

# OSMOTISCHER DRUCK, ELEKTROLYTE UND GEWEBEZELLEN

VON **H. GROSSFELD**

(Aus dem Anatomischen Institut der Universität Turin)

Mit 9 Textfiguren

Eingegangen am 5. Mai 1936

Wenn es sich, wie in den vorliegenden Versuchen darum handelt, die unmittelbare Wirkung von Stoffen auf die Gewebezelle zu studieren, so eignet sich dazu die gewöhnlich geübte Methode, Gewebezellen in Blutplasma zu züchten, nicht. Denn der Vorteil, der aus der Isolierung der Zellen aus dem Organismus erwächst, wird dadurch aufgehoben, daß man die Zellen in eine Gallerte einschließt. Die Wirkung experimentell der Kultur zugesetzter Substanzen hängt dann von den Eigenschaften der Gallerte ab (Ladung, Porenweite; Sorption, Ionenaustausch, Mischung mit dem Synäretikum u. a.). Insbesondere kann man nicht in der Plasmagallerte eingeschlossene Gewebezellen in unmittelbarem Kontakt mit elektrolytfreien Medien, noch mit anderen genau definierten Stoffmengen bringen. Hierzu kommen nur flüssig gezüchtete Kulturen in Betracht, also solche deren Medium im Versuche jeweils entfernt und neuersetzt werden kann.

## Methode

Die für die Versuche angesetzten Fibroblasten und Epithelkulturen werden nach der Deckglasmethode flüssig gezüchtet und ihr Medium besteht aus Embryonalextrakt und Ringerscher Lösung im Verhältnis von 1:1,50, mit Zusatz von destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:7. Nach ungefähr 18—30stündigem Wachstum wird das Deckglas vom Objektträger abgehoben, das Züchtungsmedium mit der Pipette sorgfältig abgesaugt und mit der zu behandelnden Flüssigkeit mindestens dreimal rasch nacheinander gewaschen. Hierauf wird die Kultur in einen nicht zu kleinen (damit Reste des Züchtungsmediums hinreichend verdünnt werden) Tropfen des Versuchsmediums gebracht, über den Objektträger umgestülpt und umrandet. Dem Versuchsmedium wird oft Neutralrot im Verhältnis von  $1:10^4$ — $1:2 \times 10^4$  zugesetzt. Die Kultur wird dann unter das im Heizkasten befindliche Mikroskop gebracht und die unmittelbare Wirkung des Versuchsmediums auf die Zellen beobachtet. Nach beliebiger Zeit kann das Versuchsmedium wieder abpipettiert und die Kultur entweder in ein anderes Versuchsmedium oder in das frühere Züchtungsmedium gebracht werden. Soll die Beobachtung im Dunkelfeld geschehen, so wird ein entsprechend dünner Objektträger benutzt. Das pH des Versuchsmediums muß jeweils, am besten ionometrisch, geprüft werden, die Eindeutigkeit der Ergebnisse hängt davon ab.

## Versuche

1. Wird nach obigem Verfahren die Umgebung der Gewebezellen möglichst elektrolytfrei gemacht und die Kultur in destilliertes Wasser gebracht, so haben in der kurzen Zeit vom Abschluß des Versuches bis zum Ansehen der Kultur

im Mikroskop, also im Laufe von etwa 30 Sekunden, bereits die meisten Zellen der Kultur Kugelgestalt angenommen und im Zytoplasma der Zellen sind sämtliche vorhandenen Granula und „Vakuolen“ in lebhaft schwingende Bewegung (Brownsche Bewegung), die auch im Hellfeld sehr gut sichtbar ist, geraten, wie man sie in der Zelle sonst nie zu sehen bekommt. Die größeren Teilchen bewegen sich dabei langsamer als die kleineren — wie das ja bei Brownscher Bewegung zu erwarten ist. Nach weiteren Sekunden bis wenigen Minuten (die Zeit hängt vom Verfahren beim Wegwaschen der Elektrolytreste des Züchtungsmediums ab), sind alle Zellen (mit Ausnahme nur von solchen, die vor dem Versuche nicht mehr gelebt hatten) kugelförmig, wobei auch der Kern kugelige Gestalt angenommen hat. Die Brownsche Bewegung im Zytoplasma wird in den nächsten Minuten und Stunden immer lebhafter und kann zuweilen auch am nächsten Tage in gleicher Stärke beobachtet werden.

Im Dunkelfeld (Cardioid- oder Wechselkondensor) beobachtet, zeigt sich folgendes Bild: gleich zu Beginn der Abrundung erscheinen in vielen Zellen sehr große Vakuolen, die aber bald darauf verschwinden. Es geraten zuerst die vorhanden gewesenen Granula und Vakuolen in Brownsche Bewegung von verschiedener Lebhaftigkeit je nach ihrer Größe. Jedoch sind zu Anfang hier und da auch kugelförmig aber trotzdem in ihrem Innern optisch leere<sup>1)</sup> Zellen zu beobachten. In den nächsten Viertelstunden erscheinen in den Zellen neugebildete immer zahlreicher werdende Teilchen in Brownscher Bewegung, die mit der Zeit größer werden. Ihr Durchmesser ist oft in den verschiedenen Zellen ein verschiedener, aber in einer und derselben Zelle anscheinend gleich. In den einen Zellen vermehren sich bald die Teilchen zusehends, in anderen werden sie nur größer ohne sich in dem Maße zu vermehren. Die Teilchen sind also in verschiedenen Zellen verschieden zahlreich. Die Teilchen schwingen gleichmäßig im ganzen Zytoplasma und reichen bis zu einer schmalen Randzone desselben heran, an die sie in ihren Schwingungen oft anschlagen. Manchmal sind im Medium außerhalb der Zelle zahlreiche schwingende Teilchen vorhanden, die offenbar von geplatzten Zellen herrühren. Nach einiger Zeit zeigen manche Kugelzellen einen stark verkleinerten Durchmesser.

Die Deutung des beschriebenen Bildes erscheint zunächst nicht schwer. Es tritt Quellung und außerdem maximale Viskositätsherabsetzung des Zytoplasmas ein, die zur starken Brownschen Bewegung der vorhandenen Teilchen führt. Die Wasseraufnahme scheint jetzt bis zum Diffusionsgleichgewicht vor sich zu gehen. Bei zu rasch anwachsendem Innendruck erfolgt ein Platzen der Zelle. Außerdem beginnt nachher im Zytoplasma eine Dispersitätsverminderung und fortschreitende Aggregation von Teilchen, die in Brownsche Bewegung treten, also ein Koagulationsprozeß. Wenn wir uns den zweiten Vorgang durch

<sup>1)</sup> Daß bei stark herabgesetzter Viskosität trotzdem im Dunkelfeld optisch leere Zellen — mit Ausnahme der Kernkontur — sich vorfinden, könnte schließen lassen, daß die dispersen Teilchen des Protoplasmas amikronische Größe haben, oder wenn sie submikronisch sind, sie nach ihrem optischen Verhalten Emulsoidteilchen, nicht aber Suspensoidteilchen sein können und daß andere Teilchen erst sekundär im Laufe des Zellebens auftreten.

Ladungsverminderung zu erklären geneigt sind, so erscheint uns der erstere Vorgang auf den ersten Augenblick lediglich auf die profuse Wasseraufnahme der Zelle aus dest. Wasser zurückführbar zu sein.

2. Werden flüssig gezüchtete Kulturen nach beschriebenem Verfahren gewaschen und in eine elektrolytfreie  $\frac{n}{36} - \frac{n}{18}$  Dextroselösung gebracht, so bietet

sich uns nach wenigen Minuten folgendes Bild dar. Zu allererst bemerkt man eine deutlichere Abgrenzung und Hervortreten des Kernes. Gleichzeitig, in den ersten 2—5 Minuten ein Zusammenballen der präformierten Zytoplasmateilchen und deren Anhaften an den Kern, wie auch zuweilen an die Innenfläche der Zellumgrenzung. Die Zellkonturen sind dann, infolge des Anklebens der Teilchen an die Zellumgrenzung, verwischt und das Zytoplasma vieler Zellen undurchsichtig. Brownsche Bewegung ist noch jetzt im Hellfeld nicht sichtbar. In den nächstfolgenden Minuten beginnt nun die Brownsche Bewegung, die allmählich zunimmt und zugleich nehmen die Zellen eine immer regelmäßiger Kugelgestalt an, nachdem manche zuvor noch eiförmiges Aussehen gezeigt hatten. Allmählich treten auch die zuerst um den Kern herum und an die innere Zellumgrenzung haftenden und zusammengeballten Teilchen in das Innere des Zytoplasmas, wo sie von Brownscher Bewegung ergriffen werden. Nach 8—25 Minuten sind alle

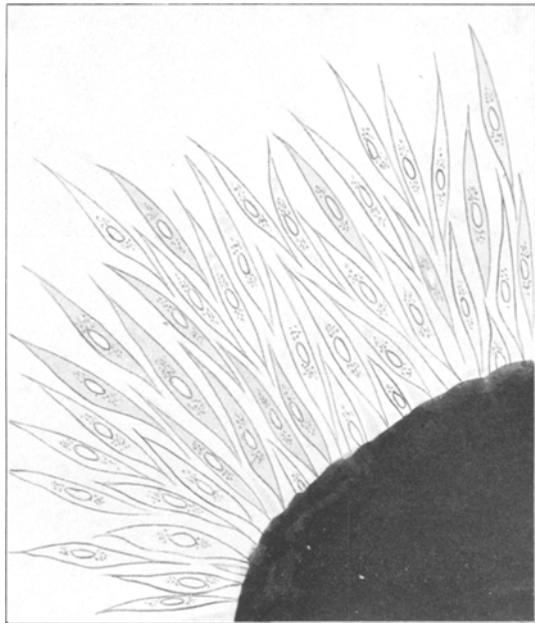


Fig. 1. Fibroblastenkultur in flüssigem Züchtungsmedium, vor dem Versuch. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

Zellen kugelförmig, die Teilchen sind gleichmäßig im Zytoplasma in Brownscher Bewegung begriffen, die aber weniger stark ist als in Versuch 1. Die Zellen des Mittelstückes — sofern sie besonders bei jungen Kulturen noch gelebt hatten — sind gleichfalls kugelförmig geworden. Das hier beschriebene Bild ist also ganz ähnlich demjenigen aus Versuch 1, zeigt aber gegen dasselbe folgende Unterschiede: 1. die völlige Zellabrundung und die Brownsche Bewegung treten in dextroshaltigen Medien später auf als in dextrorefreien Medien; 2. die Brownsche Bewegung ist in dextroshaltigen Medien weniger lebhaft; 3. ein Platzen der Zellen erfolgt hier entweder gar nicht, oder viel seltener und nur bei sehr geringem Anelektrolytgehalt; 4. die Kugelzellen scheinen dort, zuweilen, nicht immer, größer zu sein als die in dextroshaltigen Medien.

