

Beiträge zur Biologie der Strahlenwirkung.

Untersuchungen an Askarideneiern.

Von

Priv.-Doz. Dr. Hermann Holthusen.

(Aus der medizinischen Klinik Heidelberg.)

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Oktober 1920.)

I. Einleitung.

Die folgenden Untersuchungen nahmen ihren Ausgang von einer Beobachtung, die bei Gelegenheit von vergleichenden Versuchen über die Wirkung von Röntgenstrahlen verschiedener Wellenlänge an Eiern des Pferdespulwurms gemacht wurde¹⁾. Es zeigte sich nämlich, daß die Empfindlichkeit der Eier für Röntgenstrahlen nicht nur beim Vergleich von Eiern verschiedener Entwicklungsstadien (Ein- oder Mehrzellenstadium) sich voneinander unterscheidet, sondern daß sie auch in verschiedenen Phasen des Einzellenstadiums variiert, indem sie kurz vor dem Beginn der Zweiteilung stark zunimmt und nach der vollzogenen Zweiteilung rasch wieder absinkt.

Die Überlegungen, worin dieses auffällige Verhalten der Askarideneier seinen Grund haben könne, führten unter Berücksichtigung des bisher vorliegenden Beobachtungsmaterials zu verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten, so daß weitere Versuche angezeigt erschienen, um das Wesen des sich hier offenbar verbergenden gesetzmäßigen Verhaltens der Zelle aufzuklären.

Die bisherigen Erfahrungen über den Zusammenhang zwischen Röntgenstrahlenempfindlichkeit und Zellcharakter sind am schärfsten zusammengefaßt in dem Gesetz von Bergonié und Tribondeau²⁾, nach welchem die Röntgenstrahlen um so stärker auf die Zelle wirken, 1. je größer die reproduzierende Fähigkeit der Zelle ist, 2. je länger ihr karyokinetischer Werdegang ist („que leur devenir karyokinétique est plus long“) und 3. je weniger ihre Morphologie und ihre Funktionen endgültig festgelegt sind („que leur morphologie et leurs fonctions sont moins définitivement fixées“).

Von diesen drei Sätzen sind der erste und dritte ohne weiteres zu verstehen, der zweite Satz wird verständlich, wenn man berücksichtigt,

¹⁾ H. Holthusen, Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstr. **27**, 213. 1920.

²⁾ J. Bergonié und L. Tribondeau, Compt. rend. **143**, 983. 1906.

daß die genannten Autoren ihr Gesetz im Anschluß an ihre Beobachtungen über die auffallend große Radiosensibilität der spezifischen Hodenzellen aufgestellt haben, welche die Empfindlichkeit der Haut noch um ein Erhebliches übertrifft. Er soll zum Ausdruck bringen, daß die Verletzlichkeit der Zelle um so größer gefunden wird, je länger die Entwicklungsreihe eines bestimmten Zelltypus bis zur reifen Zelle ist, wobei vor allem an die Spermiogenese gedacht wurde.

Die Erfahrung, daß es vor allem sich lebhaft teilende Zellen sind, welche eine große Röntgenstrahlenempfindlichkeit auszeichnet, in den Samenkanälchen die samenbildenden Zellen, nicht die Sertolischen Zellen, an der Haut die Zellen des Stratum germinativum, an den Lymphfollikeln die Keimzentren, bei den Tumoren die rasch wachsenden, wurde von Krause und Ziegler¹⁾ schon 1906 dahin gedeutet, daß für den Grad der Radiosensibilität weniger die Zellart selbst, als vielmehr der Zustand der Zelle bestimmend ist, in welchem sie sich zur Zeit der Bestrahlung befindet. Und zwar scheint die Widerstandsfähigkeit der Zelle in allen Stadien der Kernteilung am geringsten zu sein. Auch Regaud und Blanc²⁾ entnehmen aus ihren Beobachtungen an bestrahlten Rattenhoden, daß die Karyokinese ein Zeitpunkt besonders leichter Verwundbarkeit für die samenbildenden Zellen sei. Verschiedene chemische und physikalische Eigenschaften des Chromatins werden als die Ursache der wechselnden Strahlenempfindlichkeit angesehen. Die größere Widerstandsfähigkeit der Spermatozoen wird mit dem kompakteren Chromatin erklärt, wohingegen die empfindlichen Spermatogonien durch ein fein verteiltes Chromatin ausgezeichnet sind.

Aber diese Beobachtungen sind nicht eindeutig³⁾. Was die größere Empfindlichkeit der Spermatogonien im Vergleich mit den Spermatozoen anbelangt, so kann man sie nach dem Gesetz von Bergonié-Tribondeau dadurch erklären, daß erstere einen längeren karyokinetischen Werdegang vor sich haben nach Krause und Ziegler, daß sie sich im Gegensatz zu den Spermatozoen stets in lebhafter Teilung befinden. Die verschiedenartige Verteilung der Chromatinmasse braucht zur Erklärung der Sensibilitätsunterschiede nicht herangezogen zu werden. Jedoch ist es selbst fraglich, ob die Empfindlichkeitssteigerung im Stadium der Zellteilung mit den spezifischen Vorgängen der Kernteilung in unmittelbarem Zusammenhang steht oder ob sie nicht nur ganz allgemein der Ausdruck für eine Zunahme der Verletzlichkeit ist, welche durch die Stoffwechselgröße bestimmt wird. Schon von Holzknecht wurde darauf hingewiesen, daß eine Zelle um so leichter durch

¹⁾ Krause und Ziegler, Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstr. **10**, 126. 1906.

²⁾ Regaud und Blanc, Compt. rend. de la soc. de biol. **61**, II, 163, 390, 652, 731. 1906.

³⁾ Vgl. dazu auch G. Hertwig, Str.-Ther. **11**, 833. 1920.

Röntgenstrahlen geschädigt wird, je rascher ihr Stoffwechsel abläuft und je protoplasmareicher sie ist. Auch die Beobachtungen von Schwarz¹⁾ über die Abhängigkeit der Radiosensibilität eines Gewebes von seiner Blutfüllung scheinen sich unter dem Gesichtspunkte eines erhöhten Stoffwechsels am besten erklären zu lassen. Und daß der Beginn der Zellteilung durch eine bedeutende Steigerung des Stoffwechsels, gemessen an der Größe der Atmung, eingeleitet wird, ist aus den Versuchen von Warburg²⁾ am Seeigeelei bekannt. Zwar für den Vergleich der Strahlenempfindlichkeit verschiedener Zellarten kommen wir mit dem Begriff der Stoffwechselgröße als maßgebendem Prinzip nicht aus. Das geht schon daraus hervor, daß die Leberzelle, trotz ihres großen Stoffwechsels gegen die Röntgenstrahlen relativ unempfindlich ist. Aber es wäre doch möglich, daß man die Empfindlichkeitsunterschiede ein und derselben Zellgattung unter verschiedenen Bedingungen mit ihrer Stoffwechselgröße in Zusammenhang bringen könnte. Wir sehen also, daß über den Zusammenhang zwischen Intensität der Strahlenschädigung und Zellteilung einerseits, Größe der Strahlenschädigung und Stoffwechsel andererseits zwar eine Reihe von Beobachtungen vorliegen, daß es aber bisher nicht möglich ist, festzustellen, welche Funktionen der Zelle die Sensibilität für Röntgenstrahlen wesentlich beeinflussen.

Für die Beantwortung aller dieser Fragen erwiesen sich Eier von *Ascaris megalocephala* als ein besonders geeignetes Versuchsmaterial. Einmal handelt es sich um Objekte, welche sich unter verschiedenen Bedingungen für ihren Stoffwechsel durch Veränderung der Temperatur und Sauerstoffzufuhr untersuchen lassen, und zweitens befinden sich, wenigstens im Anfang der Entwicklung, die große Mehrzahl der Zellen in der gleichen Entwicklungsphase, deren Verlauf sich vorausbestimmen läßt, so daß man immer eine große Anzahl von Exemplaren in dem gleichen jeweils gewünschten Teilungsstadium untersuchen kann.

Durch eine große Zahl von Untersuchungen an Askarideneiern unter den verschiedensten Versuchsbedingungen konnte der Nachweis erbracht werden, daß sich die Empfindlichkeitssteigerung der Zellen während der Teilung auf gewisse Stadien der Mitose beschränkt und daß hierbei ebenso wie für die Herabsetzung der Empfindlichkeit der Eier während der Anoxybiose die morphologischen bzw. physikalisch-chemischen Verhältnisse des Kerns bestimmend sind. An- und Abwesenheit von Sauerstoff für sich allein beeinflusst die Radiosensibilität der Eier nicht, deutlich dagegen die Temperatur. Der Nachweis einer Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit durch die Größe des Energieumsatzes in der Zelle konnte nicht erbracht werden.

¹⁾ Schwarz, Wien. klin. Wochenschr. Nr. 11, S. 397. 1910.

²⁾ O. Warburg, Asher Spiros. Erg. d. Physiol. **14**, 253. 1914.

