

Die Frage, ob das *Drosophila*-Auge durch die Feinstruktur der Rhabdomeren als Analysator für polarisiertes Licht geeignet ist, wie FERNANDEZ-MORAN im Anschluß an Überlegungen von AUTRUM und STUMPF³ annimmt, läßt sich auf Grund der morphologischen Befunde allein nicht entscheiden. Die in diesem Zusammenhang geäußerte Vermutung des Autors, daß gegenüberliegende Rhabdomeren einander in besonderem Maße entsprächen, können wir jedoch nicht bestätigen.

² H. HERTWECK, Z. wiss. Zool. **139**, 559 [1931].

³ H. AUTRUM u. H. STUMPF, Z. Naturforschg. **5b**, 116 [1950].

⁴ F. S. SJÖSTRAND, J. cellular comparat. Physiol. **42**, 15 [1953].

Der Abstand zwischen den dunklen Streifen, also die Breite einer Periode (Abb. 5), beträgt bei *Drosophila*, ebenso wie bei der Stubenfliege, rund 500 Å, d. h. etwa den zehnten Teil der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes. In dieser Größenordnung liegen merkwürdigerweise auch die Abstände der von SJÖSTRAND⁴ beschriebenen Streifen in den Außengliedern der Stäbchen und Zapfen des Wirbeltierauges, die nach SCHMIDT⁵ doppelbrechend sind.

⁵ W. J. SCHMIDT, Z. Zellforsch. mikroskop. Anatom. **22**, 485 [1935].

Der Einfluß von Gleichstrom auf die isolierte Leberzelle der Maus *

Von MANFRED DOHMEN

Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie in Düsseldorf

(Direktor Prof. Dr. med. H. MEESSEN)

(Z. Naturforschg. **12b**, 583—586 [1957]; eingegangen am 4. Februar 1957)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Einfluß verschiedener chemischer Substanzen auf die isolierte Leberzelle der Maus wurde auch das Verhalten der Zellen unter der Einwirkung von Gleichstrom im Phasenkontrast-Mikroskop untersucht. Dabei wurden vier verschiedene Vorgänge beobachtet: 1. Eine Wanderung ganzer Zellen und isolierter Zellkerne zur Anode hin. 2. Eine Wanderung des Kerninhaltes gleichfalls auf die Seite der Anode. 3. Schrumpfungs- und Quellungsvorgänge, die nachweislich auf einer Änderung des pH-Wertes in dem die Zellen umgebenden Medium beruhen. 4. Veränderungen an der Kernmembran und an den sog. Potocytosisblasen, die nicht auf eine Änderung des pH-Wertes in dem die Zellen umgebenden Medium zurückzuführen sind.

Die vorliegenden Beobachtungen wurden mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen und die Wirkungsweise des elektrischen Stromes in bezug auf die morphologischen Erscheinungen diskutiert.

Über den Einfluß des elektrischen Stromes auf mikroskopische Strukturen besteht ein reichhaltiges Schrifttum. Die Untersuchungen an Pflanzenzellen, Protozoen, Blut- und Gewebszellen erstrecken sich einmal auf die Wanderung von Zellen und Zellbestandteilen im elektrischen Feld, dann auf das morphologische Verhalten von Kern und Protoplasma.

1903 stellte LILLIE¹ fest, daß Blut- und Gewebszellen im elektrischen Feld wanderten. Das Ausmaß der Wanderung und die Wanderungsrichtung seien von Zelle zu Zelle und von Zellart zu Zellart verschieden. Während z. B. kleine Lymphozyten, Thymuskern und Spermienköpfe zur Anode wanderten,

ließen Muskelzellen und große Lymphozyten eine Bewegung zur Kathode erkennen. Von den Erythrozyten wanderten einige zur Anode, einige zur Kathode und einige zeigten keine Bewegung. LILLIE fand, daß das Ausmaß der Wanderung von kleinen Lymphozyten, Thymuskernen und Spermienköpfen parallel gehe mit der Färbbarkeit und der Acidität des Chromatins. Die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit besagten nach LILLIE, daß die Zellen individuell verschiedene Ladungen trügen.

