

*Cholnoky B. J.*, Plasmolyse und Lebendfärbung bei *Melosira*. *Protoplasma* **XXII** (1934): 161. — Derselbe, Farbstoffaufnahme und Farbstoffspeicherung lebender Zellen penanther Diatomeen. *Öst. Bot. Z.* **LXXXIV** (1935 a): 91. — Derselbe, Protoplasmatische Untersuchungen durch Lebendfärbung und Plasmolyse. *Mathematikai és Természettudományi Ertesítő. Ak. Wiss. Budapest* **LVI** (1935 b): 940. — *Frey-Wissling A.*, Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. Elsevier. (1948): 255. — *Gicklhorn J.*, Intrazelluläre Myelinfiguren und ähnliche Bildungen bei der reversiblen Entmischung des Protoplasmas. *Protoplasma* **15** (1932): 90. — *Guillermond A.*, The cytoplasm of the plant cell. *Chronica Botanica, Waltham, Mass.* (1941): 247. — *Höfler K.*, Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. *Sitzber. Öst. Ak. Wiss. math.-naturwiss. Kl., Abt. I*, **156** (1947): 585. — Derselbe, Neue Ergebnisse der Vital- und Fluoreszenzfärbung. *Wiss. Mitt. Pharmazeut. Forsch. Institut. Öst. Apothekerver.* **1**. (1948): 23. — Derselbe, Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biologia Generalis* **XIX** (1949): 90. — *Küster E.*, Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. *Protoplasma* **1** (1926): 73. — *Strugger S.*, Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung der Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jenaische Z. Naturwiss.* **73** (1940): 97. — Derselbe, Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. *Flora* **35** (1941): 101. — *Waldheim W.*, Differentialfärbung mit Rhodamin B. Darstellung der Gerbstoffzellen im *Carex*-Blatt. *Mikroskopie* **4** (1949): 46.

(Aus dem Histologischen Institut der Universität Lausanne, Direktor: Prof. Dr. O. Bucher, und dem Anatomischen Institut der Universität Zürich, Direktor: Prof. Dr. G. Töndury)

## ZUR METHODIK KARYOMETRISCHER UNTERSUCHUNGEN AN GEWEBEKULTUREN

Von OTTO BUCHER

Mit 2 Abbildungen

Bei der ausgedehnten Literatur, die karyometrischen Untersuchungen gewidmet ist, mag es auffallen, wie selten und auch mit wie wenig Erfolg derartige Messungen an in vitro gezüchteten Geweben durchgeführt worden sind. Dabei bieten doch gerade Gewebekulturen zum Studium experimenteller Einflüsse neben relativ einfachen, bekannten Voraussetzungen den Vorzug, daß das Kernwachstum in der lebenden Kultur direkt beobachtet werden kann. Die Hauptschwierigkeit bei der Durchführung karyometrischer Untersuchungen an Gewebekulturen liegt darin, daß die Kerne hier nicht eine genau definierbare geometrische Form (Kugel oder Rotationsellipsoid) aufweisen, sondern stark abgeplattet sind (Abb. 1). Sie liegen im Randschleier der Deckglaskulturen so, daß ihre beiden größeren Durchmesser dem Deckgläschen mehr oder weniger parallel sind, der dritte Durchmesser senkrecht dazu. Die Größe der beiden

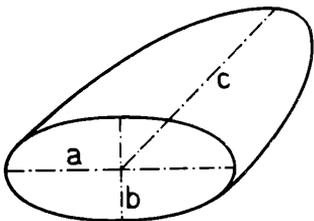


Abb. 1. Schematische Darstellung der Hälfte eines Fibrozytenkernes mit eingezeichneten Halbachsen a, b und c.

ersten Achsen ( $2a$  und  $2c$ ) kann in Totalpräparaten leicht ermittelt werden; zur Bestimmung des dritten Durchmessers ( $2b$ ) müßte man Schnittpräparate herstellen, was beim Randschleier einer Deckglaskultur gewisse Schwierigkeiten bieten und außerdem das ganze Verfahren stark komplizieren würde.

Wir haben deshalb in unserem Laboratorium eine einfache Methode ausgearbeitet<sup>1)</sup>, die uns gestattet, in die Kerngrößenverhältnisse auch ohne Bestimmung des dritten Durchmessers und ohne Berechnung der absoluten Volumengröße einen Einblick zu erhalten. Darüber

<sup>1)</sup> Unter Mitwirkung von cand. med. Ruth GATTIKER und cand. med. Bruno HORISBERGER.

möchte ich im Anschluß an den vor einiger Zeit in dieser Zeitschrift (1948: 243—250) erschienenen Aufsatz „Karyometrik“ von P. WILFLINGSEDER kurz berichten, — nicht zuletzt mit der Absicht, zu weiteren derartigen Untersuchungen an unbeeinflussten und experimentell beeinflussten Gewebekulturen anzuregen.

