- 5. Fluorescence microscopy shows the histological details of the epidermis very clearly by way of the various tones of colour.
- 6. In addition, fluorescence microscopy sometimes permits conclusions to be drawn on the chemical character of substances. This result cannot be obtained by other histological methods.

Literatur

Bejdl W., Mikroskopie 4 (1949): 28. — Bommer S., Derm. Wsch. 82 (1926): 37. — Hoepke H., Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen III/1. Springer, Berlin 1927. — Merk L., Wr. med. Wsch. (1902). — Patzelt V., Z. mikroskop.-anat. Forsch. 5 (1926): 371; ebd. 17 (1929): 253. — Derselbe und Pernkopf E., Die Haut- und Geschlechtskrankheiten 1. 1933. — Reichert C., Fluoreszenzmikroskopic mit Fluorochromen. Wien 1944. — Rabl H., Arch. mikroskop. Anat. 48 (1897) 430. — Schaffer J., Lehrbuch der Histologie und Histogenese. Engelmann, Leipzig 1922. — Derselbe, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen II/1. Springer, Berlin 1927. — Schmidtmann M., Z. ges. exp. Med. 45 (1925). — Schumacher F. und Unna P G., Lebensvorgänge in der Haut des Menschen und der Tiere. Deuticke. Leipzig-Wien 1925. — Sjöstrand F., Acta anat. Supl. ad I (1944): 1. — Stockinger L., Mikroskopie 4 (1949): 53. — Strugger S., Flora, neue Folge, 35 (1941/42): 101. — Stübel H., Pflügers Arch. ges. Phys. 142 (1911): 1. — Unna P G., Histochemie der Haut. Deuticke, Leipzig-Wien 1928. — Weidenreich F., Arch. mikroskop. Anat. 57 (1901): 583. — Zeiger K., Z. mikroskop. Anat. 23 (1936) 431; ebd. 24 (1936): 11. — Derselbe, Physikochemische Grundlage der histologischen Methodik. Steinkopf, Dresden-Leipzig 1938. Physikochemische Grundlage der histologischen Methodik. Steinkopf, Dresden-Leipzig 1938. — Derselbe, Schr. Königsbg. Gelehrten Ges., Naturwiss. Kl. 18 (1942): 31.

(Aus der chirurgischen Universitätsklinik Bologna. Direktor: Prof. G. G. Forni)

BEITRAG ZUM STUDIUM DER TUMORZELLEN IM ELEKTRONENMIKROSKOP

Von LUIGI PIACENTINI

Vortrag, gehalten bei der Zweiten Österreichischen Krebstagung in Graz am 25. und 26. Mai 1950

Mit 5 Abbildungen

Das Elektronenmikroskop (E.-M.) gestattet mit seinen weit über denen der optischen Mikroskope liegenden Vergrößerungsmöglichkeiten und seiner hundertmal höheren Auflösungsfähigkeit die Durchführung genauer Untersuchungen biologischer Art und die Erreichung wahrhaft wertvoller Ergebnisse, Die Forschungen dieser Art werden immer intensiver, und die betreffenden Veröffentlichungen nehmen an Zahl dauernd zu, wenn sie auch bei dem augenblicklichen Stand der Methode noch nicht in jedem Fall endgültige Deutungen und Schlüsse zulassen.

Das E.-M., das sich auf von den gewöhnlichen optischen Vergrößerungsgeräten ganz verschiedene physikalische Prinzipien stützt, setzt auch in der Vorbereitung des zu prüfenden Materials eine vollkommen andere Technik voraus. Es setzt den Forschungsmöglichkeiten gewisse Grenzen, vor allem im Hinblick auf die Notwendigkeit, das für den Durchgang der Elektronen unerläßliche hohe Vakuum zu schaffen, die gebräuchlichen Objektträger auszuschließen und sich nicht der gewöhnlichen histologischen Schnitte zu bedienen, da nur Schnitte mit einer Stärke von Bruchteilen eines Mikrons, die nur mit Hilfe eines Ultramikrotoms erhalten werden können, elektronendurchlässig sind. Wenn man die neueren Arbeiten vor allem auf dem Gebiet der Mikrobiologie und der normalen und pathologischen Zytologie prüft, so kann man gerade das Bestreben der Forscher feststellen, eine bessere Vorbereitungstechnik zu finden, durch die man vermeiden will, daß die Fixierungs- und Montagemethode des zu prüfenden Materials in irgendeiner Weise verändert wird.

