

Aus der Medizinischen Universitätsklinik (Ludolf-Krehl-Klinik) Heidelberg  
(Direktor: Prof. Dr. K. MATTHES)

## Über Entstehung, Morphologie und gegenseitige Beziehungen intraplasmatischer Vacuolenbildungen in lebenden Tumorzellen aus Ergüssen seröser Höhlen

Fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen

Von

D. WITTEKIND

Mit 10 Textabbildungen in 15 Einzeldarstellungen, davon 4 farbigen

(Eingegangen am 26. Januar 1960)

### I. Einleitung

In einer unlängst veröffentlichten Mitteilung (WITTEKIND 1958b) war über große, nach Acridinorange-Färbung rotfluoreszierende Einschlüsse berichtet worden, die in tumorverdächtigen, supravitalen Zellen sowie, allerdings weniger ausgeprägt, auch in Makrophagen aus Pleura- und Peritonealergüssen zu beobachten waren. Eine sichere Erklärung des Phänomens hatte sich nicht geben lassen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich nun mit der Frage, wie sich die großen, rotfluoreszierenden Areale bilden, in welchem Verhältnis sie zur intraplasmatischen Konzentration des Farbstoffes in granulärer Form stehen und in welcher Beziehung zu anderen, umschriebenen Flüssigkeitsansammlungen des Cytoplasmas, nämlich den optisch leeren Vacuolen und jenen Gebilden, die nach „Potocytose“ (ZOLLINGER 1948) entstehen.

Wenn die in jener Arbeit beschriebenen und im folgenden näher zu analysierenden Vacuolenbildungen immer wieder an Tumorzellen beobachtet werden, so vor allem deshalb, weil sie in diesen besonders oft auftreten. Die rotfluoreszierenden, intraplasmatischen „Seen“ sind von den optisch leeren, den eigentlichen „Vacuolen“ des Cytoplasmas im Sinne NASSONOVs (1930) und SCHULEMANNs (1917) abzugrenzen. Fett-, glykogen- oder schleimhaltige vacuoläre Einschlüsse ließen sich in den Exsudat-Tumorzellen nicht nachweisen.

Die Entwicklung der Auffassungen über *Ätiologie und Entstehung der optisch leeren Plasmavacuolen* ist durch die Arbeiten von BÜCHNER und seinen Mitarbeitern bedeutend gefördert worden.

Die im wesentlichen übereinstimmenden Auffassungen verschiedener Autoren zur eigentlichen Entstehungsweise der Vacuolen im Cytoplasma wurden neuerdings von V. BECKER (1954) zusammengefaßt. Da im folgenden auf die Pathogenese der Vacuolen wiederholt Bezug genommen werden muß, sei der Abschnitt hier im Wortlaut wiedergegeben:

„Bei der Verhinderung der aeroben Phase der Zellatmung können großmolekulare Zellatmungssubstrate — Glykogen, Glucose-Phosphorsäureester u. a. — in kleinere, saure (!) Moleküle anaerob abgebaut werden. Diese kleineren, aber vermehrt auftretenden Moleküle können durch den Mangel an Sauerstoff nicht weiter veratmet werden. Durch die Vermehrung der Moleküle in der Zelle vergrößert sich ihre osmotische Wirkung, es wird mehr Flüssigkeit in die Zelle hineingezogen. Die eindringende, eiweißarme Flüssigkeit stört das dynamische Gleichgewicht der intracellulären Reaktionen des intermediären Stoffwechsels. Im Falle der Vacuolenentstehung ist es der Zelle aber möglich, diese eingedrungene Flüssigkeit zu isolieren . . . Die Flüssigkeit wird durch eine Eiweiß-Lipoidfolie kugelig eingeschleudert, gleichsam auf ein „totes Gleis“ des Stoffwechsels geschoben. Die Vacuole bildet so zwar mechanisch physikalisch, nicht aber chemisch eine Störung für die Zellstoffwechselvorgänge.“

Es dürfte demnach kein Zweifel bestehen, daß die Vacuolenbildung eine Leistung der lebenden Zelle, allerdings unter ungünstigen Lebensbedingungen, darstellt, ein „gewisses Mindestangebot“ an Sauerstoff ist notwendig (KETTLER 1948), um im Zustand der „chronischen, nicht totalen Versorgungsinsuffizienz“ (LINZBACH 1952) weiterleben zu können. — Artefakte nach Anwendung bestimmter Fixationsmittel sind als solche meist sicher abgrenzbar (KNAUF und SCHRAMM 1952, ATERMANN 1958 b).

Von diesen optisch leeren Hohlraumbildungen im Cytoplasma sind morphologisch jene Eiweißablagerungen abzugrenzen, die zunächst ebenfalls als Vacuolen oder als „hyaline Tropfen“, mit dünnflüssigem, homogenen Inhalt versehen, in Erscheinung treten. Ihre Entstehungsweise ist von ALTMANN im Handbuch der allgemeinen Pathologie (1955) geschildert worden, auf eine ausführliche Darstellung kann hier verzichtet werden. Ehe extracelluläres Material an bestimmtem Ort in der Zelle abgelagert wird, ist ein unsichtbarer Transport von der Zellmembran bis zum Abscheidungsort notwendig. Geringere Mengen können im Golgi-Apparat abgelagert und kondensiert werden; größere werden in beliebigen Cytoplasma-Bereichen ausgegliedert. Die Art, wie sich die Zelle mit Eiweißkörpern auseinandersetzt, hat Ähnlichkeit mit ihrem Verhalten gegenüber basischen Vitalfarbstoffen, die ja auch sofort nach ihrem Eintritt in die Zelle an Strukturen, also an Eiweiß, gebunden werden. Hierauf ist noch zurückzukommen.

Die Entstehung intraplasmatischer Vacuolen und ihre kausale Beziehung zur Hypoxydase ist in Anbetracht der funktionellen und morphologischen Bedeutung des Phänomens mit relativer Ausführlichkeit behandelt worden. Es wird hierbei nicht übersehen, daß außer der Hypoxämie noch andere chemische Veränderungen des Mediums eine intracytoplasmatische Vacuolenbildung bewirken können, z.B. die Zugabe von Ammoniak (WARBURG 1910) und von zahlreichen anderen Substanzen, vor allem aliphatischen Aminen, die von LETTRÉ und ALBRECHT (1954) geprüft wurden. Diese Vacuolen dürften ebenfalls auf Grund eines Kompensationsversuches der Zellen gegenüber den eindringenden Substanzen entstehen. Sie können auch Neutralrot konzentrieren.

Die Literaturübersicht zeigt, daß die Hypoxydase vor allem an den Zellen der Leber studiert worden ist und sie zeigt weiter, daß im Rahmen der Hypoxydaseforschung und auch der Untersuchungen über intracelluläre Ablagerungen eine Art von Zellmaterial fast unbeachtet geblieben ist, welches aber doch in Anbetracht seiner Herkunft, seiner Morphologie und seiner Lebensbedingungen für solche Untersuchungen besonders geeignet erscheinen muß: Es handelt sich um die *normalen Zellen und Tumorzellen seröser Ergüsse*.

Entsprechend seinem Charakter als einem klinischen Untersuchungsgut, sind die Ergüsse seröser Höhlen auch vorwiegend von Klinikern in morphologischer Hinsicht bearbeitet worden. Die bekannten Monographien und Arbeiten (GRUNZE 1955, 1956, hier weitere Literatur) befassen sich vor allem mit der Zuordnung bestimmter Zelltypen und Typenkombinationen zu bestimmten Krankheiten sowie mit morphologischen Merkmalen, denen vor allem Bedeutung für die Tumordiagnose beigemessen wurde, wie etwa die Relationen zwischen Kern und Plasma, Kern und Nucleolus.

Das Vorkommen von *Vacuolen* in Exsudatmesothelien und Tumorzellen wird häufig erwähnt. Sie werden wohl als Anzeichen für eine Zellschädigung aufgefaßt. STREICHER (1950) und PAGES (1958) berichtet erstmals über *verstärktes Auftreten unter dem Einfluß cytostatischer Behandlung*. *Histochemische Untersuchungen* liegen bisher noch in relativ geringer Anzahl vor. LUSE und REAGAN (1954) beobachteten nicht selten mucicarminpositive Vacuolen in Tumorzellen aus Adenocarcinomergüssen. — v. ALBERTINI (1946) erklärte das Vorkommen von Vacuolen in Serosazellen als entweder degenerativ bedingt oder als Folge eines von ihm erstmals beobachteten Vorganges, den er als Zellgeburt bezeichnet, wobei eine Zelle

aus dem Cytoplasma einer anderen ausgestoßen werden und in dieser eine Vacuole zurücklassen soll. Seine phasenkontrastmikroskopischen Bilder lassen auch in Tumorzellen vacuoläre Cytoplasmaeinschlüsse verschiedener Form und Größe erkennen.

Beurteilt man zusammenfassend die Art der an den Ergußzellen ausgeübten Untersuchungsmethoden, so findet man ein deutliches Überwiegen der Färbeverfahren nach Fixation im Rahmen der klinischen Cytodagnostik und nur selten die Absicht, die erhaltene Zellvitalität für diagnostische und therapeutische Fragestellungen auszunützen, etwa durch planmäßige Anwendung der Vitalfärbung, von der LUDFORD und SMILES (1950) bemerkten, sie sei viel eher eine physiologische als eine morphologische Methode.

Wenn man aber die Tatsache berücksichtigt, daß die Ergußzellen i. a. noch vital sind, so müssen sie zum Studium der in ihnen entstandenen oder neu entstehenden Cytoplasmastrukturen allgemein, speziell aber auch der Hohlräume aus verschiedenen Gründen besonders gute Voraussetzungen bieten:

a) Die lebenden Zellen können im gleichen Milieu mikroskopisch untersucht werden, welches ihnen bereits innerhalb des Organismus als Lebensraum diene.

b) Es folgte daraus, daß die Zellen von den Reaktionen des Kreislaufes, insbesondere den Veränderungen an der terminalen Strombahn, bereits in vivo unabhängig sind.

c) Wenn zum Vergleich histologisches Untersuchungsgut nach Probeexcision von Tumoren oder nach Autopsie vorliegt, so kann innerhalb gewisser Grenzen auf das Ausmaß jener Zellveränderungen geschlossen werden, die durch den Übergang aus dem Gewebsverband in die Ergußflüssigkeit entstanden sind.

d) Es wird noch zu berichten sein, daß sich cytoplasmatische Vacuolen nur in großen, plasmareichen Zellen studieren lassen. In ihnen sind aber naturgemäß besonders günstige Bedingungen für die gegenseitige Abgrenzung gegeben.

Die hier geschilderten Untersuchungen sollen nun zur Kenntnis der Reaktionsmöglichkeit dieser lebenden Ergußzellen, insbesondere der Tumorzellen, beitragen. — Nachteilig für die an sich notwendigen biochemischen Untersuchungen ist die Tatsache, daß es sich um ein von Fall zu Fall wechselnd heterogenes Zellmaterial handelt.

## II. Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an Pleura- und Peritonealergüssen von 9 Patienten mit malignen Tumoren verschiedener Lokalisation durchgeführt. Drei Ergußproben stammen aus dem Untersuchungsgut der Czerny-Klinik der Universität Heidelberg.

Insgesamt sind es bis jetzt 18 Fälle, an denen die im Vorjahr beschriebene Fluoreszenzeigenart beobachtet worden ist. Die Ergüsse von 5 dieser Patienten sind während der cytostatischen Behandlung mehrfach — bis zu 22mal — untersucht worden. Infolge fortschreitender Metastasierung kamen hierzu in 3 Fällen die Ergüsse von 2 Körperhöhlen (Ascites und Pleuraexsudat), einmal Flüssigkeit aus 3 Körperhöhlen (Pleuraergüsse beidseits und Ascites) zur Beobachtung. Die histologische Untersuchung der Tumoren von 6 der autopsisch kontrollierten Patienten ergab in 2 Fällen nicht verhornendes Plattenepithel-Carcinom, in 3 Fällen teils solides, teils adenomatöses Carcinom, in 1 Fall solides, z. T. kleinzelliges Carcinom.

Die Untersuchungen erfolgten: a) unmittelbar nach Entnahme, b) nach Aufenthalt von mehreren Stunden bis zu 2 Tagen im Brutschrank bei 37°, c) nach Abkühlung auf etwa 4–6° bis zu 2 Tagen. Unmittelbar nach der Ergußpunktion wurde das Sediment fixiert (Fixierungsart je nach Art der anschließenden Färbung).

### *Vitalfärbung*

**1. Grundversuch.** Zusatz von einem Tropfen Acridinorange-Lösung (Bayer 561092) 1:100 (entspricht einer molaren Konzentration von etwa  $3 \times 10^{-3}$ ) zu 10 cm<sup>3</sup> Erguß; zentrifugieren, 1 Tropfen Sediment auf den Objektträger, Auflegen des Deckglases, Abdichten an

den Längsseiten mit Bienenwachs-Paraffin. Vergleich der gefärbten Präparate mit ungefärbtem Sediment im Phasenkontrastmikroskop.

Die nach diesem Verfahren erzielten Färbeergebnisse dienen als Standardresultate. Die weiteren quantitativen und qualitativen Modifikationen sowie Färbungen mit anderen Farbstoffen wurden hierauf bezogen unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die auf die Einzelzelle entfallende Farbstoffmenge nie völlig gleich sein kann.

**2. Vergleichende, abgestufte Färbungen.** Man beginnt mit 1 Tropfen AO 1:1000/10 cm<sup>3</sup> Erguß ansteigend auf 10 Tropfen 1:1000 als oberste Grenze der Farbstoffbelastung.

**3. Kontrollierte Vitalfärbung.** Ungefärbtes Sediment unter das zweiseitig abgedichtete Deckglas. Einstellung einer Zellgruppe im Phasenkontrastmikroskop. Auftropfen von Farblösungen verschiedener Konzentration und anderen, in ihrer Wirkung zu prüfenden Lösungen (s. Abschnitt III) auf den Objektträger nahe einer der beiden Schmalseiten des Deckglases (24 × 32 mm — < 0,17). Durch Übung läßt sich erreichen, daß der Sedimenttropfen den Raum unter dem Deckglas eben ausfüllt, schädliches Aufdrücken des Deckglases also vermieden werden kann. Heranführen des Tropfens der Testlösung an die Deckglaskante durch einen flachen Gegenstand (Rasierklinge). Es ist zu beachten, daß der Tropfen nicht über das Deckglas an das Objekt fließt; die zu untersuchende Zellgruppe soll daher einen gewissen Abstand (geeignet etwa 0,5 cm) vom Deckglas haben. — Die Lösung fließt dann durch Capillarattraktion unter das Deckglas ein, um so langsamer, je dünner die Flüssigkeitsschicht zwischen Deckglas und Objektträger vor Versuchsbeginn gewesen ist. Die Präparate sollen bald nach ihrer Herstellung untersucht werden.

**4. Einfrieren vitalgefärbter Zellen auf dem Gefriermikrotom.** — Mechanische Faktoren (Druck).

**5. Beeinflussung vitalgefärbter Zellen durch hypo- und hypertonische Lösungen, andere Farbstoffe sowie Pharmaka.** Aqua dest., physiologische Kochsalzlösung, 10%ige NaCl, Formol 10%ig in Aqua dest. und physiol. NaCl, 1%iges Osmiumtetroxyd in physiol. NaCl, 20%iger und 10%iger Alkohol in physiol. NaCl. — Farbstoffe: Janusgrün 1:10000 und 1:50000, Neutralrot 1:10000 und 1:15000, Trypaflavin 1:100000. — Fermentgifte: Dinitrophenol 10<sup>-4</sup> mol, 10<sup>-2</sup> mol, Natriumacid 5 × 10<sup>-3</sup> mol in physiol. NaCl, Aqua dest. und in isotonischer Pufferlösung („Inkubationsmedium“ nach CHANCE und HESS 1959).

**6. Beeinflussung vitalgefärbter Zellen durch UV-Licht.** Kontrollbestrahlung ungefärbter Zellen.

Sämtliche Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Jeder Versuch wurde bis zu der Erkennung eines typischen Ablaufes wiederholt.

