

(Aus dem Institut für allgemeine Biologie und experimentelle Morphologie
der Karlsuniversität in Prag.)

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER PROTOPLASMAHYSTERESIS
UND DER HYSTERETISCHEN VORGÄNGE. (ZUR KAUSALITÄT
DES ALTERNS.)

IX. PHYSIOLOGISCHE GRADIENTEN UND PROTOPLASMAHYSTERESIS.

Von

Prof. Dr. VLAD. RŮŽIČKA.

(Eingegangen am 5. Juli 1927.)

Die langjährige Arbeit des amerikanischen Biologen CHILD ermöglichte in der letzten Zeit das Verständnis vieler allgemein-biologischer Erscheinungen von fundamentaler Bedeutung durch das detaillierte Studium der sogenannten physiologischen Gradienten, welche in lebenden Körpern festzustellen sind. Als ich vor Jahren die Entwicklungsmechanik des Zentralnervensystems mit Hilfe einer neuen Methode (Arch. f. Hyg. 1912) zu studieren begann, wurde ich zu einer analogen Konzeption geführt. Äußere Umstände haben mich dann aber von diesem Thema weggeführt. Doch konnte ich analog wie CHILD erkennen, daß diese Gradienten die grundlegenden Faktoren bei der Lokalisation und Differenzierung der Teile des in Entwicklung befindlichen Embryos abgeben. Die quantitativen Gradienten physiologischer Zustände, d. h. die Richtungen in lebenden Körpern, in welchen Abstufungen verschiedener Zustände und Geschehen verlaufen, bilden den einfachsten und allgemeinsten Ausdruck von funktionellen und morphologischen Achsen, welchen eine so große Bedeutung bei morphogenetischen Vorgängen zugeschrieben wird, weil sie denselben eine bestimmte Ordnung der Polarität und Symmetrie vorschreiben. Außerdem spielen sie aber auch in der Systematik und vielen allgemeinen Fragen eine wichtige Rolle, z. B. in der Frage des biologischen Individuums, in der Frage seiner Einheitlichkeit und Ordnung, für deren Behandlung das Studium der Gradienten von höchster Bedeutung ist, indem es die naturwissenschaftliche Lösung derselben eigentlich erst ermöglicht. Gelingt es ja durch Änderung der Gradienten sowohl die Individualisation als die ontogenetische und restitutionale Morphogenese und viele Funktionen zu beherrschen und zu modifizieren. Die Gradienten bilden die Basis der Dominanz und Subordination der Körperteile und Körperebenen.

Die Gradienten haben, wie CHLD feststellen konnte, ihren Ursprung in der Wirkung von Außenfaktoren auf ein reaktionsfähiges Protoplasma von bestimmter Konstitution. Die Form des Gradienten, seinen Abfall, den Umstand ob er vorübergehend oder dauernd ist, ob er auf die Nachkommenschaft übergeht, weiterhin den Charakter der im Verlaufe des Gradienten zustande kommenden Differenzierungen, bestimmt die spezifische Konstitution des Protoplasmas.

Die Gradienten wirken somit als ordnende und determinierende Faktoren. Sie dienen als Ausgangspunkt der geordneten Entwicklung.

Bei dieser außerordentlichen Bedeutung der Gradienten für die allgemeine Biologie erscheint es sehr bemerkenswert, daß bis jetzt keine allgemeine Basis eruiert wurde, welche die stoffliche Grundlage für alle die verschiedenen Gradienten, denen man an bestimmten Stellen des Organismus begegnen kann, abzugeben imstande wäre. Die Möglichkeit, an die Lösung dieser Frage heranzutreten, eröffnete sich mir im Verlaufe meiner nunmehr bereits 18 Jahre währenden Versuche und Studien über die Protoplasmahysteresis. Als erstes wähle ich ein Objekt, dessen Hauptachsengradienten von verschiedenen Seiten her vielseitiger Untersuchung unterworfen worden ist, nämlich den gewöhnlichen Regenwurm (*Lumbricus terr. L.*).