242 Boerner, Piacentini Seit Beginn der Forschungen durch JAKOB (1942) haben sich bis zu den neuesten Arbeiten von CLAUDE, PORTER, FULLAM, BESSIS, BERNHARD und anderen die Arbeitsmethoden so verbessert, daß die Zellbilder immer klarer wurden und daß das im Gegensatz zum Zellkern durchlässige Protoplasma in Einzelheiten seiner innersten Struktur, die früher unbekannt waren, bekanntgeworden ist.

So erscheint die schon von JAKOB behauptete Wabenstruktur des Protoplasmas von dem Fixierungsmittel (Formol) abhängig, und zytoplasmatische Bilder, die früher für die lebende Zelle konstant gehalten wurden, werden heute einfach als Ergebnis der Fixierung und der Methode angesehen. CLAUDE hat als erster mit dem aufmerksamen Studium der Tumorzellen (Hühnergeschwülste I und 10, Lymphosarkom der Ratten) und ihrer Hauptbestandteile im E.-M. begonnen und bedeutungsvolle Ergebnisse erzielt, die zum großen Teil durch gleichzeitige zytochemische Untersuchungen bestätigt wurden. Photographien von Zellen, die mit Osmiumsäuredämpfen oder einer 2%igen Lösung dieser Säure fixiert wurden, haben gezeigt, daß außer den bekannten Bestandteilen der Zelle (Kern, Chondrosome, Fetttröpfchen usw.) noch mikroskopisch unsichtbare Kügelchen im Protoplasma konstant vorhanden sind, die der genannte Forscher als Mikrosome bezeichnete. Bei einem Durchmesser von etwa 100 bis 200 mu sollen sie 15 bis 20% der Zellmasse ausmachen und zum größten Teil aus Phosphorlipoiden und Kernproteinen des Ribose-Typs zusammengesetzt sein. Bei diesen Tumorzellen hat CLAUDE kleine Bestandteile von einheitlichen Ausmaßen mit einem Durchmesser von 60 bis 80 mu, vorgefunden und beschrieben, die, den Kolonien der Staphylokokken ähnlich, Anhäufungen, isoliert oder gepaart erscheinen und als Tumorvirus angesehen werden, jedenfalls aber als normale Bestandteile dieser Art Tumorzellen zu betrachten sind.

Beobachtungen über von menschlichen Tumoren stammendes Material im E.-M. sind nur von GESSLER und seinen Mitarbeitern (1947/48) sowie von FER-NANDEZ-MORAN (1948) gemacht worden, jedoch mit weniger stichhaltigen Ergebnissen, als CLAUDE erzielte.

Das Fehlen von Untersuchungen über isolierte menschliche Tumorzellen in der noch zu jungen einschlägigen Literatur, abgesehen von der Arbeit von FERNÁNDEZ-MORÁN über Gehirngeschwülste, hat mich veranlaßt, mich mit dieser Frage zu beschäftigen, um bei solchen Zellen das Vorhandensein besonderer, mit den gewöhnlichen Hilfsmitteln der Optik nicht feststellbarer Strukturen nachzuprüfen. Diese Forschung hat vor allem im Hinblick auf die Isolierung der Tumorzellen, auf die Auswahl des geeignetsten Fixierungsmittels und auf das Aufbringen der zu untersuchenden Teilchen, die eine für den Durchgang der Elektronen geeignete Dicke haben müssen, auf das Objektträgernetz Schwierigkeiten bereitet.