Die Versuche wurden durch eine Bestimmung des Grades der Schädigung in ihrer Abhängigkeit von der Intensität der Bestrahlung eingeleitet, wobei sich herausstellte, daß die Kurve, welche den Zusammenhang zwischen Bestrahlungsgröße und Intensität der Wirkung wiedergibt, am besten durch die Annahme einer sehr verschiedenen Empfindlichkeit der einzelnen Eier erklärt wird, welche sich nach dem Gaußschen Fehlergesetz um eine mittlere Empfindlichkeit gruppieren.

II. Versuchsobjekt und Versuchsanordnung.

Ascarideneier wurden zum erstenmal von Perthes¹⁾ für die Untersuchung der Röntgenstrahlenschädigung benutzt und haben sich seither als ein sehr brauchbares Versuchsmaterial erwiesen, welches einerseits durch eine große Radiosensibilität, andererseits durch große Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse ausgezeichnet ist. Die undurchdringliche Schale, welche die Eier umgibt, ist die Ursache dieser Unabhängigkeit vom umgebenden Milieu, welche soweit geht, daß die Eier sich sogar in den meisten Konservierungsmitteln noch weiter entwickeln, macht aber andererseits die Anwendung pharmakologischer Mittel, welche beim Studium der Entwicklungsvorgänge an Seeigeleiern so wertvolle Resultate gezeitigt hat, zur Unmöglichkeit. Nur die Sauerstoffatmung wird durch die Eihülle nicht beschränkt und kann daher durch Änderung des Sauerstoffpartialdruckes im umgebenden Milieu beeinflusst werden.

Die Bestrahlung der aus frischen Würmern entnommenen Eier wurde mit einer Glühkathodenröhre bei mittelharter Einstellung vorgenommen, wobei darauf Wert gelegt wurde, daß die Präparate, welche miteinander verglichen werden sollten, sich unter den gleichen geometrischen und den gleichen Bedingungen der Absorption inbezug auf die Antikathode der Röhre befanden²⁾.

Nach der Bestrahlung wurden die Eier auf ihrer Unterlage in eine feuchte Kammer gestellt und in einem Brutschrank von 22° zur Entwicklung gebracht, die bei dieser Temperatur in 8—10 Tagen soweit fortgeschritten ist, daß sich in allen normal entwickelten Eiern lebhaft bewegliche, mehrfach eingerollte Würmchen gebildet haben. Die unter dem Einfluß der Röntgenstrahlen auftretenden Schädigungen machen sich, je nach der Intensität, mit welcher die Röntgenstrahlen gewirkt haben, früher oder später geltend und bestehen bei leichten Graden der Beeinträchtigung nur in einer Verzögerung der Zellteilung, bei stärkerer Bestrahlung in Unregelmäßigkeiten der Zellbildung, Asymmetrien bei der Teilung, eigenartigen Mißbildungen in Gestalt von Auswüchsen und Vakuolen an den Embryonen, bei den stärksten Graden der Schädigung in einem völligen Sistieren der Entwicklung auf einer mehr oder minder frühen Entwicklungsstufe, meist im Stadium eines unregelmäßigen Zellhaufens.

In den folgenden Untersuchungen, bei denen es weniger auf eine Analyse der Art und Weise der unter dem Einfluß der Röntgenstrahlen auftretenden Schädigungen, als darauf ankommt, einen Maßstab für den Grad der Strahlenwirkung zu gewinnen, wurden die Erfahrungen

¹⁾ Perthes, Dtsch. med. Wochenschr. Nr. 17, S. 632. 1904.

²⁾ Da in den später zu beschreibenden Versuchen im allgemeinen nur gleichzeitig bestrahlte Präparate miteinander verglichen wurden, so konnte die Dosierung nach der Zeit als ausreichend betrachtet und von einem exakten direkten Dosierungsverfahren abgesehen werden. Nur Versuche 2—4 machen hiervon eine Ausnahme.

eigener früherer Untersuchungen¹⁾ berücksichtigt, nach welchen der Eintritt der Schädigung für die einzelnen Eier in sehr weiten Grenzen schwankt und man nur aus der Auszählung einer großen Zahl von mehreren Hundert Eiern vergleichbare Werte zu erhalten vermag. Die zahlenmäßige Angabe in Prozentsen, wieviele Eier am Ende der embryonalen Entwicklung normal entwickelte, wie viele mißgebildete, wieviele endlich in ihrer Entwicklung vollständig gehemmte Embryonen enthielten, ergab einen befriedigenden Ausdruck für den Grad der Schädigung in jedem einzelnen Falle. Da die Unterschiede zwischen geschädigten und nichtgeschädigten Individuen am Ende der Entwicklung im Ei am schärfsten hervortreten und in der angegebenen Form der Auswertung ein ausreichendes Bild des Maßes der Strahlenwirkung ergaben, so erübrigt sich eine vergleichende Beobachtung der einzelnen Serien vor diesem Zeitpunkt der beendeten embryonalen Entwicklung. Ebenso wurde die Übersicht über die an den einzelnen Präparaten auftretenden Strahleneffekte durch eine über die von uns durchgeführte Dreiteilung hinausgehende Differenzierung der einzelnen Formen der auftretenden Mißbildungen nicht deutlicher. Dagegen erschien es wichtig, dem Zusammenhang zwischen der Dauer der Bestrahlung und dem Grade der Zellschädigung Aufmerksamkeit zu schenken.

III. Beziehungen zwischen Bestrahlungsdauer und Zellschädigung.

Wenn man Askarideneier mit wachsenden Dosen von Röntgenstrahlen bestrahlt, so ist es nicht etwa so, daß der Beginn der Schädigung auch nur für einen Teil der Eier bei derselben Dosis läge. Es schwankt vielmehr die schwächste Dosis, bei der eine Schädigung beginnt, und die stärkste Dosis bei welcher noch einzelne normal entwickelte Embryonen gefunden werden, in sehr weiten Beobachtungsgrenzen. Dieser Verschiedenheit der Reaktionsweise der Einzelindividuen, welche dazu führt, daß man unter einer größeren Zahl von bestrahlten Eiern am Ende der Entwicklung stets normale und völlig in der Entwicklung gehemmte Exemplare nebeneinander erhält, wurde schon von Perthes in seiner oben angeführten Arbeit gemacht und ist eine Erscheinung, für die sich eine ganze Reihe Parallelen heranziehen lassen. Vergiftet man Protozoen mit Atropinlösungen²⁾ so liegt die wirksame Konzentration für die einzelnen Individuen in sehr verschiedener Höhe. Ähnliches findet sich bei der Hämolyse³⁾, ähnliches bei Bakterien. Madsen und Nyman⁴⁾ suchten zum ersten Male nach dem Gesetz, welches den zeitlichen Verlauf des Absterbens von Bakterien in Giftlösungen beherrscht und

¹⁾ H. Holthusen, l. c.

²⁾ S. v. Prowazek, Arch. f. Protistenk. **20**, 201. 1910.

³⁾ K. A. Hasselbalch, Biochem. Zeitschr. **25**, 367. 1910.

⁴⁾ Th. Madsen und M. Nyman, Zeitschr. f. Hyg. **57**, 388. 1907.

finden, daß die Abnahme der Keimzahlen mit der Zeit nach Art einer monomolekularen Reaktion erfolgt. Die gleiche Formel stellte Hasselbalch für die Lichthämolyse sensibilisierter Erythrocyten auf.

Es ist ohne weiteres ersichtlich, daß die Abhängigkeit der Schädigung der Askarideneier von der Bestrahlungszeit jedenfalls nicht durch eine logarithmische Kurve zur Darstellung gebracht werden kann, was der Fall sein müßte, wenn das von Madsen und Nyman für den Fall des Absterbens einer Bakterienmenge angewandte Gesetz der monomolekularen Reaktion auch für den von uns beobachteten Vorgang, welcher seiner Natur nach mit dem genannten durchaus vergleichbar

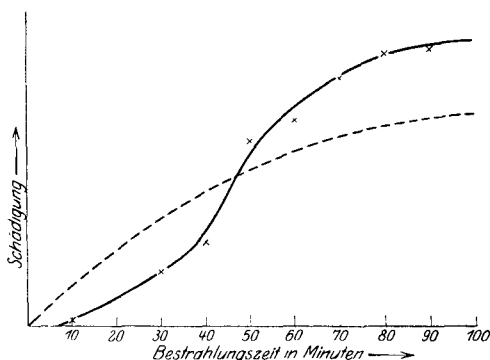


Abb. 1.

ist, zutreffend wäre. Eine solche logarithmische Kurve ist in Abb. 1 zum Vergleich gestrichelt eingezeichnet. Sie weicht in ihrer Form von der beobachteten weitgehend ab. Die Beobachtungen an Bakterien setzen ja auch theoretischen Erklärungen große Schwierigkeiten entgegen, denn ein exponentieller Verlauf der Absterbekurve besagt nichts anderes, als daß die Geschwindigkeit des Ab-

sterbens von Bakterien unabhängig von der Zeit ist, die sie in der desinfizierenden Lösung gelegen haben. Das ist biologisch schwer verständlich. Viel näher liegt der Gedanke, für die Tatsache, daß nicht alle Individuen von dem wirksamen Agens in derselben Zeit geschädigt werden, Variationen der Empfindlichkeit der Einzelindividuen verantwortlich zu machen. Wir würden dann von einer mittleren Empfindlichkeit auszugehen haben, um welche sich nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit die Einzelindividuen nach steigender und fallender Empfindlichkeit gruppieren würden. In der Schädigungskurve würde die Gegend der mittleren und somit auch der wahrscheinlichsten Empfindlichkeit durch die Stelle des steilsten Anstiegs, d. h. die rascheste Zunahme der Schädigung charakterisiert sein, während sie an den Enden der Kurve flacher verlaufen müßte. Diesen der Gaußschen Fehlerkurve eigentümlichen Charakter zeigt nun unsere Schädigungskurve ausgesprochen¹⁾. In der Gegend des Mittelwertes der Empfindlichkeit, etwa wenn die Hälfte der Zellen geschädigt sind, ist die prozentische Schädigung am