Den Arbeiten verschiedener amerikanischer Autoren gemäß kann bei segmentierten Tieren, insbesondere bei oligochäten und polychäten Anneliden festgestellt werden, daß das hintere Körperende sekundär zu einem Gebiete höheren Stoffwechsels wird, und zwar infolge des beschränkten Bereiches der Dominanz des Apikalendes. Die Längsachse des Regenwurmes stellt somit zwei in entgegengesetztem Sinne verlaufende Gradienten, deren Basalenden in der mittleren Region des Körpers zusammentreffen, und deren Apikalenden einerseits durch die Kopf-, andererseits durch die Schwanzregion dargestellt werden. Der Treffpunkt der basalen Teile der beiden Gradienten liegt nicht genau in der Mitte des Körpers, sondern dem Schwanzende näher. Da diese Gradienten, CHLD gemäß, als Gradienten der Stoffwechselintensität aufzufassen sind, stellt die Kopfregion den Bezirk des höchsten Stoffwechsels in diesem Gradient vor. Das Schwanzende, welches den Gipfel des zweiten Gradienten bildet, stellt regelmäßig ein Gebiet von etwas geringerer Stoffwechselintensität dar. Doch ist dessen Stoffwechsel immerhin hoch. Die mittleren Körperregionen weisen den niedrigsten Stoffwechsel auf. Manchmal stehen jedoch die Verhältnisse so, daß geschlossen werden muß, daß dem Schwanzende ein höherer Stoffwechsel zukommt als dem Kopfende, was für die eventuellen Regenerationsprozesse von Bedeutung ist.

Damit steht in Übereinstimmung, daß beide Gradienten nicht gleich lang sind, sondern daß der apikale (oder eventuell der Schwanz-) Gradient

länger ist als der andere; der Bereich der Dominanz hängt nämlich von der Intensität des Stoffwechsels in den Gipfelenden der Gradienten ab.

MORGAN und DIMON (Journ. of Exper. Zool. I, 1904) zeigten mit Hilfe des Galvanometers, daß in der Längsachse des Regenwurmes zwei elektrische Gradienten verlaufen, deren Gipfelenden (in der Kopf- und Schwanzregion) sich als negativ erweisen, während die Mittelenden positiv sind.

Nach GALIGHER und HYMAN (Journ. of Exper. Zool. 34, 1921) entsprechen diese elektrischen Gradienten der Anneliden Gradienten der Empfindlichkeit, der Färbung und Reduktionsfähigkeit, und zwar so, daß die Orte der höchsten Empfindlichkeit, der stärksten Färbung und Reduktion galvanometrisch elektro-negativ sind in bezug auf die Stellen der geringeren Empfindlichkeit, der schwächeren Färbung und kleineren Reduktionsfähigkeit.

Diese Übereinstimmung mit der Vorstellung eines Gradienten des Stoffwechsels ist sicherlich bedeutsam.

Trotzdem ersteht vor uns die Frage, ob es nicht möglich ist, die materielle Grundlage dieser physiologischen Gradienten festzustellen, ob es nicht möglich ist, dieselben durch einen Zustand des Protoplasmas, in welchem sie entstanden sind und in dem sie wirken, zu charakterisieren.

Bedenken wir den Zusammenhang, in welchem sich die Stoffwechselvorgänge mit den Änderungen des Dispersitätszustandes der Biokolloide befinden und welcher durch unsere Arbeiten über die Protoplasma-hysteresis aufgedeckt wurde, bedenken wir weiterhin, wie groß die Reihe derjenigen Lebensvorgänge ist, die als hysteretische bezeichnet werden müssen, so drängt sich ganz natürlich die Frage auf, ob die Protoplasma-hysteresis nicht auch eine Rolle spielt bei der Etablierung und Fixation der Stoffwechselgradienten und dadurch bei den grundlegenden Prozessen der Morphogenese und Individualisation.

Um diese Frage zu lösen, habe ich unter Mitarbeit der Herren HLUCHOVSKÝ, SVOBODA und VEJNAR eine Reihe von Bestimmungen der Protoplasma-hysteresis zum Teile mit Hilfe der Alkohol(Ausflockungs-)methode, zum Teil mit Hilfe der pH-Bestimmung in verschiedenen Abteilen des Regenwurmkörpers ausgeführt. In bestimmten Fällen wurde auch die Viskosität und die Oberflächenspannung der gewonnenen Lösungen festgestellt.

