

Experimentelle Untersuchungen zur ultraschwachen Photonenemission biologischer Systeme

Experimental Investigations on Ultraweak Photonemission from Biological Systems

B. Ruth und F. A. Popp

Radiologiezentrum der Universität Marburg, Theoretische und Experimentelle Radiologie

(Z. Naturforsch. 31 c, 741–745 [1976]; eingegangen am 5. März/14. Juli 1976)

Ultraweak Photoemission, Biological Systems, Cell Communication

Measurements on untreated yeast cells, potato- and cucumber seedlings have confirmed the existence of photon emission from biological systems known as "ultraweak luminescence". The intensity is of the order of 10^2 counts per second, and the spectral distribution shows a maximum near 550 nm. The dependence of the photon emission on certain chemicals has been investigated. Some chemicals, as for instance acetone, intensify the photon emission from cucumber seedlings without essential change of the spectral distribution. On the other hand, NaCl leads to a shift to the red region of the spectrum. The treatment of EAT-cells by 4-Hydroperoxycyclofosfamide involves a nonlinear enhancement of the intensity with increasing concentration. There are some indications that collective interactions of the system are more appropriate than simple chemiluminescence reactions.

Einleitung

Ultraschwache Photonenemission aus biologischen Systemen, auch als „ultraschwache Lumineszenz“ bekannt¹, wird seit mehr als zwanzig Jahren erforscht. Sie unterscheidet sich von der gewöhnlichen Biolumineszenz¹: (1) Bis auf wenige Ausnahmen – zum Beispiel bei einigen Algen, Bakterien und Protozoen – wurde die Strahlung in allen untersuchten pflanzlichen und tierischen Zellen nachgewiesen¹. (2) Die Intensität der Strahlung liegt in der Größenordnung einiger hundert bis tausend Photonen pro cm^2 und pro sec^1 . (3) Die Energien der vom Zellverband ausgestrahlten Photonen bilden ein Kontinuum im Spektralbereich des sichtbaren Lichts bis an die langwellige Grenze des Ultraviolett. Die maximale Intensität liegt um 550 nm (2,3 eV), die bis zu einer Grenzwellenlänge um 350 nm (3,5 eV) stetig abfällt^{2, 3}.

Weitere physikalische Eigenschaften der Biophotonen – wie zum Beispiel die Polarisation –, sowie Ursprung und biologische Bedeutung sind bis heute unbekannt.

Über die gesicherten Eigenschaften (1) bis (3) hinaus gibt es Hinweise, daß (4) die Mitochondrien unter Sauerstoffverbrauch UV-Strahlung erzeugen^{4, 5}, (5) der Fluoreszenz von Tryptophan bei 350 nm (3,5 eV) eine besondere Bedeutung zu-

kommt⁶, (6) im Gegensatz zur Biolumineszenz die ultraschwache Lumineszenz in höherentwickelten Organismen stärker ausgeprägt ist als in entwicklungsgeschichtlich vergleichsweise niedriger organisierten Arten¹, (7) die Strahlung Zellteilungen beeinflusst⁷, zur Kommunikation zwischen den Zellen verwendet wird und dabei möglicherweise genetische Information überträgt⁸, (8) die Zellen vor der Mitose am stärksten Photonen aussenden⁹, und ferner eine Sekundärstrahlung im Gewebe verstärkt werden kann, die sich mit einigen zehn Metern pro Sekunde fortpflanzt¹⁰ und (9) Krebsgewebe intensive Strahlenquellen sind¹¹.

Material und Methode

Zur Untersuchung ultraschwacher Photonenemission wird ein Photomultiplier (PM) vom Typ EMI 9558QB mit einer S-20-Q-Kathode (Durchmesser 44 mm) durch eine Diskriminatorschaltung als Photonen-zähler benutzt^{12–14}.

