

Aus der Abteilung für Gewebezüchtung (Prof. Dr. med. ELSE KNAKE) des Max-Planck-Institutes für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie, Berlin-Dahlem

Über Spätveränderungen von Zellen bei Einwirkung von Mitosegiften Beobachtungen an Gewebekulturen

Von

KARL-EDUARD SCHNEWEIS

Mit 9 Textabbildungen in 24 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 27. November 1957)

Einleitung

Über die Wirkungsweise von Mitosegiften liegen sehr viele Untersuchungen vor. Aber das späte Schicksal der durch Mitosegifte beeinflussten Zellen wurde bisher kaum beachtet. Wir interessierten uns aus zwei Gründen dafür. Je mehr nämlich Mitosegifte als Cytostatika therapeutisch angewandt werden, um so wichtiger ist die Beantwortung der Frage, was schließlich aus den so betroffenen Zellen wird. Man möchte wissen, ob sie zugrunde gehen, ob sie in degeneriertem Zustand weiterleben oder ob sie sich wieder vollständig erholen.

Der zweite Anlaß, das Spätschicksal solcher Zellen zu verfolgen, ist theoretischer Natur. LETTRÉ (1941 und 1942) hat die Hypothese aufgestellt, daß im ausbreitenden Organismus das Wachstum durch körpereigene Mitosegifte zum Stillstand gebracht wird; das ungehemmte Wachstum der bösartigen Tumoren soll dadurch zustande kommen, daß die Tumorzellen diese Mitosegifte chemisch verändern, sie dadurch unwirksam machen und sich so ihrer Wirkung entziehen. Nach dieser Hypothese, der von KNAKE (1943) widersprochen wurde, muß LETTRÉ also annehmen, daß die vermuteten endogenen Mitosegifte die normalen Zellen nur daran hindern, sich weiter zu teilen, daß sie sie im übrigen aber völlig gesund und unverändert lassen. An Seeigeleiern haben DRUCKREY u. Mitarb. (1957) Spätwirkungen von Colchicin beobachtet; die befruchteten, an der Teilung behinderten Eier wurden ohne Ausnahme aufgelöst.

An lebenden Somazellen von Wirbeltieren fehlten bisher entsprechende systematische Untersuchungen, was unter anderem in methodischen Schwierigkeiten begründet sein dürfte. Die Lebendbeobachtung einzelner Zellen über mehrere Tage ist nur in der Gewebekultur möglich. Auch da gibt es leider keine Methode, die beste optische Verhältnisse mit gleichmäßig gutbleibenden Lebensbedingungen verbindet. Um bei starker Vergrößerung mit Phasenoptik beobachten zu können, entschieden wir uns für Deckglaskulturen. Dabei mußten wir in Kauf nehmen, daß sich im Laufe von 3 Tagen nach dem Umsetzen der Kulturen ihre Lebensbedingungen allmählich verschlechterten. Da wir aber die Versuchskulturen mit ebenso alten Geschwisterkulturen

ohne Mitosegiftzusatz (Volumausgleich mit Tyrodelösung) verglichen, konnten die durch Alterung der Kulturen hervorgerufenen Schädigungen nicht mit Mitosegiftschäden verwechselt werden.

Wir haben also geprüft, ob es eine Grenzdosis gibt, bei der das dauernd einwirkende Mitosegift die Zellen an der Mitose behindert, ohne sie im übrigen zu schädigen. Bei niedrigen Dosen gaben wir das Mitosegift gleich beim Umsetzen der Kultur hinzu; auf diese Weise erreichten wir eine möglichst langdauernde Einwirkung des Giftes. Bei höheren Giftdosen mußte die Methodik allerdings abgewandelt werden, da diese Konzentrationen die Zellen nicht mehr auswachsen ließen. Die Kulturen mußten dabei ohne Mitosegift angezüchtet werden und eine schöne Wachstumszone gebildet haben, ehe die Mitosegiftlösung zugegeben wurde. Bei diesem Vorgehen reichten die uns insgesamt zur Verfügung stehenden 72, in Ausnahmefällen 96 Std aus, um unsere Fragen zu beantworten.

Versuchsanordnung

Sogenannte Osteoblastenkulturen aus dem os frontale von 11–12tägigen Hühnerembryonen wurden in der üblichen Weise gezüchtet. Für den Versuch und die Beobachtung mit Phasenoptik setzten wir die Deckgläser auf flache Objektträger mit niedrigen Paraffinfüßchen. Versuchs- und Kontrollkulturen waren meistens Hälften der gleichen Kultur.

Die Untersuchungen wurden mit den Mitosegiften Colchicin und Trypaflavin durchgeführt.

Versuchsanordnung A (niedrige Dosen Mitosegift)

Versuchskultur. 1 Tr.¹ Hühnerplasma + 1 Tr. einer Mischung aus Embryonal-extrakt und Mitosegift in Tyrodelösung.

Kontrollkultur. 1 Tr. Hühnerplasma + 1 Tr. einer Mischung aus Embryonal-extrakt und Tyrodelösung.

Nach 24 Std Aufsetzen der Deckgläser auf flache Objektträger und Beginn der fortlaufenden Lebendbeobachtung.

Versuchsanordnung B (höhere Dosen Mitosegift)

(Colchicin > 1:20 Millionen, Trypaflavin > 1:2 Millionen)

Versuchs- und Kontrollkultur. 1 Tr. Hühnerplasma und 1 Tr. Embryonalextrakt. Nach 24 Std Aufsetzen auf flache Objektträger. Dabei Zusatz von 1 Tr. Mitosegift in Tyrodelösung in den Spalt zwischen Deckglas und flachem Objektträger (Versuchskultur) bzw. von 1 Tr. Tyrodelösung in gleicher Weise (Kontrollkultur).