In einer früheren Arbeit (1949) haben wir die angewendete Technik und die nach Fixierung mit Formol erzielten Ergebnisse dargestellt. Obgleich die Bilder die bei diesem Fixierungsmittel typischen Merkmale zeigten (Vakuolen, wabenartiger Aufbau), so haben sie doch auch einige den bösartigen Tumorzellen eigene Merkmale klargelegt: ungeordnete Trabekulatur des Protoplasmas, Randhöhlungen verschiedener Form und Größe, Zytoplasmaschollen von veränderlicher Dichte und unregelmäßiger Oberfläche, Reichhaltigkeit an undurchlässigen, meist rundlichen Körpern, wahrscheinlich Mitochondrien (Abb. 1). Diese Körper zeigen eine einheitliche Größe und erscheinen isoliert oder in mehr oder weniger zahlreichen Anhäufungen verschiedener Größe und mit wechselnder Dichte. Einige Anhäufungen sind in ihrer Gesamtheit für Elektronen undurchlässig, andere besitzen kleinere oder größere Zonen stärkerer Verdickungen, die oft nur auf die Peripherie beschränkt sind, so daß man an die Existenz einer Membran denken kann.

Kürzlich haben wir, unter Beibehaltung der alten Technik für die Isolierung

der Tumorzellen, das Formol als Fixierungsmittel durch Osmiumsäure (Dämpfe oder 2%ige Lösung) ersetzt, da wir überzeugt waren, daß wir nach den guten Resultaten, die CLAUDE und seine Mitarbeiter mit dieser Methode erzielen konnten, ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse damit erhalten würden.

Das zu prüfende Material, das in Tyrode, die die roten Blutkörperchen ausscheidet, angesetzt war, wird 5 bis 15 Minuten lang in einer 2%igen wäßrigen Osmiumsäurelösung fixiert. Nach wiederholter Waschung mit destilliertem Wasser wird es in kleinen Tropfen mit Hilfe einer Pasteurschen Pipette auf das Objektträgernetz verteilt und dann zur Eintrocknung gebracht (P_2O_5). Die Fixierung des Materials, das nach Ansetzung in Tyrode schon auf den Objektträger gebracht wurde, kann durch Anwendung der Dämpfe einer 2%igen Osmiumsäurelösung für 10 bis 15 Minuten und nachfolgender Waschung des so fixierten Präparates in destilliertem Wasser durchgeführt werden.

Bei dieser Fixierungsmethode erscheint das Protoplasma, das meist gewundene Umrisse zeigt, nicht mehr mit Vakuolen, sondern mit einer gleichförmigeren, regelmäßigeren Struktur (Abb. 2-3). In der Perinuklearzone werden fast in Berührung mit dem Kern mehr oder weniger rundliche, vereinzelte oder angehäufte Granula bemerkt, die gegen das Protoplasma wegen ihrer dunklen, wenn nicht direkt schwarzen Farbe recht deutlich hervortreten. Die größten Granula stellen wahrscheinlich durch Osmiumsäure reduzierte Lipoide dar; die weniger umfangreichen müssen vermutlich als Mitochondrien angesehen werden, soweit sie rundlich sind, und als Chondriokonten. wenn sie länglich oder fadenförmig sind (Abb. 4-5). Nach der Peripherie hin zeigt das Protoplasma in Verbindung mit einer zunehmenden Verminderung der Anzahl der Granula eine deutliche feine Netzstruktur, deren längste und am besten sichtbare Fibrillen meistens sternförmig ausstrahlen. Charakteristisch ist weiterhin das Vorhandensein kleiner rundlicher Kügelchen (manchmal Bläschen), die ungeordnet oder längs der Fibrillen verteilt sind, ziemlich einheitliche Ausmaße haben (Durchmesser etwa 100 mu) und den Mikrosomen von CLAUDE, PORTER und FULLAM zu entsprechen scheinen, welche als konstante Bestandteile des Protoplasmas betrachtet werden. Im Gegensatz zu der kürzlich (1948) von MONNÉ ausgesprochenen Meinung glauben wir nicht, die Mikrosomen mit den Chromidien identifizieren zu können, die ziemlich regelmäßige kugelförmige Bildungen mit einem Durchmesser von 120 bis 150 mu darstellen und von einigen Autoren (LEHMANN) als autoreproduktive Elemente, Biosomen, und von anderen (CLAUDE) als unbestimmte, vielleicht artifizielle Protoplasmainklusionen angesehen werden.