**Apparate.** Kombinationsmikroskop (Zeiss) für Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie (HASELMANN und WITTEKIND 1957). Erreger- und Sperrfilter wie in früheren Arbeiten angegeben. Contax-Aufsatzkamera.

Filme: Agfa CN-17, Agfa Isopan FF 13/10 Din. Belichtungszeiten bei Okular 10×, Objektiv 100×: Fluoreszenzmikroskop 75 sec, Phasenkontrast 50 sec, Okularmikrometer von Zeiss.

### III. Ergebnisse

**1. Grundversuch.** Färbung mit 1 Tropfen AO 1:100. In Ergüssen, die massenhaft Tumorzellen einzeln und in Verbänden enthalten, ist die Zahl rotfluoreszierender Vacuolen von Fall zu Fall ungleich groß. Bei einigen Patienten (B., H., J., K.) waren sie in den ersten Ergußproben sehr zahlreich (Abb. 7), eine Patientin zeigte nur in einigen Zellen die Veränderung. Sie ist am besten ausgeprägt in einzeln liegenden Zellen und in den Randelementen großer Verbände. Rote Granula (r. G.) und rotfluoreszierende größere Areale, bei denen es sich oft um rote Vacuolen (r. V.) handelt, können in einer Zelle gemeinsam vorkommen; in der unmittelbaren Nachbarschaft r. V. fehlen die r. G. aber meist oder sind nur spärlich vorhanden (Abb. 6d). Optisch leere Vacuolen können zugleich mit r. V. in einer Zelle vorkommen, sich überlagern und in der Form gegenseitig beeinflussen, wobei der Eindruck besteht, daß sich häufiger die r. V. an die leeren Vacuolen (l. V.) anpassen als umgekehrt. Nur wenn volle

und leere Vacuolen groß sind, ist der Kern in die Zellperipherie verdrängt und dann oft pyknotisch, d. h. fluoreszenzmikroskopisch dicht grün. Manchmal zeigen r. V. betonte Rotfluoreszenz, manchmal, vielleicht unter dem Einfluß cytostatischer Behandlung, enthalten r. V. noch dichte rotfluoreszierende Einschlüsse.

Im *Phasenkontrastmikroskop* (Phako) gelingt eine weitere Differenzierung großer, rotfluoreszierender Areale: a) R. V. werden als graugelbe, im Hellfeld als gelbe, homogene Flächen dargestellt. b) Andere rotfluoreszierende, als



Abb. 1

Abb. 1. Ascitestumorzellen, teils solides, teils adenomatös wachsendes Carcinom. Im Cytoplasma der unteren Zelle mehrere grobe, sphärische, rotfluoreszierende Einschlüsse



Abb. 2

Abb. 2. Pleuradeckzellen im Verband. Vacuolenartig erweiterte Interzellularräume ohne Fluoreszenz

Schollen bezeichnete Einschlüsse sind kompakter, von dunklem Gelb, sie scheinen sich über das Abbildungsniveau vorzuwölben (Abb. 1), die Begrenzung bei ihnen ist meist oft kantig, bei den Vacuolen mehr abgerundet, aber ebenfalls unregelmäßig und nicht immer kreisrund. c) Homogen rotfluoreszierende Bereiche können sich phasenoptisch auch als mehr oder weniger gut erhaltene phagocytierte Zellen oder Zellräume erkennen lassen, die unmittelbar im Cytoplasma liegen oder von einer leeren (Abb. 4), gelegentlich auch fluoreszierenden Vacuole umgeben sind. — Zellen mit leeren und roten Vacuolen können Kerne in Mitose zeigen. — Hervorzuheben ist noch, daß die Darstellung der Vacuolen im Phako weitgehend von ihrem Tiefendurchmesser beeinflußt wird: Wenn sie in senkrechter Richtung einen Großteil des Zelldurchmessers einnehmen, so heben sie sich als helle Areale scharf gegen das dunklere Cytoplasma der Umgebung ab. Sehr flache Vacuolen erscheinen dagegen in einem schleierhaften Grau, da das Bild durch breitere, ober- oder unterhalb liegende Cytoplasmaschichten mit beeinflußt wird. Einer besonderen Erwähnung bedürfen jene Vacuolen, die sich entweder im Interzellularraum (Abb. 2) oder in seiner unmittelbaren Umgebung bilden. Bei letzteren handelt es sich oft um kleine, scharf abgegrenzte, in Gruppen



Abb. 3. Tumorzellgruppe-, Pleura- und Peritonealmetastasen eines unbekannten Primärtumors. Im gemeinsamen Mittelpunkt des Zellverbandes zahlreiche kleine, nichtfluoreszierende Vacuolen. Eine große, optisch leere Vacuole li., eine weitere, dunkelgefärbte — rotfluoreszierende — unten am Bildrand

ohne Abhängigkeit vom Eiweißgehalt des Mediums, werden diese Einschlüsse so groß, daß sie ebenfalls als rotfluoreszierende Vacuolen erscheinen. Die Größe



Abb. 4. Tumorzelle mit großer, optisch leerer Vacuole, in dieser mehrere Histiocyten und Lymphocyten. Besonders intensive Fluoreszenz der phagocytierten Zellen

nahe dem gemeinsamen Grenzbereich von zwei oder mehr Zellen liegende Hohlräume (Abb. 3).

Von Fall zu Fall in verschiedenem Ausmaß können Vacuolen eine oder mehrere phagocytierte Zellen (Abb. 4) enthalten, meist Lymphocyten, segmentkernige Leukocyten, seltener auch histiocytäre Elemente oder Tumorzellen. Stets zeigen diese phagocytierten Zellen eine intensive Affinität zu AO.

Weiterhin finden sich in den Ergüssen andere Zellen unterschiedlicher Zahl: Pleuradeckzellen mit kleinen, meist gleichkalibrigen r. G., monocytäre Phagocyten (die „Exsudatpolyblasten“ Maximows), deutlich erkennbar an ihren groben r. G., die im Phago zwischen starklichtbrechenden, glänzenden, nicht fluoreszierenden Körnchen liegen. Gelegentlich, dieser Zellen zeigt von Fall zu Fall starke Unterschiede, segmentkernige Leukocyten stets mit feinen r. G. (s. auch WITTEKIND und VÖLCKER 1957). — Das oben beschriebene Bild ist nicht ein „Zustand“, sondern ein Ausschnitt aus einem fortschreitenden Prozeß, nämlich der je nach Zelltyp verschieden ablaufenden Auseinandersetzung zwischen Zellen und Farbstoff. Ein stationärer Zustand ist erst dann eingetreten, wenn autolytische Vorgänge die Zellen zu gequollenen, unterschiedslos grünfluoreszierenden Gebilden umgeformt haben.

Unter dem Deckglas wird sehr oft die Farbstoffaufnahme fortgesetzt, kenntlich am Übergang aus einer anfangs manchmal noch schleierartigen roten Fluoreszenz der Vacuolen in ein sattes Lackrot, welchem im Phasenkontrast ein intensives

Gelb entspricht. Nach sehr verschieden langer Zeit, variierend zwischen etwa 1—24 Std, verschwinden die r. G. Endzustand ist eine gleichmäßige Grünfluoreszenz aller Zellstrukturen, die in Einzelheiten noch weitere Stunden unterscheidbar sein können. Ergußtumorzellen zeigen nach Konservierung im Kühlschrank meist deutlich mehr Vacuolen als unmittelbar nach der Entnahme. Konservierung vitalgefärbter Zellen im Kühlschrank ist über mehrere Stunden möglich, bei 37° tritt der Zelltod schon früher ein. In den Ergüssen der Patienten K. K. und S. S. kam es ohne Wechsel des Mediums zu Zellteilungen im Brutschrank wie bei Zimmertemperatur. In vitro neugebildete Zellgruppen zeigen keine Vacuolen. — Bei einer weiteren Patientin wurden autoptisch Peritonealmetastasen eines kleinzelligen Tumors gefunden. Der zellreiche Ascites hatte keine vacuolenhaltigen Elemente erkennen lassen.

Das oben beschriebene „Standardbild“ kann nun in vielfältiger Weise beeinflusst werden:

**2. Vergleichend abgestufte Färbungen.** 1/10 der unter 1. verwendeten Farbstoffmenge zeigt die Zellplaques als schwach grünleuchtende Bereiche, in denen sich schon einige heller grüne Granula abgrenzen lassen, die im Phako als schwach graue Scheiben kaum zu differenzieren sind. 2/10 AO: Tumorzellen: kräftige Grünfluoreszenz des Plasmas, dicht grüne und grün-rötliche Granula, große, homogene, mattgrünfluoreszierende Vacuolen, neben r. V., keine Unterscheidungsmöglichkeiten im Phako. Makrophagen mit deutlichen roten Granula. Nach gleichmäßiger weiterer Steigerung der Farbstoffmenge nimmt zunächst die Ausbreitung der r. G. in den Makrophagen zu, dann kommt es bei etwa 5 Tropfen AO 1:1000 erstmals zur Ausbildung von r. V. in Tumorzellen, die bei weiterer AO-Zugabe nicht nur an Fluoreszenzintensität, sondern auch an Zahl zunehmen. Etwa zur gleichen Zeit bilden sich auch die roten Granula in den Tumorzellen voll aus. — Dieser Bericht über die abgestuften Färbeversuche schildert den Stand wenige Minuten nach Färbebeginn. Auch aus stark verdünnten Lösungen (AO 1:50000 bis 1:100000) können die Zellen im Brutschrank im Verlauf mehrerer Stunden den Farbstoff bis zur Rotfluoreszenz von Granula und Vacuolen konzentrieren.

**3. Kontrollierte Vitalfärbung.** Es besteht die Möglichkeit, den Färbeprozess vorwiegend im Fluoreszenz- oder vorwiegend im Phako zu beobachten. Von letzterer Möglichkeit wurde häufiger Gebrauch gemacht, da sich gezeigt hatte, daß zwar ausgebildete r. V. meist recht resistent gegen UV-Licht sind, ihre Entstehung dagegen schon durch eine sehr kurze Expositionszeit entweder völlig gehemmt oder lediglich der unmittelbare Übergang in gleichmäßige Grünfluoreszenz herbeigeführt werden kann. Die Durchführung der kontrollierten Anfärbung wird erleichtert durch das relativ große Eigengewicht der Tumorzellverbände, die meist am Ort bleiben, wenn die Flüssigkeitsbewegung, leicht wahrnehmbar am Vorbeifließen der stets vorhandenen Erythrocyten, einsetzt. Im Fluoreszenzmikroskop sieht man überdies das Herannahen einer je nach Konzentration roten oder grünen „Welle“.

**AO 1:1000.** Im Fluoreszenzmikroskop zeigt sich, daß die Zellmembran kein Hindernis für das Fluochrom bedeutet. Die Färbung schreitet langsam von außen nach innen vor, die Zeiten schwanken in Abhängigkeit von der Schnelligkeit, mit der der Farbstoff über das Präparat vordringt, sowie von der Größe der Einzelzelle, bzw. der Zellverbände. Die Außenbezirke können bereits rotfluoreszieren, wenn die Zentralpartien noch schwache Grünfluoreszenz zeigen. Dringt der Farbstoff langsam genug vor, so bilden sich im Plasma sehr schnell — etwa in 0,5—1 sec — die r. G., stets zuletzt geht der Kern in Rotfluoreszenz

über. Es ist also möglich, daß nach Abschluß des Prozesses diffus rotfluoreszierende — durch Farbstoffüberdosierung abgetötete — Zellen noch deutlich erkennbare rotfluoreszierende Granula enthalten, die in wenigen Sekunden zwischen Beginn der Färbung und Eintritt des Zelltodes entstanden sind. Im Phako nimmt die Zelle eine messinggelbe Farbe an, sie schrumpft und erschwert damit die weitere Beurteilung.

*AO 1:10000.* Die einzelnen Stadien der Färbung folgen langsamer aufeinander und sind daher besser zu erkennen, insbesondere auch die Fluochromierung der r. V.: Nachdem die ganze Zelle Grünfluoreszenz angenommen hat, füllen sich plötzlich bisher leere Vacuolen, mit rotfluoreszierendem Inhalt. Ein grünfluoreszierendes Übergangsstadium ist nicht zu erkennen. Anscheinend kann die Bildung r. V. vor der der AO-Granula erfolgen. Wenn innerhalb leerer Vacuolen im Phako Brownsche Molekularbewegung nachzuweisen war, so bleibt sie nach Übergang in Gelbfärbung (= Rotfluoreszenz) sehr oft erhalten, die ausführenden Teilchen sind infolge ihrer intensiveren Leuchtkraft auch weiter gut abgrenzbar.

Anders vollzieht sich die Bildung der oben als *Schollen* bezeichneten Cytoplasmaeinschlüsse: Sie entstehen ebenfalls plötzlich, zeigen aber dann im Verlauf von einigen Minuten ein langsames Wachstum, bis sie bei einem Durchmesser von etwa  $4-5\ \mu$  stehenbleiben. Dabei kann der Vacuolenbestand vom Beginn der Färbung an völlig unverändert bleiben.

In geeigneten Fällen läßt sich aber auch die *Entstehung der optisch leeren Vacuolen* selbst beobachten. Die Gesamtzellgröße ändert sich dabei nicht. Es wurde aber berücksichtigt, daß nach Einströmen von Flüssigkeit unter das Deckglas abgeplattete Zellen in die runde Form zurückkehren, also scheinbar kleiner werden. Nach Auflegen des Deckglases war häufig zu beobachten, wie im Cytoplasma, ohne erkennbare Beziehung zu einer präexistierenden Struktur, plötzlich Hohlräume auftauchten. Zunächst immer rund, können sie im Laufe von Sekunden bis etwa 6 min unter Änderung ihrer Form anwachsen, bis sie auf einem sehr verschiedenen Größenniveau zu einem vorläufigen Stillstand kommen. Selten kann man das rapide, über fast den gesamten Cytoplasmabereich sich erstreckende Anschwellen eines solchen Gebildes beobachten, und nur dann besteht der Eindruck gleichzeitiger Verdrängungseffekte. In Zellen mit solchen Riesenvacuolen kann der in die Peripherie verdrängte Kern deutlich pyknotisch sein. Kleinere Vacuolen mögen sich in unmittelbarer gegenseitiger Nachbarschaft bilden, bleiben aber stets selbständig und verschmelzen nicht miteinander. Nach Einsetzen der Strömung nimmt der Durchmesser der Zellen und der Vacuolen ab. Bei kontrollierter Vitalfärbung kann dieser an sich ohne Milieuänderung ablaufende Vorgang der Vacuolenbildung unmittelbar vom Färbeprozess gefolgt sein. Die Aufeinanderfolge beider Ereignisse ist in der Abbildungsserie (6a—d) wiedergegeben. Sie zeigt in Abb. 6b neugebildete Vacuolen neben vorbestehenden (links am Bildrand). Nach Eintreffen des AO-Gemisches nehmen beide Hohlraumgruppen konzentrierten Farbstoff auf. Eine Vacuole am linken Bildrand bleibt leer. Der ständige Wechsel von fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopischen Betrachtungen ermöglicht die Analyse des Vorganges.

Vacuolen dieser Art können eine gewisse Stabilität zeigen und bis zum Auftreten deutlicher Autolysezeichen mehr oder weniger verändert erhalten bleiben. Andererseits werden sich



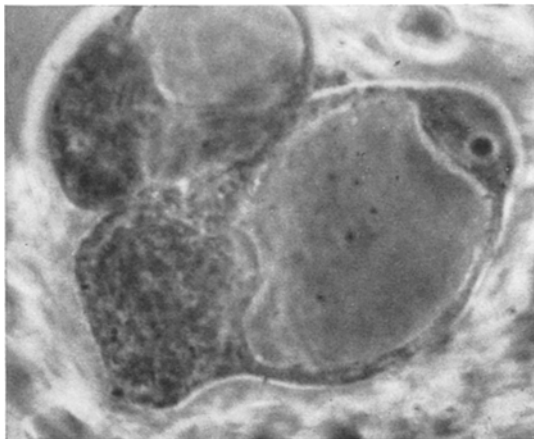
weitere Untersuchungen zur Morphologie des Zelltodes mit der überraschenden Tatsache zu befassen haben, daß selbst Riesenvacuolen bei gleichzeitiger Zellschrumpfung wieder völlig verschwinden können (nach mehreren Stunden bis Tagen).