Beginn der Beobachtung nach weiteren 12 Std, also insgesamt 36 Std nach dem Umsetzen der Kultur.

Versuchs- und Kontrollkulturen beobachteten wir auf dem heizbaren Objekt-tisch mit Phasenoptik (Leitz) bei 8mal 40- und 8mal 90facher Vergrößerung.

¹ Wir arbeiteten mit freifallenden Tropfen aus senkrecht gehaltenen Pipetten, die gleiches Lumen und gleiche Abtropffläche hatten. Unsere Konzentrationsangaben sind innerhalb der auf diese Weise erreichbaren Genauigkeit zu verstehen. — Die genannten Dosierungen berücksichtigen stets die Verdünnung durch das Nährmedium.

Photographiert wurde mit einer Leica (Abbildungsmaßstäbe 107:1 und 240:1, Nachvergrößerung der Positive 5:1).

Nach Abschluß der Lebendbeobachtung wurden die Kulturen in Carnoy fixiert und mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbt.

Ergebnisse

Im folgenden werden bei der angegebenen Giftdosis jeweils die Mitosestörungen und sonstigen Zellschädigungen besprochen, die bei dieser Konzentration überwiegend vorkamen. Es gab auch Zellen, die weniger stark, und einzelne, die stärker geschädigt waren.

Wir fassen unsere Befunde in 2 Tabellen zusammen, deren graphischer Teil sich an die von v. MÖLLENDORFF eingeführten und von seinen Schülern BUCHER u. a. übernommenen Darstellungen weitgehend anlehnt.

Colchicin. In Tabelle 1 sind die unter Colchicin beobachteten Mitoseabläufe und das späte Schicksal dieser Zellen dargestellt.

Colchicin 1:100 Millionen. Metaphase auf 25—40 min verlängert. Kern und Plasmateilung normal, die restituierten Ruhezellen zeigten keine Veränderungen.


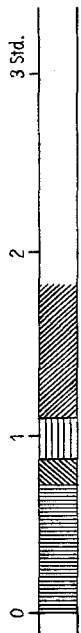



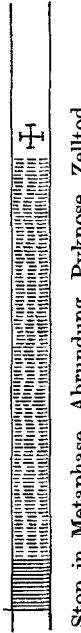
Colchicin 1:50 bis 30 Millionen. Metaphase bis zu 90 min (bei 1 Zelle auf 4 Std) verlängert; während dieser Zeit zunehmende Verklumpung der Chromosomen; dann plötzlich Auflösung des Chromosomenkonglomerats und Ablauf einer normalen Anaphase. Bei einem Teil der Zellen blieb die Zellteilung aus. Nach langdauernden Teilungsversuchen mit heftigen Plasmabewegungen und tiefen Einschnürungen des Zellleibs (Abb. 1a) oder nach nur flachen Taillierungen der Zelle ohne stärkere Plasmaunruhe streckte sich die Zelle, und die Einschnürungen wurden ausgeglichen (Abb. 1b). Oft deutlich verzögerte Restitution der beiden Tochterkerne in der ungeteilten Zelle. Weiterhin keine wesentliche Veränderung dieser Zellen.

Besondere Beobachtungen: Bei 2 der sich nicht teilenden Zellen entstanden amitoseähnliche Bilder. Einmal dadurch, daß bei der Restitution der Kerne zuerst 3 Kernzentren erschienen (Abb. 1b), von denen dann 2 zu einem hantelförmigen Kern zusammenflossen (Abb. 1c); das andere Mal dadurch, daß die in der ungeteilten Zelle restituierten Kerne zunächst wie durch eine Schnürfurche getrennt beieinander lagen (Abb. 2a) und später auseinanderwichen (Abb. 2b)¹.

Colchicin 1:25 und 1:10 Millionen. Hemmung in der Metaphase, zunehmende Verklumpung der Chromosomen, Abrundung der Zellen,

¹ Bei den später angewandten höheren Konzentrationen konnten während der Diffusion des Colchicins in das Nährmedium Mitosen beobachtet werden, bei denen nach der Kernteilung die Plasmateilung ausblieb. Die Abb. 2a und b wurden bei einer solchen zufälligen Beobachtung aufgenommen.

Tabelle 1. *Mitoseverlauf und weiteres Schicksal dieser Zellen in Colchicin- und Kontrollkulturen*

Zahl der beobachteten Mitosen	Colchicinzusatz	Mitoseverlauf	Spätschicksal
47	—	 <p>normal, 1 tripolare Mitose</p>	normal bzw. 3 einkernige Zellen
18	1:100 Millionen	 <p>verzögert</p>	überleben anscheinend ohne Schädigung
10	1:50 Millionen und 1:30 Millionen	 <p>verzögert, Plasmateilung behindert, 2 kernige Zellen</p>	überleben anscheinend ohne Schädigung
2	1:25 Millionen und 1:10 Millionen	 <p>Stop in Metaphase, Rekonstruktion 1 kerniger Zellen</p>	geschädigt, überleben
15	1:25 Millionen und 1:10 Millionen	 <p>Stop in Metaphase, Abrundung, Pyknose</p>	schwer geschädigt, überleben
5	1:25 Millionen und 1:10 Millionen	 <p>Stop in Metaphase, Abrundung, Pyknose, Zelltod</p>	Auflösung, Tod

□ Prophase, ▤ Metaphase, ▦ Anaphase, ▨ Telophase, ▩ Rekonstruktionsphase, Pathologischer Verlauf unterbrochen schraffiert.

heftige Plasmabewegungen; das Chromatin war schließlich in der lebenden Zelle nicht mehr zu sehen, die Färbung zeigte in den Zellen pyknotische Chromatin-Substanz.