PENTIMALLI² berichtete 1909 über die Verschiebung von Teilungsfiguren im elektrischen Feld auf die Seite der Anode. Er schloß, daß die Chromatinmassen der sich teilenden Zellen gegenüber den

* Die Befunde wurden vor der Arbeitsgemeinschaft Rheinisch-Westfälischer Pathologen am 8. Dezember 1956 demonstriert.

¹ R. S. LILLIE, Amer. J. Physiol. **8**, 273 [1903].

² F. PENTIMALLI, Arch. Entwickl. mech. Organismen **28**, 260 [1909].

übrigen Kern- und Protoplasma-Bestandteilen negativ geladen seien. Da er im Ruhekern keine Verschiebung sah, glaubte er, daß die elektrische Ladung im Ruhekern gleich Null sei. 1939 wies KAMIYA³ darauf hin, daß die Verschiebung der Chromatinmassen nicht auf einer bestimmten elektrischen Ladung beruhe, sondern passiv durch Quellungs- und Entquellungsvorgänge erfolge. 1954 stellten PHILIPOT und STANIER⁴ an isolierten Rattenleber-Kernen fest, daß der Kerninhalt auf die Anode zu wandere, nicht aber der Kern. Sie folgerten, daß der Inhalt des Kernes vorwiegend negative Ladungen enthalte, dagegen der Kern selbst elektroneutral sei; die negativen Ladungen seien an die Nucleinsäuren gebunden. Diese Auffassung stimmt mit den Beobachtungen von LILLIE¹ und PENTIMALLI² insofern überein, als die Spermatozoen und die Chromatinmassen der in Teilung begriffenen Zellen nach LILIENFELD⁵ den höchsten Bestand an Nucleinsäuren aufweisen.

Der Einfluß von Gleichstrom auf die Morphologie von Kern und Protoplasma wurde schon 1895 von KLEMM⁶ ausführlich beschrieben. Bei Versuchen mit *Tradescantia*-Haaren fand KLEMM, daß sich der Zellkern unter der Einwirkung von Gleichstrom um nahezu das Doppelte vergrößere. Das Protoplasma verschiedener Zellen reagiere mit einer schaumigen Aufquellung und mit einem Zerfall. Die gleichen Veränderungen beobachtete KLEMM auch bei der Einwirkung von Laugen.

Die eigenen Untersuchungen über den Einfluß von Gleichstrom auf isolierte Leberzellen schließen sich an diese Ergebnisse an.

1. Methodik

Unsere Zellpräparate wurden durch Abschaben von einer frischen Schnittfläche der Leber unmittelbar nach dem Tod des Tieres gewonnen. Der Leberbrei wurde auf einen Objektträger gebracht und einige Tropfen einer 0,9-proz. Kochsalzlösung oder des isotonischen Natrium-Acetat-Puffergemisches nach Michaelis zugesetzt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte nach dem Phasenkontrast-Verfahren mit Hilfe eines Wasser-Eintauchobjektivs der Firma Leitz. Die für das Wasser-Eintauchverfahren entwickelten Objektträger enthalten in der Mitte eine eingeschliffene ringförmige Rinne, die ein Auseinanderfließen des Tropfens verhindert. Als Elektroden wurden zwei aus einer Platin-

Gold-Legierung bestehende Drähte in eine den elektrischen Strom nicht leitende Kunststoffhülle, die auf jedes Objektiv aufgesetzt und während der mikroskopischen Untersuchung gedreht werden kann, eingeschmolzen. Die unten aus der Hülle herausragenden freien Enden der Elektroden tauchen beim Senken des Tubus in den Wassertropfen. Durch die Befestigung der Elektroden am Objektiv wurde erreicht, daß jede im Zentrum des Blickfeldes eingestellte Zelle denselben Bedingungen unterliegt. Die untere Front des Objektivs wurde durch eine Kollodiumschicht vom Wasser isoliert. Als Stromquelle diente der durch einen Synchronmotor in Gleichstrom umgewandelte Wechselstrom des Netzes. Durch Verschieben eines in den Stromkreis eingebauten Widerstandes konnte die Stromstärke variiert und an einem Ampèremeter abgelesen werden. Die Stromdichte ($j = \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$) berechnete sich auf rund $166,6 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$ (bei einer Stromstärke von 10 mA und bei einer Oberfläche der Elektroden von rund $0,06 \text{ cm}^2$). Die Abbildungen wurden mit einer „Leica“ (Agfa-Isopan-Film) gewonnen (Vergrößerung 1 : 2000).