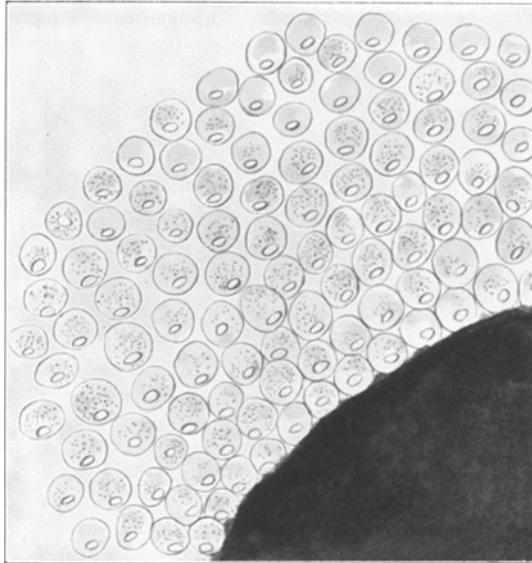


Fig. 2. Dieselbe Kultur wie in Fig. 1, 5 Minuten nach der Behandlung mit  $\frac{n}{36}$  Dextrose in dest. Wasser. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

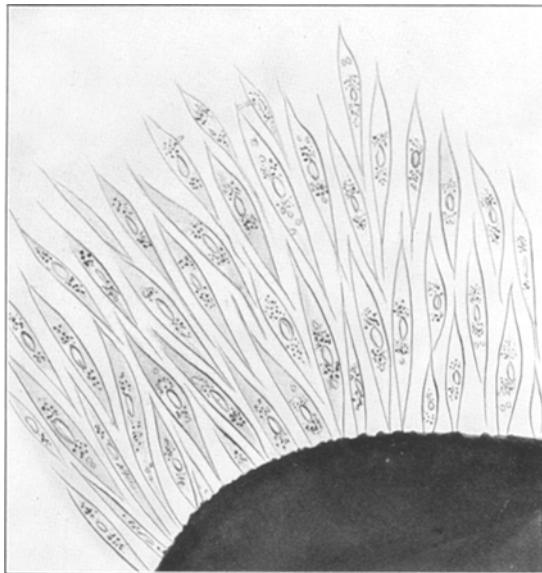


Fig. 3. Dieselbe Kultur wie in Fig. 1 und 2 nach Reversion durch  $\frac{n}{10}$  Natriumbromid-Lösung in dest. Wasser, dem Neutralrot 1 : 10<sup>4</sup> zugesetzt wurde. Das Präparat zeigt in allen Zellen regelmäßig vitalgefärbte Neutralrotgranula. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

Es wurden elektrolytfreie dextroshaltige Medien von verschiedenem Molgehalte serienweise zu Versuchen der beschriebenen Art benutzt, aus denen sich Durchschnittswerte ergaben, die in folgender Tabelle zusammengestellt sind. Die Zellabrundung tritt bei allen hier verwendeten Anelektrolytkonzentrationen ein, mit bedeutenden Unterschieden in der Geschwindigkeit ihres Eintretens und in der Stärke der Brownschen Bewegung.

Normalität der Dextrose	Fast alle Zellen haben Kugelgestalt angenommen nach Minuten	Im Hellfeld sichtbare Brown. Bew. i. Zytoplasma
0	$\frac{1}{6}$ —3	sehr stark
$\frac{n}{36}$	3—8	stark
$\frac{n}{27}$	6—18	mäßig stark
$\frac{n}{18}$	10—30	weniger stark
$\frac{n}{12}$	12—35	sehr gering

$\frac{n}{9}$  Dextrose zeigt zu starke Zellschädigung. Die Geschwindigkeit des Eintretens der Erscheinungen ist aber auch bei verschiedenen Zellen in ein und derselben Kultur etwas verschieden. Sie hängt, wie es sich weiterhin zeigte, auch vom Alter der Zelle ab und tritt zuweilen nahe am Mittelstück früher ein als in der Peripherie.

Die Rolle der Anelektrolyte beim Auftreten der beschriebenen Erscheinungen ist also offenbar eine sekundäre: Die Abdiffusion der an der Zellgrenze befindlichen Elektrolyte in die Dextroselösung ist eine langsamere als in destilliertes Wasser, die minimale für das Bestehen der Zellform offenbar nötige Elektrolytkonzentration bleibt daher längere Zeit an der Zellgrenze erhalten als in dest. Wasser, was den späteren Eintritt der Zellabrundung bewirkt. Außerdem dürfte nach erfolgtem Elektrolytentzug bei höheren Dextrosekonzentrationen ein Austritt von Wasser ins Medium erfolgen, was durch Viskositätserhöhung eine Verlangsamung der Brownschen Bewegung in der Zelle zur Folge hat.

3. Wird zur Erhöhung des osmotischen Druckes des elektrolytfreien Versuchsmediums als Nichtleiter Harnstoff benutzt, so treten die beschriebenen Erscheinungen an der Zelle genau so auf, wie bei Verwendung von bloßem destilliertem Wasser. Bei Zusatz von bis  $\frac{n}{5}$  Harnstoff ändert sich der Ablauf der Erscheinungen und die Stärke der Brownschen Bewegung unmerklich. Erst bei höherer Konzentration des Nichtleitchters, und zwar von  $\frac{n}{5}$  bis  $\frac{n}{1}$  tritt eine zunehmende bedeutende Verlangsamung der Brownschen Bewegung ein. Das auffallend verschiedene Verhalten von Harnstoff und Dextrose, indem ersteres bis  $\frac{n}{5}$  die Ablaufgeschwindigkeit der Erscheinungen nur unmerklich

beeinflusst, kommt vielleicht daher, daß der Harnstoff weniger die Zelle schädigt — offenbar spielt aber hier auch das bessere Permeieren des Harnstoffes in die Zelle eine Rolle. Wir sahen, daß Nichtleiter durch rein osmotische Wirkung, die Erscheinungen, die durch Elektrolytschwund an der Zelloberfläche auftreten, verzögern. Die osmotische Wirkung eines Nichtleiters auf die Zelle muß aber um

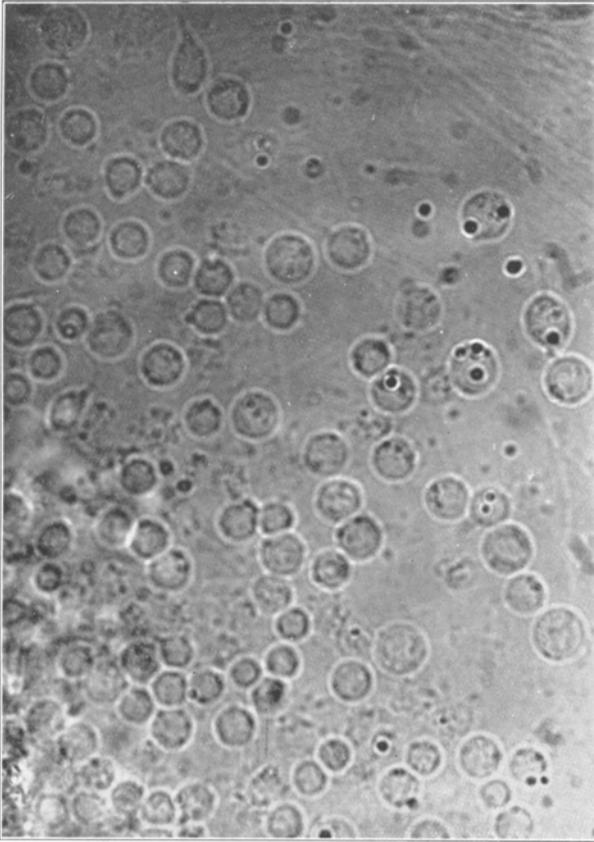


Fig. 4. Eine Fibroblastenkultur 8 Minuten nach Behandlung mit  $\frac{n}{1}$  Harnstoff in dest. Wasser. Photogr. Vergrößerung 330  $\times$ .

so geringer sein, je mehr er selbst in die Zelle eindringt. Permeieren die kleineren Moleküle des Harnstoffes schneller in die Zelle als diejenigen der Dextrose, so verzögern sie das Eintreten der Wirkung des Elektrolytmangels weniger als die der Dextrose. Man wird hierbei unwillkürlich an die gleichen Verhältnisse bei der Plasmolyse der Pflanzenzelle erinnert, bei der aber der Effekt naturgemäß ein umgekehrter ist, daß gut permeierende Substanzen die Plasmolyse nicht hervorrufen. Denn die Plasmolyse der Pflanzenzelle ist ja schon die unmittelbare Folge der Druckerhöhung im Medium.

4. Über die minimale Elektrolytkonzentration im Medium, die nötig ist, damit das beschriebene Phänomen nicht auftritt, geben weitere Versuche Aufschluß. Werden nach gründlicher Waschung der Zellen diese in ein Ver-

suchsmedium gebracht, das 5 Teile einer Ringerlösung auf 100 Teile dest. Wasser enthält, so treten die geschilderten Erscheinungen noch genau so auf, aber in etwas verlangsamer Art. Die Zellzahl, die durch Platzen vernichtet wird, ist dabei eine viel geringere als in dest. Wasser. In Medien von 10 bis 20 Teilen Ringerlösung pro Hundert dest. Wasser, treten die Erscheinungen meist nicht mehr auf, in ihnen erfolgt nur starke Zellschädigung anderer Art.