Bei einer Temperatur von -40°C erreicht der PM eine Dunkelzählrate von 40 cps (counts per second). Ein Chopper vor dem PM ermöglicht, sowohl die Dunkelzählrate zu registrieren – wenn die Chopperscheibe den PM verdeckt – als auch die Offenzählrate, wenn der PM von der Chopperscheibe freigegeben wird. Das geschieht innerhalb eines Chopperzyklus von einer Sekunde. Zwei Zähler addieren die beiden Zählraten getrennt während eines Meßintervalls (1s bis $2^{11}\text{s} \approx 34\text{ min}$) auf. Die Differenz ergibt die Photonen-zählrate^{15, 16}. Auf diese

Weise wird der Fehler durch Schwankungen der Dunkelzählrate herabgesetzt. PM-Spannung und Diskriminatorschwelle werden auf optimales Signal-Rausch-Verhältnis eingestellt¹⁷.

Zur Eichung wird das Licht einer Jod-Quarz-Lampe durch Neutralfilter auf eine Intensität in der Größenordnung der erwarteten Lichtintensitäten der biologischen Objekte abgeschwächt. Die ermittelten Quantenausbeuten der Apparatur haben zwischen der Wellenlängen von 736 nm bis 500 nm innerhalb der Fehlergrenzen die gleichen Werte, wie sie der Hersteller angibt¹⁸. Deshalb werden für den gesamten Spektralbereich die Werte der Quantenausbeute dem Katalog entnommen.

Für den Nachweis eines Photonenstromes von 29 Photonen/s braucht man beispielsweise bei 543 nm (entsprechend einer Stromdichte von 1,9 Photonen/(s·cm²)) auf einem Signifikanzniveau von 99,9% eine Meßzeit von etwa sechs Stunden.

Die Quarzküvette befindet sich 13 cm vor der PM-Kathode in Meßposition innerhalb eines von innen verspiegelten Ellipsoids, das die Strahlung auf die PM-Kathode konzentrieren soll. Der effektive Raumwinkel ist – wie die Reflexion auch – von der Wellenlänge abhängig und liegt zwischen 1,16 bei 331,5 nm und 1,64 bei 736 nm. Die Küvette selbst zeigt eine Aktivität von $2 \pm 0,5$ cps. Nach zwölf Stunden Dunkelheit registriert man noch $0,7 \pm 0,3$ cps.

Bei der Messung der Photonenzählraten wird die Küvette zur ständigen Kontrolle des Nullpunkts in einen Schacht unterhalb der Meßposition geschoben, so daß kein Licht aus der Küvette auf die PM-Kathode fallen kann. Zum Ausmessen des Spektrums werden Interferenzfilter im Bereich von 331,5 nm bis 736 nm zwischen Ellipsoid und Chopper eingeschoben. Danach wird die Zählrate bestimmt. Das Spektrum wird jeweils auf die Gesamtzählrate normiert.

Ergebnisse

In Anknüpfung an die Experimente von Konev⁹ wurde zunächst Photonenemission bei Hefezellen *Torula utilis* nachgewiesen. Zellen in der Nährlösung „Rider's Medium“ mit einer Zelldichte von 12000/mm³ bzw. 20000/mm³ zeigten Photonenzählraten von 19 resp. 13 cps. In Fällen, bei denen keine Photonenemission festgestellt werden konnte, erwies es sich, daß die Zellen nicht gewachsen waren.

In weiteren Versuchen wurden Tradescantiapflanzen untersucht, die nach stärkerer Anfangsaktivität im Verlauf einiger Stunden mit etwa 80 cps strahlten.

Kartoffelkeime von 1 cm Länge, die zusammen mit einem Stück Kartoffelknolle in das Ellipsoid gebracht worden waren, wiesen einen Aktivitätsverlauf auf, wie er als Beispiel in Abb. 1 dargestellt ist. Die Photonenemission hielt auch nach vier Tagen noch an. Zum Vergleich wurden Keime gekocht, in Aceton gelegt, getrocknet und am nächsten Tag auf ihre Aktivität hin untersucht. Ihre Photonenemission nahm ständig ab (Abb. 1). Wurden diese Keime noch zusätzlich im Mörser zerrieben, dann fiel ihre Aktivität wesentlich rascher ab (Abb. 1).