2. Beobachtungen

Nach dem Einschalten des Gleichstromes fällt zuerst die Wanderung der Erythrozyten, Protoplasma-Bestandteile und Zelltrümmer auf, die scharenweise durch das Blickfeld ziehen. Eine Wanderung von Leberzellen und isolierten Zellkernen ist äußerst selten zu beobachten. Nur an ganz frischen Präparaten konnte eine Bewegung der Zellen und Kerne zur Anode hin festgestellt werden, und zwar nur dann, wenn sie *frei* umherschwammen. Da die größeren Elemente, d. h. die Leberzellen und Kerne, schnell zu Boden sinken und auf dem Objektträger haften, ist selbst bei großen Stromstärken eine Wanderung nicht mehr zu erreichen.

An diesen nicht mehr frei beweglichen isolierten Kernen, aber auch an intrazellulär gelegenen Kernen beobachtet man unmittelbar nach dem Einschalten des Stromes eine Verschiebung der Nukleoli zur Anode hin. Beim Umpolen wandern die Nukleoli augenblicklich zur gegenüberliegenden Seite, schaltet man den Strom ab, so nehmen sie die ursprüngliche Lage wieder ein. Das Ausmaß der Verschiebung und die Geschwindigkeit, mit der die Nukleoli sich innerhalb der Kernumgrenzung auf die Seite der Anode bewegen, sind etwa proportional der Stromstärke. Bei konstanter Stromstärke ist das Ausmaß der Verschiebung der Nukleoli in den einzelnen Kernen aber verschieden; die Nukleoli rück-

³ N. KAMIYA, Ber. Physiol. **115**, 304 [1939].

⁴ J. G. PHILIPOT u. J. E. STANIER, Nature [London] **174**, 651 [1954].

⁵ LILIENFELD, Arch. Physiol. **1893**, 391.

⁶ P. KLEMM, Jb. wissenschaft. Bot. **28**, 647 [1895].

ken in manchen Kernen bis an die Kernmembran, in anderen verlagern sie sich nur wenig.

Etwa 1–3 Min. nach dem Einschalten eines Stromes von 10 mA beginnen die Kerne allmählich zu „glänzen“, sie werden kleiner und zeigen eine doppelte Konturierung; dann schrumpfen Kern und Protoplasma plötzlich zusammen. Läßt man den Strom noch weiter einwirken, vergrößern sich nach etwa 1–3 Min. die geschrumpften Kerne wieder, das Protoplasma beginnt zu quellen, und innerhalb weniger Sek. löst sich die ganze Zelle auf. Die Schrumpfungs- und Quellungsvorgänge wurden auch bei Zugabe von Säure bzw. Lauge beobachtet. Eine Färbung der Zellen mit Kongorot läßt erkennen, daß die Schrumpfung nach Einschalten des Stromes mit einer Blaufärbung und die folgende Quellung mit einer erneuten Rotfärbung der Zellen und des umgebenden Mediums einhergehen.

Neben der Verschiebung der Nukleoli schrumpft unmittelbar nach Einschalten des Stromes auch die Kernmembran. Manchmal ist die Membran an einer umschriebenen Stelle unregelmäßig gewellt und doppelkonturiert (Abb. 1 c* und 1 d), manchmal sieht man eine zirkuläre Schrumpfung und Verkleinerung des Kernes (Abb. 2 b und 2 c). Diese Schrumpfung ist reversibel. Beim Abschalten des Stromes ist der Kern morphologisch unverändert. Auch beim Umpolen bildet sich die Schrumpfung augenblicklich zurück (Abb. 1 c und 2 d). Wechselt man die Elektroden ab, zeigt sich die Schrumpfung wieder an derselben Stelle und in demselben Ausmaß. Dieses Hin und Her läßt sich – solange der Kern noch nicht zu „glänzen“ beginnt – beliebig oft wiederholen. Das Ausmaß der Schrumpfung ist von der Stromstärke abhängig. In vielen Fällen veränderte sich ein im Zentrum des Blickfeldes gelegener Kern beim Einschalten des Stromes nicht, beim Umpolen aber trat eine umschriebene oder zirkuläre Schrumpfung der Kernmembran auf. Die Untersuchung von mehreren, gleichzeitig beobachteten Kernen ergab, daß sich die Kerne gegensinnig verhielten (Abb. 2), d. h. die einen schrumpften, während die anderen sich nicht veränderten; nach dem Umpolen lagen die Verhältnisse umgekehrt.