Aus diesem Stadium gab es 3 Entwicklungsmöglichkeiten:

a) Die Zelle breitete sich aus, und aus dem verklumpten Chromatin restituierte sich ein Ruhekern. Die entstandenen Ruhezellen behielten einen höckerigen Plasmasaum bei, ihr Plasma war stark vakuolisiert, sie waren also krank und geschädigt.

b) Die Zelle kugelte sich vollends ab und blieb starr bis zum Schluß der Beobachtung.

c) Nachdem die Zelle mehrere Stunden abgekugelt und starr gelegen hatte (Abb. 3a), löste sie sich auf (Abb. 3b).

Wirkung von Colchicin auf Ruhezellen. Schädigung der Ruhezellen bei Dosen $> 1:15$ Millionen: Auftreten von Vacuolen im Plasma, Abrundung der Zellen; die Mitochondrien wurden kontrastarm, verkürzten sich, zerfielen in Granula oder quollen zu dicken, gewundenen Fäden auf (Abb. 4).

Trypaflavin. In Tabelle 2 sind der Mitoseablauf der unter Trypaflavin beobachteten Zellen und ihre späteren Veränderungen zusammengefaßt.

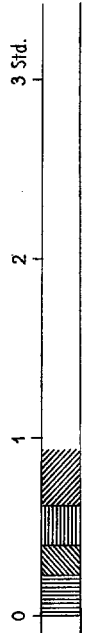

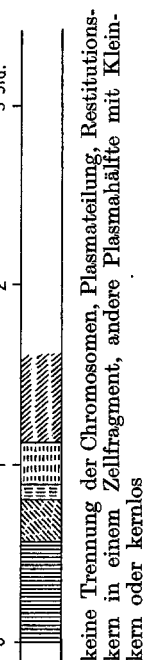
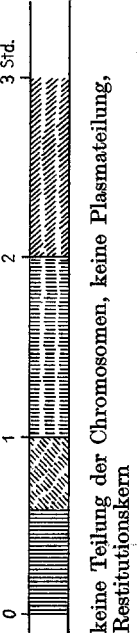
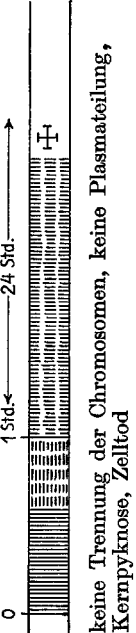
Trypaflavin 1:2 Millionen. Metaphase etwas verlängert. In der Anaphase entstanden Chromosomenbrücken durch Chromosomenverklebungen. Sie wurden schließlich auseinandergezogen, normale Plasmateilung und Restitution. Keine weitere Veränderung der Zellen.

Trypaflavin 1:1 Million und 1:500 000. Zahl der Mitosen stark vermindert. Metaphase morphologisch nicht verändert (Abb. 5a), aber verlängert; durch starke Chromosomenverklebungen in der Anaphase breite Brückenbänder, bei vorwiegend seitlichen Verklebungen Ringbildungen (Abb. 5b); keine Trennung der Chromosomen, die teilweise auseinandergewichenen Chromosomen vereinigten sich wieder. In anderen Zellen gar kein Ansatz zur Anaphase.

Aus diesem Stadium 3 Entwicklungsmöglichkeiten:

a) Der Zelleib teilte sich ungleichmäßig in der Ebene der nicht getrennten Chromosomen (Abb. 5c und d), ein unscharf begrenzter Restitutionskern mit wolkig-wabiger Struktur ohne eindeutige Nucleolen entwickelte sich in dem Zellteil mit dem größeren Chromosomenanteil (Abb. 5e und g). Das andere Zellfragment, das sich der Form nach zu einer spindeligen Ruhezelle ausstreckte, erhielt einen pyknotischen Kleinkern oder gar keinen Kern (Abb. 5f und h). Beide „Tochterzellen“ überlebten die Beobachtungszeit, waren aber stark geschädigt; den kernlosen Anteil konnte man allerdings kaum noch als Zelle bezeichnen.

Tabelle 2. *Mitoseverlauf und weiteres Schicksal dieser Zellen in Trypaflavin- und Kontrollkulturen*

Zahl der beobachteten Mitosen	Trypaflavinzusatz	Mitoseverlauf	Spätschicksal
53	—	 <p>normal, bei einer Zelle keine Plasmateilung</p>	normal bzw. 1 zweikernige Zelle
25	1:2 Millionen	 <p>Anaphase mit Chromosomenbrücken</p>	überleben anscheinend ohne Schädigung
10	1:1 Million und 1:500000	 <p>keine Trennung der Chromosomen, Plasmateilung, Restitutionskern in einem Zellfragment, andere Plasmahälfte mit Kleinkern oder kernlos</p>	geschädigt, überleben
7	1:1 Million und 1:500000	 <p>keine Teilung der Chromosomen, keine Plasmateilung, Restitutionskern</p>	geschädigt, überleben
1	1:1 Million	 <p>keine Trennung der Chromosomen, keine Plasmateilung, Kernpyknose, Zelltod</p>	Auflösung

□ Prophase, ■ Metaphase, ▨ Anaphase, ▩ Telophase, ■ Rekonstruktionsphase. Pathologischer Verlauf unterbrochen schraffiert.