¹⁾ Im folgenden muß, soweit es nicht zur Beurteilung der Versuche unbedingt notwendig ist, aus Raumangel von einer eingehenden Wiedergabe der Versuchsprotokolle Abstand genommen werden.

größten, der Anstieg der Kurve am steilsten¹⁾. Wir behalten uns vor, in einer besonderen Arbeit eine genauere Analyse der Schädigungskurve, insbesondere ihrer beiden, an dem Maßstab der Zeit gemessen, deutlich asymmetrischen Äste²⁾, deren Erklärung uns allzu weit in die Probleme der Kollektivmaßlehre hineinführen würde, zu geben. In diesem Zusammenhange und für das Folgende ist nur wichtig, daß wir durch die Kenntnis des Verlaufs der Schädigung mit der Bestrahlungszeit einen Maßstab gewonnen haben, der eine feststehende Beziehung zwischen Intensität der Wirkung und Größe der Schädigung (ausgedrückt durch die Prozentzahlen der geschädigten Eier) enthält. Als wichtigstes Resultat entnehmen wir der Schädigungskurve die Tatsache, daß Unterschiede in der Empfindlichkeit dann am stärksten zur Geltung kommen werden, wenn man die Bestrahlungsdauer so wählt, daß etwa die Hälfte der Eier in ihrer Entwicklung beeinträchtigt ist.

IV. Schwankungen der Radiosensibilität von Askariden-eiern im Lauf ihrer embryonalen Entwicklung.

In einer früheren Arbeit wurde darauf hingewiesen, daß die Empfindlichkeit der Eier gegen Röntgenstrahlen in der ersten Zeit nach der Entnahme aus den mütterlichen Organen konstant bleibt. Weitere Untersuchungen erwiesen dann aber, daß dies nur für die ersten Stunden der Entwicklung gilt und daß schon vor dem Beginn der ersten Zellteilung die Empfindlichkeit der Eier eine ausgesprochene Zunahme erfährt. Der folgende Versuch erläutert diese Verhältnisse:

Versuch 2: Einfluß des Zellentwicklungsstadiums auf die Empfindlichkeit in der Zeit von der Entnahme aus dem Eischlauch bis zum Beginn der ersten Zellteilung.

19. XII. 1^h 30' vorm. Präparation eines *Ascaris*. Sämtliche Eier im reifen Einzellstadium. Bestrahlung mit Härte 10, 0,3 mm Kupferfilter, 2½ Stunden. Dosierung mit dem Elektrometer. (Methode s. Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstr. 27, 213. 1920.)

Präparat	Bestrahlungszeit	Bedingungen	Zellstadium bei Versuchsbeginn	Resultate 26. XII.	Relative Schädig.
Kontrolle	—	Kommt gleich nach Entnahme in Wärmeschrank	Einzellstadium	95 % n. 5 % geschädigt	—
1	4—7 h nachm.	Bis zur Bestrahlung bei Zimmertemperatur		23 % n. 7 % tg. 70 % vg. ³⁾	1
2	8—10½ h abends	Aufbewahrung bei Zimmertemperatur bis zum Bestrahlungsbeginn		15 % n. 5 % tg. 80 % vg.	1,14
3	8—10½ h abends	Bis zum Bestrahlungsbeginn im Wärmeschrank 22—23°	Beginn. Zellteilung (10 % Zweizeller)	4 % n. 2 % tg. 94 % vg.	1,48

¹⁾ Vgl. dazu K. Kiskalt, Zeitschr. f. Hyg. 81. 42. 1916.

²⁾ Die gleiche Asymmetrie zeigen übrigens die Kurven des zeitlichen Verlaufs der Saponinhämolyse von Handowsky (l. c.), welche dort durch das Vorwiegen junger resistenter Erythrocyten erklärt wird.

³⁾ n. = normal, tg. = teilweise gehemmt, vg. = völlig gehemmt.

Es wurde also der Temperatureinfluß auf die Entwicklungsgeschwindigkeit dazu benutzt¹⁾, um gleichzeitig Portionen verschiedenen Entwicklungsstadiums nebeneinander zu erhalten. In diesem Falle (Präparat 2 und 3) ist man von Dosierungsfehlern, die sich beim Vergleich nacheinander bestrahlter Präparate ergeben könnten, unabhängig. Der Versuch scheint dem Gesetz von Bergonié und Tribondeau zuwiderzulaufen, nach welchem mit dem Fortschreiten der Zelldifferenzierung eine Empfindlichkeitsverminderung zu erwarten wäre. Ziehen wir aber nicht nur die Entwicklung bis zur ersten Zellteilung, sondern auch die weiteren Stadien des embryonalen Wachstums in den Kreis unserer Betrachtungen, so finden wir doch ein ausgesprochenes Nachlassen der Empfindlichkeit mit zunehmender Zelldifferenzierung²⁾.

Versuch 5. Änderung der Empfindlichkeit von Ascarideneiern im Verlauf ihrer embryonalen Entwicklung.

23. XII. Bestrahlung mit Härte 6, 0,1 mm Kupferfilter, 2,3—2,5 M.A.

Präparat	Datum der Bestrahlung	Art der Vorentwicklung	Zellstadium bei Bestrahlungsbeginn	Bestrahlungsdauer	Resultate	Relative Schädigung
Kontrolle	—	—	—	—	99% n. 1% geschädigt	—
1	23. XII. abends	9 Std. Zimmertemperatur	Einzellstadium	90'	9% n. 4% tg. 87% vg.	90
2	23. XII. abends	9 Std. Wärmeschrank	Zweizellstadium	90'	28% n. 14% tg. 58% vg.	61
3	24. XII. vorm.	24 Std. Zimmertemperatur	Zweizellstadium	90'	53% n. 5% tg. 72% vg.	47
4	24. XII. vorm.	24 Std. Wärmeschrank	Vier-, Sechsa- chtzellenstadium	90'	67% n. 14% tg. 19% vg.	41
5	25. XII. vorm.	48 Std. Zimmertemperatur	Achtzellenstadium und darüber	90'	72% n. 9% tg. 19% vg.	38
6	25. XII. vorm.	48 Std. Wärmeschrank	Beginnendes Gastrula- stadium	90'	93% n. 4% tg. 3% vg.	17,5
7	26. XII. vorm.	72 Std. Wärmeschrank	Beginnende Streckung der Larven	180'	94% n. 2% tg. 4% vg.	8,5

¹⁾ Vgl. dazu O. Hertwig, Arch. f. mikr. Anat. **51**, 319—381. 1898.

²⁾ Zu ähnlichen Resultaten führten die Untersuchungen von C. R. Bardeen (Am. Journ. Anat. Vol. 2) an Froscheiern in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Anm. b. d. Korr.: Erst jetzt kommt mir die Arbeit des gleichen Autors (Am. Journ. Anat. Vol. 11. 1910/11) zu Gesicht, in welcher gleichfalls eine Empfindlichkeitssteigerung gegen R-Strahlen kurz vor einer neuen Furchungsteilung an Kröteneiern gefunden wurde.

Es scheinen sich also den im Bergonié-Tribondeauschen Gesetz zum Ausdruck kommenden Faktoren, welche das Ei im Sinne einer Verminderung seiner Anspruchsfähigkeit gegenüber den Röntgenstrahlen im Lauf seiner embryonalen Entwicklung beeinflussen, andere empfindlichkeitssteigernde Einflüsse zu überlagern, bei denen es nach den Bedingungen ihres Auftretens nahe liegt, an einen Zusammenhang mit dem Zellteilungsprozeß zu denken. Das kommt in einer Kurvendarstellung der Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen übersichtlich zum Ausdruck. Trägt man in einem Koordinatensystem als Abszisse das Entwicklungsstadium, als Ordinate die Empfindlichkeit in willkürlichem Maß ein¹⁾ (Abb. 2), so sieht man, daß die Empfindlichkeitskurve zwar im allgemeinen mit fortschreitender Entwicklung abfällt, daß ihr aber im Beginn sozusagen ein Wellenberg überlagert ist, dessen Gipfel zeitlich mit der ersten Zellteilung zusammenfällt.