Wird Neutralrot solchen Medien zugesetzt, die eine Elektrolytkonzentration von unterhalb einer 25proz. Ringerlösung enthalten, so erfolgt keine Vitalfärbung, die Zellen können aus solchen Medien kein Neutralrot aufnehmen. Aus einem von 25proz. Ringerlösung aufwärts enthaltenden Medium nehmen erst die Zellen in normaler Weise Neutralrot auf. Dieses Verhalten der Zellen in den verdünnten Ringerlösungen ändert sich nicht, wenn dem Medium Dextrose zugesetzt wird.

% Ringer	Browsche Bewegung im Zytoplasma und Kugelform der Zellen
$\frac{1}{8}$	In $\frac{1}{6}$ —3 Minuten
5	In 2—6 Minuten
10	Zuweilen in 10—20 Minuten teilweise Abrundung. Zuweilen in manchen Zellen ganz geringe Brownsche Bewegung. Zellschädigung. Oft Vakuolisierung. Keine gefärbten Neutralrotgranula.
15	Keine Abrundung, Zellschädigung. Oft Vakuolisierung. Keine gefärbten Neutralrotgranula.
20	Keine Abrundung. Keine Brownsche Bewegung im Hellfelde. Zellschädigung. Keine gefärbten Neutralrotgranula. Oft Vakuolisierung.

5. Werden Zellen, die nach gewöhnlichem Verfahren in geronnenem Blutplasma gezüchtet werden und im Koagulum eingeschlossen sind, mit dest. Wasser, dem Neutralrot zugefügt wurde, behandelt, so treten keine Zellveränderungen der beschriebenen Art auf, die Zellform bleibt unverändert, die Zellen nehmen aber aus diesem Medium kein Neutralrot auf. Wird derselben Kultur nach einiger Zeit Neutralrot in Ringerlösung zugesetzt, so nehmen dann noch die Zellen in ganz normaler Weise Neutralrot auf.

Werden im Plasmakoagulum eingeschlossene Zellen mit Neutralrot enthaltendem dest. Wasser, dem eine Dextroselösung  $\frac{n}{18}$  zugefügt war, wie oben behandelt, so ändern die Zellen ebenfalls ihre Form nicht und nehmen auch kein Neutralrot aus diesem Medium auf, bleiben aber am Leben, denn nachher in Ringerscher Lösung zugesetztes Neutralrot bewirkt Vitalfärbung in typischer Weise. Die Zellen der Plasmakulturen zeigen aber in den Versuchsmedien, aus denen sie kein Neutralrot aufnehmen, Wachstumsstillstand.

Das in diesen Versuchen den Plasmakulturen zugesetzte dest. Wasser nimmt also, ehe es an die Kulturzellen gelangt, aus dem Plasmakoagulum Elektrolyte auf und wirkt auf die Zellen nicht als elektrolytfreie, sondern als elektrolytarme bzw. auch hypotonische Flüssigkeit. Da die Wirkung von den Plasmakulturen zugesetztem dest. Wasser auf die Zellen eine ganz ähnliche ist, wie die Wirkung einer 20proz. Ringerlösung auf freiliegende flüssig gezüchtete Zellen, so ergibt sich daraus, daß das zugesetzte dest. Wasser ungefähr 20 % des Elektrolytgehaltes einer Ringerlösung aus der Gallerte und durch Mischung mit dem Synäretikum<sup>1)</sup> bekommt. Wegen der Diffusionsverlangsamung in

<sup>1)</sup> H. Grossfeld, Zeitschr. Zellf. 20, 730 (1934).

Gallerten nimmt natürlich der Elektrolytgehalt der Flüssigkeit mit der Zeit langsam zu<sup>1)</sup>. Jedenfalls bleibt hier der Elektrolytgehalt des die Zellen unmittelbar erreichenden Mediums in einem Konzentrationsbereich, in dem die oben an freien Gewebezellen beschriebenen Erscheinungen nicht auftreten, die Aufnahme von Neutralrot aber nicht erfolgt.

6. Über das Verhalten einzelner Elektrolyte sei hier folgendes kurz erwähnt. Aus einer  $\frac{n}{7}$  und  $\frac{n}{10}$  Natriumchloridlösung nehmen flüssig gezüchtete und nach obigem Verfahren behandelte Kulturen in normaler Weise Neutralrot auf, zeigen aber dann eine etwas kürzere Lebensdauer als in gleicher Weise mit Ringerlösung behandelte Kontrollkulturen. Eine  $\frac{n}{20}$  Natriumchloridlösung ruft keine Zellabrundung hervor und läßt noch zuweilen schwache aber normale Neutralrotfärbung zu, bewirkt Zellschädigung. Eine  $\frac{n}{50}$  Natriumchloridlösung in dest. Wasser ruft nur manchmal Abkuglung der Zellen herbei bei nur schwacher Brownscher Bewegung der Teilchen.

Aus einer  $\frac{n}{10}$  Natriumbromidlösung erfolgt eine Färbung von Neutralrotgranula.  $\frac{n}{10}$  Kaliumchloridlösungen bewirken manchmal ganz kurzdauernde Farbaufnahme. Nach einigen Minuten tritt Entfärbung, Abrundung und oft Brownsche Bewegung auf.  $\frac{n}{50}$  Kaliumchloridlösung bewirkt ganz rasche Zellabrundung mit sehr starker Brownscher Bewegung von Zytoplasmateilchen.

Aus  $\frac{n}{10}$  Calciumchloridlösungen erfolgt keine Neutralrotaufnahme, die anfangs sich zuweilen zeigende Brownsche Bewegung im Zytoplasma hört sehr bald auf. In ähnlicher Weise wirkt meist  $\frac{n}{20}$  Calciumchloridlösung.  $\frac{n}{50}$  Calciumchlorid ruft rasche Abkuglung mit Brownscher Bewegung herbei.

Gemische von je  $\frac{n}{50}$  NaCl-, KCl- und CaCl<sub>2</sub>-Lösungen zu gleichen Teilen bewirken ebenfalls ziemlich rasch Abrundung und Brownsche Bewegung, wobei letztere in Gegenwart von  $\frac{n}{50}$  NaCl geringer ist. Über das Eindringen von Elektrolyten in Abwesenheit des equilibrierten Elektrolytgemisches wird an anderer Stelle berichtet.

7. Werden flüssig gezüchtete Epithelkulturen (es wurden Magen- und Leberepithelkulturen benutzt) nach dem beschriebenen Verfahren mit elektrolyt-freien Medien behandelt, so erfolgt ebenfalls eine rasch einsetzende Abkuglung der Zellen, die vom Auftreten starker Brownscher Bewegung im Zytoplasma begleitet ist. In flüssigem Medium überlebende Leukozyten nahmen prompt Kugelgestalt unter dem Einfluß von dest. Wasser an, auch dann, wenn letzterem  $\frac{n}{18}$  Dextrose zugesetzt wurde. Brownsche Bewegung wurde hierbei nicht beobachtet.

<sup>1)</sup> H. Grossfeld, Arch. exp. Zellf. 14, 317 (1934).

8. Wurden in flüssigem Medium gezüchtete Gewebezellen am zweiten Züchtungstage in ein elektrolytfreies Versuchsmedium gebracht, das  $\frac{n}{36} - \frac{n}{18}$  Dextrose oder bis  $\frac{n}{5}$  Harnstoff enthält, und ist vollständige Abkuglung der Zellen mit lebhafter Brownscher Bewegung im Zytoplasma bereits eingetreten, so kann man durch Zuführung von Elektrolyten die Rückverwandlung der Kugelzellen in normale Fibroblasten bzw. Epithelzellen herbeiführen. Man muß dabei einige Mi-

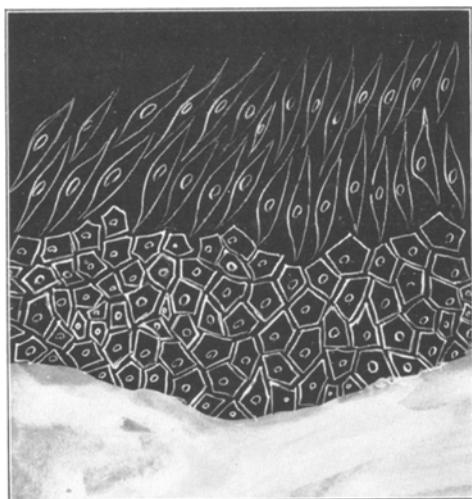


Fig. 5. Leberkultur in flüssigem Züchtungsmedium vor dem Versuch. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

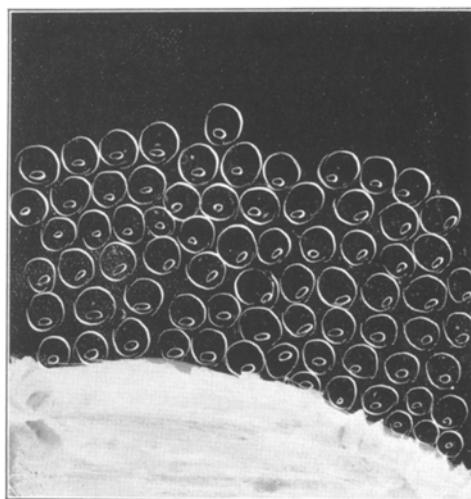


Fig. 6. Dieselbe Kultur wie in Fig. 5. 3 Minuten nach Behandlung mit dest. Wasser. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

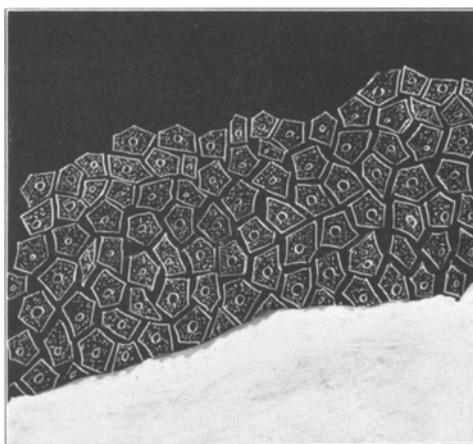


Fig. 7. Eine Stelle aus derselben Kultur wie in Fig. 5 und 6 nach Reversion durch Ringlösung. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

nuten nach Eintritt der Abkuglung das erste Versuchsmedium durch Absaugen mit der Pipette entfernen und die Kultur in ein elektrolythaltiges Versuchsmedium bringen, am besten in eine Ringersche Flüssigkeit, der eine Neutralrotlösung zugesetzt wurde. Es tritt dann sehr rasch, meist noch ehe man die Kultur unter das geheizte Mikroskop gebracht hat, die Wiederaufnahme der normalen bi- oder multipolaren Fibroblastenform ein, die Brownsche Bewegung ist bereits vollständig verschwunden, und eine allmählich zunehmende typische Rotfärbung von Neutralrotgranula zeigt das Leben der rückverwandelten Zellen (Fig. 3) an. Auch in einer Janusgrünlösung von  $1 : 2 \times 10^4$  zeigte sich eine Vitalfärbung der Mitochondrien. In den meisten Fällen sind jetzt viele Vakuolen in den normalgeformten Zellen erschienen.