Tabelle 3. *Mitosegift-Einwirkung auf die abgebildeten Zellen*

Zeit in Std	Colchicinverdünnung			
	1:30 Millionen	1:10 Millionen	1:20 Millionen	1:10 Millionen
		s. Fußnote S. 251		Ruhezelle
0				
12				
24	○ ×	○ ×		
36			○	×
48				
60			×	
72			×	
Ver- größerung der Abb.	1:550	1:550	1:550	1:1200
	Abb. 1	Abb. 2	Abb. 3	Abb. 4

Zeit in Std	Trypaflavinverdünnung				
	1:1 Million	1:750 Tausend	1:330 Tausend	—	—
			Ruhezellen	Kontrolle	Kontrolle
0					
12					
24					
36	○ ×	○	×	×	
48		×	×		×
60					
72					
Ver- größerung der Abb.	1:550	1:550	1:550 7b = 1:1200	1:550	1:1200
	Abb. 5	Abb. 6	Abb. 7	Abb. 8	Abb. 9

■ Substanzeinwirkung, ○ Mitosebeginn, × Photo.

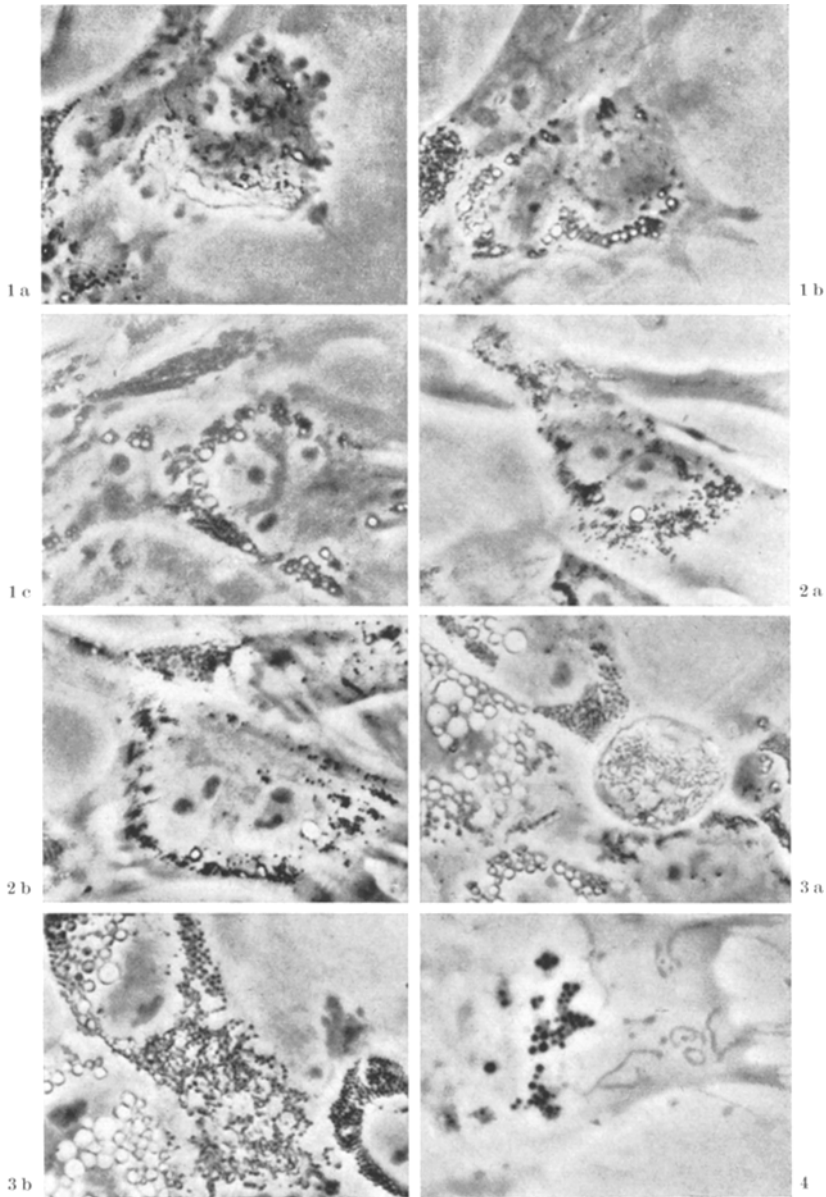


Abb. 1—4

Abb. 1. a Nach verlängerter Metaphase und normal abgelaufener Anaphase jetzt Durchschnürungsversuche mit starken Plasmabewegungen und tiefer Einkerbung der Zelle. b Keine Teilung eingetreten, Zelle hat sich ausgebreitet, Rest der Einkerbung noch zu sehen. Drei Nucleolen mit kleinen hellen Höfen. c Einkerbung ganz ausgeglichen, 2 Kernzentren zu einem hantelförmigen Kern mit 2 Nucleolen zusammengefloßen. Der links liegende Kern hat einen zweiten Nucleolus erhalten. Abb. 2. a Nach Mitose Restitution einer zweikernigen Zelle. Beide Kerne liegen nahe aneinander, wie durch Schnürfurche getrennt. b Kerne sind auseinandergewichen. Abb. 3. a Nach zunächst normaler Metaphase mit geordneter Äquatorialplatte und darauffolgender zunehmender Verklumpung der Chromosomen jetzt völlig abgerundete Zelle ohne Plasmabewegungen. b Völlige Auflösung der Zelle. Abb. 4. Schädigung einer Ruhezelle; dicke gequollene wurstförmige Mitochondrien