Diese Vermutung wird dadurch nicht beeinträchtigt, daß vom Zellteilungsprozeß abhängige Schwankungen der Empfindlichkeit in den weiteren Entwicklungsstadien der Eier nicht nachgewiesen werden konnten. Bei allen unseren Versuchen handelt es sich ja um Durchschnittswerte,

und so werden sich vorübergehende Änderungen der Empfindlichkeit nur dann geltend machen können, wenn man ein sehr gleichartiges Material zur Verfügung hat, d. h. Eier, welche sich alle in annähernd dem gleichen Entwicklungsstadium befinden. Diese Bedingung ist aber bereits für das Zweizellenstadium nicht mehr erfüllt. Wir werden später Versuche mitteilen, in denen es durch einen Kunstgriff, nämlich vorübergehende Sauerstoffentziehung, gelang, auch im Zweizellenstadium ein sehr gleichwertiges Material von Eiern zu gewinnen, bei dem dann auch eine sehr ausgesprochene Empfindlichkeitssteigerung mit dem Beginn der nächsten Kernteilung nachgewiesen werden konnte. (Versuch 9.)

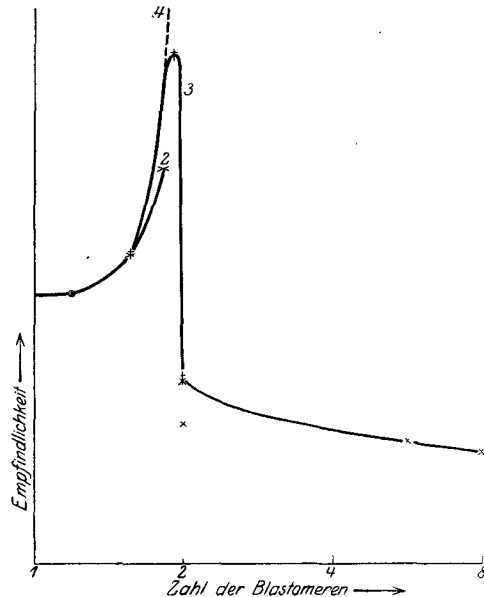


Abb. 2.

¹⁾ Die Kurvenpunkte bis zum Zweizellenstadium stammen aus den Resultaten der Versuche 2—4, die übrigen Kurvenpunkte aus Versuch 5.

V. Unabhängigkeit der Sensibilität von der Sauerstoffatmung.

Nach dem, was bisher über die Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit von Zellen bekannt ist, mußte man vor allem daran denken, daß mit dem Vorgang der Zellteilung eine vorübergehende Steigerung des Stoffwechsels der Zelle verbunden sei, und daß diese in ähnlicher Weise wie bei den Versuchen von Schwarz¹⁾ über die Abhängigkeit der Hautempfindlichkeit von der schwächeren oder stärkeren Durchblutung derselben, die Strahlenempfindlichkeit beeinflusste. Nun wissen wir zwar aus den bekannten Versuchen von Warburg²⁾, daß die Oxydationsgeschwindigkeit bei Seeigeleiern nach der Befruchtung und mit dem Beginn der Entwicklung sehr rasch ansteigt, aber weiterhin bleibt die Oxydationsgeschwindigkeit sehr konstant und steigt nur noch wenig an. Andererseits konnte Meyerhof³⁾ nachweisen, daß während und bei künstlich aufgehobener Furchung, die pro Milligramm verbrauchte Sauerstoffmenge die gleiche war. Wenn hiernach ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Zellentwicklung und Stoffwechselgröße auch wenig Wahrscheinlichkeit für sich hatte, so erschien die Frage doch wichtig genug, um sie am Askaridenei einer direkten Prüfung zu unterwerfen.

Zu diesem Ende mußte die zweckmäßigste zur Verfügung stehende Barcroft'sche Manometermethode, welche in der von Siebeck angegebenen Modifikation den Vorzug besitzt, daß man bei dieser Anordnung zu jeder beliebigen Zeit ablesen kann, mit Rücksicht darauf, daß es sich um ein sehr kleines Versuchsobjekt und daher auch im günstigsten Falle um sehr kleine Sauerstoffmengen handelte, abgeändert werden. Brauchbare Resultate wurden erhalten, nachdem die Anordnung als Differentialmethode ausgearbeitet, und die Apparatur, wie sie wiederholt beschrieben worden ist⁴⁾, in allen Dimensionen erheblich verkleinert worden war.

Die Form und die Abmessungen des Apparates gehen aus Abb. 3 hervor. Die beiden Gefäße *a* und *b* sind durch Glasschliff mit den Enden eines U-förmigen Manometerrohres verbunden, dessen beide Schenkel außerdem durch die Glashähne *c* und *d* mit der Außenluft kommunizieren. Gefäß *a* wird mit einem Brei von Askarideneiern beschickt, nachdem vorher in die schlauchförmige Ausbuchtung des Gefäßchens einige Tropfen Natronlauge zur Absorption der Kohlensäure mittels einer gebogenen Glaskanüle hineingebracht worden sind. In das Gefäß *b*,

¹⁾ Vgl. S. 23.

²⁾ O. Warburg, *Erg. d. Physiol.* **14**, 253. 1914.

³⁾ O. Meyerhof, *Biochem. Zeitschr.* **35**, 246. 1911.

⁴⁾ Bezüglich des Prinzips der Methode und der Art und Weise der Berechnung vgl. R. Siebeck, *Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden* **9**, 33. 1915.

welches ein gleiches Volumen besitzen muß wie Gefäß *a*, wird eine dem Volumen der Askarideneier entsprechende Menge Wasser gebracht, und beide Gefäße bei geöffneten Hähnen *c* und *d* mittels der Glasschliffe gut an das Manometer angeschlossen. Das Manometer ist mit einer Lösung von Natrium choleinicum vom spezifischen Gewicht 1,034 gefüllt. Durch Heben oder Senken des durch einen Schlauch mit dem U-Rohr des Manometers verbundenen Ansatzrohrs *e* wird die Flüssigkeitskuppe in beiden Schenkeln auf die Nullmarke eingestellt, und darauf die Hähne *c* und *d* geschlossen. Hängt man das Manometer in einen Thermostaten, so daß die Gefäße *a* und *b* von Wasser bedeckt sind, so ist bei konstanter Temperatur das Maß des Ansteigens der Flüssigkeitskuppe im Manometerrohr auf der Seite des Gefäßes *a* in der Zeiteinheit ein Ausdruck für die Oxydationsgeschwindigkeit der in *a* befindlichen Askarideneier. Temperatur- und Barometereinflüsse müssen sich infolge der Gegeneinanderschaltung der gleichgroßen Gefäße *a* und *b* im gleichen Sinne äußern und können durch ein Heben und Senken des Schenkels kompensiert werden.

Bei Versuchen, welche sich über längere Zeit erstrecken, machte sich, infolge der Schwierigkeit, nach dieser Methode völlig aseptisch zu arbeiten, die Bakterienentwicklung in dem Eierbrei durch eine starke Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit zunächst störend bemerkbar. Es konnte diesem Übelstand aber durch Zusatz geringer Mengen von Cyannatrium, welches die Bakterienatmung vollständig aufhebt, aber auch in größeren Konzentrationen nicht durch die Eihülle zu dringen vermag, abgeholfen werden. Zwei in dieser Weise angestellte Oxydationsversuche seien im folgenden als Beispiel mitgeteilt. Gleichzeitig mit den Atmungsgefäßen befand sich eine Portion der Eier in einem offenen Gläschen im Thermostaten und diente, indem ihm von Zeit zu Zeit Proben entnommen wurden, zur mikroskopischen Kontrolle der fortschreitenden Entwicklung.

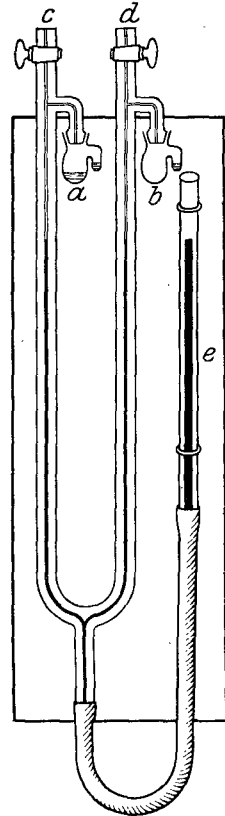


Abb. 3.

Versuch 6 und 7.

Die Versuche zeigen, ebenso wie mehrere andere gleichsinnig verlaufende, eine sehr gleichmäßige Oxydationsgeschwindigkeit der Askarideneier und keine Andeutung eines Einflusses des Zellteilungsvorgangs auf die Atmungsgröße.

Versuch 6.

13. II. 9^h 45' bis 10^h. Es werden Eier eines frisch präparierten Spulwurms mit einem Tropfen $\frac{1}{100}$ n-Cyanatriumlösung zu einem Brei verrührt. Davon werden etwa 200 mg in das Atmungsgefäß gebracht und an den Wänden verstrichen (Vergrößerung der Oberfläche!). Versuchsbeginn 10^h.