Es wurde in einigen Fällen die Reversion an einer und derselben Fibroblastenkultur mehrmals hervorgerufen. Nach eingetretener Wiederaufnahme der Fibroblastenform kann nämlich ein elektrolytfreies Medium neuerdings Kugelform der Zellen und Brownsche Bewegung und eine rechtzeitige Zufuhr von Elektrolyten abermalige Reversion herbeiführen. Der Zeitpunkt, in dem die durch Elektrolytmangel hervorgerufenen Veränderungen noch durch Elektrolytzusatz reversibel sind, hängt nicht nur von der Ablaufgeschwindigkeit der Veränderungen ab, sondern auch von der Beschaffenheit der Kulturzellen im Züchtungsmedium. Dieser Zeitpunkt muß also danach gewählt werden und ist von Kultur zu Kultur etwas verschieden. Er hängt auch deutlich vom Anelektrolytgehalt des ersten Versuchsmediums ab. Ein zu niedriger osmotischer Druck desselben bewirkt einen zu raschen Ablauf der Veränderungen, insbesondere ein zu rasches Eintreten des offenbar irreversiblen Koagulationsprozesses im Innern der Zelle und außerdem ein Verschwinden zahlreicher Kugelzellen durch Platzen derselben: ein zu hoher osmotischer Druck des ersten Versuchsmediums, insbesondere wenn er von zellschädigenden Substanzen herrührt, erschwert die Reversion infolge irreversibler Zellschädigung. Die Reversion hat nur dann als echt zu gelten, wenn nicht nur die ursprüngliche Zellform mit einem Schlage wieder hergestellt ist, sondern wenn auch aus dem zweiten Versuchsmedium eine Vitalfärbung mit Neutralrot oder mit Janusgrün in typischer Weise erfolgt. Es sei erwähnt, daß bei Zusatz verschiedener osmotisch wirkender Stoffe die Kugelzellen oft auch geringe Streckung mit Verzerrung der Zellform aufweisen, was mit Reversibilität nichts zu tun hat. Sie erfolgt lediglich infolge von Entquellung und zeigt dann nie Vitalfärbung. Außerdem tritt sie entschieden langsamer ein, man kann diese Formänderung gut verfolgen, während für die echte Reversionsstreckung der Zellen gerade ihr sehr rasches Eintreten besonders kennzeichnend ist. Eine Wiederaufnahme der normalen Zellform bei Elektrolytzusatz tritt entweder sehr rasch oder gar nicht mehr ein, eine nachher erfolgende geringe Zellstreckung ist nur die Folge der Erhöhung des osmotischen Druckes im Medium.

9. Die Reversion der normalen Zellform wurde bisher durch Zusatz von Ringerlösung herbeigeführt. Es galt aber die Frage zu beantworten, ob auch einzelne Elektrolyte und welche eine echte Reversion der beschriebenen Zellveränderungen herbeizuführen vermögen. Zu diesem Behufe wurden als zweites

Versuchsmedium  $10^{-1}$  molare Lösungen der verschiedenen Elektrolyte in dest. Wasser benutzt. Als die Kulturen unter Einwirkung elektrolytfreier Versuchsmedien Kugelform der Zellen und Brownsche Bewegung aufwiesen, wurden einige mit einer  $10^{-1}$  molaren Natriumchloridlösung und die anderen Kontrollkulturen mit einer Ringerschen Flüssigkeit behandelt, in beiden Fällen unter Zusatz von Neutralrot zum Medium. Alle so behandelten Kulturen zeigten eine echte Reversion mit typischer Färbung der Neutralrotgranula. Erst nach 6—8 Stunden zeigte es sich aber, daß die mit  $10^{-1}$  molarem Natriumchlorid behandelten Zellen früher abstarben als die mit Ringerlösung behandelten. Als Kulturen nach Behandlung mit einem  $\frac{n}{36}$  Glukose enthaltendem elektrolytfreiem Medium in eine  $\frac{n}{20}$  Natriumchloridlösung gebracht wurden, war echte Reversion nicht zu erzielen, und in den meisten Zellen war noch längere Zeit Brownsche Bewegung zu sehen.

Als in ganz analoger Weise in einer Versuchsreihe als zweites Versuchsmedium eine  $\frac{n}{10}$  Natriumbromidlösung benutzt wurde, zeigte sich dasselbe Bild wie bei Benutzung einer  $\frac{n}{10}$  NaCl-Lösung, die Zellen zeigten nach der Behandlung normales Aussehen und normale Neutralrotfärbung und waren von den mit Ringerlösung behandelten Kontrollkulturen nicht zu unterscheiden (Fig. 3). Erst nach 8 Stunden stellte sich an ihnen Zellschädigung und Zelltod früher ein als bei den mit Ringerlösung nachbehandelten Kontrollkulturen.

Wurde als zweites Versuchsmedium eine  $\frac{n}{10}$  Natriumjodidlösung benutzt, so trat weder eine Reversion der Fibroblastenform der Zellen, noch eine normale Färbung von Neutralrotgranula auf. Es fanden sich keine anderen Elektrolyte, die als 2. Versuchsmedium benutzt, eine Reversion herbeizuführen vermöchten. Sie wirkten alle, und jeder auf eigener Art, in größerem oder geringerem Grade schädigend auf die Zelle ein und änderten nur den beschriebenen Ablauf des Phänomens in elektrolytfreien Medien. So war in KCl- und KBr-Lösungen die Brownsche Bewegung im Zytoplasma weiter sehr lebhaft, dagegen in gleichmolaren LiCl-, MgCl<sub>2</sub>-, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösungen hörte die Brownsche Bewegung sofort auf. Eine genauere Behandlung der Wirkungsweise dieser Elektrolyte kann jetzt noch nicht erfolgen.

10. Werden die durch das 1. Versuchsmedium kugelrund gewordenen Zellen mit Brownscher Bewegung im Zytoplasma der Einwirkung einer  $\frac{n}{10}$  Ammoniumchloridlösung unterworfen, so treten uns folgende Erscheinungen entgegen: Die kugelrunden Zellen vergrößern sich zusehends meist ganz bedeutend, die Brownsche Bewegung wird womöglich noch lebhafter, es erscheinen im Zytoplasma ganz große Vakuolen, wie sie sonst nie gesehen werden, manche Zellen mehrere solcher Vakuolen enthaltend, geben ihre Kugelform zugunsten einer unregelmäßigen Gestalt auf. — Wird eine ebensolche  $\frac{n}{10}$  Ammoniumchloridlösung in dest. Wasser als erstes Versuchsmedium freien Gewebezellen

einer flüssigen Kultur zugesetzt, so treten die bei Verwendung elektrolytfreier Medien beschriebenen Veränderungen hier in besonders ausgeprägter Weise auf, die schleunigst sich abkugelnden und Brownsche Bewegung der Teilchen zeigenden Zellen sind meist merklich größer als in elektrolytfreien Medien, und es erscheinen in den Zellen Riesenvakuolen, wie sie vorhin beschrieben wurden.

Wird eine  $\frac{n}{10}$  Ammoniumchloridlösung in Ringerscher Flüssigkeit als I. Versuchsmedium benutzt, so treten an den Zellen keine der beschriebenen Veränderungen auf, die Zellen behalten ihre normale Fibroblastenform und es zeigt sich keine Brownsche Bewegung. Das Ammoniumchlorid kann also jetzt



Fig. 8. Fibroblastenkultur in flüssigem Züchtungsmedium vor dem Versuch. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

seine stark quellende Wirkung auf die Zelle nicht entfalten. Das heißt, das  $\text{NH}_4\text{Cl}$  kann nur in Abwesenheit des normalen Elektrolytgemisches in die Zelle eindringen, um sie zur Quellung zu bringen, nicht aber in Gegenwart des letzteren. Werden freie Zellen flüssig gezüchteter Kulturen in ein Versuchsmedium von gleichen Teilen einer  $\frac{n}{15}$  Natriumchloridlösung und einer  $\frac{n}{15}$  Ammoniumchloridlösung gebracht, so zeigen die Zellen zunächst Zeichen von Quellung, werden aber gar nicht abgerundet und sehr bald erscheint das ganze Zytoplasma feingranuliert, die Zellform bleibt erhalten.

Werden aber ebensolche Zellen in ein Versuchsmedium von gleichen Teilen einer  $\frac{n}{15}$  Kaliumbromidlösung und einer  $\frac{n}{15}$  Ammoniumchloridlösung, oder auch einer  $\frac{n}{15}$  Calcium-

chloridlösung und einer  $\frac{n}{15}$  Ammoniumchloridlösung gebracht, so zeigen die Zellen sogleich die Erscheinungen der Abkuglung mit Brownscher Bewegung, der Quellung und Vakuolisierung, wie sie durch die Einwirkung des Ammoniumchlorids zu erwarten sind. Es ist also offenbar das Natriumchlorid, das das ungestörte Eindringen des Ammoniumchlorids in die Zelle verhindert.