In dem ersten Versuche wurden die Tiere in drei gleich lange Teile, den Kopf-, Schwanz- und Mittelteil geteilt. Dieselben wurden mit Glascherben verrieben, der gewonnene Brei mit dem 10fachen Volumen destillierten Wassers ausgelaugt, filtriert und 5 cm des Filtrates mit 7 cm destillierten Wassers verdünnt. Die letztere kolloide Lösung wurde dann zu den Messungen verwendet. In diesem Versuche wurden gleichzeitig

20 Tiere verarbeitet, so daß die gewonnenen Zahlen Durchschnittswerte sind:

	Kopfteil	Mittelteil	Schwanzteil
pH . . .	6,2	5,8	6
Alkohol . .	0,25 ccm	0,45 ccm	0,4 ccm

Später wurde die Methode aus verschiedenen Gründen, insbesondere aus dem Grunde, um zu eruieren, wie weit der Bereich des einzelnen Gradienten reicht, vervollkommenet, indem die Tiere nun in fünf Teile geteilt wurden, welche zerrieben, zehnfach mit Wasser verdünnt und nach 24stündigem Aufenthalt im Eiskasten filtriert wurden. Das Filtrat zeigte eine verschieden intensive Trübung, und zwar, wenn wir die Teile, in welche der Körper aufgeteilt wurde, mit fortlaufenden römischen Zahlen bezeichnen, die stärkste, in II gleich hinter I der Kopfreion, dann absteigend von III bis V, die schwächste in I, dem eigentlichen Kopfteil. Läßt man diese Lösungen zwei Tage stehen, so kommt es zu einer spontanen Ausflockung in derselben Ordnung, so daß die Lösung II vollständig koaguliert, die Lösung I stärker getrübt ist als früher. Ganz analoge Verhältnisse traten bei den Filtraten der Versuchsserie VI in Erscheinung.

Die Alkoholreaktion wurde in der Weise ausgeführt, daß zu 5 ccm der Kolloidlösung 1 ccm 96%igen Alkohols hinzugefügt und der Fortschritt der Ausflockung beobachtet wurde.

Solche Messungen wurden im ganzen an 205 Tieren in sechs Serien ausgeführt. Die erhaltenen Resultate sind also wiederum Durchschnittswerte.

Serie I. 20 Tiere.

	I.	II.	III.	IV.	V.
pH . . .	6,1	5,8	5,5	6,0	6,1

Die Alkoholreaktion nicht ausgeführt.

Serie II. 20 Tiere

	I.	II.	III.	IV.	V.
pH . . .	6,3	5,9	5,45	5,7	5,9

Die Alkoholprobe nicht ausgeführt.

Serie III. 15 Tiere.

	I.	II.	III.	IV.	V.
pH . . .	6,2	5,9	5,7	5,4	5,8
Alkohol	+	++++	++++	+++	++

In diesem Versuche fiel der Kopfteil etwas länger aus, so daß er technisch nicht ganz tadellos ist.

Serie IV. 30 Tiere.

	I.	II.	III.	IV.	V.
pH . . .	7,0	6,6	6,2	6,7	6,9
Alkohol	+	++++	++++	+++	++

Serie V. 50 Tiere.

	I.	II.	III.	IV.	V.
pH . . .	7,1	6,6	6,3	6,7	6,9
Alkohol	+	++++	+++++	+++	++

Die Alkoholreaktion verlief in diesem Falle nachfolgend. Nach 24stündigem Stehen im Probierröhrchen koagulierte III vollständig, in II bildeten sich grobe Flocken, die rasch sedimentierten, in IV feinere, in V kaum merkliche Flocken, I war gleichmäßig stark getrübt.

Serie VI. 70 Tiere.

	I.	II.	III.	IV.	V.
pH	7,2	6,5	6,2	6,6	7,0
Alkohol	IV2	VI	V2	IV2	V2
Die nativen Trübungen . .	III	V2	IV2	IV	III2

Die Werte der Alkoholreaktion entsprechen den Graden auf der Skala des von PATOČKA konstruierten indirekten Nephelometers, welche die Intensität der Trübung objektiv festhalten. Die Skala steigt von I—VI. Mit derselben Methode wurde der Grad der nativen Trübungen in den von den einzelnen Körperteilen gewonnenen Filtraten der gewonnenen Kolloidlösungen bestimmt. Vergleichen wir diese Zahlen, so bemerken wir, daß sie einander vollkommen entsprechen und daher ein gutes Bild von dem kolloiden Zustande im Körper des Regenwurmes geben.

Übersehen wir die gewonnenen Resultate, so ersehen wir vor allem, daß der pH-Gradient, den wir als einen Gradient der chemischen Reaktion der Körpergewebe auffassen können, tatsächlich die Existenz zweier Gradienten im Körper des Regenwurmes andeutet, welche entgegengesetzt gerichteten Gradienten des Stoffwechsels entsprechen. Den höchsten pH-Werten begegnet man nämlich an den beiden Körperenden, an welchen sich die Gipfel der Gradienten, also die Stellen des intensivsten Stoffwechsels befinden sollen, während die niedrigsten pH-Werte an den mit dem niedrigsten Stoffwechsel ausgestatteteten Stellen der mittleren Körperregionen zu konstatieren sind.

