

Methode zur Untersuchung des Stoffwechsels einzelner Gewebekulturen.

(Kurze Mitteilung.)

Von

O. Suschny, E. Broda, L. Sverak, H. Bilek und O. Feldstein,

I. Chemisches Laboratorium und II. Physikalisches Institut der Universität Wien,

und

L. Stockinger und H. Madl,

Histologisches Institut der Universität Wien.

(Eingelangt am 4. Juli 1952. Vorzulegen in der Sitzung am 16. Okt. 1952.)

Mit Hilfe der Gewebezüchtung werden in der Hauptsache die morphologisch erfaßbaren Veränderungen der Zellen studiert. Eine Reihe von spezifischen Methoden gibt auch über die chemische Zusammensetzung bzw. die Lokalisation einzelner Stoffe Aufschluß. So kann man z. B. den Nukleoproteingehalt der Zellen qualitativ und annähernd auch quantitativ mit UV-Absorptions- und mit Färbemethoden untersuchen. Untersuchungen über den Gasstoffwechsel können wegen des geringen Volumens der umgesetzten Gase nicht an einzelnen, sondern nur an Gruppen von Kulturen vorgenommen werden. Die Methode der Autoradiographie ermöglicht eine gewisse Lokalisation der zugeführten Stoffe, ohne näheren Aufschluß über die Zusammensetzung der neugebildeten Verbindungen zu geben.

Wir haben nun eine allgemeine und ins Einzelne gehende Methode zur Untersuchung des Stoffwechsels individueller Gewebekulturen entwickelt, die darauf beruht, daß radioaktiv markierte Kohlenstoffverbindungen noch in äußerst kleiner Menge nachgewiesen werden können. Radioaktiv markierte Zucker sind dargestellt worden¹, die vorläufig bis zu $6 \cdot 10^7$ Zerfälle/min. mg aufweisen. Man kann dann mit Hilfe des Gas-Geiger-Zählrohres² noch bis zu 10^{-10} g solcher Zucker oder entsprechende Mengen ihrer Umwandlungsprodukte bestimmen. Das Verfahren zur Untersuchung des Stoffwechsels der Gewebekulturen besteht nun darin, daß den Kulturen die Zucker in Ringer- oder Tyrodelösung zugeführt werden, daß dann die einzelnen Kulturen nach einer Periode des Wachstums chemisch in Fraktionen zerlegt und die Aktivitäten dieser Fraktionen einzeln bestimmt werden. Wenn eine solche Fraktion, z. B. die der fettlöslichen Stoffe, sich als radioaktiv erweist, so kann auf Grund der gemessenen Aktivität berechnet werden, wieviel

¹ L. Sverak, H. Bilek und E. Broda, Mh. Chem., im Druck.

² O. Feldstein und E. Broda, Nature (London) 168, 599 (1951).

Zucker die Kultur in Lipide umgewandelt hat. Die Aufteilung der Kultur in Fraktionen ist trotz ihrer geringen Masse möglich, da ihr nach Beendigung des Wachstums inaktive Trägerstoffe (in unserem Beispiel: Fette) in beliebiger Menge zugefügt werden können und die Abscheidung der aktiven Stoffe dann gemeinsam mit dem inaktiven Träger erfolgt. Das Mitreißen aktiver Begleitstoffe wird durch Zusatz entsprechender „Zurückhalteträger“ vermieden.

Das Verfahren mit Hilfe der markierten Atome weist noch — wie alle derartigen Verfahren — den Sondervorteil auf, daß nicht nur die Zusammensetzung der Stoffwechselprodukte, sondern auch die Kinetik des Stoffwechsels einwandfrei erforscht werden kann.