II. Werden freie flüssig gezüchtete Gewebezellen in ein Versuchsmedium einer  $\frac{n}{10}$  Natriumphosphatlösung in dest. Wasser gebracht, so treten sofort Zellabkuglung, starke Brownsche Bewegung, bedeutende Zellvergrößerung und

zahlreiche Riesenvakuolen in den Zellen auf; werden dagegen ebensolche Zellen in ein Versuchsmedium einer  $\frac{n}{10}$  Natriumphosphatlösung in Ringerscher Flüssigkeit gebracht, der auch Neutralrot zugesetzt wurde, so erleiden die Zellen gar keine Veränderung, die Zellform bleibt ganz normal und Neutralrot wird in ganz normaler Weise aufgenommen. In einer  $\frac{n}{10}$  Natriumphosphatlösung verhalten sich also die Zellen ganz genau so, wie in einer  $\frac{n}{10}$  Ammoniumchloridlösung.

12. Es wurden mehrere Tage alte Kulturen in flüssigem Medium zuerst mit Neutralrot in Ringerlösung vitalgefärbt und dann der Einwirkung von elektrolytfreien Medien unterworfen.

Diejenigen Kulturen, deren Zellen normalgefärbte Neutralrotgranula aufwiesen, zeigten in elektrolytfreien Medien regelrecht die beschriebenen Erscheinungen. Die Kulturen dagegen, an denen Vitalfärbung nicht mehr auftritt, zeigten ein verschiedenes Verhalten. Die einen zeigten in keiner Weise mehr die beschriebene Wirkung des elektrolytfreien Mediums, die anderen aber scheinbar toten Kulturen, noch immer. Aus weiteren Versuchen ergab sich aber, daß die beschriebenen Wirkungen des elektrolytfreien Mediums nur an noch lebenden Zellen auftreten, tote Zellen aber in salzfreien Medium weder Kugelform annehmen noch Brownsche Bewegung<sup>1</sup> im Zytoplasma zeigen. (Wie sollten denn Erscheinungen, die durch Ladungsrückgang Viskositätsherabsetzung und Koagulation herbeiführen, bei toten bereits entladenen und koagulierten Zellen auftreten?) Daraus ergab sich aber, daß Zellen,

die wir nach ihrem Aussehen und ihrem Verhalten Neutralrot gegenüber (diffuse Rotfärbung; Kernfärbung) für tot zu halten pflegen, es noch nicht immer sein müssen. Das Auftreten oder Nichtauftreten der beschriebenen Erscheinungen im salzfreien Medium kann als endgültige Probe für das Leben der Zellen benutzt werden. Es zeigte sich ferner, daß die Ablaufgeschwindigkeit der Erscheinungen in salzfreien Medien vom Alter und Zustande der Zellen abhängt. In jungen, ungeschädigten Kulturen verlaufen sie sichtlich schneller als in älteren und geschädigten. Bei letzteren ist auch die Brownsche Bewegung im Zytoplasma

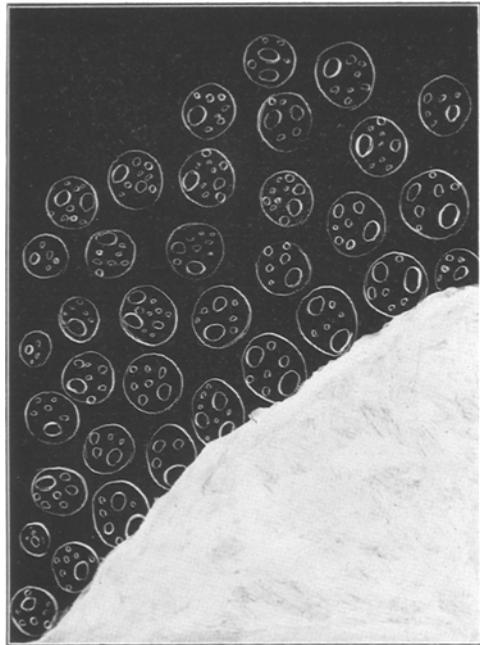


Fig. 9. Dieselbe Kultur wie in Fig. 8 nach Behandlung mit  $\frac{n}{10}$  Ammoniumchlorid in dest. Wasser. Starke Zellvergrößerung und große Vakuolen. Zeiss Ok. 4 Imm.  $\frac{1}{7}$ .

eine trägere. Es gibt auch hier und da Zellen, die aus unbekanntem Gründen sich im salzfreien Medium nicht abrunden, alle anderen Erscheinungen aber, wie Brownsche Bewegung im Zytoplasma usw. aufweisen.

13. Wir wollen an dieser Stelle aus einer anderen Reihe von Versuchen einige Ergebnisse mitteilen, weil sie geeignet sind, in gewissem Sinne zur Beleuchtung der beschriebenen Erscheinungen beizutragen. Wir haben bisher die elektrolytfreien Versuchsmedien bei einer gleichen Anzahl von Wasserstoff- und Hydroxylionen also bei neutralem pH benutzt. Versuche bei verschiedenem pH zeigten nun, daß ein Überwiegen der Anzahl der OH'-Ionen über die Anzahl der H'-Ionen die beschriebenen Erscheinungen in salzfreien Medien ganz enorm fördert. Mit dem Wachsen des Verhältnisses der OH'-Ionen zu den H'-Ionen im salzfreien Medium nimmt die Geschwindigkeit des Eintrittes der Zellabkuglung und der Brownschen Bewegung deutlich zu, um bei höherem pH in überstürzter Weise zu verlaufen. Bei Benutzung von Versuchsmedien mit immer steigendem pH gelangen wir zu einer Hydroxylionenkonzentration, bei der eine neue Erscheinung sich den oben beschriebenen zugesellt. Nach schneller Abkuglung der Zellen fangen sie an nacheinander zu platzen, wie Seifenblasen, und aus der geplatzen Stelle der Kugelzelle ergießt sich nach einer Richtung ein flüssiger Zellinhalt mit zahlreichen in ihm suspendierten Teilchen (die auch außerhalb der Zelle ihre Brownsche Bewegung bewahren). Nach dem Platzen der Hüllen und Ausschütten des flüssigen Inhaltes sind meist nur noch im Medium schwimmende Partikelchen in Brownscher Bewegung zu sehen. Es wurde aber öfters beobachtet, daß eine Kugelzelle, nachdem ihre Hülle an einer Stelle aufreißt und ein Teil des Inhaltes ausgeschüttet wird, sie sich gleich darauf wieder abrundet und ganz ihr früheres Aussehen annimmt, meist aber dann schon mit merklich geringerer Brownscher Bewegung der Teilchen. Solches Aufreißen der Zelle mit teilweise Ausschütten von Zellinhalt und Wiederabrundung, spielt sich zuweilen an einer und derselben Zelle mehrmals hintereinander ab und bewirkt dann eine Verkleinerung des Zelldurchmessers. Die Zeitspanne zwischen der Abkuglung der Zelle und ihrem Platzen hängt von der Höhe des pH des Mediums ab. Bei sehr hohem Hydroxylionengehalt ist der Verlauf der Erscheinungen so überstürzt, daß sie sich der Beobachtung fast ganz entziehen, so z. B. bei einer  $10^{-2}$  molaren Natriumhydroxyldlösung, welche einem pH 12 entspricht. Bei pH 10—pH 11 kann man die beiden Prozesse, die Annahme der Kugelgestalt mit Brownscher Bewegung im Zytoplasma und das spätere ein- oder mehrmalige Aufreißen der Kugelhülle mit Ausschütten von Zellinhalt gut auseinanderhalten. Denn es dauert dann oft mehrere Minuten bis der letztere Vorgang auftritt. Ein niedrigerer Hydroxylionengehalt, einem pH etwa 9 entsprechend, beschleunigt den ersteren Prozeß der Zellabrundung, bewirkt aber kein Auflösen (Verseifen) der Zellhülle<sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Es wurde gelegentlich beobachtet, daß bei mit Neutralrot zuvor vitalgefärbten und nachher mit NaHCO<sub>3</sub> behandelten Fibroblasten, ein Platzen der kugelförmig gewordenen Zellen eintrat, ohne vorangegangenes Verschwinden der Rotfärbung in der Zelle, also ohne vorheriges Eindringen von OH'-Ionen in die Zelle, also offenbar nur durch Einwirken der OH'-Ionen auf die Zellhülle.

Nun zeigten aber andere Versuche, daß ein hoher Hydroxylionengehalt nicht nur in salzfreien Medien, sondern im normalen elektrolythaltigen Medium<sup>1)</sup> — im letzteren Falle nur bei noch höherem OH'-Gehalt — genau dieselben obenbeschriebenen Erscheinungen an Gewebezellen hervorruft, also sowohl die Zellabrundung mit Brownscher Bewegung im Innern, wie auch bei noch höherem pH das beschriebene Platzen der Kugeln mit Ausschütten ihres Inhaltes. Wir ersehen daraus, daß die Erscheinungen der Zellabrundung und maximaler Viskositätsherabsetzung sowohl durch Elektrolytentzug allein, als auch durch Hydroxylionen allein herbeigeführt werden können und daß beim Zusammenwirken beider Momente die Wirkungen sich addieren und die Erscheinungen rascher auftreten, daß dagegen der zweite Vorgang der Läsion der Kugelhülle von den Hydroxylionen herbeigeführt wird<sup>2)</sup>. Ein hoher Hydroxylionengehalt in einem normalen salzhaltigen Medium kann also ein die Zellladung schützendes Moment aufheben und Zellabrundung mit maximaler Viskositätsherabsetzung bewirken.