Seit den ersten, grundlegenden Untersuchungen von W. JACOB wissen wir, daß häufig mehr als eine Kerngröße (natürlich mit einer mehr oder weniger großen Variationsbreite) vorkommt, wobei sich die den verschiedenen Häufigkeitsmaxima entsprechenden Volumina wie 1 2 4 8 verhalten und somit eine geometrische Reihe bilden. Die betreffenden Größenklassen wurden Regelklassen genannt und mit den Symbolen  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_4$ ,  $K_8$  usw. bezeichnet. Da die ersten Untersuchungen an kugeligen Kernen durchgeführt wurden, war die Berechnung der Volumina aus den gemessenen Durchmessern kein Problem. Etwas größere Schwierigkeiten bot die Volumenbestimmung bei ellipsoiden Kernen. Den Bindegewebskernen sowie den Kernen in vitro gezüchteter Zellen vollends begegnete man mit größter Zurückhaltung; manche Forscher hielten wegen der nicht regelmäßigen Form und der Schwierigkeiten bei der Messung des dritten Durchmessers Größenbestimmungen bei diesen Objekten für wenig erfolgversprechend, ja sogar für undurchführbar.

Für unsere Untersuchungen benützten wir Bindegewebeulturen (des Menschen und verschiedener Tiere, insbesondere des Kaninchens), die in üblicher Weise in einem Tropfen von homologem Blutplasma und einem Tropfen Gewebeextrakt oder auch Embryonalextrakt auf Deckgläschen im Thermostaten bei Körpertemperatur gezüchtet wurden. Die Kulturen wurden in Carnoyscher Flüssigkeit fixiert und mit Eisen-hämatoxylinlack nach v. MÖLLENDORFF gefärbt (vgl. W. und M. v. MÖLLENDORFF, 1926: 517—519, oder F. ROULET: 274).

In dem vom eingepflanzten Mutterstück ausgewachsenen dünnen Randschleier können wir nun die Kerne im Totalpräparat direkt ausmessen. Wir brauchen also die Kulturen nicht erst einzubetten und zu schneiden und haben deshalb — ganz abgesehen von der Vereinfachung des Verfahrens — auch weniger mit artefiziellen Veränderungen der Kerngrößen zu rechnen. Wir achten jedoch genauestens darauf, daß alle Präparate, die wir vergleichen wollen, technisch genau gleich behandelt werden. Wir zeichnen die Kerne gewöhnlich bei 1500facher Vergrößerung (weil wir bei den verwendeten relativ dicken Deckgläschen mit der Ölimmersion meistens nicht nahe genug an die gezüchteten Zellen herankommen können) mit einem Projektionszeichenapparat. Da wir mit Totalpräparaten arbeiten, besteht auch keine Gefahr, daß wir nur Kernsegmente zeichnen. Wir erhalten die im allgemeinen leicht scharf einstellbare größte optische Schnittebene der Kerne, deren Fläche wir schließlich mit einem Planimeter ausmessen.

Die Fehler, mit denen wir bei diesem Vorgehen zu rechnen haben, sind, wie wir an anderer Stelle genauer ausgeführt haben (O. BUCHER und B. HORISBERGER), gering. Der gesamte Methodefehler setzt sich aus einem Zeichnungsfehler und einem Planimetrierungsfehler zusammen. Berechnen wir als wichtigstes Streuungsmaß die mittlere quadratische Abweichung  $s$ , so beträgt diese bei 1500facher Vergrößerung für die Gesamtmethode 1,24%, für das Zeichnen 0,67% und für das Planimetrieren 1,03%.

Wir sind ursprünglich von der Arbeitshypothese ausgegangen, daß die dritte, im Totalpräparat nicht meßbare Achse  $z$  (vgl. Abb. 1) beim Größerwerden der Kerne den andern beiden, dem Deckgläschen mehr oder weniger parallel liegenden und somit gut meßbaren Achsen  $a$  und  $c$  proportional zunimmt. Daß diese unseren weiteren Berechnungen zugrunde liegende Voraussetzung richtig ist, zeigt neben den an Schnittpräparaten vorgenommenen Messungen des dritten Durchmessers vor allem auch die Tatsache, daß wir mit der Anwendung unserer Methode zur Auswertung von bisher etwa 50.000 Kernen in Gewebekulturen gute Resultate erhalten haben.