**4. Kurzfristiges Einfrieren vitalgefärbter Präparate auf dem Gefiermikrotom.** Setzt man AO-fluochromierte Zellen für 1 min der Temperatur aus, bei der Gefrierschnitte angefertigt werden, so resultiert eine unterschiedslose Grünfluoreszenz, die r. V. sind leer, die r. G. verschwinden, die Kerne von Tumorzellen sind nicht mehr homogen, sondern zeigen deutlich die scholligen Chromatinstrukturen wie nach Fixation gefärbte Präparate.

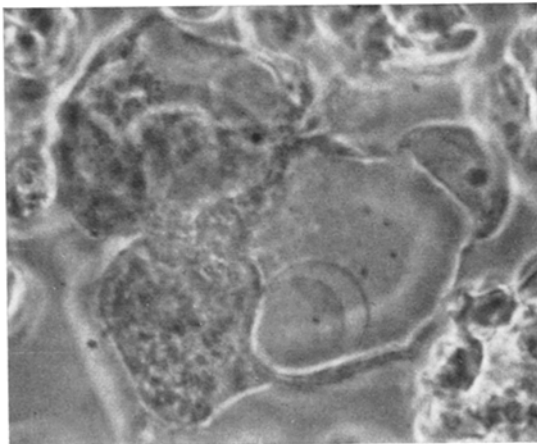
*Einfluß mechanischer Faktoren.* Übt man im Bereich einer im Mikroskop eingestellten Tumorzelle einen Druck auf das Deckglas aus, so läßt sich der rotfluoreszierende Inhalt der Vacuole auspressen. Die Vacuolenwand erscheint nachher gefaltet und ihrer Spannung beraubt, der restliche Hohlraum ist kleiner als vorher (Abb. 5a, b).

*Quantitative und qualitative Veränderungen der Ergußzellen im Laufe der klinischen Behandlung.* Hier sei erwähnt, daß bei 5 der cytostatisch

behandelten und über mehrere Monate cytologisch kontrollierten Patienten die Zahl der Tumorzellen langsam abnahm. In Pleuraergüssen, viel ausgeprägter als im Ascites, kam es nach der lokalen Injektion zu ihrem fast vollständigen Verschwinden. Lymphocyten in größerer oder geringerer Zahl waren dann die einzigen noch nachweisbaren Zellen. Die Kontrollen zuvor hatten eine stetige Zunahme der leeren Vacuolen, speziell der besonders großen und polymorphen Formen, und eine wohl nicht nur relative, sondern auch absolute Abnahme der r.V. erkennen lassen, die aber nach der erfolgten Bildung sehr resistent gegen UV-Licht sind. Dreimal wurde beobachtet, daß die intraplasmatische Konzentration des Farbstoffes nicht nur zu roten Granula, sondern auch zu feinen roten, *strichförmigen*



a



b

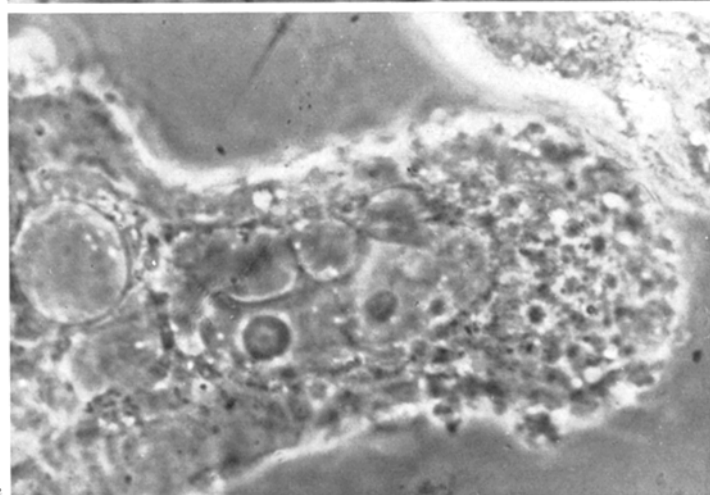
Abb. 5. a Große, rotfluoreszierende Vacuole in einer Tumorzelle. Kern der oberen Zelle in die Peripherie gedrängt. b Die gleiche Zellgruppe, Zustand nach Druck auf das Deckglas: Rotfluoreszenz geschwunden, der Hohlraum kleiner geworden, die Zellwand gefaltet



a



b



c

Abb. 6a—d. Die Entstehung rotfluoreszierender Vacuolen. a Tumorzelle unmittelbar nach Anfertigung des Präparates. b Die gleiche Zelle wenige Minuten später: Über dem Kern haben sich mehrere Vacuolen gebildet. Bewegungsunschärfe am re. Rand der unteren Vacuole. Zunächst noch keine Fluoreszenz. c Weitere Gestaltänderung der Vacuolen. Neu gebildete kleine, nichtfluoreszierende Vacuolen im peripheren Cytoplasma

Gebilden erfolgt. Bei Kernschädigung (z. B. Karyorrhexis) ist die Fähigkeit zur Farbstoffkonzentration prinzipiell noch erhalten, aber immer stark vermindert, oft jedoch völlig aufgehoben.

Nach lokaler Behandlung ist die Reaktion einzelner Körperhöhlen weitgehend unabhängig voneinander; wenn der beschriebene, durch alleinige Anwesenheit von Lymphocyten charak-

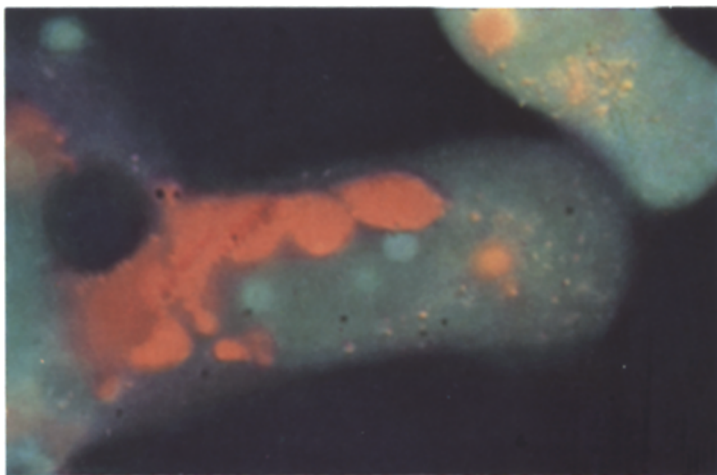


Abb. 6 d

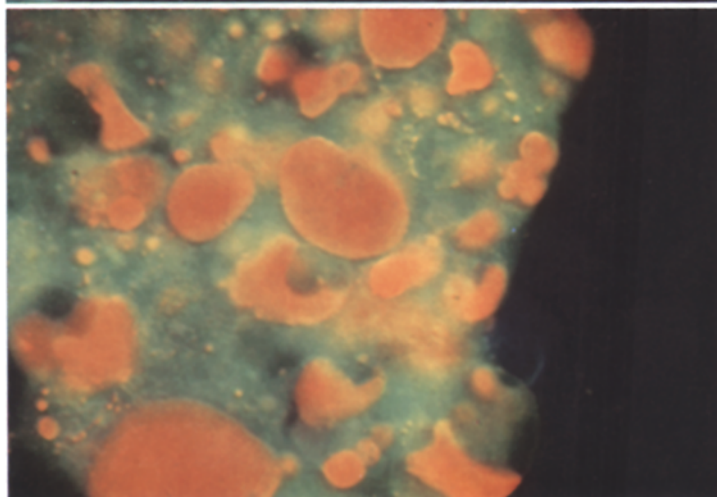


Abb. 7

Abb. 6 d. Die gleiche Zelle im Fluoreszenzmikroskop. Die neugebildeten und auch einige der prä-existierenden Vacuolen zeigen Rotfluoreszenz. Nur ganz vereinzelt rote Granula in ihrer unmittelbaren Umgebung. Die Zelle oben re. enthält wesentlich mehr rote Granula

Abb. 7. Metastasierendes Ovarialcarcinom. Pleuraerguß. Tumorzellverband mit zahlreichen rotfluoreszierenden Vacuolen. Nur wenige rotfluoreszierende Granula

terisierte Endzustand z. B. in einem Pleuraraum erreicht ist, können nach fortgeschrittener Metastasierung, etwa im Peritonealraum, sich bildende Ergüsse das Bild einer vollkommen unbeeinflussten Vitalfärbung bieten.

**5. Beeinflussung vitalgefärbter Ergußzellen durch verschiedene Lösungen:**  
*Aqua dest.* Der Prozeß läuft sehr schnell ab. Zunächst buchtet sich die Zellmembran an einer oder mehreren Stellen blasenartig vor, ohne das strukturierte

Cytoplasmaanteile in den frei werdenden Raum nachfolgen — der von ZOLLINGER (1948) nach MELTZER (1904) als Potocytose, submikroskopische Wasseraufnahme durch lebende Zellen, bezeichnete Vorgang. Etwa zugleich schwellen die r. V. an, werden, bei gleichbleibender Rotfluoreszenz, im Phako immer durchsichtiger gelb, bis sie plötzlich „platzen“: Der Inhalt färbt vorübergehend teils die Umgebung rot, teils kann er sich zu einigen rotfluoreszierenden Tropfen kondensieren, bis auch diese nach etwa 30 sec verschwinden. Die Rotfluoreszenz wird nach wenigen Minuten von einer diffusen Grünfluoreszenz abgelöst. Die Restvacuole ist kleiner, höchstens gleich groß wie die r. V. Anders verhalten sich die l. V., sie schwellen an, ändern sich im übrigen aber nicht mehr und sind auch nach einer Viertelstunde noch scharf abgegrenzt erkennbar. Neue Vacuolen entstehen im Cytoplasma nicht. — Die Kerne, anfangs mit intensiver Grünfluoreszenz nur im Bereich der Membran und des Nucleolus, zeigen im geschwellenen Zustand eine intensive, gleichmäßige, homogen-milchige Grünfluoreszenz. Dem entspricht im Phako der „trübe Kerntyp“ nach ZOLLINGER. — Innerhalb leerer Vacuolen phagocytierte, rotfluoreszierende Zellen nehmen an der Wasseraufnahme nicht teil, sie halten die Rotfluoreszenz länger als alle anderen Strukturen. Ähnlich, nur langsamer, ist der Ablauf unter 0,5%iger NaCl. Allerdings können flüssigkeitsreichere r. V. noch nach  $\frac{1}{2}$  Std nachweisbar sein. Die Potocytose-Blasen fluorescieren stets schwächer grün als das Cytoplasma, sehr selten können sie in sich noch eine rotfluoreszierende, viel häufiger eine optisch leere Vacuole enthalten (Abb. 8a, b).

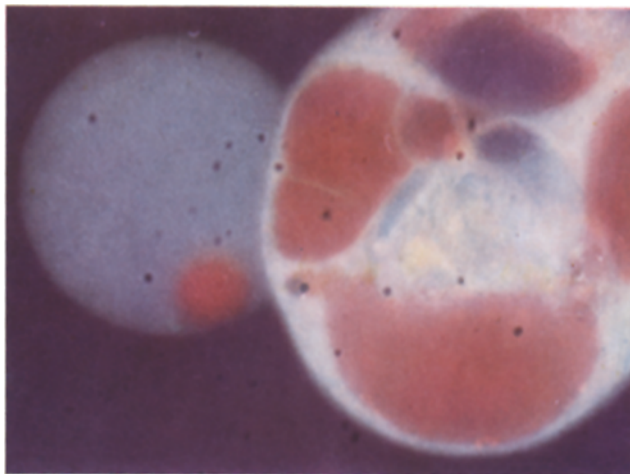
*10% NaCl.* Schnelle und intensive Schrumpfung, an der sich alle Zellbestandteile beteiligen. Im Phako kaum Einzelheiten unterscheidbar. R. V. sind in stark reduziertem Umfang im Phako mit intensiv gelber Farbe noch nach 20 min vorhanden, wenn andere rotfluoreszierende Strukturen den Farbstoffüberschuß schon abgegeben haben.

*Physiologische NaCl.* Die Zellen schrumpfen, allerdings ist das Ausmaß, wegen der mit dem Flüssigkeitsstrom verbundenen Formänderung (s. S. 318), schwer zu beurteilen; r. V. sind noch vorhanden, Tumorzellen halten sich länger als Makrophagen und besonders als segmentkernige Leukocyten, die alsbald einen Umschlag der Kernfluoreszenz aus Grün in Rotorange zeigen.

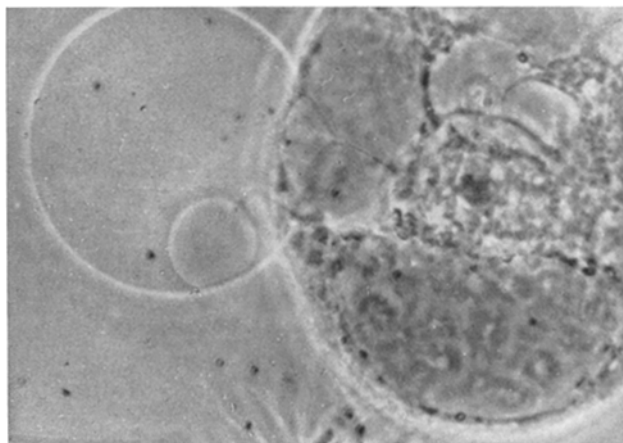
*Anfärben von Zellen mit AO 1:15000 in physiol. NaCl.* Auch in eiweißfreier Farblösung kommt es zur Ausbildung von r. G. und r. V. Wieder ist zu erkennen, daß Makrophagen und segmentkernige Leukocyten, die in geringerem Umfang ebenfalls Granula gebildet hatten, schon nach wenigen Minuten absterben, bzw. daß die Kerne von Grün- in Orangefluoreszenz übergehen. Alkohol 10% in physiol. NaCl: Sehr langsam verlieren r. G. und r. V. ihre Rotfärbung, es besteht der Eindruck, als werde der Farbstoff aus den Vacuolen ausgewaschen. In der grünfluoreszierenden Zelle bleiben leere Hohlräume zurück.