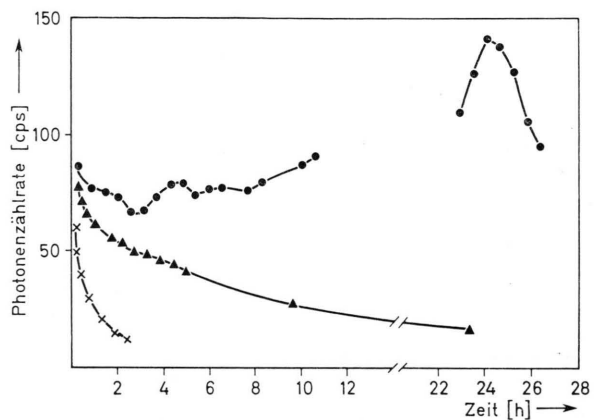


Abb. 1. Zeitabhängigkeit der Photonenemission von unbehandelten (●●●), mit Aceton behandelten (▲▲▲) und zusätzlich im Mörser zerriebenen (×××) Kartoffelkeimen.

Als weiteres biologisches Objekt wurden etwa 2 cm lange Gurkenkeime benutzt, die in vollständiger Dunkelheit gewachsen waren. Bei schwachem Rotlicht in das Ellipsoid gebracht, nahm die Photonenaktivität von Anfangswerten um 300 cps im Laufe einiger Stunden auf 100 bis 200 cps ab. Diese Aktivität hielt dann 24 Stunden und länger an. Sie war von Keim zu Keim sehr unterschiedlich, und auch hier traten unregelmäßige Intensitätsschwankungen auf. Während der Messungen waren die Keime auf Längen zwischen drei und fünf cm angewachsen. Getrocknete Gurkenkeime hatten noch eine Aktivität von etwa 20 cps.

Aus Abb. 2 ist zu erkennen, daß das Spektrum seine Hauptkomponente bei etwa 550 nm hat. Im Langwelligen ist ein Wiederanstieg der Photonenintensität festzustellen. Bei den Wellenlängen 400 nm und 369 nm konnte dagegen keine Photonenemission nachgewiesen werden. Möglicherweise werden aber im kurzwelligen Bereich selbst noch unter

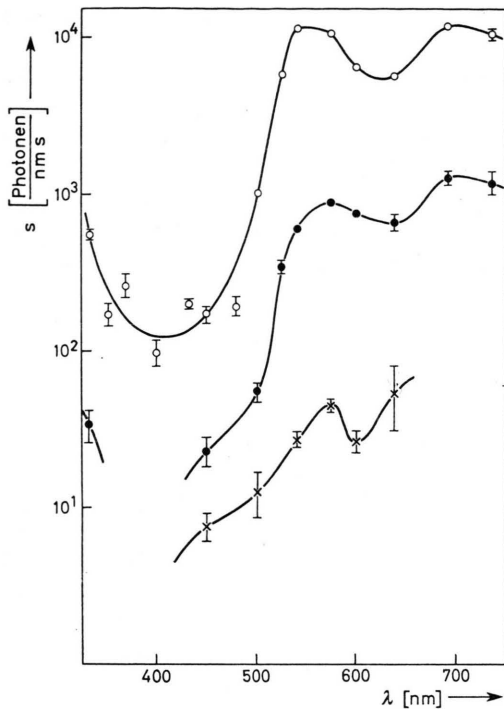


Abb. 2. Spektrale Intensität S von unbehandelten ($\times \times \times$, normiert auf 100 cps), mit Cialit ($\bullet \bullet \bullet$, normiert auf 1000 cps) und mit Aceton behandelten ($\circ \circ \circ$, normiert auf 10000 cps) Gurkenkeimen.

350 nm Photonen emittiert. Eine der beiden Messungen bei 331,5 nm wies darauf hin. Ein zweifelsfreier Nachweis war nicht möglich.