Zwischen dem Kernvolumen  $V = \frac{4}{3} \pi a b c$  und der gemessenen Projektionsfläche  $F = \pi a c$  besteht die Beziehung  $V = \frac{4}{3} b F$ . Hätten wir nun bei jedem Kern auch noch

den Halbmesser  $b$ , so könnten wir das Volumen sofort berechnen. Da uns aber die absolute Kerngröße weit weniger interessiert als das gegenseitige Verhältnis der Kernvolumina, können wir — unter Benützung der Voraussetzung, daß sich  $b$  den Halbachsen  $a$  und  $c$  proportional verändert — das uns unbekannte  $b$  aus der Gleichung eliminieren, wie wir an anderer Stelle mathematisch abgeleitet haben (vgl. O. BUCHER und B. HORISBERGER). Verhalten sich nämlich die Kernvolumina  $V_1 V_2 V_4 \dots$  wie  $1 2 4 \dots$ , so verhalten sich die ihnen in unserem Fall entsprechenden Projektionsflächen, deren Größen wir bereits planimetrisch bestimmt haben, wie folgt:

$$F_1 : F_2 : F_4 : F_8 \dots = 1 : \sqrt[3]{2^2} : \sqrt[3]{2^4} : \sqrt[3]{2^6}$$

das heißt, der Quotient der steigenden geometrischen Reihe beträgt  $\sqrt[3]{4} = 1,5875$ .

Würden sich jedoch nicht die Volumina, sondern die Kernoberflächen  $O_1:O_2:O_4$  wie  $1:2:4$  ... verhalten (vgl. dazu G. HERTWIG, 1938), dann verhielten sich, wie sich in analoger Weise ableiten läßt (vgl. O. BUCHER und R. GATTIKER), die gemessenen Flächen

$$F_1 : F_2 : F_4 : F_8 \dots = 1 : 2 : 4 : 8 :$$

Im allgemeinen werden 150—200 Kerne zur variationsstatistischen Verarbeitung der Kerngrößenverhältnisse eines bestimmten Präparates genügen. Bei einem wenig ausgeglichenen Kernmaterial brauchen wir indessen größere Stichproben: So haben wir für die in Abb. 2 wiedergegebenen Kerngrößen-Frequenzkurven aus menschlichen Fibroblastenkulturen in der Innen- wie in der Außenzone je 1000 Kerne gemessen.

Für die statistische Auswertung des gewonnenen Zahlenmaterials und die Ermittlung einer Verteilungskurve müssen wir die Einzelwerte in geeigneter Weise in Klassen zusammenziehen, wie das P. WILFLINGSIEDER in dieser Zeitschrift an einem konkreten Beispiel gezeigt hat. Daß für die Kerngrößen biologisch nur das logarithmische Einteilungsprinzip in Frage kommt, ist durch die Arbeiten von E. HINTZSCHE (1945, 1946) eindeutig gezeigt worden: Der auf der Abszisse aufgetragene Abstand zwischen  $K_1$  und  $K_2$  muß gleich groß sein wie der Schritt von  $K_2$  zu  $K_4$  oder von  $K_4$  zu  $K_8$  usw., da es sich grundsätzlich ja immer um das gleiche, nämlich um eine Verdoppelung des Kernes, handelt. In unserem Falle muß, da wir ja mit den Projektionsflächen arbeiten, das  $F$  der nächst höheren Regelklasse also immer 1,5875mal größer sein.

Die beste Variationskurve erhalten wir dann, wenn wir — wie das auch E. HINTZSCHE getan hat — zwischen je zwei Regelklassen noch drei Zwischenklassen einschieben. Die Mitten dieser Zwischenklassen erhalten wir in einfacher Weise, indem wir den logarithmischen Abstand der Mitten zweier aufeinanderfolgender Regelklassen durch vier dividieren ( $\frac{1}{4} \log 1,5875 = 0,05018$ ). Wenn wir zum Logarithmus einer Regelklassenmitte dreimal 0,05018 hinzuzählen, erhalten wir somit die Logarithmen der Mitte der drei Zwischenklassen, mit der vierten Addition die Mitte der nächst höheren Regelklasse usw. Die Logarithmen der Klassengrenzen kann man berechnen, indem man zum (vom) Logarithmus der Klassenmitte 0,02509 ( $= \frac{1}{8} \log 1,5875$ ) hinzuzählt (bzw. abzählt) sowie auch — etwas weniger genau — als arithmetisches Mittel aus den Logarithmen der Mitte aneinandergrenzender Klassen. Die Logarithmen aufeinanderfolgender Klassengrenzen unterscheiden sich natürlich ebenfalls um 0,05018, und man kann für die Berechnung der weiteren Klassengrenzen selbstverständlich von der ersten in der beschriebenen Weise ermittelten Klassengrenze ausgehen.