Die sog. „Potocytosis-Blasen“, die sich nach ZOLLINGER⁷ an der Oberfläche lebensfrischer, suspendierter Zellen bilden, wurden durch Gleichstrom vergrößert. Schon nach einem kurzen Stromstoß konfluieren einzelne Blasen und nehmen an Um-

fang zu (Abb. 3); beim Abschalten des Stromes behalten sie diese Form und Größe bei; läßt man den Strom weiter einwirken, lösen sich die Blasen auf. Diese Erscheinungen wurden nicht nur an lebensfrischen, sondern auch an „trübe geschwollenen“ Zellen beobachtet.

Die eigentümlichen Bläschen, die man an intrazellulären und an isolierten Kernen beobachten kann, blieben unbeeinflusst (Abb. 1).

Alle beschriebenen Veränderungen vollzogen sich unter der Einwirkung von Gleichstrom sowohl in 0,9-proz. Kochsalzlösung, als auch in isotonischer Pufferlösung. Nur die Schrumpfungs- und Quellungsvorgänge traten im Puffergemisch langsamer als in physiologischer Kochsalzlösung auf.

3. Diskussion

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von LILLIE¹ haben wir im elektrischen Feld eine Wanderung ganzer Zellen und isolierter Kerne festgestellt; PHILIPOT und STANIER⁴ sahen dagegen keine Wanderung der Kerne der Rattenleber. Da sie offenbar mit Deckglaspräparaten arbeiteten, wäre es möglich, daß die Kerne noch schneller als bei unseren Untersuchungen mit dem Wasser-Eintauchobjektiv am Objektträger oder Deckglas anklebten, und deshalb keine Bewegung beobachtet werden konnte. Nach unseren Ergebnissen müssen wir jedenfalls annehmen, daß die Zellen und Zellkerne der Mäuseleber negativ geladen sind und deshalb zur Anode wandern.

Die Verschiebung der Nukleoli auf die Seite der Anode deutet darauf hin, daß nicht nur die Zellen und Zellkerne, sondern auch die Nukleoli eine negative Ladung besitzen. Diese Vermutung wurde auch von PENTIMALLI², PHILIPOT und STANIER⁴ ausgesprochen. KAMIYA³ nahm hingegen an, daß die Verschiebung der Chromatinmassen an *Tradescantia*-Haaren passiv durch intrazelluläre Quellungs- und Entquellungsvorgänge erfolge. Diese Annahme kann durch die von uns beobachteten Erscheinungen unterstützt werden. Nach dem Einschalten eines Gleichstromes schrumpft die Kernmembran zirkulär oder an einem Pol, und beim Abschalten oder Umpolen vergrößert sich der Kern wieder. Diese Volumenänderung müßte mit einem momentanen Austritt von Wasser bzw. mit einer Wiederaufnahme einhergehen. Es ist jedoch auffällig, daß die Nukleoli stets

* Abb. 1–3 s. Tafel S. 582 b.

⁷ H. U. ZOLLINGER, Amer. J. Pathol. **24**, 445 [1948].

zur Anode wandern, die Veränderung der Kernmembran und der Kerngröße dagegen keine Beziehung zu einer der beiden Elektroden erkennen lassen.