*Formol 10% in NaCl 0,85% ( $p_H$  6,4).* Der Ablauf der Formolfixation erscheint besonders aufschlußreich. Nach Beginn der Schrumpfung dauert es etwa 30 sec, bis das Maximum der Schrumpfung erreicht ist. Nach den Erscheinungen im Phako liegt eine echte Schrumpfung, nicht nur eine Formänderung, vor: Die Zellwände (Tumorzellen) werden eingefaltet, besonders dort, wo nur eine schmale Cytoplasmabrücke die Zellmembran von einer schrumpfenden Vacuole trennt. Die Strukturen werden stärker lichtbrechend. Dann dehnt sich die Zelle langsam

wieder aus, die Randfalten glätten sich, nach  $1-1\frac{1}{4}$  min kann der alte Umfang wieder erreicht sein. Bis hier kein deutlicher Unterschied zwischen roter und leerer Vacuole. Etwa von der 4. min ab verschwinden die r. V.: Sie können



a



b

Abb. 8a. Bronchialcarcinom. Ascitestumorzellen. Die Zellgruppe enthält alle in dieser Arbeit besprochenen Cytoplasmastrukturen: oben optisch leere Vacuolen, 3 große r. V. Li. potocytotische Blase, von einer tieferen Zellebene ausgehend, mit weniger intensiver Grünfluoreszenz als die Masse des Cytoplasmas. Scharf abgegrenztes, rotfluoreszierendes Areal im unteren re. Quadranten.

b Dieselbe Zelle im Phako

plötzlich ihren Inhalt an die Umgebung abgeben, die dann kurze Zeit Rotfluoreszenz zeigt. Andere, über längere Zeit resistente Vacuolen zeigen aber ein neues Phänomen: An der Vacuolenwand, meist in einem nahe der Zellperipherie gelegenen Abschnitt, bildet sich plötzlich, etwa nach 5—10 min, eine neue, optisch leere Vacuole, die den fluoreszierenden Anteil langsam zurückdrängt. Eine scharfe Grenzlinie kann dann für einige Zeit unbeweglich bleiben und ein Gleichgewicht zwischen beiden Teilen vermuten lassen; nach etwa 10—15 min verschwindet plötzlich die Grenzlinie. Unmittelbar anschließend

kann man in ihrer Nähe, und zwar auf der zuvor optisch leeren Seite, grobkörnige, gelbliche Niederschläge erkennen. Die vom Vacuolenrand begrenzte Rotfluoreszenz geht vom Vacuoleninhalt abgeschwächt auf ihre Umgebung über, die für kurze Zeit eine schmutzige, rote Fluoreszenz, im Phako eine graugelbe Farbe zeigt. Anschließend an den plötzlichen Farbwechsel kann die jetzt leere Vacuole wieder anschwellen. Die l. V. zeigen kein solches Phänomen einer neuen Vacuolenentstehung. Sie nehmen nur an der Wiederausdehnung der Zelle teil. Nach etwa 30 min ist ein — vielleicht nur vorläufig — stabiler Zustand erreicht, insgesamt ist der Zelldurchmesser jetzt geringer als vor Versuchsbeginn, die Vacuolen sind absolut ebenfalls kleiner, ihre Relation zum Gesamtdurchmesser hat aber zugenommen.

Besonders resistent gegen Formol sind die als *Schollen* bezeichneten, nach AO-Fluochromierung gebildeten Cytoplasmaeinschlüsse: Unmittelbar nach Beginn der Formoleinwirkung zeigen sie eine geringe, aber doch deutliche Anschwellung. Sie erweisen sich dann resistenter gegen Formol als alle anderen rotfluoreszierenden Strukturen. Nach etwa 20 min nur langsames Abblässen der Fluoreszenz, im Phako Übergang in ein fahles Graugelb, nach 1 Std ist im Cytoplasma immer noch ein blaßgelblicher, nicht vacuolärer Verdichtungsherd zu erkennen.

1% *Osmiumtetroxyd* in *physiol. NaCl*. Die Vacuolen werden ganz plötzlich, nach etwa 1 min, entfärbt, ohne Ausbildung einer intracellulären Zwischenmembran. Danach lebhaft, lang anhaltende Brownsche Bewegung. Nach  $1\frac{1}{2}$ —2 min ist die Plasmafluoreszenz gelöscht, im Hellfeld und Phako sieht man jetzt die bräunliche Verfärbung durch Osmium. Die Kerne behalten die Fluoreszenz länger.

*Beeinflussung vitalgefärbter Zellen durch andere Farbstoffe und Pharmaka.*

a) *Janusgrün* („Behringwerke“, I. G. Farben Nr. 335016). Anfärben von Erguß mit einer Farbstoffmenge entsprechend einer Konzentration 1:10000. 3 min stehenlassen, anschließend 1 Tropfen AO 1:100. Blaufärbung der Mitochondrien und Bildung r. V. ist innerhalb einer Zelle möglich, allerdings in wesentlich abgeschwächtem Umfang. Sehr bald kann diffuse Grünfluoreszenz der manchmal auffallend ausgebreiteten, wie aufgeflossenen Zellen eintreten, oder es kann in gleich groß gebliebenen Zellen zu diffuser Rotfluoreszenz des Plasmas kommen.

Eine sehr bemerkenswerte Beziehung besteht zwischen Janusgrün und AO: Im Bereich der blaugefärbten Mitochondrien, die vorwiegend dem Kern eng anliegen, fehlt die Fluoreszenz. Nach Exposition im BV-Licht sieht man im Phako das Verschwinden der Blaufärbung, zugleich im Fluoreszenzmikroskop den Beginn der Grünfluoreszenz. Auch wenn die Kerne das schwache Rosarot des Janusgrüns angenommen haben, ist ihre Grünfluoreszenz nur gering. Nach Exposition im Tageslicht oder im BV ist der gleiche Farbaustausch nachweisbar. Vorfärbung mit *Janusgrün* 1:50000: r. G. und r. V. vorhanden, Farbtöne aber ebenfalls nicht so leuchtend wie nach typischer Färbung.

b) *Trypaflavin* (Bayer) 1:100000. Starke, gleichmäßige Grünfluoreszenz, viele Vacuolen bleiben leer, einige sind schwach milchig grün. Im Plasma wenige lebhaft grüne Körnchen, denen im Phako kleine graue Gebilde entsprechen. Der Vergleich ist erschwert, da nach Trypaflavinfärbung die Strukturen im Phako silbrig flimmern, stärker lichtbrechend verändert und die Zellen auch

leicht geschrumpft sind. Besonders schnell treten Veränderungen der Zellen i. S. der Potocytose ein. Die Blasen zeigen keine oder geringere Fluoreszenz als ihre Umgebung.

c) *Neutralrot* (Bayer). I. 1:10000, in NaCl schwach grüngelbliche Fluoreszenz, die unter BV-Exposition in ein grelles Grün übergeht. Einige Vacuolen leer, einige mit intensiv schwarzem Inhalt, der beim Umschalten in Hellfeld und Phako kirschrote Farbe zeigt. Ebenso verhalten sich feine Körnchen im Cytoplasma.

II. 1:15000, im Ergußüberstand gelöst. Im Fluoreszenzlicht ein anderes Verhalten: Wieder der Umschlag aus einer hier sehr schwachen Grüngelb-

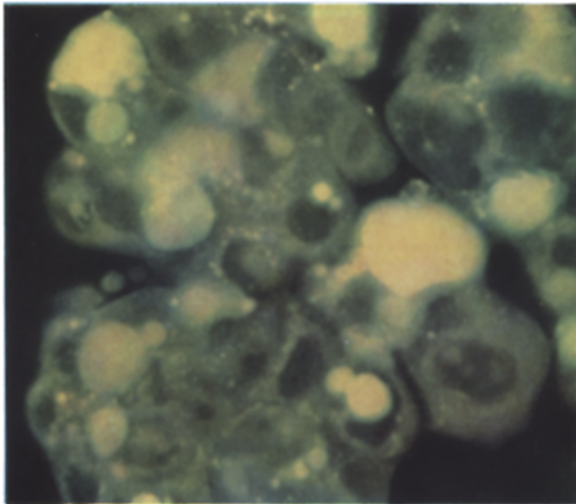


Abb. 9. Gleicher Fall wie Abb. 6. Neutralrot 1:15000 in zellfreier Ergußflüssigkeit gel.: Grelle grüne Fluoreszenz von Vacuolen und groben Granula nach BV-Exposition

fluoreszenz in ein intensiveres Grün. Zugleich treten im Erguß einer Patientin (M. M.) aber auch feinere und gröbere grellgrüne Tropfen im Cytoplasma auf, während sich mehrere, zuvor leere Vacuolen plötzlich mit einem grellgrün-fluoreszierenden Inhalt füllen (Abb. 9). In anderen Ergüssen war dieses Phänomen ebenfalls, aber weniger ausgeprägt, nachzuweisen. Es ist durch weitere BV-Belichtung nicht mehr beeinflussbar. Im *Phako* erscheinen die grünen Tröpfchen grau, flüssigkeitsreich, die fluoreszierenden Vacuolen sind von den nicht fluoreszierenden nicht sicher zu differenzieren, insbesondere zeigen sie nicht die mit Fluoreszenzlöschung verbundene kirschrote Färbung. Neutralrot läßt stets den Kernbereich ungefärbt und fluoreszenzfrei.

Neutralrot, bzw. Trypaflavin, einem bereits AO-gefärbten Erguß in verschiedener Konzentration zugesetzt, beeinträchtigen in Abhängigkeit von ihr die Intensität der Rotfluoreszenz, Neutralrot stärker als Trypaflavin, bis unter Neutralroteinwirkung die Fluoreszenz rotleuchtender Strukturen aufhört. In einem *Gemisch von AO und Evans Blue* (1:10000) zeigen die vormals roten Vacuolen eine intensive, milchige Grünfluoreszenz.

*Dinitrophenol* und *Natriumacid* beeinträchtigen die Granulabildung quantitativ erst in relativ hohen Konzentrationen:  $10^{-3}$  mol (DNP),  $5 \times 10^2$  mol



(Na-Acid). Gleichzeitig kommt es phasenoptisch zur Mitochondrienquellung und allgemein zur verstärkten Wasseraufnahme in die Zelle. Die  $10^{-4}$  molare Lösung von DNP ist auf die Granulabildung ohne Einfluß. Der biologische  $p_H$ -Bereich wurde durch Zugabe der eiweißhaltigen Ergüsse, bzw. einer isotonischen Pufferlösung nach CHANCE und HESS (1959) gewahrt. — Nach Suspension des Sediments vitalgefärbter Ergußzellen in DNP  $10^{-3}$  mol in physiol. NaCl ( $p_H$  4) wird die Rotfluoreszenz der Vacuolen mit dem plötzlichen Ausfall einer feinkörnigen, im Phako dunkelroten, kristallartigen, nichtfluoreszierenden Granulation beendet, die nach mehreren Minuten verschwindet. Im übrigen entwickeln sich Veränderungen, die als Folge einer Säureeinwirkung zu erwarten sind.

Darüber hinaus fanden sich keine sicheren Unterschiede in den morphologischen Veränderungen nach DNP und Natriumacid. Vielleicht ist DNP ein die Farbstoffkonzentration im Cytoplasma stärker hemmendes Mittel als Natriumacid.

Die Untersuchung der nach Fixation gefärbten Präparate ließ der Erwartung gemäß keine umschriebenen Veränderungen erkennen, die mit der zuvor abgelaufenen Vitalfärbung in Beziehung zu bringen wären. Frühere Untersuchungen (ZEIGER und SCHMIDT 1957, WITTEKIND 1958a) hatten gezeigt, daß es einer gewissen, hier nie erreichten Zeitspanne bedarf, bis die Nucleoprotein-AO-Verbindung vor allem durch Wasserentzug so gefestigt ist, daß sie den Fixations- und Färbeprozess überdauert. — Im Sudanschwarz-Präparat erkennt man in Histiocyten grobe, in vielen Tumorzellen feinere schwarze Körnchen, die den phasenmikroskopisch sichtbaren, nicht fluoreszierenden, stark lichtbrechenden Granula entsprechen dürften.

Die übrigen Färbungen brachten keine neuen oder in diesem Zusammenhang bedeutungsvollen Ergebnisse.

**6. Beeinflussung vitalgefärbter Zellen durch Blauviolett-Licht.** Es wurde bereits erwähnt, daß die Entstehung von roten Vacuolen schon durch kurze Expositionszeiten beeinträchtigt wird. Nach  $1\frac{1}{2}$ –2 min Belichtung kann die Vacuolenfüllung noch eintreten, es bleibt aber dann bei einer milchigen Grünfluoreszenz. Nach Belichtung ausgebildeter r. V. geht das je nach Konzentration der Farbstoffmenge leuchtende bis matte Rotorange in ein stumpfes Schwarzrot, schließlich in ein schwaches Grün über, welches allerdings nicht näher zu bezeichnen ist, da alle Zellen nach BV-Exposition eine milchige, kompakte Grünfluoreszenz zeigen, die sich aus dem reinen, durchsichtigen „Grasgrün“ entwickelt, welches frisch gefärbte, in unverändertem Medium verbliebene Zellen aufweisen. Die r. G. verlieren ihre Rotfluoreszenz manchmal früher, manchmal später als die r. V., am meisten resistent erweisen sich die roten Schollen. Die leeren Vacuolen bleiben unverändert. Sie nehmen auch noch lange nach Exposition keinen Farbstoff auf. Im Phako kann Gelbfärbung von r. V. und r. G. noch erhalten sein, wenn im Fluoreszenzmikroskop der Rückgang der Rotfluoreszenz bereits fortgeschritten ist.

#### IV. Besprechung der Ergebnisse

Für die Beantwortung der Frage, welches Aussagevermögen den hier mitgeteilten Ergebnissen hinsichtlich der Entstehung und gegenseitigen Beziehung intraplasmatischer Hohlräume zukommt, sind vor allem 2 Faktoren zu berücksichtigen: nämlich erstens die besonderen Lebensbedingungen der Ergußtumorzellen, die auf die Entstehung der *optisch leeren* Vacuolen- und die Eigenart der Acridinorange-Fluochromierung, die auf die Bildung *rotfluoreszierender Vacuolen*



maßgebenden Einfluß haben müssen. Das als Potocytose bezeichnete Phänomen, nur in Gemeinschaft mit schwerer Zellschädigung beobachtet, hat hier weniger ein Interesse per se als vielmehr in seiner Beziehung zu den anderen Erscheinungen, die als Leistungen der lebenden Zelle zu werten sind.

**1. Zur Entstehung der optisch leeren Vacuolen.** Einleitend war bereits die Auffassung mehrerer Autoren wiedergegeben worden, wonach akuter  $O_2$ -Mangel über eine vermehrte Flüssigkeitsaufnahme zur Bildung scharf begrenzter, optisch leerer Vacuolen z. B. in Leberzellen führt. Es kann durchaus sein, daß die Vacuolenentstehung auch durch eine intracelluläre Wasserverschiebung gefördert wird, da mit zunehmender Annäherung an den isoelektrischen Punkt, infolge der Ansäuerung, das intracelluläre Eiweiß Quellwasser freigibt (NETTER 1950).

Es erscheint denkbar, daß die Sauerstoffmangelsituation in dem Moment gegeben ist, da sich die Zelle aus dem Gewebsverband löst, um in den Erguß überzutreten. Der Vergleich von Ergußzellen mit dem histologischen Schnitt aus einer der betreffenden Körperhöhle anliegenden Metastase zeigte, daß deren Tumorzellen praktisch vacuolenfrei sind. Als wahrscheinlich ist anzunehmen, daß die Sauerstoffversorgung im Erguß weniger gut ist als bei erhaltenem Anschluß an das Gefäßsystem. Die Versorgung mit  $O_2$  und Nährstoffen erfolgt jetzt nicht mehr durch die Capillaren, sondern durch die den Erguß begrenzenden serösen Häute. Hinzu kommt ein veränderter Eiweißgehalt des Mediums; im Durchschnitt etwa 3% im Erguß gegenüber dem um das Doppelte höheren im Blut.

Die *besonderen Lebensbedingungen in Tumorgewebe*n dürften bei mangelnder Blutzufuhr den schnellen Eintritt der Nekrose und damit das Ausbleiben eines Zwischenstadiums bedingen, in welchem die unter  $O_2$ -Mangel stehenden Tumorzellen noch Vacuolen zu bilden vermöchten. Auf einer infolge des intensiven Stoffwechsels höheren Empfindlichkeit gegenüber ungenügender Sauerstoffzufuhr mag z. T. auch beruhen, daß Tumorzellen im Erguß so viel mehr und so viel größere Vacuolen enthalten als normale Zellen, etwa die Pleuradeckzellen. Das ungleiche Ausmaß der Vacuolenbildung an den erwähnten Zellen steht vielleicht in Beziehung zum Ausmaß der in ihnen gegebenen verschiedenen intensiven Hemmung der Oxydation, die ihrerseits zu dem Zeitraum Beziehung haben dürfte, der zwischen Übertreten der Zelle aus dem Gewebsverband in die Ergußflüssigkeit und Entnahme der Ergußflüssigkeit liegt. Es ist in diesem Zusammenhang zu beachten, daß die Zahl der Vacuolen abnimmt, wenn es, wie in 2 Fällen deutlich beobachtet, ohne Auswechseln der Suspensionsflüssigkeit zur Zellvermehrung in vitro kommt. Das Absterben der Zellen nach etwa 24 Std geschieht dann ohne nochmalige Vacuolenbildung.