Damit kennen wir das Prinzip, nach welchem wir die Einteilung in Regel- und Zwischenklassen vornehmen können. Was wir jedoch noch nicht kennen — und eigentlich zuerst wissen sollten —, ist die genaue Lage der wichtigsten Regelklasse (der

Hauptklasse), auf die sich die Berechnung der übrigen Klassen aufbaut. Entspricht die Größe der gemessenen Kerne ungefähr einer Normalverteilung, das heißt, ergibt die Frequenzkurve der verschiedenen Kerngrößen eine Gauß-Laplacesche Kurve (Glockenkurve), dann läßt sich die Mitte leicht berechnen (vgl. E. HINTZSCHE 1946, P. WILFLINGSEDER 1948).

Bei den Kernen der Gewebekultur haben wir erst bei großen Stichproben annähernd eine symmetrische Verteilung gefunden, so daß wir öfters gezwungen sein werden, für ein kleineres Kernmaterial empirisch eine geeignete Klasseneinteilung zu finden. Wir haben deshalb für eine mittlere Projektionsfläche von  $K_1 = 98, 100, 102, 104, 106, 108$  und  $110 \mu^2$  die Klasseneinteilung ausgerechnet und entsprechende Listen zur Eintragung der planimetrisch ermittelten Werte angefertigt. Bei einer Vergrößerung von 1500mal — mit der wir gewöhnlich arbeiten — erhalten wir die in Tabelle I in  $\mu^2$  angegebenen Werte.

Die Wahl des geeigneten Klassentypus, welche die biologischen Eigenschaften des ausgewerteten Kernmaterials am besten wiedergibt, ist sehr wichtig. So darf ein einem bestimmten Kerngrößenbereich zugehörendes Häufigkeitsmaximum nicht zwischen zwei Klassen fallen, da mit seiner Aufteilung auf zwei Klassen die Kerngrößen-Frequenzkurve einen ganz anderen Charakter erhalten würde.

In Abb. 2 sieht man nun die Kurven dargestellt, die wir aus der Einteilung der Meßergebnisse von 2000 Kernen aus menschlichen Fibroblastenkulturen in die sechs „Standardklassen“ der Tabelle I erhalten haben. Die Einteilung in die Klasse  $K_1 = 110 \mu^2$  (Abb. 2 g) ergäbe die gleiche Kurve — nur um eine Klassenbreite nach links verschoben — wie die Einteilung in die Klasse  $K_1 = 98 \mu^2$  (Abb. 2 a), da in beiden Fällen als Klassengrenzen die gleichen Zahlenwerte vorkommen, wie aus Tabelle I zu ersehen ist. Der Zufall will es, daß bei dem diesen Untersuchungen zugrunde gelegten Kernmaterial die Unterschiede zwischen den infolge der verschiedenen Klasseneinteilung verschiedenen Frequenzkurven nicht so stark sind wie in manchen andern Fällen (vgl. O. BUCHER und B. HORISBERGER, Abb. 4 a—f). Es ist deshalb nicht einfach zu entscheiden, welches nun im vorliegenden Fall die „richtigen“ Kurven sind. Noch wichtiger als die Abklärung dieser Fragestellung ist indessen, daß experimentell beeinflusste Kulturen und parallel geführte Kontrollkulturen, welche miteinander verglichen werden sollen, in den gleichen Klassentyp eingeteilt sind.

Die Berechnung einiger Kurvencharaktere (für Einzelheiten vgl. Ch. WILLIGENS 1932/33, A. SCHWARZ 1943, ferner O. BUCHER und R. GATTIKER 1950) ergibt für die Symmetrie der Kurven die besten Resultate bei den Einteilungsklassen „102“ und „104“ sowie den Kurven, deren Mitten wir als geometrische Mittel aller planimetrierten Werte erhalten haben. Die Berechnung der Wölbungskoeffizienten zeigt, daß — unabhängig vom Klassentyp — die Kerngrößen-Frequenzkurven der Innenzone einer Normalverteilung näherstehen als die der in bezug auf das Wachstum aktiveren Außenzone, am nächsten beim Klassentyp „98“.

Bestimmen wir die Mitte der Frequenzkurven unter der Annahme einer symmetrischen Verteilung und errechnen wir davon ausgehend die Klasseneinteilung, so erhalten wir die Kurven der Abb. 2 h. Die Tatsache, daß wir zum gleichen Resultat gelangen, ob wir vom Kernmaterial der Außenzone oder von dem der Innenzone ausgehen — die für die Mitte von  $K_1$  und  $K_2$  errechneten Werte unterscheiden sich tatsächlich um den von uns abgeleiteten Faktor 1,5875 — ist eine weitere Bestätigung dafür, daß die von uns ausgearbeiteten Berechnungsgrundlagen stimmen.