### Diskussion

Die bisherigen Versuche drängen zu der Annahme, daß an den durch den Elektrolytentzug auftretenden Vorgängen neben einer eventuellen Wasser-verschiebung durch osmotische Kräfte, noch ein anderes Moment sich beteiligen muß, das aber auch mit der Wirkung osmotischer Kräfte in irgendeiner Weise zusammenhängt. Denn erstens ist schon die Abrundung der Zelle nicht ohne weiteres durch vermehrte Wasseraufnahme zu erklären, denn wir beobachten oft stärkere Grade von Zellquellung ohne Abrundung der weiter lebenden Zellen, jedenfalls stärkere Grade der Quellung als sie osmotische Kräfte in einem Medium von  $\frac{n}{12} - \frac{n}{9}$  Dextroselösung zulassen. Dagegen genügen 10 % des equilibrierten Elektrolytgemisches, um die Abrundung der Zellen zu verhindern, trotzdem in diesem Medium die Zellen sehr stark geschädigt werden. Bei Zusatz zu stark schädigender Stoffe, besonders solcher, die auf das Protoplasma koagulierend wirken, wie z. B. mancher Elektrolyte in höheren Konzentrationen tritt allerdings die Zellabrundung nicht ein. Die fällende Wirkung solcher Stoffe tritt meist so rasch ein, daß die beschriebenen Vorgänge der Zellabrundung und Viskositätsverminderung durch Entzug des equilibrierten Elektrolytgemisches nicht mehr in Erscheinung treten können. Werden aber solche Stoffe in geringen Konzentrationen dem Versuchsmedium zugesetzt, z. B. als  $\frac{n}{50} - \frac{n}{30}$  CaCl<sub>2</sub> u. a., so kann noch die fällende Wirkung des zugesetzten Stoffes kurze Zeit nach dem Eintreten der Abrundung und Viskositätsherabsetzung in Erscheinung treten.

Auch die maximale Viskositätsherabsetzung des Zytoplasmas, deren Ausdrück das Auftreten der starken auch im Hellfeld sichtbaren Brownschen Be-

<sup>1)</sup> Bei evtl. Mischung von Pufferlösungen mit Ringerflüssigkeit muß das pH korrigiert werden. Es sind hier auch besonders Nebenwirkungen von Puffersubstanzen auf die Zelle auszuschließen und zu vermeiden, daß das Medium hypertonisch wird.

<sup>2)</sup> Das Platzen von Zellen in dest. Wasser bei neutralem pH infolge zu raschen Anwachsens des Zellinnendruckes gehört nicht hierher.

wegung der Granula und Vakuolen ist, kann durch bloße Wasseraufnahme kaum erklärt werden. Besonders nicht in den Fällen, wo bei stärkeren Anelektrolytkonzentrationen, also ungeschwächtem osmotischem Druck, die lebhafteste Brownsche Bewegung dennoch auch im Hellfeld zu sehen ist. Am wenigsten aber kann das Phänomen der später einsetzenden Aggregation von Protoplasmateilchen, die in Brownsche Bewegung treten und immer zahlreicher bzw. immer gröber werden, durch Wasseraufnahme allein erklärt werden. Von bloßer Wasseraufnahme, bei Ausbleiben anderer Veränderungen wäre ja eher eine Dispersitätserhöhung zu erwarten, während wir hier augenscheinlich eine Dispersitätsverminderung, eine Teilchenaggregation vor uns haben.

Die Möglichkeit, daß trotz maximaler Viskositätserniedrigung des Zytoplasmas, in dem die lebhafteste Brownsche Bewegung gut im Hellfeld sichtbar wird, dennoch die Kugelgestalt der Zelle gut erhalten bleibt, kann hier nur davon herrühren, daß die Zelle jetzt von einer dem Ausfließen des Zellinhaltes verhindernden Hülle umgeben ist, und nicht etwa davon, daß das Dispersionsmittel des Zellinhaltes mit Wasser unmischbar ist: denn beim Platzen der Hülle ergießt sich der Inhalt sofort ins Außenmedium.

Diese Hülle ist offenbar nicht identisch mit der Grenzschicht der intakten Zelle, sondern ihr Entstehen ist eine der Veränderungen, die in den Komplex der Erscheinungen gehören, die der Elektrolytentzug nach sich gezogen hat. Es dürfte sich aber hier vielleicht eine Möglichkeit darbieten aus der jetzt entstandenen, veränderten Zellhülle eine Einsicht in den Bau der früheren normalen Zellgrenzschicht zu gewinnen.

Halten wir an der Tatsache fest, daß der ganze beschriebene Komplex von Erscheinungen — Zellabkuglung, maximale Viskositätserniedrigung, allmähliche Koagulation des Zellinhaltes, Entstehung einer relativ höherviskösen Zellhülle usw. — nur infolge Unterschreitung eines Minimums an equilibriertem Elektrolytgemisch im Medium entstehen kann, mit Ausnahme des einen Falles einer hohen  $C_{OH}$  im Medium, der im gleichen Sinne wie Elektrolytmangel wirkt. Was wir dann im Laufe von Stunden bei Elektrolytmangel im Medium — zumal im Dunkelfeld — beobachten, ist ganz augenscheinlich ein langsamer Koagulationsprozeß. Dieser Koagulationsprozeß führt in der Grenzschicht, an der die oberflächenaktiven Stoffe, wie Phosphatide u. a. angesammelt sein müssen, zu einem anderen Ergebnis als im Zellinnern. Die an der Zellgrenzschicht angereicherten Phosphatide u. a. sind im elektrolytfreien Medium ausgefallen und koaguliert. An der intakten Zelle im elektrolythaltigen Medium waren sie offenbar dispergiert. Es ergibt sich von selbst die Annahme, daß die Kraft, die die Teilchen der Zellgrenzschicht früher normalerweise in dispergiertem Zustand gehalten hat, eben die fehlenden Elektrolyte sind.

Die Vorstellung, die wir uns dabei über das Zustandekommen dieses Dispersionszustandes mit Hilfe der Elektrolyte machen könnten, wäre sehr einfach. Die entsprechenden Elektrolyte bauen an den Zellkolloiden wahrscheinlich eine elektrische Doppelschicht auf, die den Attraktionskräften der Teilchen entgegenwirkt. Diese Doppelschicht wehrt auch das Eindringen vieler Substanzen in das Zellinnere ab. Die von ihr geschaffene Potentialdifferenz erteilt diesen Teilchen eine Ladung, vielleicht ein Ladungsmaximum gerade im Neutralpunkt,

und Elektrolytentzug bewirkt hier durch Aufhebung des Potentialsprunges die Entladung und Aggregation der Teilchen — gerade umgekehrt, wie wir das besonders bei lyophoben Solen meistens zu sehen gewohnt sind. Die Aufladung der Oberflächen amphoterer Körper durch Ionen entsprechender Elektrolyte würde in unserem Falle die Teilchen peptisieren — und ihre Entladung durch Entzug der Elektrolyte ihre Ausfällung bewirken. (Die Frage, ob wir uns durch Elektrolytentzug dem IEP nähern oder einem andern Ladungsminimum, wie auch die Möglichkeit einer Beeinflussung der Lage des IEP selbst durch die Elektrolyte, soll hier nicht erörtert werden.) — Wir müssen uns aber fragen, in welcher Weise die von den entsprechenden Elektrolyten wahrscheinlich aufgebaute Doppelschicht im elektrolytfreien Versuchsmedium sogleich zerstört und eine Teilchenentladung herbeigeführt wird. Wir sind genötigt anzunehmen, daß die die Doppelschicht bildenden Elektrolyte, bei den Gewebezellen locker genug an die Teilchen gebunden sind, daß sie in zu stark hypotonisches bzw. elektrolytfrei gemachtes Medium abdifferenzieren müssen. Bei höherer als einer 5proz. Ringerlösung entsprechenden Elektrolytkonzentration im Außenmedium, wäre das Haften der Elektrolyte an die Teilchen noch stark genug, um dem jetzt geringeren osmotischen Druck zu widerstehen. Genauer würden wir uns die Verhältnisse folgendermaßen vorstellen. Wenn die Chlornatriumionen mit praktisch nicht diffusiblen Protoplasmateilchen in irgendeiner Verbindung stehen, und wenn normalerweise infolge des Nichtdiffundierens der Protoplasmateilchen nach außen, ein Donnangleichgewicht besteht (es ist ja für die Anwendung des Donnanprinzips gleichgültig, ob und in welcher Weise der Elektrolyt an das nicht diffusible Teilchen gebunden ist), also außen mehr Chlornatriumionen sich anhäufen, als es dem van t'Hoff'schen Gesetze entspricht, so müßte bei einer sehr starken Verdünnung des Chlornatriumgehaltes im Außenmedium ein neues Gleichgewicht sich einstellen. (Wir sehen dabei der Einfachheit halber von der Anwesenheit anderer Elektrolyte ab.) Denn das Endgleichgewicht bei starker Verdünnung des diffusiblen Ions ist ja dann bekanntlich ein solches, daß das ganze Chlornatrium sich in der Außenflüssigkeit befindet. Dieser fast völlige Verlust des Chlornatriums durch die Protoplasmateilchen bewirkt ihren Ladungsrückgang und involviert das beschriebene Phänomen<sup>1)</sup>.

Für die Art der Bindung der in Frage kommenden den Zellen im Versuch entzogenen Stoffe an die Protoplasmateilchen, sind wohl folgende Tatsachen von Belang:

1. Die durch Elektrolytentzug hervorgerufenen Veränderungen sind in gewissen Zeiträumen prompt reversibel;

<sup>1)</sup> Wenn die bekannten Versuche an Einzellern ergeben haben, daß letztere ein Medium von dest. Wasser ohne Schaden vertragen, so muß daraus geschlossen werden, daß an ihnen die durch Elektrolyte unterhaltene Doppelschicht fester in die Teilchen eingebaut ist als an Gewebezellen. Dies ist auch begreiflich, wenn man bedenkt, daß die Gewebeflüssigkeit, der die Osmoregulation obliegt, mit in das System des Vielzellers gehört und daß eben dadurch die Gewebezelle ein mehr offenes System darstellt, in das ihr Außenmedium in mancher Beziehung mit hineingehört.