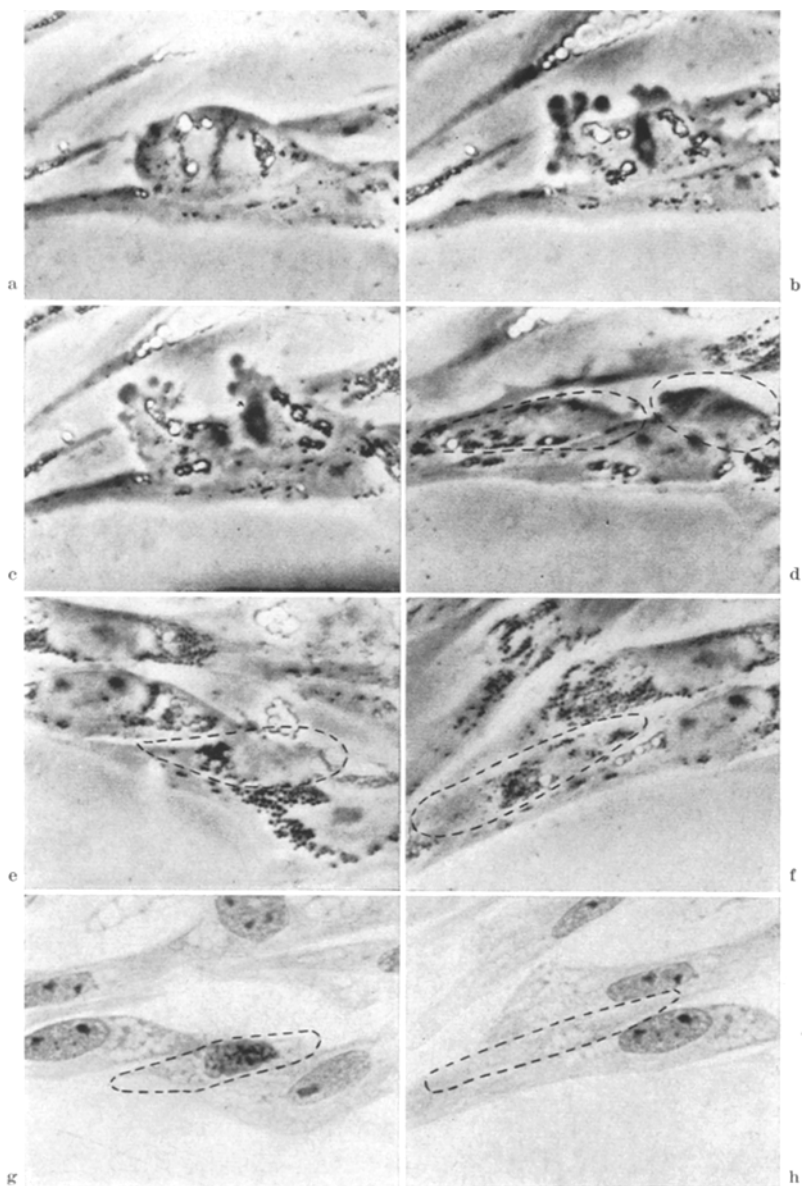


Abb. 5a—h

Abb. 5. a Normale Metaphase; Plasma, das die Spindel enthält, hebt sich deutlich hell ab. b Nur die mittleren Chromosomen weichen auseinander, die seitlichen sind verklebt. Beginnende Einschnürung der Zelle. c Durchschnürung der Zelle in Ebene des Chromatins, im Bild linksliegende Zelle erhält nur wenig oder gar kein Chromatin. d In den Markierungen die völlig getrennten Tochterzellen. e In der Markierung die vorher im Bild rechtsliegende Zelle. Sie ist ausgebreitet. Kein regelrechter Kern ist restituirt, Kernraum wolkig gezeichnet. f In der Markierung die vorher im Bild linksliegende Zelle, langgestreckt. Kein Kern, kein Kernraum. g Kultur fixiert und gefärbt. In der Markierung die in e beschriebene Zelle. Kern unregelmäßig begrenzt, grobe Struktur, besonders zentral angedeutet, eine grobe rosettenartige Zeichnung. h In der Markierung die in f beschriebene Zelle: chromatinfreier Plasmastreifen