Die gestrichelte Kurve links in den Abb. 2 a—f repräsentiert die Kerngrößenverhältnisse in der an das Mutterstück angrenzenden Innenzone, die ausgezogene Kurve rechts die der (den äußersten Zelllagen des Randschleiers entsprechenden) Außenzone. Die den beiden Kerngrößen-Frequenzmaxima der zwei Zonen zugehörigen Kernvolumina verhalten sich wie 1 : 2, die von uns planimetrierten Flächen als wie  $1 \sqrt[3]{2^2} = 1,5875$  (vgl. auch in Tabelle II  $K_1$  und  $K_2$ ). Da die beiden Zonen

Tabelle I. Klasseneinteilung bei verschiedener Lage der Mitte von  $K_1$ 

Klasse	98	100	102	104	106	108	110
	104,1— 116,7 116,8— 131,1	106,2— 119,1 119,2— 133,7	108,3— 121,5 121,6— 136,4	110,5— 123,9 124,0— 139,1	112,6— 126,3 126,4— 141,8	114,7— 128,7 128,8— 144,4	116,8— 131,1 131,2— 147,1
$K_{1/2}$	131,2— 147,1 147,2— 165,1 165,2— 185,4 185,5— 208,1	133,8— 150,1 150,2— 168,5 168,6— 189,1 189,2— 212,3	136,5— 153,1 153,2— 171,9 172,0— 192,9 193,0— 216,6	139,2— 156,5 156,6— 175,2 175,3— 196,7 196,8— 220,8	141,9— 159,1 159,2— 178,6 178,7— 200,5 200,6— 225,1	144,5— 162,5 162,6— 182,0 182,1— 204,3 204,4— 229,3	147,2— 165,1 165,2— 185,4 185,5— 208,1 208,2— 233,6
$K_1$	208,2— 233,6 233,7— 262,1 262,2— 294,3 294,4— 330,4	212,4— 238,3 238,4— 267,5 267,6— 300,3 300,4— 337,1	216,7— 243,1 243,2— 272,9 273,0— 306,3 306,4— 343,8	220,9— 247,9 248,0— 278,2 278,3— 312,3 312,4— 350,6	225,2— 252,6 252,7— 283,6 283,7— 318,3 318,4— 357,3	229,4— 257,4 257,5— 288,9 289,0— 324,3 324,4— 364,1	233,7— 262,1 262,2— 294,3 294,4— 330,4 330,5— 370,8
$K_2$	330,5— 370,8 370,9— 416,2 416,3— 467,2 467,3— 524,4	337,2— 378,4 378,5— 424,7 424,8— 476,8 476,9— 535,2	343,9— 386,0 386,1— 433,2 433,3— 486,3 486,4— 545,9	350,7— 393,5 393,6— 441,7 441,8— 495,8 495,9— 556,6	357,4— 401,1 401,2— 450,2 450,3— 505,4 505,5— 567,3	364,2— 408,7 408,8— 458,7 458,8— 514,9 515,0— 578,0	370,9— 416,2 416,3— 467,2 467,3— 524,4 524,5— 588,7
$K_3$	524,5— 588,7 588,8— 660,8 660,9— 741,8 741,9— 832,6	535,3— 600,7 600,8— 674,3 674,4— 756,9 757,0— 849,6	546,0— 612,7 612,8— 687,8 687,9— 772,1 772,2— 866,6	556,7— 624,8 624,9— 701,3 701,4— 787,2 787,3— 883,6	567,4— 636,8 636,9— 714,8 714,9— 802,3 802,4— 900,6	578,1— 648,8 648,9— 728,3 728,4— 817,5 817,6— 917,6	588,8— 660,8 660,9— 741,8 741,9— 832,6 832,7— 934,6
$K_4$	832,7— 934,6 934,7— 1049,1 1049,2— 1177,6	849,7— 953,7 953,8— 1073,0 1073,1— 1201,6	866,7— 972,8 972,9— 1091,9 1092,0— 1170,5	883,7— 991,8 991,9— 1113,3 1113,4— 1249,8	900,7— 1010,9 1011,0— 1134,7 1134,8— 1273,7	917,7— 1030,0 1030,1— 1156,1 1156,2— 1297,8	934,7— 1049,1 1049,2— 1177,6 1177,7— 1332,8

fließend ineinander übergehen, ergibt sich für die Auswertung der Kerngrößenverhältnisse in Gewebekulturen eine neue Schwierigkeit: Es muß sorgfältig darauf geachtet werden, daß beim Zeichnen der Kerne die beiden Zonen nicht verwischt werden, sonst können, wie an anderer Stelle ausgeführt (vgl. O. BUCHER und R. GATTIKER, Abb. 1 und 3 a—f), je nach dem zufälligen Mischungsverhältnis die mannigfaltigsten, im einzelnen schwer analysierbaren Kurven entstehen.