Periode	Beobachtungs-zeit	Dauer	Tem-peratur	Differenzen der beiden Manometer-schenkel in mm	O ₂ -Verbrauch ¹⁾ in 3 Stunden in mm	Zellentwicklung
1	von 10 ^h 10'	3 ^h 5'	24,8	10,7	5,2	100% Einzeller, weniger als 1% Zweizeller
	bis 1 ^h 15'		24,9			
2	1 ^h 15'	3 ^h	24,9	11,0	5,5	3% Einzeller
	4 ^h 15'		24,9			97% Zweizeller
3	4 ^h 15'	3 ^h	24,9	11,2	5,6	100% Zweizeller
	7 ^h 15'		24,9			
4	7 ^h 15'	3 ^h 15'	24,9	11,8	5,4	70—80% Drei- bis Vierzell.
	10 ^h 30'		24,7			20—30% Zweizeller

Versuch 7.

23. II. 1^h nachm. 200 mg Eierbrei wie oben behandelt. Versuchsbeginn 2^h nachm.

1	von 2 ^h 1'	3 ^h 27'	25,6	7,0	3,0	100% Einzeller
	bis 5 ^h 28'		25,9			
2	5 ^h 28'	2 ^h 32'	25,6	5,1	3,5	20% Einzeller
	8 ^h		25,5			80% Zweizeller
3	8 ^h	2 ^h 33'	25,5	5,1	3,5	Drei- bis Vierzeller
	10 ^h 33'		25,9			

Man könnte gegen die Schlüssigkeit dieser Versuche den Einwand erheben, daß hier die Komponente eines etwa vorhandenen und — wie die gleich zu besprechende Möglichkeit eines anoxybiotischen Fortlebens dartut — durchaus möglichen anaeroben Stoffwechsels, nicht berücksichtigt wurde. Aber die Tatsache, daß mit dem Aufhören der Sauerstoffzufuhr die Zellteilung sofort sistiert, beweist, daß die hier ins Auge gefaßte vitale Funktion von dem Sauerstoffwechsel beherrscht wird. Wir kommen somit dazu, die Schwankungen der Empfindlichkeit im Laufe der Entwicklung nicht als Folge einer veränderten Funktion, sondern eines veränderten Zustandes der Zelle anzusehen, und damit unter — im weitesten Sinne des Wortes gesprochen — morphologischen Gesichtspunkten zu betrachten.

VI. Zusammenhang zwischen Änderungen der Radiosensibilität und morphologischen Veränderungen.

Über die morphologischen Veränderungen, die sich bei der Zellteilung vor allem im Kern abspielen, sind wir durch die Forschungen der beiden letzten Jahrzehnte des vorigen Jahrhunderts recht genau

¹⁾ Für die Berechnung ist neben der abgelesenen Druckänderung die Kenntnis des Volumens des Atmungsgefäßes und des spez. Gewichts der Manometerflüssigkeit erforderlich. In bezug auf die Einzelheiten der Berechnung und der Fehlerquellen muß auf die zitierte Arbeit von R. Siebeck verwiesen werden.

orientiert: gerade die Eier des Pferdespulwurms bildeten für diese Forschungen das klassische Versuchsobjekt¹⁾).

Die Darstellung der Chromosomen und damit der indirekten Kernteilung überhaupt, gelingt leicht, indem man das mit Eisessigalkohol fixierte Material mit alkoholischem Karmin nach Grenacher - Meyer färbt, und die Eier nach der Verdunstungsmethode in Glycerin einbettet. Die histologische Kontrolluntersuchung einer Probe der jeweils bestrahlten Eier diente uns nur dazu, das Kernteilungsstadium festzustellen, in welchem die Bestrahlung in jedem Einzelfalle ausgeführt war. Die etwa unter dem schädigenden Einfluß der Strahlen auftretenden pathologischen Veränderungen des Kernteilungsvorgangs sollen hier nicht berücksichtigt werden. Sie gleichen weitgehend den durch Radiumbestrahlung bewirkten Veränderungen, welche in der bekannten Darstellung von Hertwig²⁾ eine vortreffliche Würdigung gefunden haben.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die erste Zellteilung bei allen Eiern, welche einem Muttertier in der gleichen Höhe der Eischläuche entnommen sind, fast zur gleichen Zeit eintritt. Das deutet darauf hin, daß man alle Eier, wenigstens im Stadium bis zur ersten Kernteilung, als in der gleichen Phase der Entwicklung befindlich ansehen kann. In der Tat wurde diese Auffassung für die erste Zellteilung im großen und ganzen bestätigt. Um auch für die verschiedenen Phasen der nächstfolgenden Kernteilung, bei welcher die individuellen zeitlichen Schwankungen bereits so groß sind, daß man ein Präparat nicht mehr nach einer bestimmten Phase der Karyokinese charakterisieren kann, ein homogenes Ausgangsmaterial zu bekommen, erwies es sich als günstig, den Eiern kurz vor der ersten Teilung die Sauerstoffzufuhr abzuschneiden. Auf diese Weise kann man, ohne die Lebensfähigkeit der Eier zu beeinträchtigen, ihre Weiterentwicklung unterbrechen und ein in bezug auf das Entwicklungsstadium definiertes, nämlich im Kernruhestadium befindliches Ausgangsmaterial von Eiern der gleichen Herkunft erhalten.

In allen anaeroben Versuchen wurde der Sauerstoff durch Absorption in alkalischer Pyrogallollösung entfernt. Die Eier wurden mit einem Tropfen Wasser in der Mitte eines Objektträgers ausgebreitet und dieser mittels erwärmten Piccins auf einen flachen Glastrog aufgekittet. Ist der Luftabschluß vollständig, so behält die Pyrogallollösung eine rehbraune Färbung; Dunkelfärbung weist auf einen ungenügenden Luftabschluß hin. Die Eier selbst verhalten sich ver-

¹⁾ Th. Boveri, *Erg. d. Anat. u. Entwicklungsgesch.* **1**, 386. 1891. Ders., *Zellenstudien* H. 3. Jena 1890.

²⁾ O. Hertwig, *Arch. f. mikr. Anat.* **77**, II, 1. 1911; ferner: P. Hertwig, *ebenda* S. 301. — F. Payne, *Arch. f. Entwicklungsmechanik* **36**, 287. 1913.

schieden. Werden Askarideneier kurz vor der Teilung anaerob eingeschlossen, so beenden sie im allgemeinen die angefangene Teilung, befinden sie sich in einem Stadium kurz nach der Teilung oder sind sie eben dem Eischlauch entnommen, so entwickeln sie sich überhaupt nicht weiter. In der Regel wird also — und das zeigen auch die histologischen Untersuchungen — in einer sauerstofffreien Atmosphäre nach einiger Zeit ein Ruhestadium des Kernes erreicht. Wurden z. B. Portionen von Eiern kurz vor der Zweiteilung anaerob eingeschlossen so teilten sich die Eier noch und die Chromosomen bildeten sich zurück, dann aber sistierte die Weiterentwicklung. Ließ man jetzt wieder Sauerstoff hinzutreten, so dauerte es drei Stunden und mehr, ehe die ersten Veränderungen an dem Kernchromatin sichtbar wurde, worauf die weiteren Phasen der Mitose sich in der üblichen Weise abwickelten.

In den beiden folgenden Versuchen kommt die Abhängigkeit der Röntgenstrahlenempfindlichkeit vom Kernteilungsstadium zu deutlichem Ausdruck:

Versuch 8.

Empfindlichkeitsänderung der Askarideneier in verschiedenen Zellstadien mit histologischer Kontrolle.

10. III. 10^h vorm. Präparation eines Spulwurms. Die verschiedenen Zellentwicklungsstadien werden dadurch erhalten, daß die Eier verschieden lange Zeit im Thermostaten vorentwickelt und dann auf Eis gebracht werden. Gleichzeitig wird von jeder Portion ein Teil anaerob eingeschlossen.

Serie A.

Präparat	Zellstadium nach Versuchsende	Resultat der histologischen Untersuchung	Auszählung der entwickelten Embryonen
1 a	Sämtliche Eier im Einzellenstadium	Sämtliche Eier im Einzellenstadium. Männlicher und weiblicher Kern getrennt. Kernbläschen noch vorhanden. Chromosomenbildung hat noch nicht begonnen.	34% n. 16% tg. 50% vg.
2 a	Sämtliche Eier im Einzellenstadium	Sämtliche Eier im Einzellenstadium. Der männliche und weibliche Kern ist noch gesondert sichtbar, doch beginnen sich in einigen Eiern, etwa 30%, die Chromosomen zu bilden. Und zwar läßt sich bereits deutlich erkennen, daß je 2 Chromosomen aus dem männlichen und weiblichen Kern entstehen.	8% n. 6% tg. 86% vg.
3 a	70—80% Einzeller 20—30% Zweizeller	Die Eier befinden sich in verschiedenen Stadien der Mitose. Chromosomen noch nicht gebildet . . . 12% Chromosomen deutlich 27% Äquatorialplatte 44% Trennung der Chromosomen 7% Zweizeller 10%	1% n. 2% tg. 97% vg.

Versuch 8. Serie A. (Fortsetzung.)

Präparat	Zellstadium nach Versuchsende	Resultat der histologischen Untersuchung	Auszählung der entwickelten Embryonen
4 a	80% Zweizeller 20% Einzeller	Etwa die Hälfte der Eier befindet sich im Zweizellenstadium. Chromosomen noch nicht gebildet 8% Chromosomen deutlich 13% Äquatorialplatte 27% Zweizeller mit noch deutlich sichtbaren, z. T. in der Rückbildung begriffenen, Chromosomen 47%	3% n. 2% tg. 95% vg.