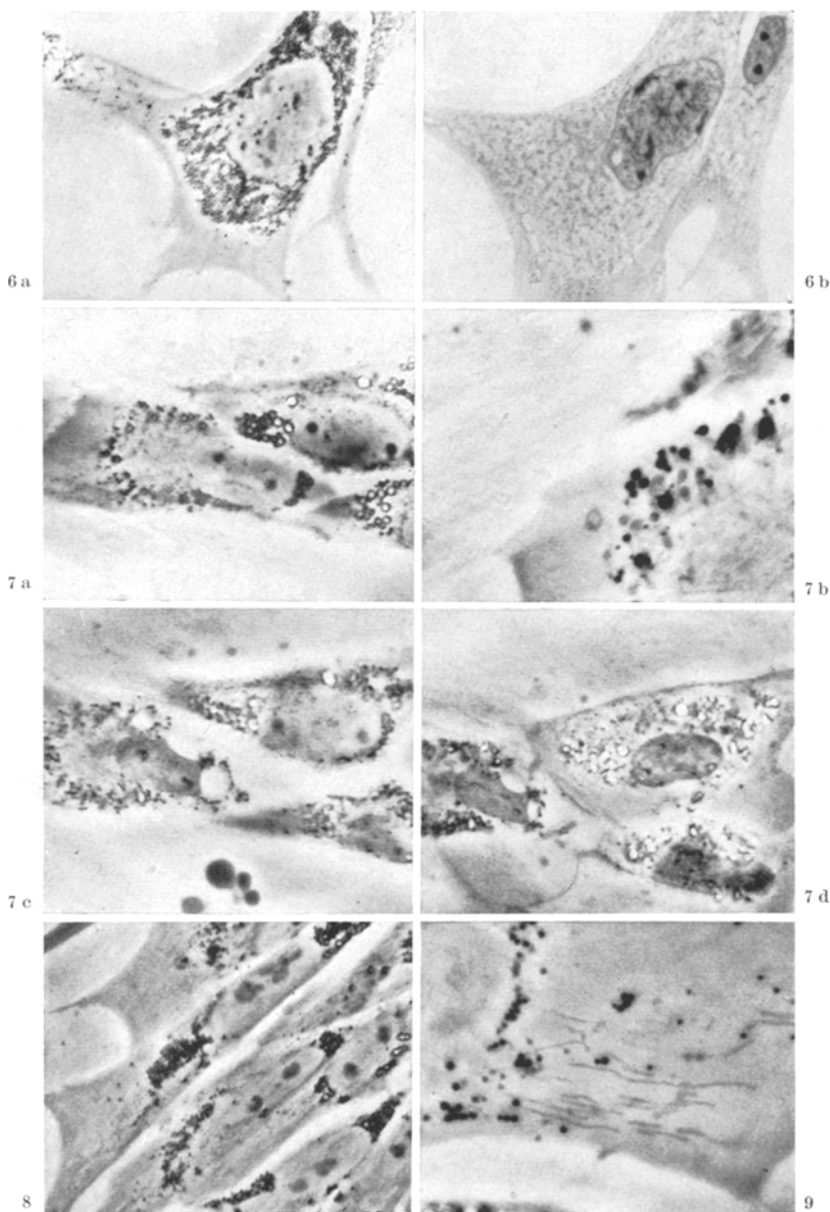


Abb. 6—9

Abb. 6. a Nach einer Anaphase mit Ringbildung und Rückkehr der Chromosomen zur Mitte hat sich in der ungeteilten Zelle ein großer Kern restituirt, der unregelmäßig begrenzt, wolkig gezeichnet ist und fünf unscharf abgesetzte nucleolenartige Strukturen enthält. b Kultur fixiert und gefärbt. Unregelmäßig begrenzter großer Kern mit grober Zeichnung. Unscharf begrenzte nucleolenartige Gebilde. Vacuole im Kern. Abb. 7. a Schädigung der Ruhezellen; kleine, hart gezeichnete und tiefschwarz erscheinende Nucleolen. b Mitochondrien dieser Zelle. Zwischen schwarz erscheinenden Fettkörnchen am Kernpol liegen Mitochondrien als dicke, gequollen wirkende Kügelchen. Ein Mitochondrienkügelchen mit exzentrischer Aufhellung. c Kerne werden schattenhaft, Nucleolen noch kleiner. Im Plasma Vacuolen, die den Kern verformen. d Zellen durch die ineinandergeflossenen Vacuolen ballonartig aufgetrieben. Abb. 8. Langgestreckte Zellen in Kontrollkultur. Kerne regelmäßig und scharf begrenzt. In jedem Kern zwei grau-schwarz erscheinende Nucleolen. Im Plasma schwarz erscheinende Fetttropfchen. Abb. 9. Lange, gestreckte, fadenförmige Mitochondrien in Zellen einer Kontrollkultur; daneben schwarz erscheinende Fetttropfchen

b) Keine Plasmateilung; aus den ungetrennten Chromosomen entwickelte sich ein Restitutionskern mit den eben beschriebenen Schädigungen (Abb. 6a und b).

c) Keine Plasmateilung; Verklumpung des Chromatins, Auflösung der Zelle.

Wirkung von Trypaflavin auf Ruhezellen: Trypaflavin 1:500 000. Die Nucleolen wurden klein, rund und erschienen im Phasenkontrast sehr dunkel (Abb. 7a), die Mitochondrien wurden kurz, oval bis rund und manchmal exzentrisch aufgehellt, so daß sie wie ein kleines Bläschen aussahen (Abb. 7b). Nach 20 Std gingen bei dieser Dosis einige Zellen zugrunde: Im Plasma traten zunächst mehrere kleinere Vacuolen auf (Abb. 7c), die sich vergrößerten, zusammenflossen und die Zelle ballonartig auftrieben (Abb. 7d); der Kern schrumpfte und wurde durch die Vacuolen deformiert (Abb. 7c und d; Nucleolen und Mitochondrien in gleich alten Kontrollkulturen s. Abb. 8 und 9).

Trypaflavin 1:250 000. Nach 20 Std waren fast alle Zellen der Kultur in der eben beschriebenen Weise zugrunde gegangen.

Dosis und Dauer der Mitosegift-Einwirkung auf die abgebildeten Zellen, Zeitpunkt des Mitosebeginns und der Photos, ebenso die Vergrößerung der Abbildungen sind aus der Tabelle 3 zu entnehmen.

Besprechung

Bei der Besprechung unserer Ergebnisse fassen wir zunächst zusammen, was unsere eingangs gestellte Frage beantwortet. Es sind das die Zellveränderungen, die anderen Untersuchern entgingen, weil sie ihre Beobachtungen schon vor deren Eintreten abbrachen. Ferner erwähnen wir einige weitere Feststellungen, die die Ergebnisse anderer Autoren ergänzen.

