

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 electron 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 ferrocytochrome 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 Dekamethylendiguandindichlorhydrat 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.

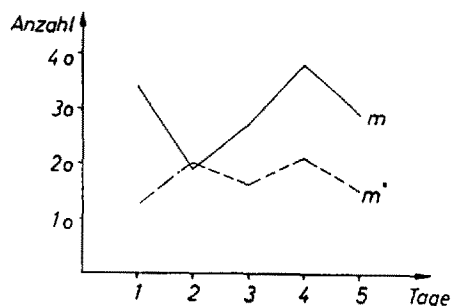


Abb. 1. Gesamtrate.

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

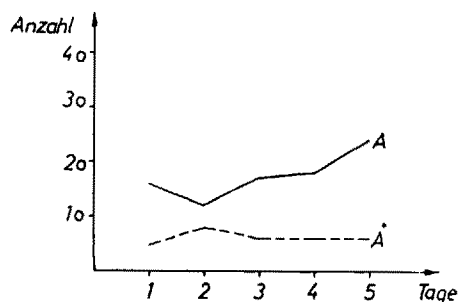


Abb. 2. A-Zellen.

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

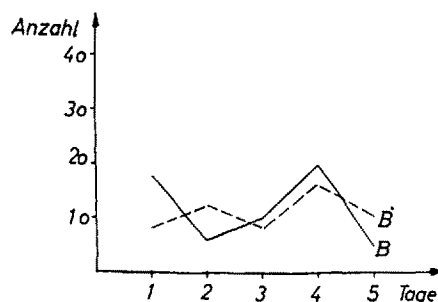


Abb. 3. B-Zellen.

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).

Die histologische Untersuchung der *A*-Zellen ergab keinen Anhalt für eine zytologisch fassbare Schädigung, jedoch eine auffällige Herabsetzung der Mitosefrequenz beider Inselzelltypen (Abb. 1, Kurve *m*). Aus dem Vergleich der Abbildung 2, Kurve *A'*, und der Abbildung 3, Kurve *B'* liess sich das Absinken der Mitoserate allein, auf eine Mitosehemmung der *A*-Zellen zurückführen. Die Beeinflussung der *A*-Zellteilung erweist sich in der Herabsetzung der sich teilenden *A*-Zellen auf 25 % gegenüber den Normaltieren am 5. Lebenstag. Der nahezu gleichbleibende Anteil von *A*-Zellmitosen nach Synthalin A wurde als Ausdruck einer spezifischen Schädigung angesprochen, da eine analoge Beeinflussung der *B*-Zellen nicht nachweisbar war.

Das Erscheinungsbild der mitotischen *A*-Zellen¹ mutete in bezug auf die spezifische rote Granulierung bei den injizierten Jungtieren im Vergleich zu den Kontrolltieren völlig unversehrt an. Die morphologische Analyse der mittleren bis späten Prophasen wie der frühen bis späten Metaphasen ergab eine mittelgradige Pyknose. Die azentrischen Chromosomenpartien hatten stark zur Verklebung neigende, wulstige Randzonen, während das Zentromer unverändert erschien.

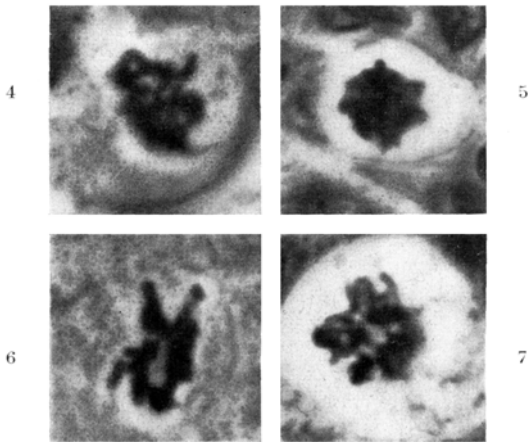


Abb. 4–7.

Inselzellen in Mitose. Ratte, 4.–5. Lebenstag. 3000mal vergrössert.