2. Die beschriebenen Erscheinungen, die Elektrolytmangel im Medium an den Gewebezellen hervorrufen, wie auch die Reversion der Erscheinungen bei Elektrolytzusatz treten mit großer Geschwindigkeit ein;

3. Die Reversion bei Elektrolytzusatz tritt sichtlich noch viel rascher ein als die Veränderungen an den Zellen beim Elektrolytentzug. Letztere Tatsache kann ja nur davon herrühren, daß eine sehr geringe Stoffmenge, etwa eine dünnste Schicht schon zur Erzielung eines vollen Effektes hinreicht, und daß diese minimale Stoffmenge bei Elektrolytzusatz natürlich früher aufgenommen wird, dagegen bei Elektrolytentzug erst später, denn ganz zuletzt abgegeben wird. Nach diesen in allen Fällen hervortretenden Tatsachen zu urteilen, würde es sich im allgemeinen um eine Adsorption von Elektrolyten handeln.

Kommen wir jetzt auf die Deutung der Einzelphasen des beschriebenen Phänomens zurück. Das stundenlang (oft bis 24 Stunden) dauernde Stadium der Koagulation der Protoplasmateilchen nach Elektrolytentzug ist offenbar durch Entladung der Teilchen bewirkt und zeigt uns die Rolle der Elektrolyte im Aufbau der aufladenden Doppelschicht.

Die Viskositätsherabsetzung des Zytoplasmas, die sich in unserem Phänomen durch das Sichtbarwerden der Brownschen Bewegung auch bei Hellfeldbeleuchtung kundgibt, weist ganz verschiedene Grade auf in Abhängigkeit vom osmotischen Druck des Versuchsmediums. Der Grad der Viskositätsherabsetzung ist bei gleicher Teilchengröße direkt an der Stärke der Brownschen Bewegung ablesbar. Letztere schwankt zwischen kaum sichtbarer bei Verwendung isotonischer elektrolytfreier Medien und äußerst lebhafter bei Verwendung von dest. Wasser oder bei Zusatz von quellungsfördernden Mitteln wie Ammoniumchlorid und Natriumphosphat. Die Wasseraufnahme spielt also hierbei für die Stärke der Brownschen Bewegung sicherlich eine große Rolle, kann aber nicht, wie oben erwähnt wurde, als ausschließliches Moment für die Viskositätsherabsetzung im Zytoplasma gelten. Die Viskosität in den hier in Betracht kommenden Systemen ist ja bekanntlich, außer von dem Gesamtdurchmesser der Teilchen, noch von dem an ihnen bestehenden elektrokinetischen Potentialsprung abhängig, also von der durch die Elektrolyte aufgebauten Doppelschicht. Die Viskosität sinkt ja bekanntlich zu einem Minimum herab, wenn der elektrokinetische Potentialsprung an den Teilchen, z. B. im isoelektrischen Punkt von Eiweißlösungen zerstört ist. Wir erwähnten, daß in unserem Falle eine Ladungshöhe der Teilchen im Neutralpunkt von dem durch adsorbierte Elektrolyte aufgebauten elektrokinetischen Potentialsprung herrühren müßte. Wird dieser durch Abwanderung der Elektrolyte mehr oder weniger zerstört, so bewirkt eine Ladungsverminderung auch eine Herabsetzung der Viskosität und völlige Entladung ein Viskositätsminimum. Hierbei dürfte eine gleichzeitige Wasseraufnahme das Ausmaß der Viskositätsverminderung verstärken.

Wir erwähnten schon, daß es auch nicht befriedigen kann, die Wasseraufnahme allein für die Erscheinung der Zellabkuglung in unserem Phänomen verantwortlich zu machen, schon mit Rücksicht darauf, daß die Abkuglung in isotonischen Medien gleichfalls eintritt. Es sei auch darauf hingewiesen, daß absterbende Zellen überhaupt sehr häufig Kugelform annehmen, insofern

die Viskosität ihres Protoplasmas dies zuläßt, d. h. insofern das Absterben nicht unter Umständen stattfindet, die eine Gelifikation des Protoplasmas verursachen. Eine Abkugelung des Protoplasmas der Zellen muß natürlich immer dann eintreten, wenn die Zelle nicht in ihrer früheren Form gelifiziert worden ist und wenn örtliche Oberflächenspannungsdifferenzen nicht bestehen. Mehr können wir nicht wissen solange wir die Kräfte nicht kennen, die Bewegungen von Teilen der Zelloberfläche bewirken. Wir dürfen höchstens aus unseren Versuchen allgemein schließen, daß die Form der embryonalen Gewebezellen mit der Ladung der Teilchen an der Zelloberfläche zusammenhängt. Vielleicht ist die Elektrolytadsorption an der Zelloberfläche eine ungleichmäßige. Die Oberflächenspannung wird ja durch Elektrolyte sicher verändert. Durch Aufladung, die die Teilchen voneinander abstößt, wird die Oberflächenspannung als Kohäsionskraft herabgesetzt, und durch etwaige ungleichmäßige Aufladung vielleicht örtlich verschieden herabgesetzt.

In unseren Versuchen konnten Gewebezellen in einem 1. Versuchsmedium, das ausschließlich  $\frac{n}{10}$  Natriumchloridlösung enthielt, einige Zeit gut leben, aber nicht so gut wie im equilibrierten Elektrolytgemisch. Aus der ganz normalen Neutralrotfärbung im Natriumchloridmedium zu schließen, dürfte auch in diesem Medium eine normale Stoffaufnahme möglich sein. Als 2. Versuchsmedium angewandt, bewirken sowohl  $\frac{n}{10}$  NaCl-Lösung als auch eine  $\frac{n}{10}$  NaBr-Lösung die Reversion der Kugelzellen. Andere Kationen, auch einwertige, können das Natriumion nicht ersetzen, während das Chlorion durch das Bromion gut ersetzbar ist. Die Unersetzbarkeit gerade des Natriumions für einen Aufbau der elektrokinetischen Doppelschicht ergibt sich wohl aus der Natur des adsorbierenden Teilchens, in die wir bisher noch keine Einsicht haben. In diesem Zusammenhang erscheinen uns die Befunde aufschlußreich, die sich bei der Anwendung von Versuchsmedien von höheren  $C_{OH}$  ergeben haben. Wir fanden ja, daß es gerade die Hydroxytionen, und nur diese, sind, welche nicht nur im elektrolytfreien Medium das beschriebene Phänomen außerordentlich beschleunigen, sondern auch in sonst normalem elektrolythaltigem Medium bei bestimmter Konzentration das gleiche Phänomen regelmäßig hervorrufen. Es vermag also sowohl die Wirkung des Elektrolytmangels auf die Zelle zu verstärken als auch diese Wirkung allein herbeizuführen. Wir dürfen wohl annehmen, daß es sich hierbei um eine Entladung der Teilchen durch Zerstörung der Doppelschicht durch die ungewöhnlich stark beweglichen Hydroxytionen handelt. Bei der vorliegenden Adsorption des Elektrolyten ist dann auch das Kation, das Natriumion, das nach außen gerichtete Ion der Doppelschicht. Hydroxytionen in entsprechender Konzentration können also hier als entgegengesetzte Ionen die Doppelschicht und damit den Potentialunterschied vernichten. Im Gegensatz dazu finden wir, daß Chlorammonium nur das durch Elektrolytentzug eintretende Phänomen zu beschleunigen und zu verstärken, nicht aber das Phänomen selbständig hervorzurufen vermag. Demgemäß sind auch die Zellveränderungen bei hoher  $C_{OH}$  andere als die unter der Einwirkung von Chlorammonium ent-

standen. Im letzteren Falle zeigen die Zellen enorme Quellung, Vergrößerung und Vakuolisierung, während bei der Einwirkung von Medien mit hoher  $C_{OH}$  rasche Abkuglung, aber keine sichere Zellvergrößerung gefunden wird. Denn in diesen Medien wird die Entladung durch Vernichtung der Doppelschicht herbeigeführt, während Ammoniumchlorid nur eine Zellquellung herbeiführt, wenn es nach Vernichtung der Doppelschicht durch das Fehlen des equilibrierten Elektrolytgemisches am Eindringen in die Zelle nicht mehr verhindert wird. Steigern wir noch weiter die  $C_{OH}$  des Mediums, sowohl in dest. Wasser wie auch in Ringerscher Flüssigkeit, so begegnen wir der beschriebenen Erscheinung des Platzens der Zellhülle mit Ausschütten von flüssigem Zellinhalt. Dieses Platzen der verdichteten Zellhülle ist hier nach soeben gesagtem nicht die Folge starker Quellung allein, sondern scheint durch Einwirkung der Alkalien auf die lipoidhaltige Zellhülle (Verseifung) zu erfolgen. Denn im Falle von Chlorammonium begegnen wir dieser Erscheinung trotz starker Quellung nicht.

Dagegen kommt häufig ein Platzen von kugelförmigen Zellen vor bei Verwendung von nur dest. Wasser als Versuchsmedium und bei gründlicher Wegspülung der am Explantat vom Züchtungsmedium zurückgebliebenen Elektrolyte. Hier ist das Platzen der Zellhülle nur eine Folge des starken und zu rasch anwachsenden Innendruckes der Zelle. Dieser Vorgang ist nun ganz analog demjenigen, wie er bei der Hypotoniehämolyse der roten Blutkörperchen vorkommt, wo ebenfalls durch ein Platzen der Erythrocytenmembran Blutfarbstoff, d. h. Zellinhalt der Erythrocyten, ausgeschüttet wird.

Wir dürfen nun in allgemeiner Art feststellen, daß die Hypotoniehämolyse der Erythrocyten nur ein Spezialfall eines allgemeinen Zellphänomens ist, dessen Ablauf an den tierischen Gewebezellen durch die vorliegenden Versuche mitgeteilt wurde.