Schwer zu beurteilen ist die *sicher vermehrte Vacuolenbildung während der cytostatischen Behandlung*. Es ist durch die Untersuchungen von HOLZER (1956) u. a. ja gesichert, daß die Cytostatica ebenfalls in die fermentativen Prozesse eingreifen. Wenn die vermehrte Vacuolenbildung unmittelbare Folge der Einwirkung cytostatischer Substanzen wäre, so ließe sich dieser Vorgang durchaus zu der „histotoxischen Hypoxydose“ (STRUGHOLD 1944, BÜCHNER 1957) in Beziehung setzen. Es ist aber auch zu berücksichtigen, daß fast stets die lokale, besonders die intrapleurale Applikation cytostatischer Substanzen zur Schwartenbildung führt (K. H. BAUER 1952), welche vielleicht den Stoffaustausch erschwert. Womöglich erklären sich die mehrfach berichteten Erfolge von lokaler cytostatischer Behandlung z. T. mit einer solchen, nur mittelbaren Wirkung. Die Tatsache, daß in frisch hergestellten Präparaten relativ häufig Vacuolenbildung

zu beobachten ist, kann mit einem plötzlich verstärktem Sauerstoffmangel, der vielleicht durch den Deckglasdruck verschärft wird, erklärt werden.

Bemerkenswert ist, auf welch verschiedenen Stufen die Vacuolenbildung stehen bleiben kann: Große Gebilde und Blasen, die die ganze Zelle ausfüllen und den Kern in die Peripherie verdrängen, wurden in ihrer stets raschen Bildung (s. auch TROWELL 1946) beobachtet. Zu beachten ist auch die bei starker „blasiger Entartung“ des Cytoplasmas nicht seltene Kernpyknose. Fließende Übergänge zwischen „vacuolärer Degeneration“ und „blasiger Entartung“ (B. FISCHER 1922), von KETTLER zunächst (1948) bezweifelt, später (1952) von ihm und anderen Autoren (ATERMANN 1958a, b) als möglich angesehen, kommen also in Ergußtumorzellen sicher vor.

Schließlich ist noch das Zunehmen der leeren Vacuolen in den Tumorzellen nach längerem Aufbewahren zu erwähnen. Sicher ist hier eine weitere Beeinträchtigung der Stoffwechseltätigkeit ursächlich beteiligt. Diese muß aber wenigstens teilweise erhalten sein, um eine Überwässerung der Zelle zu verhindern (LE FEVRE 1955). Die Aufbewahrung *in vitro*, auch unter Beibehaltung des Suspensionsmilieus, muß ja schon deshalb zu einer Störung der Osmoregulation führen, weil das mangelnde O<sub>2</sub>-Angebot, der fehlende Austausch von Nährstoffen gegen Schlackenstoffe, der Temperaturabfall neben der in diesen Versuchen nicht durchgeführten Anpassung des Ionenmilieus an *in vitro*-Bedingungen eine solche Störung begünstigen müssen (AEBI 1951).

Die Entstehung dieses Vacuolentyps ist so ausführlich besprochen worden, um seine Eigenart gegenüber dem „Vacuom“ im Sinne von PARAT (1928) hervorzuheben. Das Vacuom, als klassisches Objekt der Vitalfärbung durch Neutralrot, hat enge Beziehungen zum Golgi-Apparat. Die Hohlräume in Exsudatzellen haben diese Beziehung eben nicht.

**2. Zur Entstehung der rotfluoreszierenden Vacuolen, Einfluß der Vitalfärbung.** Es ist nun das Problem zu behandeln, in welcher Weise sich die Zellen anzupassen haben, wenn im Zuge der Vitalfärbung die Farbstoff-Kationen die Zellmembran erreichen. Zahlreiche Faktoren, von denen sich viele in komplizierter Weise gegenseitig beeinflussen, sind hier zu berücksichtigen. Eine auch nur annähernd vollständige Besprechung ist aber unmöglich, denn die Fortschritte der Zellphysiologie und Biochemie der letzten Jahrzehnte lassen erkennen, daß die Vitalfärbung zu sehr vielen und in wesentlichen Punkten oft noch ungeklärten Problemen dieser Forschungsgebiete Beziehungen hat. Zu nennen sind insbesondere Zellpermeabilität, Ionenaustausch, Nucleinsäurestoffwechsel, der durch den Farbstoff verursachte Eingriff in den Fermentapparat nicht nur des Zellinneren, sondern auch der Zelloberfläche (ROTHSTEIN 1954). Noch schwieriger ist die Aufgabe, die gegenseitige Beeinflussung der Vitalfärbung und der intracellulären Vacuolenentstehung richtig einzuschätzen. Die Diskussion muß sich darauf beschränken, nur die Schlüsse zu ziehen, die ganz unmittelbar durch die oben mitgeteilten Beobachtungen als naheliegend erscheinen. Die Deutung wird darüber hinaus erschwert durch die fast völlige Ausschaltung von Maß und Zahl aus diesen Untersuchungen, die den schnellen Ablauf von Reaktionen an lebenden Objekten zum Gegenstand haben.

Trotzdem wird an der Auffassung festgehalten, die Vitalfärbung sei auch heute noch eine der Methoden der Wahl zum Studium der Vacuolen (HOVASSÉ 1956), um so mehr, als unsere Untersuchungen geeignet erscheinen, zu einem kritischen Einwand Stellung zu nehmen, mit dem der obengenannte Autor die anerkannte Brauchbarkeit der Vitalfärbung sogleich wieder einschränkt; die Spezifität bei Vacuolenanfärbung sei deshalb nur begrenzt, weil der Farbstoff, in diesem Zusammenhang das Neutralrot als Beispiel für andere basische Farben,

nicht nur das Vacuom als vorgebildete Zellstruktur färbt, sondern auch selbst neue „Vacuolen“ bildet, deren Gesamtheit CHLOPIN (1927, 1928) und KEDROWSKI (1937, 1941) als Krinom bezeichnet hatten. — Das *Acridinorange* erscheint für solche Untersuchungen ein besonders geeigneter Farbstoff. Vor allem erfüllt er die Forderung von GICKLHORN (1931), man solle in der Vitalfärbung nur auf physikalisch-chemisch wohl definierte Substanzen zurückgreifen.

Wesentlich ist die Affinität des Farbstoffes zu den Nucleinsäuren (GÖSSNER 1949, SCHÜMMELFELDER 1948—1956, SCHÜMMELFELDER u. Mitarb. 1957, 1958, v. BERTALANFFY und BICKIS 1956, ZEIGER u. Mitarb. 1951—1957). Seine relativ gute Verträglichkeit, die Beziehung zu den Nucleinsäuren des Kerns, vor allem der Ribosenucleinsäure des Plasmas, weiter die Möglichkeit, den „Konzentrationseffekt“ (STRUGGER 1940) auszunutzen, also den Umschlag von Grün- zu Rotfluoreszenz im Konzentrationsbereich von 1:100, sind Eigenschaften, die ihm als Vitalfarbstoff zunehmende Beachtung sichern (ZEIGER u. Mitarb. 1951 bis 1957, WEISMANN 1953, WEISSMANN und GILGEN 1956, WITTEKIND und VÖLKER 1957, WITTEKIND 1958a, b).

Auf eine Eigenschaft sei noch hingewiesen, die das AO möglicherweise mit einem anderen basischen Farbstoff, dem Thionin, teilt: KOCH und EVANS (1956) fanden an Kaltblüterorganen, daß Thionin in niedriger Konzentration das Eindringen von Natrium in die Zelle behindert und dieses im Bereich von  $10^{-3}$  mol völlig aufhebt. Die Abgabe von Na aus der Zelle bleibt unbeeinträchtigt. Die interessante Erscheinung wird mit einer Störung der Affinität zwischen Na und seiner Trägersubstanz erklärt. — Sollte AO einen ähnlichen Effekt haben, so könnte er vielleicht zur Erklärung der fehlenden Zellschwellung nach Fluochromierung beitragen.

Im Rahmen unserer Fragestellung erscheint nun vor allem interessant, inwiefern der AO-Vitalfärbung von Ergußzellen Eigenarten zukommen. Man wird sie vor allem in 2 Umständen sehen müssen: 1. Es hat sich beweisen lassen, daß Vacuolen, die als morphologisches Substrat einer Zellschädigung — z. B. des Sauerstoffmangels — anzusehen sind, bei Hinzukommen einer weiteren Schädigung — der Vitalfärbung — dieser gegenüber eine Anpassung vornehmen in dem Sinne, daß sie ihre Funktion, Ausgliederung von Flüssigkeit aus den Zellstrukturen, jetzt an dieser neugebildeten Flüssigkeit ausüben. War es zuerst Wasser, so ist es jetzt die AO-Lösung. Die Natur dieser AO-Lösung führt uns aber zu dem weiteren Anlaß, in diesem Zusammenhang von einem Sonderfall der Vitalfärbung zu sprechen: Auf Grund der erwähnten physikalisch-chemischen Eigenart des Farbstoffes ist sicher, daß die Rotfluoreszenz der Vacuolen auf seine Konzentration in diesem Bereich hinweist. Die Konzentrationsleistung wurde von der Gesamtheit der lebenden Zelle durchgeführt, da hier der Einfluß einer besonderen, an die Vacuole gebundenen Struktur, des Golgi-Apparates, nicht zur Diskussion steht.

Es besteht also ein Konzentrationsgradient von der Vacuole zum umgebenden Cytoplasma, und es fragt sich, wodurch er gebildet und aufrechterhalten wird. Ein Substrat muß vorhanden sein, an welches der Farbstoff gebunden ist, denn schon aus Gründen des Ionengleichgewichtes ist undenkbar, daß die Vacuole eine reine, hochkonzentrierte Lösung von AO in Wasser speichert.

Fraglich ist die Möglichkeit eines Vergleiches mit der Rotfluoreszenz pflanzlicher Vacuolen (HÖFLER 1947), da ja im animalischen Bereich der stets als Kation vorliegende Farbstoff jede Membran ohne Schwierigkeit permeiert. Keinesfalls wirken die hier diskutierten Vacuolen als „Ionenfalle“ im Sinne HÖFLERS.

Unsere Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß der Inhalt der r. V. *eiweißhaltig* ist, und sie lassen insbesondere vermuten, daß eine Nucleoproteid-AO-

Verbindung vorliegt. Anlaß für diese histochemisch unbewiesene Annahme ist zunächst die Beobachtung, daß i. a. eine Beziehung besteht zwischen der Anwesenheit r. V. und der Bildung r. G. im Cytoplasma. An diesen Granula ist aber der histochemische Nucleinsäurenachweis gelungen (ZEIGER und SCHMIDT 1957, WITTEKIND 1958a). — Entweder fehlen i. a. die r. G. in Zellen mit r. V., oder sie sind in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft vermindert. Die Annahme liegt nahe, daß die Zelle mit geringerem Energieaufwand die bereits vorhandenen Vacuolen füllt, als den Farbstoff an verschiedenen Orten in der Nucleoproteid-AO-Verbindung auszusondern. Der letztere Vorgang, die Krinombildung nach CHLOPIN, steht also nicht, wie von HOVASSE angenommen, im Gegensatz zu jeder Funktion des „Vacuums“, sondern beide, Vacuolenfüllung und Krinombildung, sind, wenigstens in dem hier beobachteten speziellen Fall, die morphologischen Anzeichen für die Fähigkeit lebender Zellen, das gleiche Ergebnis, nämlich die Befreiung der Strukturen von schädlichen oder im Überfluß vorhandenen Substanzen, auf verschiedenem Wege zu erreichen.

Auch ohne diese Argumentation mit der topographischen Beziehung zwischen Krinombildung und Lage der roten Vacuolen ist wahrscheinlich, daß stets der gleiche, von ALTMANN (1955) beschriebene Vorgang bei der AO-Fluochromierung lebender Zellen abläuft, nämlich „einmal die Fixierung des Farbstoffes an den Nucleoproteiden und deren rein passive, einer Präcipitation vergleichbaren Alteration, zum anderen die Segregation und Konzentration dieser Verbindung infolge einer aktiven Leistung der lebenden Zelle, die als eine Art Schutzmaßnahme ein Fortwirken und ein weiteres Ausbreiten des schädigenden Stoffes einzudämmen und zu verhindern vermag“.

Bemerkenswert verschieden muß der Wassergehalt in Krinomgranula einerseits, den r. V. andererseits sein. Nimmt man nämlich an, daß die Zelle stets nur eine bestimmte Menge Substrat zur AO-Bindung und -Konzentration freistellen kann, so verteilt sie sich im Falle der Vacuolenfüllung ja auf einen ungleich größeren Raum.

Diese begründete Annahme nun, daß die optisch leeren „Abscheidungs-vacuolen“ eine Nucleoproteid-AO-Verbindung aufnehmen, läßt die Eigenart der Vitalfärbung vacuolenhaltiger Ergußzellen auch darin sehen, daß eben eine *eiweißhaltige* Lösung in die Vacuolen sezerniert wird. Erst unlängst hatte ROTHSTEIN (1954) die Annahme als „unrealistisch“ bezeichnet, Proteinmoleküle könnten einfach durch die Zellmembran diffundieren. Eine Membran grenzt aber sicher die leeren Vacuolen vom umgebenden Cytoplasma ab, dafür spricht allein die Tatsache, daß TROWELL (1946) die Vacuolen auch nach dem Zellzerfall erhalten fand. Die begründete Wahrscheinlichkeit, daß r. V. auch Eiweiß enthalten, möchte andererseits gegen den Hintergrund neuerer Arbeiten als nicht besonders auffallend erscheinen.

Bereits PICHOTKA (1942) hatte manche Leberzellvacuolen als schwach eosinfärbbar gefunden, TROWELL (1946) weist auf das mögliche Vorhandensein eines eiweißhaltigen Vacuoleninhaltes hin, schließlich grenzten DONTACH und WEINBREN (1952) die nach partieller Ektomie der Rattenleber entstandenen eiweißhaltigen Cytoplasmaeinschlüsse deutlich von den aus hypoxämischer Ursache entstandenen optisch leeren Vacuolen ab. An eiweißhaltigen Tropfen kommt es zu einer deutlichen Konzentration von Evans Blue. In späteren Arbeiten von FISCHER und FISCHER 1954, ATERMANN 1958a, b wird ein grundsätzlicher Unterschied zwischen eiweißfreien und eiweißhaltigen Vacuolen nicht mehr aufrechterhalten.

Eine solche Abgrenzung könnte in der Tat unnötig erscheinen, da ja auch die hier diskutierten cytoplasmatischen Hohlräume auf unterschiedliche Eiweiß-

gehalte, damit auf fließende Übergänge zu völlig eiweißfreien Vacuolen schließen lassen. Es bleibt aber doch weiterhin problematisch, wie großmolekulare Substanzen, eben etwa Eiweiß oder das von ATERMANN (1958b) verwendete Dextran, die Membran einer vorgebildeten Vacuole passieren. Schließlich sprechen die Ergebnisse verschiedener Arbeiten und auch die der AO-Vitalfärbung — Krinombildung und Vacuolenfüllung — für die Annahme, daß der Ablagerungsmodus von derjenigen Substanz entsprechend beeinflußt wird, die zunächst im Überschuß vorhanden ist; handelt es sich um Eiweiß, so werden „hyaline Tropfen“ gebildet, als die man wohl die von DONIACH und WEINBERG (1952) nach partieller Hepatektomie beobachteten Gebilde ansehen kann; auch die Entstehung der zuvor beschriebenen AO-„Schollen“ und der Krinom-Granula beruht auf der Kondensation einer Flüssigkeit, die schon *primär* eiweißhaltig war, im Gegensatz zu dem *zunächst* sicher stets wäßrigen Inhalt der auf Grund von Hypoxydase entstandenen Vacuolen. Wahrscheinlich ist eben, daß man sich die Zellmembranen nicht als stets kontinuierliche, starr permeable Membranen vorstellen muß. Dagegen sprechen unter anderen auch die Beobachtungen, daß Öltropfen (CHAMBERS 1935) die Zellmembran von innen nach außen, Eiweißtropfen sie bei „Pinocytosis“ (H. LEWIS) in umgekehrter Richtung passieren können, und schließlich, daß sich innerhalb der Vacuolen so oft phagocytierte Zellen finden (Abb. 4).