Diese Resultate, die mit menschlichen, gleich nach der operativen Herausnahme des Tumors isolierten und fixierten Tumorzellen erzielt wurden, zeigen, daß die Struktur dieser Zellen der analog ist, die von CLAUDE und seinen Mitarbeitern bei in vitro kultivierten Sarkomzellen des Huhnes beobachtet wurden (feine Netzstruktur, Mikrosomen, Mitochondrien, Chondriokonten), wenn man davon absieht, daß bei unseren Präparaten die Teilchen fehlten, die von den genannten Forschern als Virus beschrieben wurden.

Die Ergebnisse, über die hier berichtet wird, stammen aus Untersuchungen, die sich noch in ihrem Anfangsstadium befinden, und gestatten daher nicht die Formulierung irgendwelcher endgültiger Urteile über die innerste Natur der menschlichen Tumorzellen. Dies um so weniger, als die zu ihrer Vergleichung mit normalen oder von gutartigen Geschwulstgeweben herstammenden Bestandteilen erforderliche Arbeit noch in der Ausführung ist. Hiezu kommt, daß die Frage der Fixierung, wie BESSIS richtig sagt, "noch weit von der Lösung entfernt ist und erst eine auf zahlreiche Versuche gestützte kritische Prüfung es ermöglichen wird, sich eine Meinung zu bilden, um unter allen untersuchten Artefakten diejenigen anzugeben, die der Wirklichkeit am nächsten kommen".

Abb. 1. Zelle eines Rektumkarzinoms.

Aussehen des vakuolisierten Protoplasmas. Unregelmäßige Anhäufungen zytoplasmatischer Substanz. Vereinzelte oder gruppierte rundliche Körper (Mitochondrien?). Formolfxierung. Vergrößer. 10.000:1.

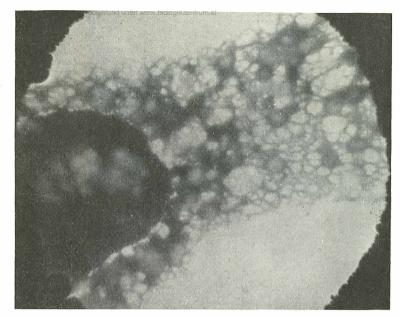
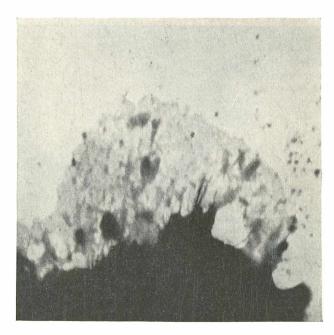


Abb. 2. Zelle eines Magen-karzinoms.

Netzstruktur des Protoplasmas. Perinukleare Körnchen, wahrscheinlich lipoide. Mitochondrien. Fixierung mit 20/0iger Osmiumsäure. Vergrößerung 9500:1.



Wenn auch alle diese Ungewißheiten bestehen, so kann man doch sagen, daß durch die beschriebenen Methoden die Isolierung der menschlichen Tumorzellen und ihr Studium im E.-M. möglich geworden ist, obgleich dieselben wegen ihrer Dicke für Forschungen dieser Art keine günstigen Bedingungen bieten. Die Einheitlichkeit der erhaltenen Bilder, vor allem betreffs der protoplasmatischen Struktur, die sich mit den von anderen Autoren erzielten Ergebnissen in vollem Einklang befindet,

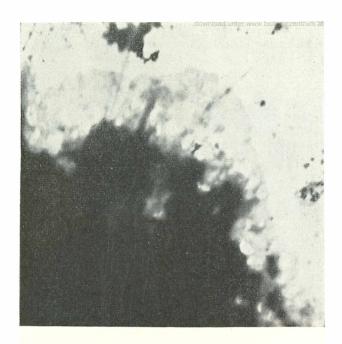


Abb. 3. Zelle eines Rektum-karzinoms.