Chemikalien können die Photonenemission beträchtlich ändern. Bei Zugabe von Aceton steigt die Gesamtaktivität der Gurkenkeime auf über 10000 cps an, bei Cialit^R-Lösung (2-Äthyl-Quecksilbermercaptobenzoxazol-5-carbonsauerer Natrium, 1 mg/ml) über 1000 cps, bei gesättigter NaCl-Lösung auf 500 bis 1000 cps und bei Äthanol auf 300 bis 500 cps. Damit vergrößert sich die Intensität bis zu einem Faktor um 100. Der zeitliche Verlauf der Photonenemission ist sehr unterschiedlich: Bei Aceton und Äthanol sinkt die Zählrate nach hoher Anfangsintensität langsam ab. Bei NaCl und Cialit dagegen steigt die Gesamtaktivität vom Wert unbehandelter Keime nach einer Latenzzeit unterschiedlicher Dauer (10 min bis 1 h) auf die angegebenen Werte. Bei NaCl kann der Anstieg sehr sprunghaft erfolgen. Auch nach Erreichen einer Sättigungsaktivität treten zuweilen starke Fluktuationen auf, die bis zu 10% der Gesamtaktivität betragen.

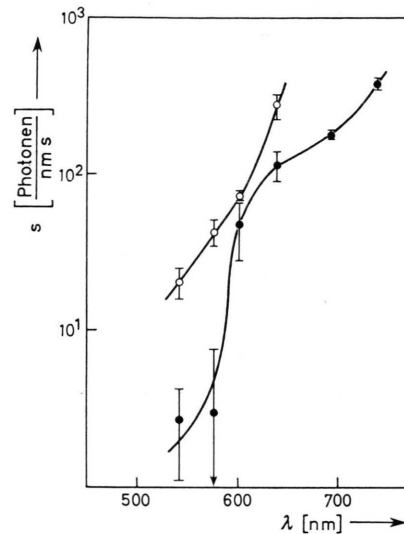


Abb. 3. Spektrale Intensität S der mit NaCl-Lösung behandelten Gurkenkeime ($\circ \circ \circ$, normiert auf 300 cps) und von Yoshida-Ascides-Tumorzellen, die mit 4-Hydroperoxy-cyclophosphamid versetzt sind ($\bullet \bullet \bullet$, normiert auf 100 cps). Der Pfeil am Fehlerbalken gibt an, daß der Nullpunkt noch innerhalb der Fehlergrenzen liegt.

sinken der Intensität bei 543 nm beobachtet, und bei Gurkenkeimen, die mit Aceton behandelt wurden, ist nach 18 h das Spektrum stärker geglättet und ins Langwellige verschoben.

Bei Yoshida-Ascites-Tumorzellen von Ratten und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen von Mäusen trat eine Aktivität von 2 ± 1 cps bzw. 3 ± 1 cps auf. Nach Zugabe von Cyclophosphamid (2 mg/ml bei Rattentumoren, 4 mg/ml bei Mäusetumoren) änderte sich die Photonenemission nicht wesentlich, ebenso wenig wie nach Zusatz von Ifosfamid und Trofosfamid (16 mg/ml bzw. 2 mg/ml), jeweils nur zu EAT-Zellen von Mäusen. Dagegen stieg die Photonenemission nach Zusatz des Metabolisierungsproduktes 4-Hydroperoxy-Cyclophosphamid (4HPCP) bis auf über 1000 cps bei beiden Tumorarten an.