### Zusammenfassung

1. Mit Hilfe der in den vorliegenden Versuchen angewandten Methode kann man die unmittelbare Wirkung von Stoffen auf die Gewebezelle genau so wie an frei lebenden Zellen beobachten.

2. Werden Gewebezellen aus ihrem flüssigen Züchtungsmedium nach gründlicher Waschung in ein elektrolytfreies Versuchsmedium gebracht, so tritt im Laufe von wenigen Sekunden folgendes aus drei Hauptvorgängen zusammengesetztes Phänomen auf.

a) Die Abkuglung der Zellen.

b) Das Auftreten von lebhafter Brownscher Bewegung der Granula und Vakuolen im Zytoplasma als Ausdruck einer starken Viskositätsherabsetzung. Nach einiger Zeit tritt hinzu:

c) Ein langsamer Koagulationsprozeß im Zytoplasma, der sich im Erscheinen neuer immer zahlreicher werdender Teilchen in lebhafter Brownscher Bewegung kundgibt.

3. An manchen kugelförmigen Zellen erfolgt hier und da ein Platzen der Zellhülle mit Ausschütten von flüssigem Inhalte mit Teilchen in Brownscher Bewegung.

4. Wird als Versuchsmedium eine 5proz. Ringerlösung benutzt, so treten die beschriebenen Vorgänge — mit Ausnahme des zuletzt genannten Platzens der Zellhülle — genau so auf wie oben, haben aber einen um 1—3 Minuten langsameren Ablauf.

5. Desgleichen treten die genannten Erscheinungen auf, wenn dem elektrolytfreien Versuchsmedium Anelektrolyte in verschiedener, die Zelle nicht so gleich vernichtender Konzentration zugesetzt werden, also etwa eine sogar 1 n Harnstofflösung oder entsprechende Dextroselösungen.

In elektrolytfreien  $\frac{n}{36}$  bis  $\frac{n}{12}$  dextrosehaltigen Versuchsmedien treten die Erscheinungen genau so auf, wie oben beschrieben, erleiden aber in ihrem Ablauf eine der Konzentration des Anelektrolyten proportionale Verlangsamung. Die Lebhaftigkeit der Brownschen Bewegung nimmt mit steigender Anelektrolytkonzentration ab.

6. In einer 10proz. Ringerlösung in dest. Wasser treten die genannten Vorgänge schon nicht mehr oder nur vereinzelt auf, dagegen starke Zellschädigung.

Aus einer bis 20proz. Ringerlösung tritt kein Neutralrot in flüssig gezüchtete Kulturzellen ein. Die Zellen der Plasmakulturen nehmen aus zugesetztem dest. Wasser kein Neutralrot auf, zeigen aber keine Spur der oben beschriebenen Erscheinungen. Das Plasmakulturen zugesetzte dest. Wasser nimmt also aus dem Plasmamedium anfangs ungefähr einen Elektrolytgehalt einer 10 bis 20proz. Ringerschen Flüssigkeit auf.

7. Es ergibt sich daraus, daß das beschriebene Phänomen sowohl durch osmotische Druckdifferenz als auch — was ebenfalls mit letzterem zusammenhängt — in unmittelbarer Weise durch die Abdiffusion von Elektrolyten in das elektrolytfreie Versuchsmedium hervorgerufen wird. Es muß durch starke Herabsetzung des Elektrolytgehaltes in der Außenflüssigkeit ein neues Gleichgewicht sich einstellen: Bei starker Verminderung des Elektrolytgehaltes in der Umgebung nicht diffusibler Teilchen wandert bekanntlich der ganze Elektrolytgehalt nach der Außenflüssigkeit. Der Elektrolytverlust bewirkt durch Ladungsverminderung eine Viskositätsherabsetzung (Brownsche Bewegung), die durch vermehrte Wasseraufnahme nur verstärkt wird. Weiter fortschreitende Entladung führt die langsame Koagulation im Zellinnern herbei.

Die an der Zellgrenze angereicherten oberflächenaktiven Substanzen verdichten sich nach dem Elektrolytverlust zur Zellhülle. Diese lipoid- und fettsäurehaltige Zellhülle wird durch alkalihaltige Versuchsmedien prompt aufgelöst (verseift), wodurch ein rasches Platzen der Hüllen mit Ausschütten des Zellinhaltes erfolgt. Außerdem erfolgt öfters auch im Neutralpunkt bei elektrolytfreien und stark hypotonischen Medien, ein Platzen der Zellhülle, das hier durch rasche Drucksteigerung, die die Elastizität der entstandenen Zellhülle nicht ausgleichen kann, herbeigeführt wird. Diese letztere Erscheinung ist ganz analog dem Platzen der Erythrozyten mit Ausschütten ihres Zellinhaltes, des Hämoglobins, bei der Hypotoniehämolyse.

8. Das beschriebene Phänomen ist reversibel. Wird also zu einem bestimmten Zeitpunkte anscheinend dann, wenn die Koagulation noch nicht begonnen, oder die wachsenden Teilchen noch nicht eine gewisse Größe erreicht haben, die Kultur in ein zweites elektrolythaltiges Versuchsmedium gebracht, so nehmen die Zellen äußerst rasch ihre frühere normale Zellform wieder an, bei gleichzeitigem sofortigem Aufhören der Brownschen Bewegung im Zytoplasma. Ist dem zweiten Versuchsmedium Neutralrot zugesetzt worden, so erfolgt bald eine normale Vitalfärbung der Granula. Desgleichen erfolgt eine normale Färbung der Mitochondrien mit Janusgrün.

9. Die Reversion kann nicht nur durch Ringerlösung, sondern auch durch eine  $\frac{n}{10}$  Natriumchloridlösung und ebenso durch eine  $\frac{n}{10}$  Natriumbromidlösung prompt herbeigeführt werden. Auch die Vitalfärbung der Zellen erfolgt dann auch aus diesen Lösungen genau so wie aus Ringerlösung. Dagegen kann die Reversion nicht herbeigeführt werden durch NaJ, KCl, KBr, KJ, LiCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

10. Die Reversibilität der Erscheinungen, die große Geschwindigkeit ihres Eintretens wie auch der Umstand, daß die Reversion bei Elektrolytzusatz noch viel schneller eintritt als die Erscheinungen bei Abdiffusion der Elektrolyte zeigen, daß es sich um mit Adsorptionsvorgängen verbundenen Erscheinungen handeln dürfe.

Werden Gewebezellen aus ihrem flüssigen Züchtungsmedium in eine  $\frac{n}{10} - \frac{n}{15}$  Ammoniumchloridlösung gebracht, so treten die unter 1. und 2. beschriebenen Vorgänge in verstärktem Maße auf.

Es tritt nämlich zu der Zellabkuglung und Viskositätsverminderung eine besonders starke Zellquellung hinzu. Die einen Zellen vergrößern sich zusehends, in den anderen erscheinen zahlreiche Riesenvakuolen.

Wird eine ebensolche Ammoniumchloridlösung einem equilibrierten Elektrolytgemische zugesetzt und als Versuchsmedium benutzt, so zeigen die Zellen in demselben keinerlei Veränderungen der beschriebenen Art. Die Zellen ändern ihr normales Aussehen nicht. Das Ammoniumchlorid kann also in Gegenwart des equilibrierten Elektrolytgemisches nicht in die Zellen eindringen, um in ihr seine quellende Wirkung zu entfalten.

11. Werden Gewebezellen aus ihrem flüssigen Züchtungsmedium in ein Gemisch von gleichen Teilen einer  $\frac{n}{15}$  Ammoniumchloridlösung und einer  $\frac{n}{15}$  Natriumchloridlösung gebracht, so treten an den Zellen gleichfalls keinerlei Veränderungen in oben beschriebenem Sinne auf.

Wird aber ein Versuchsmedium von gleichen Teilen einer  $\frac{n}{15}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung und einer  $\frac{n}{15}$  KBr- oder  $\text{CaCl}_2$ -Lösung benutzt, so treten sogleich Abkuglung, Brownsche Bewegung im Zytoplasma und enorme Quellungerscheinungen auf. Es sind also die Elektrolyte des Natriumchlorids, die dem Ammoniumchlorid das Permeieren in die Zelle verwehren. Die Ersetzbarkeit des Anions nicht aber

des Kations weisen auf die besondere Bedeutung des Kations, des Natriumions, für die Abwehr vor dem Eindringen von Stoffen in die Zelle hin. Ein ganz ähnliches Verhalten wie das Ammoniumchlorid zeigt auch das Natriumphosphat.

12. Werden flüssig gezüchtete Gewebezellen in ein elektrolytfreies Medium mit hohem Hydroxylionengehalt gebracht, etwa entsprechend einem pH 10, so treten die unter 1. und 2. geschilderten Erscheinungen mit großer Beschleunigung und Heftigkeit auf. (Bei noch höherem pH tritt dann das beschriebene Verseifen und Platzen der Lipoidhülle auf.) Die Wirkung der OH'-Ionen ist offenbar gleichsinnig mit der des elektrolytfreien Mediums und verstärkt die letztere.

13. Werden flüssig gezüchtete Gewebezellen in eine Ringersche Flüssigkeit mit hohem Hydroxylionengehalt gebracht, etwa entsprechend einem pH 11, so treten die unter 1. und 2. geschilderten Erscheinungen prompt und mit großer Geschwindigkeit auf.

Ist dabei die Hydroxylionenkonzentration nicht zu stark, so bleibt die Zerstörung der Lipoidhülle aus. Die Hydroxylionen vermögen also auch in Gegenwart eines equilibrierten Elektrolytgemisches das Phänomen prompt herbeizuführen.

14. Das beschriebene Phänomen tritt nicht nur an flüssig gezüchteten Fibroblastenkulturen, sondern in gleicher Weise an Epithelkulturen und ebenso auch an in flüssigem Medium überlebenden Leukozyten auf.

15. An geschädigten Zellen treten die beschriebenen Veränderungen in verlangsamer Weise auf. Tote Zellen zeigen das Phänomen natürlich nicht. Erst das Ausbleiben des beschriebenen Phänomens ist ein sicheres Zeichen des Zelltodes.

---