16. III. 8^h 30' bis 10^h 30'. Bestrahlung der Serie B anaerob, Härte 6, Kartenfilter. Nach der Bestrahlung werden die anaeroben Gefäße geöffnet und eine Portion zur histologischen Untersuchung in Eisessigalkohol gelegt. Ebenso wird unmittelbar nach Versuchsende eine mikroskopische Auszählung der Eier vorgenommen.

Serie B.

Präparat	Entwicklungsstadium nach Versuchsende	Resultat der histologischen Kontrolle	Auszählung der entwickelten Embryonen
1 b	100% Einzeller	Alle Eier sind im Einzellenstadium. Männlicher und weiblicher Kern noch getrennt. Keine Chromosomen.	51% n. 18% tg. 31% vg.
2 b	78% Einzeller 28% Zweizeller	In den Kernen der Einzeller sind teilweise deutliche Chromosomen sichtbar, und zwar im Stadium der Äquatorialplatte. In den Zweizellern hat sich das Chromatin zu Kernbläschen aufgelöst.	37% n. 13% tg. 50% vg.
3 b	17% Einzeller 82% Zweizell. 1% Dreizeller	Die Kerne vereinzelter Einzeller enthalten Chromosomen. In allen Zweizellern befinden sich die Kerne im Ruhestadium.	40% n. 10% tg. 50% vg.
Kontrolle	100% Einzeller	—	99% n. 1% geschädigt

Versuch 9.

1. V. Frische, befruchtete Askarideneier werden bis zur beginnenden Zweiteilung im Wärmeschrank entwickelt und dann in verschiedenen Portionen anaerob eingeschlossen.

3. V. 8^h vorm. Präparat 1 geöffnet in Thermostat 22°

12^h nachm. „ 2 „ „ „ „

4^h nachm. „ 3 „ „ „ „

8^h nachm. „ 4 „ „ „ „

8^h 30' bis 9^h 30'. Bestrahlung mit Härte 6, Kartonfilter, 40 und 60 Min.

Vor Beginn der Bestrahlung Einlegen einer Portion Eier jedes Präparates in Eisessigalkohol zur histologischen Kontrolle.

Präparat	Entwicklungsstadium nach Versuchsende	Resultat der histologischen Kontrolle	Bestrahlungszeit	Auszählung der entwickelten Embryonen
1.	etwa 8% Drei- und Vierzeller 10% Zweizeller 10% Fünf- und Sechszeller	Die Zellen befinden sich in lebhafter mitotischer Kernteilung. Dabei hat immer nur ein Teil der Zellen ausgebildete Chromosomen, ein Teil zeigt Rückbildung der Chromosomen oder auch völlig ruhende Kerne und Kernbläschen.	40'	7% n. 6% tg. 83% vg.
			60'	4% n. 16% tg. 80% vg.
2.	90% Zweizeller 10% Dreizeller	Fast alle Zellen finden sich im gleichen Stadium der Chromosomenbildung, und zwar vorwiegend der Äquatorialplatte und der darauf folgenden Stadien, in welchen sich die Chromosomen bereits geteilt haben.	40'	0% n. 1% tg. 99% vg.
			60'	100% geschädigt
3.	5% Einzeller 95% Zweizeller	In allen Eiern sind noch deutliche Kerne sichtbar, doch beginnt das Chromatin bereits schollig zu zerfallen.	40'	57% n. 14% tg. 29% vg.
			60'	30% n. 18% tg. 52% vg.
4.	8% Einzeller 95% Zweizeller	In allen Eiern finden sich ausgebildete Kerne mit fädigem Chromatingerüst.	40'	72% n. 13% tg. 15% vg.
			60'	52% n. 17% tg. 31% vg.

Die Empfindlichkeit der Zellen ist also nicht in allen Stadien der Mitose die gleiche. Sie nimmt bereits merklich zu, wenn die Chromosomen sich zu bilden anfangen, erreicht aber offenbar ihr Maximum erst mit der Bildung der Äquatorialplatte und sinkt nach erfolgter Teilung der Chromosomen und besonders nach erfolgter Zellteilung auch dann schon ab, wenn die Chromosomenschleifen sich noch nicht wieder aufgelöst haben. In den anacroben Präparaten sind diese Unterschiede viel weniger ausgeprägt, wenn auch in dem vorliegenden Versuche nicht ganz ausgeglichen. Entsprechend sind auch die histologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten der B-Serie viel weniger ausgesprochen als in der A-Serie: in den meisten Eiern befinden sich die Kerne im Ruhestadium, nur in Präparat 2b sind in einigen Eiern Chromosomen vorhanden, und dementsprechend zeigt 2b auch die größte Schädigung durch die Bestrahlung. (Warum in diesem Falle in einzelnen Eiern anders als sonst die Chromosomen während der sechstägigen Anoxybiose erhalten blieben, vermögen wir nicht anzugeben.)

Man könnte gegen eine Verallgemeinerung der Ergebnisse des Versuchs 8 mit Recht den Einwand erheben, daß sich in dem Beobachtungs-

zeitraum nicht nur eine gewöhnliche Zellteilung abspielt, sondern vor allem die Vereinigung von männlichem und weiblichem Kern, mit welcher besondere, sich bei den übrigen Zellteilungen nicht wiederholende Vorgänge verbunden sein könnten. Es ist deswegen von besonderer Wichtigkeit, daß sich in Versuch 9 das gleiche Verhalten auch beim Übergang vom Zwei- zum Drei- und Vierzellenstadium wiederfindet. Die Art und Weise, wie das Material zu diesem letzteren Versuch erhalten wurde, erforderte allerdings noch eine Kontrolle. In der Versuchsreihe 9 wurde den Eiern der Sauerstoff vorübergehend entzogen, und die Bestrahlung geschah kürzere oder längere Zeit, nachdem die Luft wieder zu den einzelnen Proben Zutritt hatte. In den gefundenen Unterschieden der Empfindlichkeit, ihrem langsamen Wachsen, könnte weniger ein Ausdruck der morphologischen Veränderungen als vielmehr eine Folgeerscheinung der allmählich wieder eintretenden normalen Sauerstoffatmung gesehen werden. Aber abgesehen davon, daß es unwahrscheinlich wäre, daß die Atmung so lange Zeit brauchte um sich wieder einzustellen, spricht der folgende Atmungsversuch der an Eiern die eine Zeitlang anoxybiotisch aufbewahrt worden waren in unmittelbarem Anschluß an den Wiederzutritt von Sauerstoff angestellt wurde, direkt dagegen:

Versuch 10.

20. VII. 5^h nachm. wird eine größere Portion von Eiern in beginnender Zweiteilung anaerob eingeschlossen, am

22. VII. 10^h vorm. geöffnet. Die Eier befinden sich im Zwei-Dreizellenstadium, wie die histologische Kontrolle ergibt, mit ausgebildeten Kernen ohne Mitosen.

98 mg Eierbrei wird mit einem Tropfen $\frac{1}{10}$ n-Cyankaliumlösung vermischt und in ein Atmungsfläschchen gebracht.

Zeit	Temperatur	Dauer	Skalenteile Differenz	Differenz auf 3 Std. berechnet	Histologische Kontrolle
10 ^h 40'	18,72	172'	5,2	5,4	Kerne im Ruhestadium, keine Mitosen.
1 ^h 32'	18,81				
1 ^h 35'	18,81	179'	5,0	5,0	Beginnende Zusammenballung des Chromatins.
4 ^h 34'	18,91				
4 ^h 35'	18,91	185'	4,8	4,7	Zahlreiche Mitosen in der Mehrzahl der Eier.
7 ^h 40'	18,91				

Die verbrauchte Menge Sauerstoff ist hier sogar in den ersten Stunden, nachdem den Eiern wieder Sauerstoff angeboten wird, größer als später. Doch ist in der ersten Periode ein gewisser Betrag für die physikalische Sauerstoffabsorption in Rechnung zu setzen.