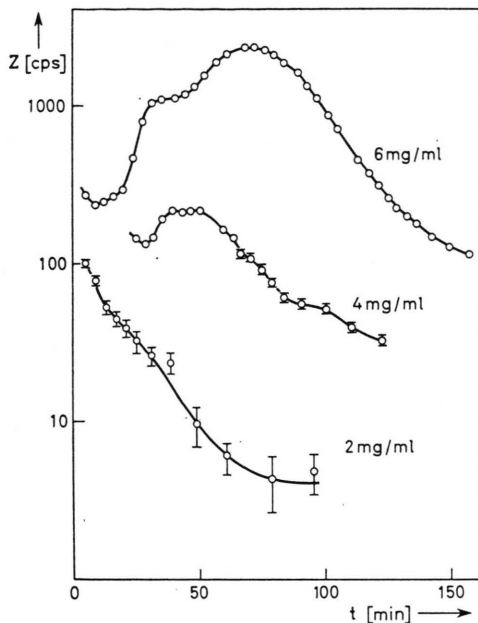


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Gesamtintensität bei Yoshida-Ascites-Tumorzellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von 4-Hydroperoxycyclophosphamid behandelt werden.

In Abb. 4 ist der zeitliche Verlauf der Gesamtaktivität für verschiedene Konzentrationen von 4HPCP in Yoshida-Ascites-Tumorzellen von Ratten aufgetragen. Größenordnung und Struktur der Wirkungskurven sind reproduzierbar. Die Gesamtaktivität steigt im Verhältnis zur Konzentration überproportional an. Dieser Effekt kann auch nicht von einer chemischen Reaktion mit Wasser herrühren, wie Kontrollversuche zeigten. Mit Wasser vermengt gleichen die Zählraten den Aktivitäten bei dem Versuch mit Zellen und der geringsten Konzentration von 4HPCP (2 mg/ml). Das Spektrum der Photonenemission ist in Abb. 3 dargestellt. Photonen können erneut nur im Langwelligen nachgewiesen werden. Ehrlich-Ascites-Tumorzellen von Mäusen strahlen nach Zugabe von 4 mg/ml 4HPCP mit einer Anfangsaktivität von über 3000 cps.

Diskussion

Soweit von der Literatur her bekannt, bestätigen die Messungen die Existenz¹⁹, die Intensität¹ und das Spektrum² der ultraschwachen Photonenemission aus biologischen Systemen. Nicht bestätigt wer-

den konnte, daß Tumorzellen allgemein besonders stark strahlen.

Über die bekannten Ergebnisse hinaus zeigen sich bemerkenswerte Einflüsse verschiedener Agentien auf die Photonenemission, die noch weiter untersucht werden müssen. Intensität, zeitlicher Verlauf und Spektrum können unabhängig voneinander durch einige Chemikalien stark beeinflusst werden. Andere Substanzen dagegen ändern die Eigenschaften der natürlichen Emission offenbar nur geringfügig.

Daß es sich um biologische Erscheinungen handelt, die nicht einfach mit Chemilumineszenzreaktionen der zugegebenen Substanzen mit isolierbaren Bestandteilen der Zelle erklärt werden können, zeigt sich (1) an der (für biologische Systeme) typischen überproportionalen Dosisabhängigkeit (der Photonenintensität) (Abb. 4), (2) an der möglichen Erhaltung der spektralen Verteilung auch noch nach erheblicher Änderung der Intensitäten infolge der Einwirkung *verschiedener* Substanzen (Abb. 2) und (3) an gelegentlichen Fluktuationen im zeitlichen Verlauf der Photonenemission. Die letzte Erscheinung, die noch gründlicher untersucht werden muß, deutet kollektive Wechselwirkung des Zellverbandes an.

Besonderes Interesse verdient auch die UV-Komponente des Spektrums. Nach Messungen von Colli und Mitarbeitern² und nach den eigenen Untersuchungen unbehandelter Gurkenkeime kann zunächst eine obere Grenzenergie um 3 eV erwartet werden. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß eine Energiequelle in den Zellen ein Primärspektrum liefert, das sicher kurzwelliger ist als das gemessene. Ferner entziehen sich eventuell vorhandene niedrige Intensitäten in diesem Spektralbereich dem Nachweis mit der verwendeten Apparatur. Und schließlich legt die nachgewiesene UV-Komponente des sonst gleichartigen Spektrums nach der Behandlung der Gurkenkeime mit Aceton, Cialit (Abb. 2) und auch Äthanol den Schluß nahe, daß auch die natürliche Photonenemission Komponenten in diesem Spektralbereich hat. Konev konnte auch tatsächlich bei 300 nm sogar ein Maximum der Emission von Hefezellen feststellen⁹.