Aus diesem Grunde sowie auch aus der Tatsache, daß allgemein mit zu kleinen Stichproben und ohne das logarithmische Klasseneinteilungsprinzip gearbeitet wurde, sind die einzigen uns aus der Literatur bekannten Kerngrößen-Verteilungskurven aus Gewebekulturen von WERMEL und IGNATJEW (1932), WERMEL und PORTUGALOW (1935) und von GAILLARD und BAKKER (1938) nicht brauchbar. Ganz unverständlich ist auch, welchen Zusammenhang WERMEL und Mitarbeiter zwischen ihren errechneten Kurven und den hineingezeichneten symmetrischen „Idealkurven“ sehen wollen. Auch die Meßresultate von G. C. DOGLIOTTI (1927), F. DEMUTH (1931) und von E. FREERKSEN (1933) sind statistisch gesehen wertlos.

Da wir es in der wachsenden Gewebekultur also nicht mit einem einheitlichen Kernmaterial zu tun haben, erhält man bei mehrmaliger Auswertung ein und derselben Kultur niemals in allen Einzelheiten übereinstimmende Kerngrößen-Frequenzkurven, da die Auswahl der Stichprobe aus der Grundgesamtheit immer bis zu einem gewissen Grade dem Zufall überlassen ist; außerdem spielt die Größe der Stichprobe dabei eine wichtige Rolle. Es ist jedoch möglich, Kurven zu erhalten, zwischen denen die Anwendung statistischer Prüfverfahren, z. B. der  $\chi^2$ -Methode, keine gesicherten Unterschiede mehr ergibt. Zum Nachweis nur geringer Differenzen in den Kerngrößen von verschieden behandelten Kulturen müssen oft Tausende von Kernen gemessen werden, um zuverlässige Resultate zu erhalten.

So haben wir z. B. nur zur Beantwortung der Frage, ob zwischen 1, 2 und 4 Tage in vitro gezüchteten Kaninchen-Fibrozytenkulturen Kerngrößenunterschiede bestehen, insgesamt 9200 Kerne ausgewertet. Als Resultat zeigte sich, daß die Kerne mit der Zunahme der Verweildauer in vitro etwas an Größe verlieren, jedoch nicht so viel, daß neben der Frequenz auch die Lage der Regelklassen beeinträchtigt würde.

Schließlich soll noch darauf hingewiesen werden, daß bei der Auswertung eines bestimmten Kernmaterials — dies gilt nicht allein für die Verhältnisse der Gewebekultur — durch verschiedene Untersucher noch ein gewisser, im Einzelfall zweifellos recht verschieden großer individueller Fehler zum Methodefehler hinzukommt. Beim Vergleich der Resultate (z. B. verschiedener Mitarbeiter) ist an diese Möglichkeit zu

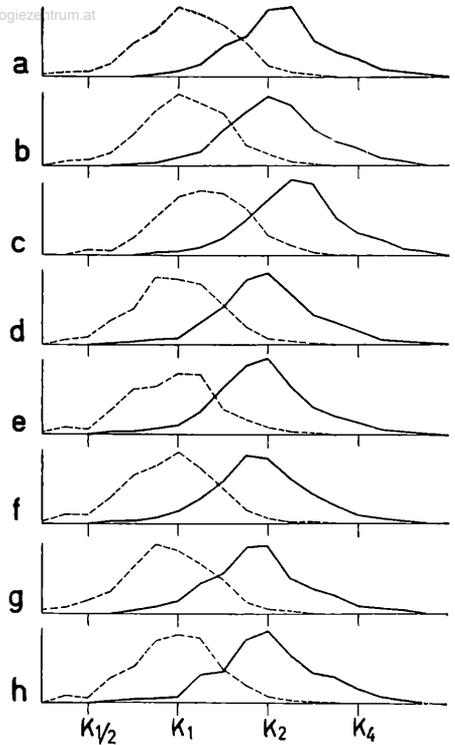


Abb. 2. Kerngrößen-Frequenzkurven aus menschlichen Fibroblastenkulturen.