Unsere Untersuchungen haben eine sichere morphologische Beziehung zu den von LEWIS (1931) an Makrophagen in Gewebekulturen entdeckten und u. a. vom Holterschen Arbeitskreis (HOLTER und MARSHALL 1954, CHAPMAN-ANDRESEN und HOLTER 1955, CHAPMAN-ANDRESEN 1957, HOLTER 1959) an Amöben eingehend studierten Phänomen der *Pinocytose* nicht erkennen lassen. Die unverändert abgerundete Tumorzelloberfläche während der Vacuolenentstehung spricht auch nicht für einen grundsätzlich ähnlichen Wirkungsmechanismus.

Die Versuche zeigten, wie schnell die Rotfluoreszenz der leeren Vacuolen eintritt, und außerdem, daß sie erst dann eintritt, wenn die Gesamtheit der zugehörigen Zelle grünfluoresciert, die Voraussetzungen für einen intraplasmatischen Farbstofftransport zur Vacuole also gegeben sind. Würden die präformierten Vacuolen auch schon eine präformierte, färbbare Substanz enthalten, oder wäre der von manchen Vacuolen bekannte niedrige  $p_H$ -Wert (PARAT 1928) für die Anreicherung von allein maßgeblicher Bedeutung, so könnten besonders exponiert liegende Vacuolen auch vor der übrigen Zellen Rotfluoreszenz annehmen.

Während nun der Modus der bemerkenswert schnellen Füllung der Vacuolen durch die Nucleoproteid-AO-Verbindung als ungeklärt bezeichnet werden muß, so erweist sich dann die Vacuolenwand als fähig, den neu aufgenommenen Inhalt zu bewahren, wie es bei einer eiweißhaltigen Flüssigkeit zu erwarten ist. Ebenso ungelöst ist das im Prinzip ähnliche Problem, in welcher Weise von den Protozoen die Fermente, also Eiweiße, in die Nahrungsvacuolen abgegeben werden (KITCHING 1956).

Es wird eingeräumt, daß die Definition des Inhaltes rotfluoreszierender Vacuolen als einer „Acridinorange-Nucleoproteidverbindung“ ungenau ist und zu theoretischen Bedenken Anlaß geben kann. So darf angenommen werden, daß am Zustandekommen der Rotfluoreszenz außer der salzartigen Bindung auch Adsorptionsvorgänge beteiligt sind. Eine exakte physikalisch-chemische Definition des Vacuoleninhaltes wird aber noch so lange schwierig sein, als z. B. noch nicht geklärt ist, ob die Rotfluoreszenz des  $AO^+$  dem Dimeren zugeordnet werden kann (BARTELS 1954). Im übrigen hat sich kein Anhaltspunkt für die Anwesenheit anderer Trägersubstanzen in den Vacuolen gefunden, welche ebenso wie Nucleoproteidverbindungen die gegenseitige Wechselwirkung von Farbstoffionen nach Adsorption und Ladungs-

neutralisation zur Metachromasieentstehung erlauben würden (s. hierzu SCHEIBE und ZANKER 1957). In den Rahmen der Diskussion um den Vakuoleninhalt gehört noch der Hinweis auf die wichtigen Arbeiten von DUSTIN jr. (1957), der auf Grund von Untersuchungen mit Neutralrot die Anwesenheit basophiler — NS-haltiger — Substanzen im Cytoplasma sogar als Voraussetzung zur Vitalfärbung von Cytoplasmavakuolen ansieht. Allerdings berücksichtigt er nicht die Probleme, die sich mit der Annahme verbinden, jene unabhängig vom Golgi-Apparat, etwa nach Einwirkung von Ammoniumsalzen, entstandenen Vakuolen könnten eiweißhaltig sein. Die Gleichsetzung von Vakuolen verschiedener Herkunft mit dem Krinom i. S. CHLOPINS (1927) auf Grund der Untersuchungen DUSTINS an kernhaltigen Erythrocyten und Reticulocyten kann im übrigen in dieser Absolutheit für die hier besprochenen Zellen nicht anerkannt werden.

Die wechselweise Beobachtung im Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop lehrt, daß im einzelnen die Zusammensetzung des fluoreszierenden Vakuoleninhaltes erheblichen Schwankungen unterliegen muß: Zunächst weist darauf der Umschlag von einer phasenoptisch nicht erkennbaren Grünfluoreszenz bei sehr niedriger, in Rotfluoreszenz bei höherer Farbstoffdosierung hin. Aber auch innerhalb der Rotfluoreszenz bestehen quantitative, mit objektiven Meßmethoden kaum faßbare Unterschiede, die ihre Entsprechung im Phasenmikroskop haben: von einer schwachen, schleierartigen Rotfluoreszenz in vielen frisch aufgefüllten Vakuolen, mit kaum angedeuteter Gelbfärbung im Phako, bis zu intensivem, lackartigen Rotleuchten, das mit einer starken Gelbfärbung im Phako bzw. Hellfeld einhergeht. Diesem Farbwechsel entsprechen mit Sicherheit Unterschiede in der AO-Konzentration, wahrscheinlich aber auch Unterschiede im Eiweißgehalt. In manchen r. V. muß der Wassergehalt noch sehr hoch sein, wie man aus der oft zu beobachtenden lebhaften Brownschen Bewegung von ebenfalls rotfluoreszierenden Teilchen schließen kann. Prinzipiell dürfte möglich sein, den Eiweißgehalt solcher Vakuolen ungefähr zu bestimmen.

Vorversuche sind unternommen worden: Vitalgefärbte Ergußzellen wurden in einer 20%igen isotonischen Lösung von Rinderalbumin suspendiert. Darin zeigten aus der Zelle austretende, an das umgebende Medium unmittelbar angrenzende r. V. negativen Phasenkontrast als Zeichen dafür (BARER, ROSS und TKACZYK 1953, BARER und JOSEPH 1954, 1955), daß der Eiweißgehalt des umgebenden Mediums erwartungsgemäß höher war. Mit einer entsprechenden Anpassung des Albumingehaltes wird man ungefähre Gleichheit der Brechungsindices der zu testenden Innen- mit der Außenlösung erreichen können.

Dem *Formolversuch* kommt für die Beurteilung der Vakuolenmembran und dem von ihr eingeschlossenen Inhalt besondere Bedeutung zu. Auf die Art, wie das Formol lebende Zellen fixiert, haben eine Fülle chemischer und physikalischer Faktoren Einfluß, die erst unlängst von CRAWFORD und BARER (1951) anlässlich ihrer kontrollierten Fixationsversuche an lebenden Kaltblüterzellen analysiert worden sind: Reaktionen zwischen Formaldehyd sowie Amino-, Imino-, Sulphydril- und anderen Gruppen der Aminosäuren, Reduktionsvermögen, osmotische Effekte, Einfluß des Salzgehaltes der Lösungen, Veränderungen der Membranpermeabilität u. a.

Es erscheint gerechtfertigt, wenn sich eine kurze Besprechung des Versuches der kontrollierten Fixation vitalgefärbter Zellen auf Hinweise zur Beeinflussung des osmotischen Gleichgewichtes und der Permeabilität beschränkt, denn die schnell bis zu einem Endstadium der diffusen Grünfluoreszenz ablaufenden Vorgänge dürften in der Hauptsache von diesen beiden Faktoren beeinflusst sein. Die starke initiale Schrumpfung der Zellen innerhalb 20—30 sec nach Kontakt mit Formol in physiol. NaCl stimmt gut mit den fast gleichen, von CRAWFORD und

BARER an Schneckenamöbocyten ermittelten Zeiten überein. Die Auffassung dieser Autoren dürfte zu Recht bestehen, daß die Zellen zunächst impermeabel für Formol sind und daß während dieser kurzen Zeitspanne Wasser die Zelle verläßt. An diesem passageren Wasserverlust werden auch die Vacuolen, anscheinend sogar in besonders starkem Maße, beteiligt. Das Wiederanschwellen der Zelle dürfte dann das Eindringen des Formols und damit den eintretenden Zelltod anzeigen. Bemerkenswert ist dann um so mehr, wie lange die Vacuolenmembran Widerstand leistet und in welcher Weise er schließlich gebrochen wird: Die Entstehung einer optisch leeren Vacuole nach 4—15 min innerhalb der präexistierenden r. V. muß ein postmortales Ereignis sein. Zur Erklärung wird man komplizierte Ionenaustauschvorgänge heranziehen müssen, die weiterer Erforschung bedürfen. Wie man das plötzliche Auftreten von Körnchen nahe der intravacuolären Grenzlinie (S. 323) zu erklären hat, wird weitgehend vom Inhalt der neugebildeten Vacuole abhängen. Wahrscheinlich ist, daß sie Formol enthält. Berücksichtigt man, daß die rote Vacuole unter Spannung steht — auch der Deckglasdruckversuch weist darauf hin — so erscheint möglich, daß nach Einreißen der intravacuolären Grenzmembran zwischen fluoreszierendem und neugebildetem, optisch leerem Anteil, fluoreszierender — eiweißhaltiger — Inhalt in die neugebildete, formolhaltige Vacuole gepreßt und dort augenblicklich präcipitiert wird.

Möglich ist aber auch, daß nur scheinbar eine Vacuolenneubildung vorliegt, denkbar wäre, daß lediglich eine Ansammlung von Formol zwischen Cytoplasma und Vacuolenmembran vorliegt. Daß dieser Austausch mit vom umgebenden Plasma abhängig ist, zeigen die Versuche mit Formol in Aqua dest. Fraglich bleibt aber dann, weshalb es einer solchen umschriebenen Ansammlung des Formols bedarf. Die r. V. könnte ja bereits in dem Moment anschwellen, da sie allseitig von Formol umgeben ist. Nicht unmöglich erscheint, daß dieser Vorgang zu dem als Potocytose bezeichneten Beziehung hat, nur müßte man annehmen, daß hier die Blasenbildung an einer inneren Zelloberfläche erfolgt ist. Immerhin hatten CRAWFORD und BARER (1951) in Salamanderspermatogonien noch viele Stunden nach Immersion in 1%igem Formaldehyd das Auftreten von Blasen beobachtet. — Überraschend ist, daß nach dem plötzlichen Ausfließen des rotfluoreszierenden Inhaltes die jetzt optisch leeren Vacuolen nochmals anschwellen können.

Die Formolversuche haben im übrigen in diesem Aufklärungsmodus der r. V. einen weiteren Unterschied zwischen ihnen und den leeren Vacuolen erkennen lassen, der allerdings erst dann deutlich wurde, als das Formaldehyd in isotoni-scher Lösung angeboten wurde. (Die Problematik des Begriffes Isotonie, einer absterbenden Zelle gegenüber, sei hier nur angedeutet.) — Die Störung des osmotischen Gleichgewichtes durch Aqua dest. und hypotonische Lösungen ist so stark, daß sie die Eigenart der Testsubstanzen überlagert, was sich auch bei Anwendung etwa von Dinitrophenol zeigt, so daß ein nivellierender Effekt zustande kommt. — Auch gegenüber Aqua dest. verhalten sich volle und leere Vacuolen different, da innerhalb 20 min die ersteren stets, die letzteren nie aufgeplatzt waren.

Von Interesse ist die nach Anwendung von 10%igem Formol in Aqua dest. nachweisbare Membran um die optisch leeren Vacuolen, die sich vom umgebenden Cytoplasma abhebt und wahrscheinlich nach Permeation der Membran durch Formol wieder an dieses anlagern können.

Die Fixationsversuche wurden nicht primär mit der Absicht unternommen, den grundsätzlichen Wirkungsmodus verschiedener Fixantien zu untersuchen.

Immerhin läßt das sehr verschiedene Verhalten der Vacuolen gegenüber Formol, Osmium und Alkohol in dieser Hinsicht interessante Vermutungen zu; es zeigt demnach, daß es unmöglich ist, diesen und wohl auch anderen flüssigen Vacuoleninhalt für histochemische Untersuchungen nach Fixation und Färbung zu bewahren.

Vollkommen ungeklärt bleibt noch, ob überhaupt und gegebenenfalls welche Gesetzmäßigkeiten den Übergang in Rotfluoreszenz einiger und das Freibleiben anderer Vacuolen leiten. Sicher nimmt im Laufe cytotatischer Behandlung allgemein die Zahl der roten Vacuolen ab, diejenige der leeren zu, wahrscheinlich infolge tiefgreifender Störungen im submikroskopischen Strukturbereich.

Es ist selbstverständlich, daß die Membran leerer Vacuolen an sich ebenso durchgängig ist wie die der rotfluoreszierenden, denn anders wäre die intensive Fluoreszenz der in „leeren“ Vacuolen liegenden phagocytierten Zellen nicht erklärbar. Allein diese Tatsache zeigt, daß die Permeation allein des AO durch die Vacuolenwand für das Zustandekommen der Rotfluoreszenz nicht genügt, da dann eben ein Substrat fehlt, an das der Farbstoff gebunden wird. Die Gesamtheit der hier diskutierten Befunde bestätigt die nach Untersuchung von Leukocytenvacuolen gebildete Auffassung RICHTERS (1955), der Vacuolenmembran müßten andere Permeabilitätscharakteristika zukommen als der äußeren Zellmembran.

*Zur Anwendung anderer Farbstoffe und verschiedener Zellgifte.* Neutralrot und AO zeigen nicht nur in der Krinombildung, sondern auch gegenüber optisch leeren Vacuolen ein ähnliches, allerdings durchaus nicht gleiches Verhalten. Nur zwei Beobachtungen zur Ergänzung der Kenntnis des Neutralroteffektes werden erwähnt, die umfangreichen Erfahrungen aus der Botanik über Neutralrot als Vitalfarbstoff (STRUGGER 1940, TOTH 1951 u. a.) müssen hier unerwähnt bleiben. Im animalischen Bereich zeigt Neutralrot offenbar andere Fluoreszenzeigenschaften.

1. Ähnlich wie mit AO hatten sich einige Vacuolen mit Neutralrot gefüllt, manche waren leer geblieben. Auch das Neutralrot wird offenbar konzentriert, es zeigt dann im Hellfeld eine mattkirschrote Farbe. In diesem Bereich ist dann aber *keine* Fluoreszenz nachweisbar (Phänomen der Fluoreszenzeigenlöschung — FÖRSTER 1951, DE LERMA 1958). Die neutralrot gefüllten Vacuolen zeigen bei Lichteinwirkung verschiedener Wellenlänge die gleiche Resistenz wie die Neutralrotgranula, die Bestandteile des Krinoms sind. Hinsichtlich der Beziehung zwischen Krinom und Vacuole dürfte eine Parallele zu der zwischen AO und Neutralrot bestehen.

2. Bemerkenswert sind die Fluoreszenzeigenschaften des Neutralrotes in geringer Dosierung. Bei allen Konzentrationen war der von STRUGGER an Pflanzenzellen bereits beschriebene Fluoreszenzübergang von Gelborange in Grün zu beobachten. STRUGGER hatte die Auffassung vertreten, der Farbstoff gehe unter dem Einfluß des UV-Lichtes aus dem ionalen Zustand in den molekularen über. — Überraschend war aber *das Auftreten grellgrüner Körnchen im Cytoplasma* sowie die Tatsache, daß in manchen Vacuolen erst nach UV-Licht plötzlich ein intensiv grünfluoreszierender Inhalt sichtbar wird, und weiter, daß hier die Ergüsse verschiedener Patienten ein quantitativ besonders stark differentes Verhalten zeigen. Es ist noch ungewiß, wieweit dieses Phänomen mit den oben besprochenen Grundzügen der Vitalfärbung verwandt ist. Zweifellos verdient es aber besonderes Interesse.