Weitergehende Betrachtungen gehen aus anderen Arbeiten hervor^{3, 20-22}.

Nach diesen — nun zweijährigen experimentellen — Erfahrungen schließen wir uns der Auffas-

sung Barenboims¹⁹ an: Die Lösung der damit verbundenen Probleme steht erst in der Anfangsphase.

Die Experimente wurden im Fachbereich Physikalische Chemie der Universität Marburg durchgeführt. Dafür danken wir den Herren Dr. Schreiber, Dr. Dechant, Petri und Prof. Försterling.

Für die Unterstützung bei den biologischen Problemen danken wir den Herren Prof. Schaumlöffel und Dr. Rüther.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung des Vorhabens.

- ¹ T. G. Mamedov, G. A. Popov u. S. V. Konev, *Biofizika* **14**, 1047 [1969].
- ² L. Colli, U. Facchini, G. Guidotti, R. Dugnani Lonati, M. Orsenigo u. O. Sommariva, *Experientia* **11**, 479 [1955].
- ³ B. Ruth, in Vorbereitung.
- ⁴ Yu. A. Vladimirov u. O. F. L'vova, *Biofizika* **9**, 506 [1964].
- ⁵ A. J. Zhuravlev, O. P. Tsylev u. S. M. Zubkova, *Biofizika* **18**, 1037 [1973].
- ⁶ S. V. Konev, T. J. Lyskova u. V. P. Bobrovich, *Biofizika* **8**, 433 [1963].
- ⁷ A. G. Gurwitsch u. L. D. Gurwitsch, *Die mitogenetische Strahlung*, Jena 1959.
- ⁸ V. P. Kaznacheev, V. V. Kamenskaya, L. A. Kulikova, Yu. A. Starinkin, V. Yu. Kulikov, M. S. Nabiulin u. D. N. Gusar, in: *Physical-Mathematical Methods in Biology and Medicine* (in Russian), Novosibirsk, pp. 36–37, 1965. — S. a. „bild der wissenschaft“ **6**, 2 [1973].
- ⁹ S. V. Konev, T. J. Lyskova u. G. D. Nisenbaum, *Biofizika* **11**, 361 [1966].
- ¹⁰ W. Loos, *Naturw. Rdsch.* **27**, 108 [1974].
- ¹¹ s. Sekundärliteratur bei ¹⁰.
- ¹² R. R. Alfano u. N. Ockman, *J. Opt. Soc. Am.* **58**, 90 [1968].
- ¹³ G. A. Morton, *Appl. Opt.* **7**, 1 [1968].
- ¹⁴ J. K. Nakamura u. S. E. Schwarz, *Appl. Opt.* **7**, 1073 [1968].
- ¹⁵ C. J. Oliver u. E. R. Pike, *Brit. J. Appl. Phys. Ser. 2* **1**, 1459 [1968].
- ¹⁶ M. R. Zatzik, *Research/Development* **21**, No. 11, 16 [1968].
- ¹⁷ M. Jonas u. Y. Alon, *Appl. Opt.* **10**, 2436 [1971].
- ¹⁸ EMI-Photomultiplier tubes, EMI-Electronics Ltd. 1970.
- ¹⁹ G. M. Barenboim, A. N. Domanskii u. K. K. Turoverov, *Luminescence of Biopolymers and Cells*, Plenum Press, New York-London 1969.
- ²⁰ F. A. Popp, *Biophotonen*, Schriftenreihe Krebsgeschehen **6** (1976), Verlag für Medizin, Heidelberg 1976.
- ²¹ F. A. Popp, *Molecular Base of Malignancy* (E. Deutsch, K. Moser, H. Rainer u. A. Stacher, eds.), Thieme, Stuttgart 1975.
- ²² F. A. Popp, B. Ruth, im Druck.