Abb. 4. *A*-Zelle in früher Metaphase, Normaltier.

Abb. 5. *A*-Zelle in pyknotischer Metaphase, Synthalin-A-Effekt.

Abb. 6. *B*-Zelle in später Metaphase, Normaltier.

Abb. 7. *B*-Zelle in mittlere Metaphase, unter Synthalin A.

Abbildung 4 zeigt die *A*-Zelle eines Kontrolltieres im Stadium der frühen Metaphase. Die Chromosomen ordnen sich in die Äquatorialplatte ein und haben gleichmässige, glatte Strukturen, der Zelleib ist deutlich begrenzt. Das spärlich granuliertes Zytoplasma ist hell, nahezu homogen erscheinend, und es finden sich weder Nukleolen, Vakuolen oder Einschlüsse.

Abbildung 5 zeigt eine *A*-Zelle unter Synthalinwirkung in mittlerer Metaphase mit Pyknose. Die zentralen Chromosomenanteile sind zusammengeballt, die distalen zeigen Quellung und Klumpung. Dagegen erscheint das Zytoplasma nur wenig wabig und homogen. Diese Schädigung der *A*-Mitose als Ausdruck typischen Primäreffektes fand sich regelmässig, wenngleich in wechselnder Intensität, bei allen mit Synthalin A behandelten Tieren. Dementgegen konnten die spezifisch granulierten Teilungsformen der *B*-Zellen auch in

regelmässigen Ana- und Telophasen gefunden werden. Abbildung 6 stellt eine späte Metaphase einer *B*-Zelle des Normaltieres dar. Die einzelnen Chromosomen sind deutlich unterscheidbar und folgen bereits den polwärts gerichteten Attraktionskräften; das gröber und spärlicher granuliertes Zytoplasma ist homogen, und der Zelleib ist regelmässig begrenzt.

In Abbildung 7 wird eine *B*-Zelle nach Synthalin-A-Applikation in mittlerer Metaphase dargestellt. Auffallend ist die divergente Anordnung der Chromosomen, die jedoch mit Sicherheit einer Multipolarität im Sinne von TIMONEN und THERMAN nicht zugerechnet werden darf. Die Chromosomenoberfläche und -struktur erscheint überall gleichmässig, auch ist das granuliertes Zytoplasma homogen und scharf begrenzt. Bemerkenswert erschien, dass die Chromosomen der *B*-Zellmitosen normaler Tiere einen verstärkten Entspiralisationsgrad, schlanke azentrische Segmente und achromatische Lücken aufwiesen, wodurch eine Unterscheidungsmöglichkeit von *A*- und *B*-Mitosen besteht.

Eine grössere Mitosehäufigkeit als in den Langerhansschen Inseln wurde bei den exokrinen Pankreaszellen und den Darmepithelien gefunden. An den Mitosen dieser Zellen konnte keine Hemmung bzw. Schädigung beobachtet werden.

Die pathologischen Veränderungen der *A*-Zellteilung gehören dem Primäreffekt an, der von MARQUARDT, DARLINGTON, CATCHESIDE, LEA und anderen¹ als «unspezifische physiologische Störung» bezeichnet wird; die Folge ist eine Verlangsamung der Mitosegeschwindigkeit. Nach CARLSON² besteht in der frühen Prophase, 10–15 min vor Auflösung der Kernmembran, eine «kritische Periode», während der die Noxe voll zur Wirkung kommen muss. Danach kann sie kaum noch wirksam werden; es besteht lediglich die Möglichkeit, dass späte Prophasen sich zurückbilden.