Die Messung der Stabilität der Körperkolloide mittels der Alkoholmethode führt zu einem analogen Resultate. Auch diese Methode demonstriert das Dasein zweier entgegengesetzt verlaufender Gradienten im Regenwurmkörper, deren Gipfel an den beiden Körperenden liegen. An diesen Stellen ist dieser Reaktion gemäß die Kolloidlösung von dem isoelektrischen Punkt am meisten entfernt, während sie ihm in den mittleren Körperregionen am nächsten ist. Dieser Verlauf der beiden Gradienten entspricht, soweit unsere diesfälligen Erfahrungen reichen, vollständig der Vorstellung von Stoffwechselgradienten.

Vergleichen wir den pH-Gradient mit dem Gradient der Stabilität der Körperkolloide, so zeigt sich deutlich ihr entgegengesetzter Verlauf. Derselbe ist uns nicht neu. Wir begegneten demselben schon bei meinen

Untersuchungen über das Verhalten des pH und der Protoplasmahysterese bei alten und bei verjüngten Tieren (Dtsch. med. Wochenschr. 48, 1922), bei den Versuchen BERGAUERS mit Hyperthyreoidismus (Arch. f. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsmech. 101, 1924) und auch bei den Versuchen SVOBODAS mit Hungerung (ibid.). BERGAUER hat die Vermutung ausgesprochen, daß es sich hierbei um den Ausdruck von Dissimilationsvorgängen handelt, deren Vorwiegen an Stellen hoher Stoffwechselintensität begreiflich ist. Außer den angeführten Umständen bezeugen den intensiven Stoffwechsel auch noch andere durch verschiedene amerikanische Autoren an den Anneliden festgestellte Momente, als das sind: der gesteigerte Sauerstoffverbrauch an diesen Orten (CHILD, HYMAN und GALIGHER u. a., die intensivere Reaktion derselben auf die Wirkung verschiedener Gifte (Die Schule CHILDS), ihre galvanometrische Negativität (MORGAN und DIMON), die ich bestätigen kann. Unseren Befunden gemäß handelt es sich um Orte einer höheren Dispersion der Kolloide, denn wir haben an ihnen, wie die obigen Resultate zeigen, eine höhere Stabilität nachgewiesen. Das alles stimmt vollständig überein. Zu erklären wäre nur, warum der pH einen entgegengesetzten Verlauf aufweist und wie die galvanometrisch eruierte Elektronegativität der Gradientengipfel mit der positiven Ladung ihrer Kolloide zusammenhängt. Darüber belehren uns weitere im Laufe befindliche Versuche.

Von den angeführten Ergebnissen scheint mir derzeit das auf Grund der Bestimmungen der Kolloidstabilität gewonnene das wichtigste zu sein. Zeigt es ja doch, daß die Stabilität der Kolloide an den Gipfeln der Gradienten größer ist, als an deren Basis. Das bedeutet nämlich, daß sich die Kolloide an den Gipfeln der Gradienten in einem Zustande höherer Dispersität befinden als in den mittleren Körperregionen. Dieser Umstand ist in voller Übereinstimmung mit der Behauptung CHILDS, daß es sich um Gradienten der Stoffwechselintensität handelt.

Da jedoch die höhere Dispersität zugleich auch einem niederen Grade der Protoplasmahysterese, die niedere Dispersität aber umgekehrt einem höheren Grade derselben entspricht, so ist klar, daß die beiden Gradienten des Regenwurmkörpers nicht nur Stoffwechselgradienten darstellen, sondern auch Gradienten der Protoplasmahysterese.

Ähnlich verhalten sich auch andere Gradienten anderer Organismen. So ist z. B. in der Längsachse von *Dixippus morosus* gleichfalls eine Gradienten der Kolloidstabilität zu konstatieren.