Beim *Colchicin* traten besonders zwei Wirkungen zutage:

1. Die spezifische Spindelgiftwirkung des Colchicins kam erst bei höherer Dosierung zur Geltung. Von den in der Metaphase gestoppten Zellen entwickelten sich einige wenige zu einer geschädigten Ruhezelle zurück; das vorher verklumpte Chromatin bildete einen Ruhekern. (HUGHES [1952] hat dies, wahrscheinlich infolge seiner kürzeren Beobachtungszeit, unter Einwirkung von Colchicin niemals gesehen.) Meistens blieben die Kerne pyknotisch und die Zellen starr. Etwa $\frac{1}{4}$ dieser Zellen mit pyknotischen Kernen löste sich noch während der Beobachtungszeit auf.

2. Kleine Dosen, die noch eine Kernteilung zuließen, verhinderten die Plasmateilung. Es entstanden zweikernige, anscheinend gesunde Zellen. Nichts wies darauf hin, daß sie schließlich nicht doch wieder eine Mitose durchmachen könnten.

Trypaflavin behindert die Zellvermehrung auf zwei Wegen:

1. Die Zellen können nicht in die Mitose eintreten. Wir schlossen das daraus, daß wir Mitosen seltener als in den Kontrollkulturen fanden. BUCHER (1939) hat diese Trypaflavinwirkung durch systematische Mitosezählungen in lebenden Kulturen belegt.

2. Wenn trotzdem eine Mitose anlief, blieb die Kern- und manchmal auch die Plasmateilung aus. Es entstanden dabei entweder Zellen mit geschädigten Restitutionskernen oder Zellen mit pyknotischen Kleinkernen oder kernlose Plasmateile, wie sie auch von ALBRECHT (1954 und 1955) und von LETTRÉ u. SIEBS (1955) bei anderen Mitosegiften beobachtet wurden.

Die unter 1. genannte Wirkung des Trypaflavins beruht offenbar auf einer Schädigung der Ruhezellen; Dosen, die immer noch den Ablauf einzelner pathologischer Mitosen zuließen, führten schon nach einer Einwirkungszeit von 20 Std zu morphologischen Veränderungen der Ruhezellen. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von BRODERSEN (1943), BUCHER (1954 und 1955) und BRÄM (1951), die ebenfalls Schädigungen der Ruhezellen durch Trypaflavin beschrieben.

Für das Trypaflavin gilt in bezug auf unsere Fragestellung also Ähnliches wie für das Colchicin: Die Zellvermehrung wurde in der Gewebekultur nicht verhindert, ohne daß die betroffenen Zellen geschädigt wurden. Aus den in der Mitose gestoppten Zellen konnten sich nie wieder normale, ungeschädigte Ruhezellen entwickeln.

Die vorliegenden Ergebnisse können zur Klärung von drei weiteren Fragen beitragen:

1. Was ist die Ursache der Häufung von zweikernigen Zellen in Colchicin-Kulturen?

2. Gibt es ein vermehrtes Auftreten von „Amitosen“ in Colchicin-kulturen?

3. Wie verhält sich die Chromosomenzahl der Restitutionskerne?

Zu 1.: BUCHER (1952 und 1953) bewies durch Auszählung gefärbter Kulturen, daß nach Einwirkung von Colchicin vermehrt zweikernige Zellen vorhanden sind. Auch fand er (1939), daß die von ihm sog. Pseudoamitosen (Telophase ohne Einschnürung des Zelleibs) in gefärbten Colchicinkulturen zahlreicher waren als in den Kontrollen. Da diese Häufung aber nicht sehr groß war, wollte er daraus keine Schlüsse auf die Entstehung der zweikernigen Zellen in Colchicinkulturen ziehen. Auch wir glauben, allerdings aus einem anderen Grunde, daß ein solcher Schluß nicht erlaubt ist. Bei unseren Lebendbeobachtungen sahen wir wiederholt, daß sich in einer kaum oder gar nicht taillierten, noch ungeteilten Zelle die beiden Tochterkerne bereits restituiert hatten, daß die Zellteilung dann aber doch noch nachgeholt wurde. Umgekehrt

blieb mehrmals bei Zellen, die schon stark eingeschnürt waren, die Teilung schließlich doch aus. Es ist also nicht möglich, aus der fixierten Kultur darauf zu schließen, ob eine Zelle sich teilen wird oder nicht.

Unsere Lebendbeobachtungen ergaben nun: Von 28 Zellen, die bei geringem Colchicinzusatz noch eine Kernteilung erreichten, wurden 10 zu zweikernigen Zellen. Dagegen blieb bei keiner der 47 Mitosen in Kontrollkulturen die Plasmateilung aus. Das erlaubt den Schluß, daß die Kernteilung ohne nachfolgende Plasmateilung bei der Häufung zweikerniger Zellen in Colchicinkulturen eine Rolle spielt.

Zu 2.: **BUCHER** führt die zahlreichen zweikernigen Zellen in Colchicinkulturen auf Amitosen zurück, die in den fixierten Präparaten ebenfalls häufig sein sollen. Wir konnten unter I. zeigen, daß die Kernteilung ohne Plasmateilung an der Entstehung von zweikernigen Zellen wenigstens mitbeteiligt ist. Zwar können wir die Amitose als mitwirkende Ursache natürlich nicht absolut sicher ausschließen. Doch möchten wir darauf hinweisen, daß wir durch die verhinderte Plasmateilung in Colchicinkulturen Zellbilder sahen, die Amitosen vortäuschten, in Wirklichkeit aber gestörte Mitosen waren (s. S. 251). Wir glauben daher, daß man auch in diesem Fall aus toten, gefärbten Kulturen keine Schlüsse auf das Zellgeschehen ziehen kann.