VII. Die Rolle des Stoffwechsels und der Temperaturkoeffizient der Strahlenwirkung.

Wenn somit ein Einfluß des aeroben Stoffwechsels die Empfindlichkeitsänderung der Askarideneier auch nicht erklären kann, da während der Entwicklung keine den Empfindlichkeitsänderungen parallel laufenden Schwankungen des Stoffwechsels beobachtet werden, so ist damit die Rolle des Stoffwechsels überhaupt für die Strahlenempfindlichkeit der Wurmeier noch nicht klargestellt. Die weitere Frage ist die: wie ändert sich die Strahlenempfindlichkeit bei einer willkürlichen Beeinflussung des Stoffwechsels? Zunächst haben wir schon gesehen, daß wir den Eiern den Sauerstoff entziehen können und müssen nun überlegen, welche Stoffwechselveränderungen damit Hand in Hand gehen¹⁾. Wir wissen durch Bunge²⁾ daß die im Warmblüterdarm schmarotzenden Askariden auch normalerweise einen im wesentlichen anoxybiotischen Stoffwechsel haben. Weinland³⁾, dessen Verdienst es ist, das Wesen der hierbei verlaufenden energieliefernden chemischen Reaktionen aufgeklärt zu haben, fand, daß der Energieverbrauch im Darm aus der bei der Verwandlung von Zucker in Valeriansäure freiwerdenden Energie bestritten wird. Dies gilt aber nur für die im Darm lebenden Tiere und hat zur Voraussetzung, daß den Tieren der reichliche Kohlehydratgehalt des Darminhalts zur Verfügung steht und daß sie die Gärungsprodukte, insbesondere die Valeriansäure an die Umgebung abzugeben vermögen. Schon Bunge selber machte darauf aufmerksam, daß die in feuchter Gartenerde zur Entwicklung kommenden Eier, für welche diese Voraussetzungen nicht zutreffen, oxybiotisch sind. Die Askarideneier müssen also den fakultativ anoxybiotisch lebenden Organismen zugerechnet werden. Für diese gilt, daß ihre Energieproduktion sich außerordentlich stark vermindert (bis fast auf die Hälfte), sobald ihnen der Sauerstoff entzogen wird. Für die Beurteilung etwaiger Empfindlichkeitsänderungen bei Anoxybiose der Eier ist aber zu bedenken, daß die mit der Sauerstoffentziehung verbundene Einschränkung des Energiewechsels nicht das einzige ist, was sich ändert. Wir müssen auch auf die morphologischen Veränderungen, welche als Folge des Sauerstoffentzuges mit Regelmäßigkeit an den Zellkernen auftreten, Rücksicht nehmen. Denn wir sahen schon, welch ausgesprochenen Einfluß der Zustand des Kerns auf die Radiosensibilität der Eier hat. Glücklicherweise überdauern die unter dem Einfluß der Anoxybiose auftretenden Änderungen der Kernstruktur die

¹⁾ Für das Folgende vgl. Lesser, Das Leben ohne Sauerstoff. *Erg. d. Physiol.* Bd. 8. 1910.

²⁾ G. Bunge, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 8, 48. 1883.

³⁾ E. Weinland, *Zeitschr. f. Biol.* 42, 55. 1901.

Zeit der Anoxybiose um einige Stunden, so daß wir von ihnen absehen können, wenn wir Eier in der Anoxybiose und kurz nach wiederhergestellter Sauerstoffzufuhr miteinander vergleichen.

Versuch 11 und 12.

Datum	Präparat	Material	Bestrahlungszeit	Resultate
7. II.	1	Kontrolle. 24 Stunden anaerob aufbewahrt.	—	97% n. 3% geschädigt
	2	Sämtliche Eier im Einzellens stadium. (24 Stunden anaerob aufbewahrt und anaerob bestrahlt.)	180'	25% n. 18% tg. 57% vg.
	3	Sämtliche Eier im Zweizellens stadium. (24 Stunden bei Kellertemperatur [11°] aufbewahrt.)	180'	14% n. 6% tg. 80% vg.
20. II.	1	Kontrolle. (24 Stunden anaerob aufbewahrt.)	—	95% n. 5% geschädigt
	2	24 Stunden anaerob aufbewahrte Eier anaerob bestrahlt. Sämtliche Eier im Einzellens stadium.	90'	84% n. 5% tg. 11% vg.
	3	24 Stunden bei Kellertemperatur (11°) aufbewahrt. Sämtliche Eier im Einzellens stadium.	90'	69% n. 12% tg. 19% vg.

Die deutlichen Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit zwischen den aeroben und anaeroben Portionen sind nicht verwunderlich, da bei Kellertemperatur nach 24 Stunden immerhin die Vorstufen der ersten Kernteilung erreicht werden, während die anaeroben Präparate sich gar nicht entwickeln konnten.

Versuch 13.

Präparat	Material	Histologische Kontrolle nach Versuchsende	Resultate
1	48 Std. anaerob. Luftzutritt unmittelbar vor Versuchsbeginn	100% Zweizeller. Sämtliche Kerne finden sich im Ruhestadium mit deutlicher Kernmembran.	75% n. 9% tg. 16% vg.
2	48 Std. anaerob.	Kein Unterschied gegen 1.	82% n. 91% tg. 10% vg.
3	Kontrolle	Wie 1.	96% n. 4% vg.

In den ersten Stunden nach aufgehobener Anoxybiose bleibt die Radiosensibilität fast ebenso stark herabgesetzt wie bei völliger Sauer-

stoffabwesenheit. Daraus geht jedenfalls soviel hervor, daß die An- und Abwesenheit von Sauerstoff als solche, die Strahlenempfindlichkeit nur unwesentlich beeinflußt: wir haben ja aus dem Atmungsversuch (Versuch 10) gesehen, daß die Sauerstoffatmung unmittelbar, nachdem die Eier in eine sauerstoffhaltige Atmosphäre zurückgebracht wurden, wieder beginnt. Bei den mit der Strahlenwirkung verknüpften Reaktionen ist also der Sauerstoff nicht notwendigerweise beteiligt. In diesem Punkte verhalten sich die Röntgenstrahlen ebenso wie das ultraviolette Licht¹⁾.

Die Versuche sprechen nicht für einen Stoffwechseleinfluß auf die Radiosensibilität, wenn sie auch, solange der Energieumsatz nicht direkt bestimmt wird — was aber bei der Kleinheit der Objekte schwierig sein dürfte — nicht entscheidend sind. Aus dem Aufhören oder dem Wiederbeginn der Zellteilung auf einen größeren oder kleineren Stoffwechsel zu schließen, geht nicht an; wir wiesen ja schon darauf hin, daß der Zellteilungsvorgang als solcher die Stoffwechselgröße nicht beeinflußt. Wenn wir aber die an anderen fakultativ anoxybiotischen Organismen gemachten Erfahrungen über die Abhängigkeit der Stoffwechselgröße von der Sauerstoffanwesenheit verallgemeinern, dann müßte eine Stoffwechselabhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit in dem zuletzt mitgeteilten Versuch zu einer stärkeren Schädigung von Präparat 2 zum Ausdruck kommen, was nicht der Fall ist.

Vielleicht wäre es möglich, die Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels²⁾ für die Beantwortung unserer Frage zu benutzen? Der Energieumsatz folgt bekanntlich der R. G. T.-Regel und läßt sich daher beim Kaltblüter in weiten Grenzen variieren. Es wäre somit der nächstliegende Gedanke, durch Bestrahlung der Askarideneier bei verschiedenen Temperaturen und gleichen Dosen nach Verschiedenheiten in der Größe der Schädigung zu fahnden, und daraus einen Zusammenhang zwischen Stoffwechselgröße und Strahlenempfindlichkeit herzuleiten. Das ist aber aus folgenden Gründen nicht ohne weiteres möglich. Durch eine Erhöhung der Temperatur erhöhen wir die chemische Reaktionsgeschwindigkeit für alle Reaktionen entsprechend ihrem Temperaturkoeffizienten, und wenn — wie es wahrscheinlich ist — die Röntgenstrahlenwirkung mittelbar in chemischen Reaktionen besteht, so erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit für diese Reaktionen entsprechend dem Van t'Hoff'schen Gesetze ganz unabhängig davon, welche Reaktionen sonst noch in dem betrachteten System (z. B. als Stoffwechselreaktionen) vor sich gehen. Hier würde also nur das Nichtvorhandensein eines Temperaturkoeffizienten etwas Entscheidendes aussagen. Im anderen Falle bleibt es unentschieden, ob eine beobachtete Änderung der bio-

¹⁾ K. A. Hasselbalch, *Biochem. Zeitschr.* **19**, 435. 1909.

²⁾ Für das Folgende vgl. Kanitz, *Temperatur und Lebensvorgänge*. *Biochem. Einzeldarstellungen* Bd. **1**, Bornträger Berlin, 1915.

logischen Reaktion auf die Veränderung des Stoffwechsels zu beziehen, oder nur sozusagen als photochemischer Temperaturkoeffizient aufzufassen ist. Über den Temperaturkoeffizienten der Röntgenwirkung an biologischen Objekten ist bisher nicht viel bekannt. In den einschlägigen Lehr- und Handbüchern findet sich nichts darüber. Bering und Meyer¹⁾ richteten in ihren experimentellen Untersuchungen über die Sensibilisierung der Röntgenstrahlen mittels Wärmedurchstrahlung, ebenso wie französische Autoren, ihr Augenmerk vor allem auf die Durchblutung des Gewebes. Sie bestrahlten nur vor und nach, nicht gleichzeitig mit der Thermopenetration des Gewebes und fanden, daß nur die vorausgegangene Thermopenetration als wirksam angesehen werden konnte. Was die hierbei in Betracht kommenden Temperaturdifferenzen anbelangt, so handelt es sich bestenfalls um einige Grade. An Askarideneiern, als an poikilothermem Material, versprechen Temperaturversuche von vornherein größeren Erfolg.

Was zunächst die Technik anbetrifft, so wurden die Versuche in der Weise angestellt, daß Eier des gleichen Entwicklungsstadiums auf den Boden eines Wägegläschens gebracht wurden, welches bis zum Rande in ein Wasserbad von der gewünschten Temperatur eingetaucht war. Letzteres bestand aus einem Glasgefäß, das ringsum mit dicken Papierlagen gegen Wärme isoliert war und auch mit einer papiernen Kappe bedeckt wurde. Auf diese Weise gelang es, die Temperatur, welche in Abständen von 20' kontrolliert und eventuell korrigiert wurde, innerhalb 1° konstant zu halten.