15 Stück *Dixippus* von Mittelgröße wurden einzeln in je drei gleiche Teile zerschnitten. Dieselben wurden zu einem Brei verrieben und 24 Stunden lang mit Wasser extrahiert, und zwar so, daß auf je 1 g *Dixippus*-Substanz 10 g Wasser kamen. Die Extrakte wurden filtriert und mit der gleichen Menge Alkohol zur Ausflockung gebracht. Die gewonnenen Trübungen aus der Substanz des Kopftheiles entsprachen dem Grade IV,

des indirekten Nephelometers von ПΑΤΟՕΚΑ, des Mittelteiles dem Grade V, des indirekten Nephelometers von ПΑΤΟՕΚΑ, des Hinterteiles dem Grade VI, des indirekten Nephelometers von ПΑΤΟՕΚΑ. Nachdem die niedrigeren Grade des Nephelometers den höheren Graden der Kolloiddispersion entsprechen, so ist klar, daß hier ein Gradient vorliegt, welcher seinen Gipfel im Kopfteile besitzt, was den Forderungen CHILDS vollkommen entspricht. Der mit der höchsten Stoffwechselintensität ausgestattete Gipfel des Längsachsengradienten des *Dirippus*-Körpers weist auch die größte Dispersität auf. Dieser Gradient ist also auch als Hysterese-gradient aufzufassen, dessen niedrigste Grade im Kopfteil, dessen höchste im Hinterkörper zu verzeichnen sind. Während die niedrigeren Grade homogen erschienen, wies die Trübung aus der Hinterkörpersubstanz schon eine feine Flockung auf.

Auch am Pflanzenkörper vermag man das Vorhandensein eines mit der Längsachse des Stammes kongruenten Gradienten der Protoplasma-hysterese aufzuzeigen. Man zerlegt die Hauptachse einer in Blüte befindlichen Pflanze von *Rheum offic.* in einige Teile, die wir mit den Buchstaben A—G bezeichnen wollen und von welchen A von dem an die Wurzeln angrenzenden basalen Teil des Stengels, G aber aus der Region unterhalb der Infloreszenz abstammt, bereitet aus den einzelnen Teilen durch Zerreibung mit Seesand einen Brei, verdünnt mit dem fünfmaligen Gewicht destillierten Wassers. Von diesem Brei nimmt man 2 ccm und fügt 1 ccm Alkohol zu (in der Kontrolle 1 ccm destilliertes Wasser), um die Ausflockung zu bewirken. Die Trübungen werden einesteils mit der indirekten Nephelometrie ПΑΤΟՕΚΑΣ, andererseits mit Hilfe der freilich viel exakteren Tyndallmetrie auf ihre quantitativen Unterschiede untersucht. Wir erhielten die folgenden Resultate.

Abteil	Skala von ПΑΤΟՕΚΑ Probe mit Alkohol	Tyndallmeter	
		Probe ohne Alkohol	mit Alkohol
A	III	21,5	21
B	IV	15,5	17,5
C	IV	15,5	18
D	III	14,5	16
E	III	9	10
F	IV	15	16
G	III	14,5	14,5

Besonders die durch Tyndallmetrie gewonnenen Resultate sind überzeugend, indem sie durch den Abfall der Werte in der Richtung von der Basis zum Gipfel die Existenz des Hysteresegradienten genau in dem von CHILD gedolmetschten Sinne nachweisen. Wichtig ist, daß die Tyndallmetrie den analogen Verlauf des Gradienten auch für die natürlichen nicht mit Alkohol behandelten Gewebslösungen aufzeigt. Der Gradient

reicht nicht bis knapp unter die Infloreszenz, sondern sein, der niedrigsten Hysterese entsprechender Punkt, liegt in unserem Falle etwa 8 cm unter der ersten Blütenverzweigung. Die Tatsache, daß der Gradient nicht bis zum äußersten Gipfel des Stengels reicht, dürfte wohl mit den physiologischen Umständen der Blütenentwicklung in Zusammenhang zu bringen sein. Leider hatte ich keine Gelegenheit, den Verhältnissen der Hysteresegradienten bei einem geeigneten Pflanzenmaterial nachzugehen. Immerhin dürfte aus den obigen Angaben hervorgehen, daß sich die Pflanzengradienten ähnlich verhalten wie die tierischen, indem sie an der Basis des Pflanzenstengels der niedrigsten, an seinem Gipfel der höchsten Stabilität der Kolloide, d. h. auch der analogen Dispersität derselben entsprechen, und sich somit den von CHILD abgeleiteten Stoffwechselgradienten analog verhalten.

Auf Grund der angeführten Tatsachen erscheint der Schluß berechtigt, daß *die hysteretischen Vorgänge die allgemeine Grundlage der physiologischen Gradienten abgeben.*

Durch diese Feststellung erhöht sich wiederum die Bedeutung der hysteretischen Prozesse, wie aus den eingangs dieser Abhandlung über die Bedeutung der physiologischen Gradienten für eine ganze Reihe fundamentaler allgemein-biologischer Probleme angeführten Worten zur Genüge erhellt.