*Janusgrün.* Die Reaktion der Zelle gegenüber AO nach der Einwirkung von Janusgrün bestätigt, daß dieses die Mitochondrien nicht nur färbt, sondern auch in ihrer Funktion beeinträchtigt, und außerdem, daß die erhaltene Mitochondrienfunktion, sowohl für Krinombildung als auch für Vacuolenfüllung Voraussetzung ist. Die abgestufte Abnahme der Fluoreszenzintensität von Granula und Vacuolen läßt die Vermutung zu, daß auch quantitative Beziehungen zwischen Ausmaß der Mitochondrienblockade und Umfang des intracellulären Farbstofftransportes bestehen. Von Interesse, auch in histochemischer Beziehung, ist die Aufhebung des fluoreszenzlöschenden Effektes von Janusgrün bei seinem Übergang in die farblose Leukoform unter Einfluß des Lichtes.

Bereits DRAWERT (1953, zit. nach HARMS 1957) hatte auf das Fehlen von Fluoreszenzerscheinungen an mit Janusgrün blaugefärbten Pflanzenmitochondrien hingewiesen. Vielleicht gibt der Farbstoff nach Überführung in das reduzierte, lipoidlösliche Leukodiäthylsafranin solche Haftpunkte frei, die auch vom AO benötigt werden: Janusgrün B bildet mit Aminosäuren und denaturierten Proteinen unlösliche Komplexe. — Auch hier erscheinen weitere histochemische Untersuchungen angezeigt.

Die Versuche mit *Dinitrophenol* und *Natriumacid* sind mit besonders großer Vorsicht zu beurteilen; sie haben lediglich orientierenden Charakter und wurden zunächst nur mit der allgemeinen Absicht unternommen, nach Beziehungen zwischen einer Störung der energieliefernden Prozesse in den Zellen und dem Ablauf der Vitalfärbung zu suchen.

An den zunächst nur orientierenden Versuchen mit *Dinitrophenol* (Entkopplung der Atmung von der Bildung energiereicher Phosphate, LOOMIS und LIPMAN 1948) ist die hohe Konzentration bemerkenswert, die notwendig ist, um den Prozeß der Granulabildung deutlich zu hemmen. Eine Beeinträchtigung der Vitalfärbung durch Mitochondrienblockade spricht lediglich für die Notwendigkeit energieliefernder Prozesse im Rahmen der Vitalfärbung, ohne daß man hier eine besondere „Assoziation“ der Mitochondrien im Sinne DANIELLIS (1954) zu diesen Vacuolen anzunehmen hätte. — Die eigenartige Bildung passagerer roter Kristalle im Bereich von r. V. (DNP in physiol. NaCl) ist interessant.

Abschließend muß noch das Phänomen der *Potocytose* gewürdigt und zu den besprochenen intraplasmatischen Strukturen in Beziehung gesetzt werden:

Potocytosis, von ZOLLINGER (1948) definiert als der Prozeß, welcher in Gewebszellen nach ihrer Suspension in flüssigen Medien sichtbare Blasen entstehen läßt, ist ein noch umstrittenes Phänomen, insbesondere hinsichtlich seiner Beziehungen zum Zelltod. Zwei extreme Beobachtungen können hier einander gegenübergestellt werden: Einerseits ihr Auftreten in sicher abgetöteten Zellen mehrere Stunden nach Immersion in 1% Formalin (CRAWFORD und BARER 1951), andererseits die Blasenbildung 1 Std nach physikalischer Schädigung (Bestrahlung) bei erhaltener Atmung und Milchsäurebildung (KING, PAULSON u. Mitarb. 1959). Eigene, noch unveröffentlichte Untersuchungen weisen auf eine Abhängigkeit der Blasenbildung vom Zelltyp hin. Weitere Untersuchungen zur Deutung des wichtigen Vorganges sind notwendig. Die enge Kombination der Fluoreszenz- mit der Phasenkontrastmikroskopie wird hier einen Beitrag leisten können. In diesem Rahmen seien folgende Beobachtungen erwähnt:

Von den zuvor besprochenen intraplasmatischen Hohlräumen unterscheiden sich die „Blasen“ dadurch, daß ihr Inhalt stets in *geringerem* und nie in höherem Ausmaß fluoresziert als das Cytoplasma, von dem sie ausgehen. Bei Farbstoffüberdosierung können die Blasen auch mattröt fluorescieren, wenn die übrige Zelle diffus und massiv kupferrot leuchtet. Im übrigen sind verschiedene Grade der Grünfluoreszenz in den Blasen zu sehen, stets in Abhängigkeit von der Leuchtkraft der Mutterzelle. Bei niedrigem Farbstoffangebot ist in ihnen keine distinkte Fluoreszenz mehr nachweisbar; allerdings muß berücksichtigt werden, daß

die Suspensionsflüssigkeit ja stets AO enthält, eine Eigenfluoreszenz der Blasen also nur dann auffallen kann, wenn deren Eiweißgehalt über dem des Mediums liegt; denn es kann ja grundsätzlich kein Zweifel bestehen, daß es der unterschiedliche Eiweißanteil in dem wäßrigen Blaseninhalt ist, der die unterschiedliche Dichte der Grünfluoreszenz im wesentlichen bedingt. Der Konzentrationsgradient nach außen wird durch die Zellmembran aufrechterhalten, der Gradient in umgekehrter Richtung zum Cytoplasma hat kein morphologisches Substrat: Die „Zwischenmembran“ ZOLLINGERS ist auch fluoreszenzmikroskopisch nicht zu erkennen. Der Abfall der Leuchtkraft beginnt dort, wo die granuläre Masse des Cytoplasmas in ziemlich scharfer Linie gegen den strukturlosen Blaseninhalt abschneidet (Abb. 10).



Abb. 10. Abgestorbene Zelle. Zustand nach Potocytose. Scharfe, unregelmäßige Trennlinie zwischen Cytoplasma und strukturlosem Blaseninhalt

Die Ergebnisse zeigen also, daß potocytotische Blasen im Gegensatz zu den oben diskutierten Vacuolen nicht die Orte einer gesteigerten Farbstoffkonzentration sind und auch nicht sein können. Wenn jene von ZOLLINGER beschriebene Blasenbildung an lebenden Zellen auftritt, so doch sicher an solchen Elementen, deren Schädigung sicher noch schwerer ist als die vacuolenbildender Zellen, da erstere Wasser oder andere Stoffe, etwa Vitalfarben, nicht mehr an umschriebenem Zellort zu konzentrieren vermögen. *Entstehung von Vacuolen des oben beschriebenen Typs und Potocytosebildung wurden nie gleichzeitig beobachtet.* Vielleicht sollten innerhalb des Potocytosephänomens verschiedene Stadien abgegrenzt werden: die Abstoßung von Blasen von der Zelloberfläche in die Suspensionsflüssigkeit als leichte, die zirkuläre Ausweitung der Zellmem-

bran als schwere Form. Durch Serienphotographien konnte die Entwicklung der zweiten aus der ersteren gezeigt werden. Die Ausbuchtung zunächst nur eines Membransektors wird später von der zirkulären Ausweitung der Zellmembran „eingeholt“.

Anschließend sei noch auf den bedeutenden Einfluß eines einfachen methodischen Faktors hingewiesen: Die Änderung der Zellform nach Einsaugen zusätzlicher Flüssigkeit zwischen Deckglas und Medium zeigt, daß der Deckglasdruck allein bereits eine formverändernde und damit auch prinzipiell eine schädigende Wirkung hat, die allerdings den Gesetzen der Phasenkontrastmikroskopie entgegenkommt. Umgekehrt ist demnach die phasenoptisch ideal dargestellte Zelle sehr häufig nicht in idealen Lebensbedingungen. CRAWFORD und BARER (1951), ALTMANN und GRUNDMANN (1955) haben hierzu bereits einen wenig beachteten Hinweis gegeben.

Die Untersuchung nach Fixation gefärbter Vergleichspräparate ergab keine wesentlich neuen Gesichtspunkte. Mit Polysaccharid- und Glykogenfärbung ließ sich ein Vacuoleninhalt nicht darstellen.

**Schlußbetrachtung.** Die Arbeit wurde in der allgemeinen Absicht unternommen, die Reaktionsweisen lebender Zellen auf die Einwirkung chemischer, physikalischer und mechanischer Faktoren zu studieren. Unter diesem über-

geordneten Gesichtspunkt wurden die speziellen Untersuchungen, die teilweise auf sehr verschiedenen Voraussetzungen beruhen, vereinigt und zueinander in Beziehung gesetzt. Als Untersuchungsobjekt mußten aus eingehend besprochenen Gründen lebende Exsudatzellen sehr geeignet erscheinen.

Der Beweis für die Behauptung, es sei an lebenden Zellen experimentiert worden, ist nicht grundsätzlich und nicht für jeden einzelnen Fall angetreten worden. Die Untersuchungen gehen von der anerkannten Tatsache aus, daß die Sammlung und Konzentration von Vitalfarbstoffen in umschriebenen Zellregionen zu den Funktionen der lebenden Zelle gehört (CRAWFORD und BARER 1951). Außerdem ließ sich auf die bekannte und in diesem Zusammenhang bestätigte Möglichkeit verweisen, Exsudatzellen *in vitro* weiterzuzüchten.

Der Versuch, die Einwirkung verschiedener Faktoren auf intraplasmatische Strukturen zu prüfen und ihre gegenseitigen Relationen abzuschätzen, mag zunächst ein mehr theoretisches Interesse haben. Beziehungen zu Problemen von praktischem Belang ergeben sich vielleicht aber aus der Tatsache, daß zu den Stoffen, die einen ändernden Einfluß auf den Prozeß der Vitalfärbung nehmen können, auch cytostatische Substanzen gehören. Im übrigen scheint sich gerade in neuerer Zeit ein allgemeineres Interesse jenen Versuchen zuzuwenden, welche sich mit dem Problem der Beziehungen zwischen bestimmten schädigenden Faktoren und einem morphologischen „Äquivalentbild“ befassen.

Die vitalgefärbte Zelle ist eine kranke Zelle, eine Tatsache, welche GICKLHORN (1931) in seiner beispielhaften Arbeit hervorgehoben hat. Als eine lebende Zelle ist sie aber noch fähig, auf Umwelteinflüsse zu reagieren; viele ihrer durch Funktionen noch veränderlichen Strukturen sind gekennzeichnet nicht nur durch wechselnde Umrisse und Unterschiede im Lichtbrechungsvermögen, sondern auch durch wechselnde Farbverteilung.

Die vitalgefärbte Zelle lebt in einem Zustand der Belastung und damit der gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber zusätzlichen Belastungen. Vielleicht bietet sie aber gerade deshalb die Möglichkeit, die Wirkung weiterer, sehr geringer und sehr differenter Schädigungen zu verfolgen sowie mit mehr Präzision als bisher erreichbar den Zeitpunkt festzulegen, zu dem der Zelltod eintritt, denn auch dieser gewinnt an Gegenständlichkeit, wenn mit dem Aufhören der Funktionen Änderungen der Farbstoffverteilung verbunden sind. Die Vitalfärbung erscheint geeignet, zur „relativen Monotonie der morphologischen Symptomatik“ (LETTERER 1948) Variationen hinzuzufügen.

### Zusammenfassung

Am Beispiel der Tumorzellen seröser Ergüsse, geeigneten Objekten der Lebendbeobachtung, wurden Ursachen, Bedingungen und gegenseitige Beziehungen intraplasmatischer Vacuolenbildung erörtert, ihre Entstehung selbst sowie die morphologisch erkennbare Wirkung verschiedener, auf sie Einfluß nehmender Faktoren in kombiniert phasenkontrast-fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen beobachtet.

In großen, cytoplasmareichen Tumorzellen entstehen innerhalb von Sekunden optisch leere Vacuolen, die als morphologisches Substrat eines Sauerstoffmangels vermutet werden. Der Prozeß kann in wenigen Minuten zu einem vorläufigen Abschluß kommen. Fließende Übergänge zwischen 1—2  $\mu$  messenden Gebilden

und großen, die den Cytoplasmaraum weitgehend ausfüllen, kommen vor. Nach Vitalfärbung können die Vacuolen sehr schnell Acridinorange in verschiedenen Konzentrationen von Grün- bis zur dichten Rotfluoreszenz aufnehmen, wobei die verschiedenen Fluoreszenzschattierungen ihre Entsprechung im Phako haben. Die Voraussetzungen zur Konzentration solcher AO-Nucleoprotein-Verbindungen und ihre Passage durch die Vacuolenmembran werden besprochen. Die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten, kenntlich z. B. am unmittelbaren Nebeneinander voller und leerer Vacuolen, ist kurze Zeit über den Zelltod hinaus möglich. In Zellen mit ausgeprägter Vacuolenfluoreszenz sind rotfluoreszierende Granula selten oder fehlen völlig. Es wird offengelassen, ob nicht für die Farbstoffkonzentration in Vacuolen eine geringere Energieleistung erforderlich ist als zur Ablagerung in Granula.

Verschiedene, letztlich zum Zelltod führende Versuche werden unternommen, um die Fluoreszenzeigenschaften lebender Zellen, insbesondere ihres Vacuoleninhaltes, zu beeinflussen: Unter Aqua dest. z. B. ergießen volle Vacuolen nach Anschwellung ihren Inhalt plötzlich auf die Umgebung. 10% Formol in 0,85% NaCl führt vor der Zerstörung in vollen Vacuolen zur Membranbildung zwischen fluoreszierendem und nichtfluoreszierendem Vacuoleninhalt; leere Vacuolen schwellen nach initialer Schrumpfung. Bei Alkohol- und Osmiumfixation verteilt sich der Inhalt diffus auf die Umgebung; mit Fixationsmitteln läßt sich der Vacuoleninhalt nicht festhalten.

Durch Vitalfärbung der Mitochondrien mit Janusgrün kann die Vitalfluochromierung behindert werden.

Abschließend wird das Phänomen der Potocytose als Objekt der Vitalfärbung besprochen. Potocytotische Blasen unterscheiden sich von den zuvor behandelten Vacuolen grundsätzlich dadurch, daß sie nie den Farbstoff in höherer Konzentration enthalten als das umgebende Cytoplasma. Gleichzeitige Entstehung von Vacuolen im oben beschriebenen Sinn und von potocytotischen Blasen wurde nicht beobachtet.

### Summary

Tumor cells of serous effusions, considered suitable objects for observation in vivo, are discussed in regard to causes, conditions, and mutual relationships in the intracytoplasmic formation of vacuoles. Their development, as well as the morphologically visible changes induced in them by various substances, are studied in a combined phase contrast-fluorescence microscope.

In large malignant cells with broad cytoplasmic borders vacuoles, which are empty in the optical sense, arise within a few seconds. These vacuoles presumably are a morphologic equivalent of oxygen deficiency. After a few minutes the process ceases temporarily. Gradual transitions from small structures of about 1—2  $\mu$  to larger ones filling most of the cytoplasm may be seen.

With vital staining the vacuoles take up acridine orange very quickly in concentrations ranging from green to a very dense red fluorescence. The different shades of fluorescence may be correlated with the *phasecontrast* studies. The conditions for the concentration of such acridine orange — nucleoprotein compounds and their passage through the membrane of the vacuole are discussed. The preservation of concentration gradients, as indicated by the close proximity of full and empty vacuoles, may be possible for a short time after cell death.

In cells with intense fluorescence of the vacuoles the granules that fluoresce red are rare or totally absent.

The question whether the amount of energy required for the concentration of dye in the vacuoles is less than that needed for concentrating it in the granules is left open to discussion.

A number of experiments which leads ultimately to cell death are carried out, in order to affect the fluorescent properties of the living cells, especially the content of their vacuoles. On immersing the cells in distilled water the vacuoles swell and pour out their contents into the immediate vicinity. Before destroying the full vacuoles, 10% formalin in 0.85% saline causes formation of a membrane between fluorescent and nonfluorescent vacuolar contents. The empty vacuoles swell after initial shrinkage. The fixation in alcohol or osmium results in diffusion of the vacuolar contents into the surroundings. Fixation of the contents of the vacuoles in situ is impossible. Vital staining of mitochondria with Janus Green may disturb the vital staining with acridine orange.