Die gestrichelte Kurve links repräsentiert die Kerngrößenverhältnisse aus der an das Mutterstück angrenzenden Innenzone, die ausgezogene Kurve rechts die aus der den äußersten Zelllagen des Randschleiers entsprechenden Außenzone der Kultur. Auf der x-Achse sind die planimetrisch bestimmten Größen der Projektionsflächen der Zellkerne, auf der y-Achse die dazugehörigen Frequenzen aufgetragen. Die verschiedenen Frequenzkurven entsprechen der Einteilung der Meßresultate in verschiedene Klassentypen: a)  $K_1 = 98 \mu\text{m}$ , b)  $K_1 = 100 \mu\text{m}$ , c)  $K_1 = 102 \mu\text{m}$ , d)  $K_1 = 104 \mu\text{m}$ , e)  $K_1 = 106 \mu\text{m}$ , f)  $K_1 = 108 \mu\text{m}$ , g)  $K_1 = 110 \mu\text{m}$ ; h)  $K_1$  und  $K_2$  als geometrische Mitte berechnet.

Beispiel der Einteilung der planimetrisch bestimmten Kerngrößen aus in vitro gezüchteten menschlichen Fibroblasten in den Klassentyp »100« (Mitte von  $K_1 = 100 \mu^2$ ).

Regelklassen	Zwischenklassen	Natürliche Größe (Präparat) $\mu^2$		1500fache Vergrößerung (Zeichnung) $mm^2$		Frequenz in Prozenten	
		Klassenmitten	Klassengrenzen	Klassenmitten	Klassengrenzen	Innenzone	Außenzone
	$B_{1/2-1}$	79,4	75,0—84,0	178,5	168,6—189,1	9,6	0,3
	$C_{1/2-1}$	89,1	84,1—94,3	200,5	189,2—212,3	17,0	0,7
$K_1$		<b>100,0</b>	94,4—105,9	225,0	212,4—238,3	<b>21,5</b>	2,3
	$A_{1-2}$	112,3	106,0—118,9	252,5	238,4—267,5	18,8	4,2
	$B_{1-2}$	126,0	119,0—133,4	283,5	267,6—300,3	15,1	10,9
	$C_{1-2}$	141,4	133,5—149,8	318,3	300,4—337,1	6,6	15,9
$K_2$		<b>158,8</b>	149,9—168,1	357,2	337,2—378,4	3,1	<b>20,6</b>
	$A_{2-4}$	178,2	168,2—188,7	401,0	378,5—424,7	0,9	18,2
	$B_{2-4}$	200,0	188,8—211,9	450,0	424,8—476,8	0,2	10,8

denken; immer müssen die Versuchskulturen und die Kontrollkulturen von der gleichen Person ausgewertet werden.

Es geht aus diesen Ausführungen hervor, daß Kernmessungen auch an den abgeplatteten Zellkernen von Gewebekulturen, wie übrigens auch an Bindegewebskernen in Häutchenpräparaten, mit der von uns entwickelten Methodik durchaus möglich sind. Damit zeigt sich eine weitere, interessante Möglichkeit zur quantitativen Auswertung von Gewebekulturen in vitro, und wir möchten zu weiteren derartigen Untersuchungen anregen. Bei der Verarbeitung und Beurteilung der Meßresultate soll man sich jedoch immer der geschilderten Fehlermöglichkeiten, die man andererseits auch nicht überschätzen soll, bewußt sein und auch die modernen Methoden der Statistik anwenden.

### Zusammenfassung

Es wird angeregt, karyometrische Untersuchungen auch an Gewebekulturen in vitro durchzuführen, und eine hierfür geeignete Methodik beschrieben.

### Summary

Tissue cultures in vitro have rarely been used for caryometric studies. This is due to the fact that the nuclei in the hanging drop cultures do not possess a clearly definable geometric form but are greatly flattened.

The author has worked out a method by which it is possible to obtain a clear idea of the sizes of the nuclei without defining the third dimension and without calculating the absolute volume.

It has been shown that with the increase of the nuclei, the short axis increases proportionately to both the larger axes (see fig. 1). The short axis being perpendicular to the cover-glass, it is not measurable in the total preparations of tissue cultures. The method used is as follows: the largest projected plane of the nuclei, determined by the two axes and lying parallel to the cover-glass, is drawn with a 1,500-fold enlargement and the surface so obtained, measured with the planimeter. The variation in method is relatively small. If two volumes have a relationship of 1:2, e. g. if the volume corresponds to the frequency maxima of the nuclei in the inner zone which borders upon the central portion.

and of the outer zone, then the corresponding projection surfaces maintain the proportion of 1:1.5875, as already deduced.