Versuch 14—17.

Einfluß der Temperatur auf die Röntgenstrahlenempfindlichkeit.

Ver- such	Datum	Tempe- ratur	Zellstadium	Be- strah- lung	Schädigung durch eine Bestrahlung von der Dauer		Rela- tive Schädi- gung
a	19. II.	Kontrolle	Reifes Einzellen- stadium	Härte 6 Karton- filter	90'	150'	1,0 1,6 2,5
		2°	"		95% n. 5% geschädigt		
		13°	"		37% n. 12% tg. 51% vg.	9% n. 12% tg. 79% vg.	
		22°	"		9% n. 8% tg. 83% vg.	2% n. 4% tg. 94% vg.	
b	31. I.	Kontrolle	Sämtliche Eier i. reifen Einzellen- stadium	Härte 6 0,05 Kup- ferfilter	60'	—	1,0 1,8
		10°	"		95% n. 5% geschädigt		
		22°	"		69% n. 16% tg. 15% vg.	—	
		22°	"		15% n. 10% tg. 75% vg.	—	
c	1. II.	Kontrolle	70—80% Zweizeller,	Härte 6 0,05 Kup- ferfilter	120'	—	1,0 1,6
		12°	20—30% Drei-, Vierzell.		96% n. 4% geschädigt		
		22°	"		61% n. 14% tg. 25% vg.	—	
		22°	"		18% n. 15% tg. 67% vg.	—	
d	21. II.	Kontrolle	Zweizellen- stadium	Härte 6 Karton- filter	90'	—	1,0 2,3
		11°	"		95% n. 5% geschädigt		
		21°	"		28% n. 15% tg. 63% vg.	—	
		21°	"		2% n. 2% tg. 96% vg.	—	

¹⁾ F. Bering und H. Meyer, Münch. med. Wochenschr. Nr. 19, S. 1000. 1911.

In allen drei Versuchen ist die gleichsinnige Veränderung der Empfindlichkeit mit der Temperaturzunahme unverkennbar. Der Temperaturkoeffizient Q_{10} ist nicht immer gleich, aber doch sehr ausgesprochen, im allgemeinen etwas kleiner als 2. Die Versuche dehnten sich über mehrere Stunden aus; wir müssen daher berücksichtigen, daß der Prozeß der Zellteilung bei den Präparaten verschiedener Temperatur verschieden rasch ablief und daher eine die Kernteilungsphase betreffende Komponente der Strahlenempfindlichkeit in Betracht zu ziehen ist. Dadurch könnte der Temperaturkoeffizient zu groß erscheinen. In einem anoxybiotischen Temperaturversuch kann diese Fehlerquelle vermieden werden.

Versuch 18.

Größe des Temperatureinflusses bei der Anoxybiose.

Versuchstechnik ähnlich wie S. 13 angegeben. Die 48 Stunden luftdicht verschlossenen Tröge werden in ein Wasserbad von großer Kapazität gebracht, so daß der Objektträger mit der Wasseroberfläche abschneidet. Das Thermostatgefäß wird mit einem Karton bedeckt. Temperaturkontrolle und Korrektur alle 20 Minuten. Nach Versuchsende werden die Präparate geöffnet und aerob im Thermostaten zur Entwicklung gebracht. Zweizellstadium. Bestrahlung und Einstellung 6. 18 Minuten Abstand. Kartondeckel 2 Stunden.

Temperatur	Schädigung	Relative Schädigung
Kontrolle	99% n. 1% geschädigt	—
12°	84% n. 9% tg. 7% vg.	1,0
22°	67% n. 16% tg. 17% vg.	1,5

In diesem Versuch nimmt die Empfindlichkeit mit der Temperatur zwar zu, aber in etwas geringerem Maße als in den aeroben Temperaturversuchen. Das spricht nicht gerade für eine Abhängigkeit der Radiosensibilität vom Stoffumsatz. Denn dann wäre ein Temperaturkoeffizient von $Q_{10} = 2$ und darüber zu erwarten gewesen. Wahrscheinlicher ist die Annahme der Koppelung der primären temperaturunabhängigen photochemischen Strahlenreaktion mit sekundären temperaturabhängigen Reaktionen.

Wenn wir am Schluß aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen auch für die menschliche Pathologie einige Folgerungen ziehen wollen, so müssen wir uns zuvor die Frage vorlegen, wieweit sich die Ergebnisse, welche an einem einzelnen Objekt einer niederen Tierklasse gewonnen sind, verallgemeinern, wieweit sie sich besonders auf die höheren Organismen und speziell die menschliche Zelle übertragen lassen. Nun sind, wie eine große Reihe von Untersuchungen gezeigt hat, die Wirkungen der Röntgenstrahlen für die verschiedensten Zellarten, einschließlich der Pflanzenzellen, grundsätzlich gleich und verlaufen im Prinzip bei den Protozoen und den differenziertesten Gewebszellen in

der gleichen Weise. Wie weit die durch verschiedene Strahlengattungen (Härtegrade) gesetzten Schädigungen bei den verschiedenartigsten Objekten, Pflanzensamen, Froscheiern, menschlichem Gewebe (Haut, Ovarium) miteinander übereinstimmen, geht besonders aus den sehr genauen biologischen Untersuchungen von Krönig und Friedrich¹⁾ hervor. Und bei der hier zur Erörterung stehenden Frage nach der Beeinflussung der Empfindlichkeit durch Wachstum und Teilung, handelt es sich um allen Zellen gemeinsame Vorgänge. Nur in bezug auf den Stoffwechsel nehmen die Spulwürmer eine Sonderstellung ein, aber dem haben wir bei unseren Untersuchungen weitgehend Rechnung getragen und haben unsere Schlüsse nur mit allem Vorbehalt gezogen.

Fassen wir unsere Resultate noch einmal kurz zusammen, so sahen wir, daß der Zellkern in gewissen Stadien der Kernteilung, insbesondere im Stadium der Bildung der Äquatorialplatte und den darauf folgenden Phasen bis zur Zellteilung, eine vor den anderen Stadien der Karyokinese ausgezeichnete Empfindlichkeit besitzt. Das von Krause und Ziegler auf Grund von histologischen Untersuchungen am Gewebe (z. B. Lymphdrüsen) aufgestellte Gesetz der Empfindlichkeitssteigerung in allen Stadien der Kernteilung, ist also dahin zu präzisieren, daß das Stadium der Bildung der Äquatorialplatte besonders ausgezeichnet ist. Von einem Gegensatz zwischen ruhenden und sich teilenden Zellen kann man dabei nicht gut sprechen: denn auch in den Stadien der Zellentwicklung, in welchen keine Chromosomen vorhanden sind oder die Chromosomen sich zurückbilden, findet sich die Mehrzahl der Kerne (soweit nicht eine Ruhepause in der Entwicklung eintritt), in dauernder Umwandlung. Die Stoffwechselgröße der Eier wird von diesen periodisch verlaufenden Zellvorgängen nicht beeinflußt und kann daher auch für die Empfindlichkeitsänderung nicht verantwortlich gemacht werden. Die Empfindlichkeit der Röntgenstrahlen ist dabei von Faktoren abhängig, welche in unmittelbarem Zusammenhang mit ihrem morphologischen Verhalten stehen.

Wir fanden endlich, daß die Radiosensibilität eine ausgesprochene Temperaturfunktion ist, die wir z. T. wenigstens auf die gleichzeitig stattfindenden temperaturabhängigen Wachstumsvorgänge in den Eiern zurückführen konnten, z. T. als Folgeerscheinung mit der primären Strahlenwirkung gekoppelter, dem Temperatureinfluß unterworfenen, chemischer Reaktionen ansahen.

Der Einfluß des Stoffwechsels auf die Wirkung der Röntgenstrahlen wird damit überhaupt problematisch. Die Schwarzschen Versuche über die Sensibilisierung und Desensibilisierung der Haut durch Variation der Größe ihrer Durchblutung, erscheinen in einem anderen Lichte.

¹⁾ Krönig und Friedrich, Physikal. und biolog. Grundlagen der Strahlentherapie, III. Sonderband zur Strahlentherapie. Berlin 1918.

Denn es liegt nahe, die Wirkung der Blutfüllung und der Blutleere nicht wie es der Verfasser tat, als eine Stoffwechselwirkung aufzufassen, sondern als eine Temperaturfunktion anzusehen. Es wäre wichtig, gerade das Wesen der Desensibilisierung der Haut, welche in den Methoden von Reicher und Lenz, Christen, Müller-Immenstadt eine praktische Bedeutung gewonnen hat, unter diesem Gesichtspunkte neu zu studieren und zu untersuchen, ob nicht durch eine bewußte Beeinflussung der Temperatur der Haut und Subcutis ein wesentlich höherer Grad der Desensibilisierung zu erreichen wäre. Jedenfalls wird es nötig sein, bei methodischen Versuchen den Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit der Zelle mehr als bisher zu berücksichtigen.