Jeder einzelne Kern reagiert nur bei einer ganz bestimmten Stromrichtung mit einer umschriebenen oder zirkulären Schrumpfung. Da alle im Zentrum des Blickfeldes gelegenen Kerne aber den gleichen Feldbedingungen unterliegen, muß ihr unterschiedliches Verhalten in bezug auf die Stromrichtung auf ihre Lage zu den Elektroden zurückgeführt werden, d. h. jeder Kern reagiert nur bei einer bestimmten Drehung oder Einstellung zu den Elektroden mit einer Schrumpfung. Man könnte also daran denken, daß schon durch die Orientierung der Kerne im elektrischen Feld polare Unterschiede sichtbar werden, die sich in Änderungen der Oberflächenspannung äußern. Durch eine bestimmte Einstellung oder Drehung der Kerne zu den Elektroden könnte ein Maximum der Wirkung im Sinne einer zirkulären Schrumpfung oder ein Minimum, d. h. keine morphologische Veränderung, entstehen. Zwischen diesen Extremen liegen die Zwischeneinstellungen mit einer mehr oder weniger ausgeprägten, umschriebenen Schrumpfung der Kernmembran.

Die sog. „Potocytosis-Blasen“ reagierten an lebensfrischen wie auch an „trübe geschwollenen“ Leberzellen mit einer Vergrößerung, d. h. auch an solchen Zellen, an denen nach ZOLLINGER⁷ ein spontanes Anwachsen der Blasen nicht mehr stattfindet. Über den Wirkungsmechanismus läßt sich auch hier nichts Sicheres aussagen, so daß wir zunächst bei der Annahme von Quellungs- und Entquellungs Vorgängen oder bei einer Deutung im Sinne einer Änderung der Oberflächenspannung stehenbleiben müssen. Es ist bemerkenswert, daß sich — im Gegensatz zu den Potocytosis-Blasen an der Zellmembran — die an der Kernmembran haftenden Blasen im elektrischen Feld nicht verändern. Diese eigentümlichen Blasen dürften am ehesten zwischen der vom Protoplasma gebildeten äußeren Membran und der eigentlichen Kernmembran liegen.

KLEMM sprach von einer „Desorganisation“ der Zellen unter dem Einfluß von Gleichstrom, die sich in einer Vergrößerung des Kernes und in einer schaumigen Aufquellung des Protoplasmas manifestiere. Ähnliche Quellungserscheinungen wurden bei den vorliegenden Versuchen im Anschluß an eine Schrumpfung der Zellen beobachtet. Durch Anfärben der Zellen mit einem Indikator (Kongorot) konnte nachgewiesen werden, daß diese Schrumpfungs- und Quellungsvorgänge auf einer Erhöhung des p_H -Wertes im umgebenden Medium beruhen. KLEMM wies darauf hin, daß eine Vergrößerung des Kernes und schaumige Aufquellung des Protoplasmas auch bei Zugabe von Lauge zu beobachten sei. Ob die von ihm beschriebenen Desorganisations-Erscheinungen unter der Einwirkung von Gleichstrom ebenfalls auf einer Laugenwirkung als Folge elektrolytischer Prozesse in der umgebenden Lösung beruhen, läßt sich nicht mehr entscheiden, da den Angaben KLEMMs nicht zu entnehmen ist, unter welchen Bedingungen die Zellen dem Strom ausgesetzt waren. Bei unseren Untersuchungen konnte jedenfalls unterschieden werden zwischen den Veränderungen, die auf eine Erhöhung bzw. Abnahme des p_H -Wertes in dem umgebenden Medium zurückzuführen sind und den oben erörterten Veränderungen, die nicht auf einer Säure- bzw. Laugenwirkung beruhen. Zu diesen Veränderungen gehören — abgesehen von der Größenzunahme der Potocytosis-Blasen — die Wanderung der Nukleoli und die umschriebene oder zirkuläre Schrumpfung der Kernmembran.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß mit der Elektrolyse der p_H -Wert in der Umgebung der Zellen während der mikroskopischen Beobachtung gesteuert werden kann. Bei Verwendung von Kochsalzlösung kommt es in der Mitte zwischen den beiden Elektroden zunächst zu einer Abnahme, dann zu einer Erhöhung des p_H -Wertes. Die zeitliche Aufeinanderfolge der elektrolytischen Prozesse läßt sich durch Variieren der Stromstärke regulieren und durch Verwendung einer Pufferlösung hinauszögern.