To make a statistical evaluation and to plot a distribution curve, single planimetric values must be properly classified. The principle of logarithmic distribution has been used for this purpose. The calculation of group limits is also shown. The chief difficulty lies in choosing the type of classes (see chart 1 and fig. 2) which will render the biological characteristics of the material examined, most evident. The classes must be so selected that the frequency maxima appertaining to a definite group of nuclei sizes are not separated into two classes. Were it possible to assume that plotting would result in single peaked geometrical curves, their centres could be calculated geometrically. Where, however, this assumption does not apply, the right classification must be found empirically.

When making caryometric examinations of tissue cultures, the author most frequently applies the method described in this paper.

### Literatur

*Bucher O.*, Kernmessungen an Gewebekulturen. Verh. Anat. an Schweiz. Hochsch., Fribourg 1949; ref. Schweiz. med. Wsch. 1950. — Derselbe und *Gattiker R.*, Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen II. Die Kerngrößenverhältnisse in der unbehandelten Bindegewebekultur. Acta Anat. (im Druck). — Derselbe und *Horisberger B.*, Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen I. Zur Methodik der Kerngrößenmessung in Deckglaskulturen. Acta Anat. **9** (1950): 258—278. — *Demuth F.*, Einwirkung chemischer Stoffe auf Zellen in Gewebekulturen. Verh. Dtsch. Pathol. Ges. (1931): 95 bis 107. — *Dogliotte G. C.*, L'indice nucleo plasmatico nelle cellule coltivate „in vitro“ Arch. exper. Zellforsch. **3** (1927): 242—249. — *Freerksen E.*, Ein neuer Beweis für das rhythmische Wachstum der Kerne durch vergleichende volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen vom Meerschweinchen und Kaninchen. Z. Zellforsch. **18** (1933): 362—399. — *Gaillard P. J.*, Hormones regulating Growth and Differentiation in Embryonic Explants. Actualités scientifiques et industrielles, „Causal and Chemical Embryology“. Publié sous la direction de J. Needham, Paris 1942. — Derselbe und *Bakker J. H.*, Ned. Tijdschr. Geneesk. **82** (1938): 5; zitiert nach Gaillard 1942. — *Hertwig G.*, Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung. Anat. Anz. **87** (1938): 65—73. — *Hintzsche E.*, Statistische Probleme aus der Kerngrößenforschung. Experientia **1** (1945): 103—110. — Derselbe, Über Normalkurven der Kerngrößenverteilung. Mitt. Naturforsch. Ges. Bern, N. F., **4** (1946): 19—27. — Derselbe, Biologische Statistik durch materialgerechte Klasseneinteilung. Z. schweiz. Statistik u. Volkswirtsch. **82** (1946): 433—443. — *Jacobj W.*, Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Roux' Arch. Entw.mechan. **106** (1925): 124—192. — Derselbe, Die Zellkerngröße beim Menschen. Ein Beitrag zur quantitativen Biologie. Z. mikroskop.-anat. Forsch. **38** (1935): 161—240. — Derselbe, Die verschiedenen Arten des gesetzmäßigen Zellwachstums und ihre Beziehung zu Zellfunktion, Umwelt, Krankheit, maligner Geschwulstbildung und innerem Bauplan. Roux' Arch. Entw.mechan. **141** (1941): 584—692. — *v. Möllendorff W* und *M.*, Das Fibrocytennetz im lockeren Bindegewebe; seine Wandlungsfähigkeit und Anteilnahme am Stoffwechsel. Z. Zellforsch. **3** (1926): 503—601. — *Roulet F.*, Methoden der pathologischen Histologie. Wien 1948. — *Schwarz A.*, Über den Umgang mit Zahlen. Berlin und München 1943. — *Wermel E. M.* und *Ignatjewa Z. P.*, Studien über Zellengröße und Zellenwachstum: I. Über die Größenvariabilität der Zellkerne verschiedener Gewebearten. Z. Zellforsch. **16** (1932): 674—688; II. Über die Veränderungen der Zellgrößen bei Gewebeeplantation. Z. Zellforsch. **16** (1932): 689—706. — Derselbe und *Portugalow W W.*, Studien über Zellengröße und Zellenwachstum: XII. Über den Nachweis des rhythmischen Zellenwachstums. Z. Zellforsch. **22** (1935): 185—194. — *Willingseder P.*, Karyometrik. Mikroskopie **3** (1948), 7/8: 243—250. — *Willigens Ch.*, Methode zur Bestimmung der wichtigsten Merkmale einer statistischen Zahlenreihe. Z. schweiz. Statist. u. Volkswirtsch. **68** (1932): 445—454. — Derselbe, Eine moderne Methode zur Untersuchung von Zahlenreihen. Z. schweiz. Statist. u. Volkswirtsch. **69** (1933): 125—136.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Bucher Otto

Artikel/Article: [Zur Methodik karyometrischer Untersuchungen an Gewebekulturen. 124-131](#)