In der Perinuklearzone große, undurchlässige Körnchen. Einförmiges Aussehen des Protoplasmas. Fixierung mit 20/oiger Osmiumsäure. Vergrößerung 8800:1.



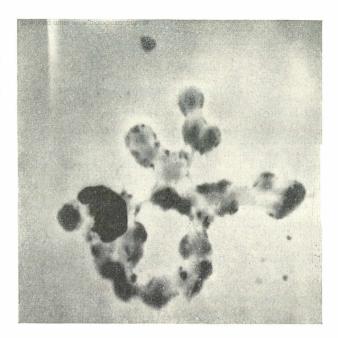
Abb. 4. Magenkarzinom-Präparat.

In seinem Unterteil abgebrochener Chondriokont. Fixierung mit 20/0iger Osmiumsäure. Vergrößerung 8000:1.

sowie die Feststellungen über die Unterschiede zwischen normalen Gewebezellen und gut- oder bösartigen Tumorzellen, worüber hier nicht berichtet wird, weil sich diese Untersuchungen noch im Anfangsstadium befinden, beweisen, daß das E.-M. für das Studium der Tumorzelle sowohl vom Standpunkt der Morphologie wie von dem der Biologie positive Möglichkeiten bietet.

Abb. 5. Magenkarzinom-Präbarat.

Eine Gruppe kettenförmig verteilter Mitochondrien. Verdichtung des Randes (Kapsel) und des Zentrums uller Körnchen. Fixierung mit 20/0jeger Osmiumsäure. Vergrößerung 8700: 1.



Zusammenfassung

Der Verfasser stellt die ersten Ergebnisse dar, die er beim Studium einzelner, aus menschlichen Tumorgeweben stammender Zellen im E.-M. erzielt hat. Besondere Verfahren zur Isolierung und Präparierung des Untersuchungsmaterials, wodurch die besonderen Schwierigkeiten der Beobachtung im E.-M., das auf von den gewöhnlichen Vergrößerungsgeräten ganz verschiedenen physikalischen Grundsätzen aufgebaut ist, überwunden wurden, haben diese Forschungen möglich gemacht.

Der Verfasser beschreibt die wichtigsten Merkmale, die die Struktur des Protoplasmas bei Fixierung mit Formol (hierüber schon frühere Veröffentlichung des Verfassers) und mit Osmiumsäure zeigt.

Obgleich sich die Studien noch in ihrem Anfangsstadium befinden und sonstige Untersuchungen dieser Art über einzelne menschliche Tumorzellen noch nicht vorliegen, gehen aus den erzielten Ergebnissen doch schon die positiven Möglichkeiten hervor, die das E.-M. für das Studium des inneren physisch-chemischen Aufbaues des Protoplasmas hinsichtlich der Unterscheidung seiner normalen von den (gut- und bösartigen) geschwulstbildenden Zellen bietet.

Summary

The author reports upon the early results he obtained with the Electronic Microscope in studying some isolate cells coming from human tumoral tissue. His research has become possible by means of special proceedings used for the isolation and preparation of the material, in order to overcome the difficulties peculiar to the observation in the Electronic Microscope which is based on physical principles very different from the usual means of magnification.

He describes the main features of protoplasma structure after fixation with formol

(already explained in a former work) and with osmic acid.

Though this inquiry is still in its opening phase and has no precedings in investigations of this kind on isolate human tumor cells, the result obtained shows the possibilities the Electronic Microscope offers for a research on the internal physico-chemical constitution of protoplasma especially with regard to the discrimination of normal cells from the (innocent and malignant) tumoral ones.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und

<u>Methodik</u>

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: 5

Autor(en)/Author(s): Piacentini Luigi

Artikel/Article: Beitrag zum Studium der Tumorzellen im Elektronenmikroskop.

<u>242-247</u>