Zu 3.: In unseren Colchicin- und Trypaflavinkulturen entstanden Restitutionskerne. Während die Restitutionskerne nach Colchicineinwirkung bei Pflanzenzellen gut bekannt sind, wurden sie für tierische Zellen unseres Wissens bisher nur von **RIES** (1939) bei Axotyllarven beobachtet. Über Restitutionskerne tierischer Zellen nach Einwirkung von Trypaflavin fanden wir keine Mitteilungen.

Die Restitutionskerne in colchicinbehandelten Pflanzenzellen sind polyploid. Die von **RIES** bei Axotyllarven beobachteten Restitutionskerne besaßen dagegen nicht den doppelten Chromosomensatz, da der Mitosestop in der frühen Metaphase einsetzte, ehe die Chromosomen sich geteilt hatten. Wir können über die Chromosomenzahl unserer Restitutionskerne in den Colchicinkulturen nichts aussagen, da wir nicht beobachteten, ob die Chromosomen sich geteilt hatten. In den Trypaflavinkulturen konnten wir aber aus dem erfolgten Ansatz zur Anaphase ablesen, daß die Chromosomen geteilt waren; die entstehenden Restitutionskerne mußten also polyploid sein.

Zusammenfassung

Aus den durch Colchicin oder Trypaflavin an ihrer Vermehrung gehinderten Zellen entstanden nie wieder normale, einkernige, ungeschädigte Zellen. Bei niedrigen Dosen Colchicin entwickelten sich oft ungeschädigte zweikernige Zellen, von denen nicht sicher war, ob sie nicht doch noch später wieder Mitosen durchmachen würden. Bei

höheren Dosen Colchicin und bei Trypaflavin wurden alle in der Mitose blockierten Zellen, wenn sie überhaupt überlebten, geschädigt. Es entwickelten sich kranke Zellen mit Restitutionskernen, Zellen mit pyknotischem Kern und kernlose Plasmafragmente. Ein Teil der Zellen mit pyknotischem Kern löste sich auf.

An der Häufung der zweikernigen Zellen in Colchicinkulturen muß die hier oft ausbleibende Plasmateilung nach Kernteilung ursächlich beteiligt sein. Unsere Lebendbeobachtungen ergaben keinen Anhaltspunkt, daß Amitosen dafür verantwortlich sind. Auf pathologische Mitoseabläufe, die im gefärbten Präparat Amitosen vortäuschen können, wird hingewiesen.

Die in Trypaflavinkulturen beobachteten Restitutionskerne müssen polyploid sein.

Literatur

ALBRECHT, M.: Chromatinfreie Cytoplasmateilung von Promyelocyten und Myelocyten unter Einwirkung von Mitosegiften in vitro. *Z. Krebsforsch.* **60**, 16 (1954). — Untersuchungen über die mitosehemmende Wirkung von Demecolcin auf menschliches Knochenmark in vitro. *Acta haemat. (Basel)* **13**, 8 (1955). — BRÄM, A.: Zum Verhalten der Mitochondrien bei Einwirkung verschiedener Pharmaka. Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop an Gewebekulturen. *Acta anat. (Basel)* **13**, 385 (1951). — BRODERSEN, H.: Mitosegifte und ionisierende Strahlung. *Strahlentherapie* **73**, 197 (1943). — BUCHER, O.: Zur Kenntnis der Mitose. VI. Der Einfluß von Colchicin und Trypaflavin auf den Wachstumsrhythmus und auf die Zellteilung in Fibrocytenkulturen. *Z. Zellforsch.* **29**, 283 (1939). Experimentelle Erzeugung von Amitosen und Zweikernigkeit in Gewebekulturen in vitro. *Verh. Anat. Ges.*, 50. Versg in Marburg 16.—18. April 1952, S. 41. — Über Größenbeziehungen von Kern und Kernkörperchen und die Möglichkeit deren experimenteller Beeinflussung in der Gewebekultur in vitro. *Verh. Anat. Ges.*, 52. Versg in Münster 6.—9. April 1954, S. 308. — Recherches caryométriques sur des cultures de tissus. XVI. Le comportement de la taille nucléaire et nucléolaire ainsi que du quotient nucléo — nucléolaire après administration de trypaflavine. *Acta anat. (Basel)* **25**, 45 (1955). — BUCHER, O., et R. GATTIGER: Contribution à l'étude des cellules binucléées dans des cultures de fibroblastes. *Exp. Cell Res.* **5**, 461 (1953). — DRUCKREY, H., D. SCHMÄHL u. K. KAISER: Versuche mit zellteilungshemmenden Giften an unbefruchteten Seeigelleiern. *Naturwissenschaften* **44**, 430 (1957). — HUGHES, A.: The effect of purines and related substances upon cells in chick tissue cultures. *Exp. Cell Res.* **3**, 108 (1952). — KNAKE, E.: Bemerkungen zu LETTRÉ'S Theorie über die Bedeutung körpereigener Mitosegifte für den Wachstumsprozeß. *Naturwissenschaften* **31**, 173 (1943). — LETTRÉ, H.: Zur Wirkung von Trypaflavin auf den Mäuse-Ascites-Tumor. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **271**, 192 (1941). — Mitosegifte und ihre Beziehungen zu Naturstoffen. *Naturwissenschaften* **30**, 34 (1942). — LETTRÉ, H., u. W. SIEBS: Zur chromatinfreien Plasmateilung. *Naturwissenschaften* **42**, 465 (1955). — RIES, E.: Die Bedeutung spezifischer Mitosegifte für allgemeinere biologische Probleme. *Naturwissenschaften* **27**, 505 (1939).

Dr. KARL-EDUARD SCHNEWEIS, Hygiene-Institut, Göttingen,
Kreuzberg 57