The phenomenon of potocytosis is discussed as an object of vital staining. Potocytotic vesicles may be differentiated basically from the vacuoles just discussed in that they never contain the staining material in higher concentrations than in the surrounding cytoplasm. The simultaneous development of vacuoles in the sense described above and of potocytotic vesicles was not observed.

### Literatur

- AEBI, H., u. A. MEYER: Das osmotische Verhalten von Leberschnitten. Ein Versuch zur Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes am isolierten, überlebenden Gewebe. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **9**, C 51 (1951).
- ALBERTINI, A. v.: Cytologische Exsudatbefunde mit dem Phasenkontrastverfahren. *Schweiz. Z. Path. Bakt.* **11**, 701 (1946).
- ALTMANN, H. W.: Allgemeine morphologische Pathologie des Protoplasmas. Die Pathobiosen. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. II/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- ALTMANN, H. W., u. E. GRUNDMANN: Phasenmikroskopische Untersuchungen zur Vitalstruktur tierischer Zellkerne. *Beitr. path. Anat.* **115**, 313 (1955).
- ATERMAN, K.: Observations on the nature of „watery vacuolation“. *Lab. Invest.* **7**, 577 (1958).
- ATERMAN, K.: „Watery vacuolation“ and „hydropic degeneration“ of the liver cells. *Symp. liver function. Publ. Nr 4 Amer. Inst. Biol. Sci.* 153 (1958b).
- BARER, R., and S. JOSEPH: Refractometry of living cells. I. Basic principles. *Quart. J. micr. Sci.* **95**, 399 (1954). — II. The immersion medium. *Quart. J. micr. Sci.* **96**, I (1955).
- III. Technical and optical methods. *Quart. J. micr. Sci.* **96**, 423 (1955).
- BARER, R., K. F. A. ROSS and J. TKACZYK: Refractometry of living cells. *Nature (Lond.)* **171**, 720 (1953).
- BARTELS, P.: Quantitative mikrospektroskopische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse Acridinorange gefärbter Zellen. *Planta (Berl.)* **44**, 341 (1954).
- BAUER, K. H.: Das Krebsproblem. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1949.
- BAUER, K. H.: Zur Chemotherapie krebserzeugender Pleuraexsudate. *Langenbecks Arch. u. Dtsch. Z. Chir.* **271**, 253 (1952).
- BECKER, V.: Geweblich gebundener Sauerstoffmangel (histotoxisch bedingte Hypoxydase). *Klin. Wschr.* **32**, 577 (1954).
- BERTALANFFY, L. v., and J. BICKIS: Identification of cytoplasmic and basophilia (Ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 481 (1956).
- BÜCHNER, F.: Das morphologische Substrat bei Angina pectoris im Tierexperiment. *Beitr. path. Anat.* **92**, 311 (1933).

- BÜCHNER, F.: Die pathogenetische Wirkung des allgemeinen Sauerstoffmangels, insbesondere bei der Höhenkrankheit und dem Höhentode. *Klin. Wschr.* **1942**, 721.
- BÜCHNER, F.: Die pathogenetische Bedeutung des allgemeinen Sauerstoffmangels. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **32**, 20 (1944—1949).
- BÜCHNER, F.: Die Pathologie der zellulären und geweblichen Oxydationen. Die Hypoxydosen. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. IV/2, II. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- CHAMBERS, R.: Studies on the physical properties of the plasmamembrane. *Biol. Bull.* **69** 331 (1935).
- CHANCE, B., and B. HESS: Electron pathways in mammalian cells. *J. biol. Chem.* 1959 (im Druck).
- CHAPMAN-ANDRESEN, C.: Some observations on pinocytosis in leucocytes. *Exp. Cell Res.* **12**, 397 (1957).
- CHAPMAN-ANDRESEN, C., and H. HOLTER: Studies on the ingestion of  $C^{14}$  glucose by pinocytosis in the Amoeba chaos chaos. *Exp. Cell Res. Suppl.* **3**, 52 (1955).
- CHLOPIN, N.: Experimentelle Untersuchungen über die sekretorischen Prozesse im Cytoplasma. *Arch. exp. Zellforsch.* **4**, 462 (1927).
- CHLOPIN, N.: Experimentelle Untersuchungen über die Vitalfärbung tierischer Zellen. *Arch. exp. Zellforsch.* **6**, 324 (1928).
- CRAWFORD, G. N. C., and R. BARER: The action of formaldehyde on living cells as studied by phase-contrast microscopy. *Quart. J. micr. Sci.* **92**, 403 (1951).
- DANIELLI, J. F.: Morphological and molecular aspects of active transport. *Symp. Soc. exp. Biol.* **8**, 502 (1954).
- DONIACH, J., and K. WEINBRENN: The development of inclusion bodies in the cells of the rat's liver after partial hepatectomy. *Brit. J. exp. Path.* **32**, 499 (1952).
- DRAWERT, H.: *Ber. dtsh. bot. Ges.* **66**, 135 (1953). Zit. nach HARMS 1957.
- DUSTIN jr., P.: Ribonucleic acid and the vital staining of cytoplasmic vacuoles in animal cells. *Symp. Soc. exp. Biol.* **1**, 114 (1947).
- FISHER, E., and B. FISHER: Cytoplasmic liver cell inclusions following arterialization of the dog. *Amer. J. Path.* **30**, 987 (1954).
- FISHER-WASELS, B.: Experimentelle Untersuchungen über die blasige Entartung der Leberzelle und die Wasservergiftung der Zelle im allgemeinen. *Frankfurt. Z. Path.* **28**, 201 (1922).
- FÖRSTER, T. H.: *Fluoreszenzorganische Verbindungen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht 1951.
- GICKLHORN, I.: Theoretische Gesichtspunkte zur Erklärung der Möglichkeit vitaler Färbungen. *Ergebn. Biol.* **7**, 657 (1931).
- GÖSSNER, W.: Zur Histochemie des Strugger-Effektes. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **33**, 101 (1949).
- GRUNZE, H.: *Klinische Cytologie der Thoraxkrankheiten*. Stuttgart: Ferdinand Enke 1955.
- GRUNZE, H.: Cytologie des Sputums und Pleuraexsudates. *Handbuch der inneren Medizin*, Bd. IV/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- HARMS, H.: *Handbuch Farbstoffe für Mikroskopie*, Bd. II/1. Kamp-Lintford Staufen Verlag 1957.
- HASELMANN, H., u. D. WITTEKIND: Phasenkontrast-Fluoreszenzmikroskopie. *Z. wiss. Mikr.* **63**, 216 (1957).
- HÖFLER, K.: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und der Stoffspeicherung? *Mikroskopie* **2**, 13 (1947).
- HOLTER, H., and J. M. MARSHALL jr.: Studies on pinocytosis in the amoeba chaos chaos. *C. R. Lab. Carlsberg* **29**, 7 (1954).
- HOLTER, H.: Pinocytosis. *Int. Rev. Cytol.* **8**, 481 (1959).
- HOLZER, H.: Enzymchemischer Angriffspunkt einiger tumorwirksamer Chemotherapeutika. *Medizinische* **15**, 576 (1956).
- HOVASSE, R.: Le vacuome animal. In: *Protoplasmatologia*. *Handbuch der Protoplasmaforschung*, Bd. III/D 2. Wien: Springer 1956.
- KAHLAU, G.: Zur cytologischen Diagnostik des Bronchialcarcinoms aus dem Sputum. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **35**, 162 (1951).

- KEDROWSKI, B.: Über die sauren (elektronegativen) Kolloide des Protoplasmas. Studien an Larven von *Rana temporaria*. IV. Mitteilung. Z. Zellforsch. **26**, 21, (1937).
- KEDROWSKI, B.: Über die sauren Kolloide des Protoplasmas. Studien an Larven von *Rana temporaria*. III. Mitteilung. Z. Zellforsch. **31**, 435, (1941).
- KEDROWSKI, B.: Über die Eigentümlichkeiten im kolloidalen Bau der Embryonalzellen. Z. Zellforsch. **31**, 435 (1941).
- KETTLER, L. H.: Über die vakuolige Degeneration der Leberzellen. Virchows Arch. path. Anat. **315**, 587 (1948).
- KETTLER, L. H.: Zur Pathogenese hydropischer Zellveränderungen in Leber und Niere. Virchows Arch. path. Anat. **321**, 326 (1952).
- KING, D. W., S. R. PAULSON, N. L. PLUCKETT and A. T. KREBS: Cell death. IV. The effect of injury on the entrance of vital dye in Ehrlich ascites tumor cells. Amer. J. Path. **35**, 1067 (1959).
- KITCHING, I. A.: Food vacuoles. In Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung, Bd. III/3b. Wien: Springer 1956.
- KNAUFF, H. G., u. W. SCHRÄMM: Zur Frage morphologischer Äquivalentbilder der histotoxischen Hypoxydase. Frankfurt. Z. Path. **67**, 308 (1952).
- KOCH, H. J., and J. EVANS: Influence of a basic dye, thionine on the absorption of sodium by the Crab Eriocheir Sinensis. Meded. Kon. vlaam. Acad. wet. Kl. Wet. **18**, Nr 8 (1956).
- LE FEVRE, P. G.: Active transport through animal cell membranes. Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung, Bd. VIII/7a. Wien: Springer 1955.
- LERMA, B. DE: Die Anwendung von Fluoreszenzlicht in der Histochemie. In Handbuch der Histochemie, Bd. I/1, S. 78. Stuttgart: Gustav Fischer 1958.
- LETTERER, E.: Naturforschung und Medizin in Deutschland 1939—1945, Bd. 70. 1948.
- LETTRE, H., u. M. ALBRECHT: Zur Wirkung von Aminen auf in vitro gezüchtete Zellen. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **279**, 206—208 (1943).
- LEWIS, W. H.: Pinocytosis. Bull. Johns Hopk. Hosp. **49**, 17 (1931).
- LEWIS, W. H.: Pinocytosis by malignant cells. Amer. J. Cancer **29**, 666—679 (1937).
- LINZBACH, A. J.: Über die vakuoläre Verfettung der Herzmuskelfasern. Virchows Arch. path. Anat. **321**, 611 (1952).
- LOOMIS, W. F., and F. LIPMAN: J. biol. Chem. **173**, 807 (1948). Zit. nach LOOMIS u. LIPMAN 1949.
- LUDFORD, R. J., and J. SMILES: Cytological characteristics of fibroblasts and sarcoma cells demonstrable by phase-contrast microscopy. J. roy. micr. Soc. **70**, 186 (1950).
- LUSE, S., and J. REAGAN: A histocytological study of effusions. I. Effusions not associated with malignant tumors. II. Effusions associated with malignant tumors. Cancer (Philad.) **7**, 1155 (1954).
- MELTZER, S. J.: Edema. Amer. J. Med. **8**, 191 (1904). Nach ZOLLINGER 1948.
- NASSONOW, D.: Über den Einfluß der Oxydationsprozesse auf die Verteilung von Vitalfarbstoffen in der Zelle. Z. Zellforsch. **11**, 179 (1930).
- NETTER, H.: Die Feinstruktur der Zelle als dynamisches Phänomen. Verh. dtsh. Ges. Path. **33**, 8 (1950).
- PAGES, A.: Le cyto-diagnostic dans les épanchements des séreuses. Sem. Hôp. Paris **34**, 253. Pathologie-Biologie. 1958.
- PARAT, M.: Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasme. Arch. d'Anat. microsc. **24**, 74 (1928).
- PICHOTKA, J.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur pathologischen Histologie des akuten Höhentodes. Beitr. path. Anat. **107**, 117 (1942).
- ROTHSTEIN, A.: The enzymology of the cell surface. In Handbuch der Protoplasmaforschung Bd. II/E 5. Wien: Springer 1954.
- RICHTER, K. M.: Studies on leucocytic secretory activity. Ann. N.Y. Acad. Sci. **59**, 863 (1955).
- SCHIEBE, G., u. V. ZANKER: Physikochemische Grundlagen der Metachromasie. V. Symp. Arb.-Gem. Histochemie 1957. Acta histochem. (Jena), Suppl. 1, 6 (1958).
- SCHÜMMELFELDER, N.: Die Fluochromierung tierischer Zellen mit Acridinorange. Naturwissenschaften **35**, 346 (1948).
- SCHÜMMELFELDER, N.: Strukturveränderungen des Protoplasmas bei dem Absterben der Zelle. Verh. dtsh. Ges. Path. **33**, 65 (1949a).
- SCHÜMMELFELDER, N.: Über die Beziehungen zwischen Stoffwechselaktivität und Acridinorange-speicherung von Zellen. Naturwissenschaften **36**, 58 (1949b).

- SCHÜMMELFELDER, N.: Die Fluochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehungen zur Stoffwechselaktivität der Zelle. *Virchows Arch. path. Anat.* **318**, 119 (1950).
- SCHÜMMELFELDER, N.: Einfluß der Pufferlösung auf die färberische Bestimmung des Umladungsbereiches von Gewebeelementen. *Z. Zellforsch.* **44**, 488 (1956).
- SCHÜMMELFELDER, N., K. J. EBSCHNER u. E. KROGH: Die Grundlage der differentiellen Fluochromierung von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure mit Acridinorange. *Naturwissenschaften* **44**, 467 (1957).
- SCHULEMAN, W.: Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen. *Biochem. Z.* **80**, 1 (1917).
- STREICHER, H. J.: Cytologische Beobachtungen nach intrapleuraler Lostherapie bei 5 Fällen von carcinomatöser Pleuritis. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **266**, 55 (1950).
- STRUGGER, S.: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* **34**, 601 (1940).
- STRUGHOLD, H.: Hypoxydose. *Klin. Wschr.* **23**, 221 (1944).
- TOTH, A.: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht. *Protoplasma* **41**, 104 (1951).
- TROWELL, O. A.: The experimental production of watery vaculation of the liver. *J. Physiol. (Lond.)* **105**, 268 (1946).
- WARBURG, O. (1910): Zit. nach LETTÉ u. ALBRECHT 1954.
- WEISSMANN, CH.: Die Vitalfärbung mit Acridinorange an Amphibienlarven. *Z. Zellforsch.* **38**, 374 (1953).
- WEISSMANN, CH., u. A. GILGEN: Die Fluochromierung lebender Ehrlich-Ascitescarcinomzellen mit Acridinorange und der Einfluß der Glykolyse auf das Verhalten der Zelle. *Z. Zellforsch.* **44**, 292 (1956).
- WITTEKIND, D.: Die Vitalfärbung des Mäuseascitescarcinoms mit Acridinorange. *Z. Zellforsch.* **49**, 58 (1958).
- WITTEKIND, D.: Beobachtungen über eine besondere Art der Acridinorangespeicherung in vitalen Ergußzellen. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **205**, 411 (1958).
- WITTEKIND, D., u. A. VÖLCKER: Zur Frage der intraplastischen Granulabildung nach Vitalfärbung mit Acridinorange. Untersuchungen am Mäuseascitescarcinom. *Protoplasma* **48**, 535 (1957).
- ZEIGER, K., u. H. HARDERS: Über vitale Fluochromfärbung des Nervengewebes. *Z. Zellforsch.* **36**, 62 (1951).
- ZEIGER, K., H. HARDERS u. W. MÜLLER: Der Struggereffekt an der Nervenzelle. *Protoplasma* **40**, 76 (1951).
- ZEIGER, K., u. W. SCHMIDT: Über die Natur der bei Intoxikation mit Acridinorange in tierischen Zellen entstehenden Stoffablagerungen. *Z. Zellforsch.* **45**, 578 (1957).
- ZEIGER, K., u. M. WIEDE: Die Speicherung von Acridinorange in der Froschleber und ihr Einfluß auf das Ausscheidungsvermögen der Leberzelle. *Z. Zellforsch.* **40**, 401 (1954).
- ZOLLINGER, H. U.: Cytologic studies with the phase microscope. *Amer. J. Path.* **24**, 545, 569, 797, 1039 (1948).

Privatdozent Dr. D. WITTEKIND  
Medizinische Universitätsklinik Heidelberg