Durch Synthalin A wird der Primäreffekt bei der *A*-Zellmitose, besonders der Metaphase, ausgeprägt. Da der Schädigungszeitpunkt in diesem Falle in das Stadium der Teilungsbereitschaft fällt, ergibt sich Übereinstimmung zur Ansicht CASPERSSONS³, wonach die Voraussetzung zur Synthese der Teilungsmechanismen die Bildung einer vermehrten Thymonukleinsäuremenge ist. Bei Zellteilungsbeginn wird jedoch die Produktion dieser Proteine blockiert und die Bildung von Thymonukleinsäure ermöglicht. Dieser Reaktionswechsel ist gegen Noxen sehr empfindlich und wird im wesentlichen von einer Zuckerkomponente getragen, welche Träger der Reduktion von Ribose in Desoxyribose ist. Inwieweit durch Synthalin A gerade im speziellen Falle die fermentativen Vorgänge einer Thymonukleinsäurebildung gehemmt werden, ist unbekannt. Da die aufgezeigten Schädigungen der *A*-Mitosen sich lediglich auf diese in Rede stehende Zellart und nicht auf andere, wenn auch wesentlich mitoseaktivere Zelltypen erstrecken, muss den spezifischen Vorgängen ein besonderer Fermentmechanismus innewohnen, der mit Synthalin A in eigener Weise reagiert. Inwieweit dieser Stoff auf die für die Thymonukleinsäure wichtige Zuckerkomponente Einfluss hat und inwieweit der funktionelle

¹ H. MARQUARDT, *Exper.* 5, H. 1 (1949). – H. LETTRE, *Strahl.-Ther.* 83, 1 (1953); *Erg. Physiol.* 46, 379 (1950). – C. D. DARLINGTON, *Symp. Soc. exper. Biol.* 1, 252 (1947). – D. G. CATCHESIDE, D. A. LEA und I. M. THODAY, *J. Genet.* 47, 137 (1946). – H. HEINRICH und H. J. SCHMERMUND, *Strahl.-Ther.* 86, 227 (1952). – H. HEINRICH, G. SCHUBERT und W. PAUL, *Naturwissenschaften* 23, 544 (1950).

² I. G. CARLSON, *Genetics* 23, 596 (1938).

³ T. CASPERSSON, *Cell Growth and Cell Function* (New York 1950).

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

Antagonismus von Glucagon und Insulin dabei eine Rolle spielt, wird das Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Research Corporation, New York, durchgeführt.

W. RUNGE und H. HEINRICH

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg¹ und der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf, den 3. Oktober 1955.

Summary

A single subcutaneous injection of synthalin-A does not affect the cytoplasm of A-cells in pancreatic islets of the rat during the 1st–5th day of life, in contrast to adult animals. Selective action was found on mitotic A-cells: reduction of mitotic frequency to 25% of the normal rate, and pathological mitoses in the sense of the so-called primary effect. The mitoses of B-cells, exocrine pancreatic cells and intestinal epithelia seemed to be unchanged, although the mitotic rate was higher than in A-cells.

¹ Die Arbeit stand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. FERNER.

Purin- und Pyrimidinbasen der Desoxyribonukleinsäure des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinoms¹

Die Nukleinsäuren (NS) gehören zu den wichtigsten Bausteinen sowohl des genetischen wie des funktionellen Apparates der Zelle und spielen zweifellos auch eine erhebliche Rolle in den verschiedenen Stadien des Karzinomwachstums. Es wurden daher zahlreiche Untersuchungen über die Konzentration und Verteilung der NS in den malignen Tumoren durchgeführt. Die Unterschiede, die dabei im Vergleich zu normalen Geweben gefunden wurden, können jedoch nicht als charakteristisch für das maligne Wachstum angesehen werden, da eine Erhöhung des NS-Gehaltes ein allgemeines Kennzeichen aller schnellwachsenden Gewebe ist. GREENSTEIN² weist daher bei der zusammenfassenden Besprechung derartiger Untersuchungen darauf hin, dass quantitative Abweichungen im NS-Gehalt ziemlich unwichtig sind gegenüber möglichen qualitativen Unterschieden im Aufbau und der Zusammensetzung der NS von normalen und von Tumorgeweben.

