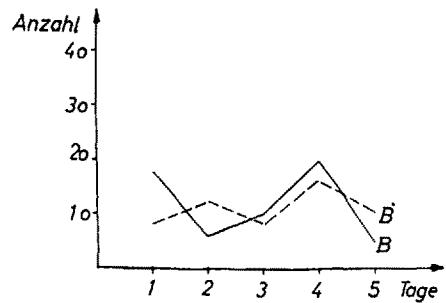


Abb. 3. B-Zellen.

Kurve B = Normaltiere, Kurve B' = Synthalin-A-Wirkung.

Bei den A-Zellen des Inselorgans der Ratte fand sich vom 1. bis 5. Lebenstag¹ eine beachtliche Mitosefrequenz (Abb. 1, Kurve m), und die bei der Gomori-Färbung rotgranulierten A-Zellen wiesen in den ersten 5 Lebenstagen einen deutlichen Anstieg der Teilungsrate um etwa 80% auf (Abb. 2, Kurve A). Die Gesamtzellzahl der Inseln nahm zu, und die AB-Relation verschob sich zugunsten der A-Zellen um 6%. Die Mitosehäufigkeit der blaugekörnten B-Zellen schwankte unspezifisch (Abb. 3, Kurve B).

Nach parenteraler Zufuhr von Synthalin A zeigten neugeborene Versuchstiere keine Symptome, 2–5 Tage alte Ratten Krankheitserscheinungen, die 20 h post injectionem letal endeten.

¹ J. C. DAVIS, J. Pathol. 64, 575 (1952).

² W. RUNGE, Klin. Wschr. 31/32, H. 15, 748 (1954).

³ C. v. HOLT und H. FERNER, Z. Zellforsch. 42, 305 (1955).

¹ H. FERNER und W. RUNGE, Z. Zellforsch. 43, 7 (1955).