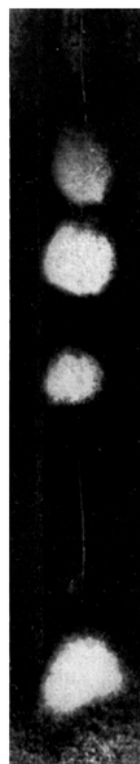
Mit Hilfe der Papierchromatographie konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Purin- und Pyrimidinbasen sowohl bei der Desoxyribonukleinsäure (DNS) als auch bei der Ribonukleinsäure (RNS) Unterschiede aufweist, die auf eine Art- bzw. Organspezifität hinweisen. Die daraufhin an Tumoren durchgeführten Untersuchungen haben die Frage nach qualitativen Abweichungen der Tumor-DNS bisher noch nicht eindeutig beantwortet³.

¹ Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² J. P. GREENSTEIN, *Biochemistry of Cancer* (Academic Press Inc., New York 1954).

³ E. CHARGAFF, *Exper.* 6, 201 (1950). – E. CHARGAFF und R. LIPSHITZ, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 3658 (1953). – A. C. GRIFFIN und A. RHEIN, *Acta Unio intern. contra Cancrum* 7, 363 (1951). – Y. KHOUVINE und J. GRÉGOIRE, *Bull. Soc. Chim. biol.* 35, 603 (1953). – S. G. LALAND, W. G. OVEREND und M. WEBB, *J. chem. Soc. (London)* 1952, 3224. – E. E. POLLI in: PIRWITZ, *Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbekämpfung* (Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954), S. 98. – L. L. UZMAN und C. DESOER, *Arch. Biochem.* 48, 63 (1954). – D. L. WOODHOUSE, *Acta Unio intern. contra Cancrum* 7, 394 (1951); *Biochem. J.* 58, 349 (1954).

Die vorliegende Arbeit ist als vorläufige Mitteilung unserer Untersuchungsergebnisse am Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinom gedacht, wobei der Purin- und Pyrimidingehalt der aus den Karzinomzellen isolierten DNS bei verschiedenem Tumoralter quantitativ bestimmt und mit den Werten der DNS aus Leber und Niere normaler Mäuse verglichen wird.



Papierchromatogramm der DNS aus den Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinoms.

Material und Methoden. Wir verwendeten ein Ehrlichsches Mäuse-Ascites-Karzinom, dessen Chromosomensatz hyperdiploid ist⁴. Das in üblicher Weise gezüchtete Ascites-Karzinom wurde a) nach 6–8 Tagen, b) nach 9–10 Tagen und c) nach 13–15 Tagen entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Aus ihnen wurde die DNS nach SCHMIDT und THANNHAUSER⁵ isoliert und von der RNS getrennt. Bei Prüfung der Trennung ergab sich aus dem vorhandenen Uracil, dass die derart isolierte DNS, wie auch von anderer Seite mitgeteilt wird, etwa 4–5% RNS enthält (Abb.). Nach Überchlorsäurehydrolyse⁶ wurden die Basen in einer Isopropanol-Wasser-Salzsäure-Lösung papierchromatographisch getrennt und ihr Standort am Chromatogramm durch Ultraviolett-kontaktphotographie⁷ bestimmt. Nach Eluierung der Basen in 4 ml 0,1 N HCl wurden die Absorptionswerte im Zeiss'schen Spektral-Photometer M 4 Q zwischen 220 und 310 mμ gemessen und daraus die Menge der einzelnen Substanzen nach VISCHER und CHARGAFF⁸ berechnet. Die Absorptionskurven zeigten

⁴ K. BAYREUTHER, *Z. Naturforsch.* 7b, 554 (1952).

⁵ G. SCHMIDT und S. J. THANNHAUSER, *J. biol. Chem.* 161, 83 (1945).

⁶ A. MARSHAK und H. J. VOGEL, *J. biol. Chem.* 189, 597 (1951). – G. R. WYATT, *Biochem. J.* 48, 584 (1951).

⁷ R. MARKHAM und J. D. SMITH, *Biochem. J.* 45, 294 (1949).

⁸ E. VISCHER und E. CHARGAFF, *J. biol. Chem.* 176, 703 (1948).