Unsere Untersuchungen wurden an Deckglaskulturen aus dem Mesenchym 8 bis 10 Tage alter Hühnerembryonen durchgeführt. Nach mehreren Passagen wurde bei der Neueinbettung dem Nährboden 1 Tropfen der jeweiligen Versuchslösung zugesetzt (Dreitropfenkultur: 1 Tr. Blutplasma + 1 Tr. Embryonalextrakt + 1 Tr. Versuchslösung). Gut wachsende Kulturen erreichen nach 48 bis 72 Stdn. einen Durchmesser von 2 bis 3 mm bei einer zentralen Dicke von 0,1 bis 0,2 mm. Sie flachen sich vom zentralen Teil, dem sogenannten Mutterstück, nach außen nach Art eines ganz flachen Kegels ab. Ihre Masse ist daher von der Größenordnung von 10^{-4} g. Die exakte Gewichtsbestimmung ist jedoch wegen des den Zellen anhaftenden Kulturmediums nicht möglich.

Zunächst soll nun über den Nachweis berichtet werden, daß überhaupt Zucker durch die Kultur aufgenommen und in chemisch veränderter Form festgehalten werden. In einer Versuchsreihe („Hauptversuch“) wurde Tyrodelösung mit 0,1% „Zucker“ verwendet. (Dieser „Zucker“ war im Gegensatz zu später verwendetem Material noch nicht papierchromatographisch gereinigt worden; er enthielt neben Glukose und Fruktose gewisse nichtionisierte Begleitstoffe.) Die spezifische Aktivität (sp. A.) des „Zuckers“ betrug $12 \cdot 10^6$ Zerfälle/min. mg. Nach 2 Tagen Wachstum bei $38,5^\circ$ wurden die Kulturen so lange gründlich abwechselnd mit Wasser und mit 0,1% Glukoselösung abgespült, bis die Waschwässer inaktiv waren. Dann wurden die Kulturen mit geringen Teilen anhaftenden Nährbodens verbrannt und die Aktivität des erhaltenen CO_2 bestimmt. Sie betrug in 5 Versuchen 233, 284, 236, 158, 172 (Mittel: 217) Stöße/Min. Die Gesamtaktivitäten der von den Kulturen aufgenommenen und gespeicherten Stoffe müssen bedeutend größer gewesen sein, da alle löslichen Umwandlungsprodukte während des Waschens verlorengehen mußten.

Um uns gegen die Möglichkeit zu sichern, daß Radiozucker vom Gewebe rein „physikalisch“ — beispielsweise durch Adsorption an Zellwänden — festgehalten werden und dann eine Aktivität des Gewebes vortäuschen könnten, wurden mit der gleichen Tyrodelösung Kontroll-

versuche angesetzt, in denen der Tropfen erst zu Ende der Wachstumsperiode auf die Kultur gesetzt, ihr also keine Zeit zur chemischen Assimilation gegeben wurde. Die Aktivitäten ergaben sich zu nur 30, 10, 19, 1, 0 (Mittel: 12) Stößen/Min. Schließlich sollte die Möglichkeit ausgeschaltet werden, daß auch ein „physikalisches“ Festhalten erst nach einer gewissen Versuchszeit wirksam werden könnte. Dazu wurde in einem weiteren Versuch die eine Hälfte der Kulturen nur einen Tag mit aktivem Zucker (papierchromatographisch gereinigte Glukose; sp. A. $63 \cdot 10^6$) wachsen gelassen, die andere Hälfte aber — nach ebenfalls eintägigem Wachstum — kurz abgespült und dann weitere zwei Tage mit inaktiver Tyrodelösung (mit 0,1% Glukose) weiterwachsen gelassen. Man darf annehmen, daß unter diesen Umständen beide Versuchsreihen genug Zeit für „physikalische“ Aufnahme, die Kontrollkulturen aber auch genug Zeit für den vollkommenen Ersatz des „physikalisch“ aufgenommenen aktiven Zuckers durch inaktiven Zucker hatten. Die Ergebnisse waren: 75, 47 (Mittel: 61); Kontrollen 48, 49, 26 (Mittel: 41). Es liegt also kein Unterschied vor, der auch nur annähernd mit jenem im Hauptversuch zu vergleichen wäre. Man darf schließen, daß die „physikalische“ Aufnahme unter unseren Bedingungen höchstens eine unwesentliche Rolle spielt; daß die Kontrollversuche überhaupt eine geringere Aktivität zeigten, ist nicht verwunderlich, da ja eine gewisse Menge des vorher chemisch assimilierten Radiokohlenstoffes durch Atmung u. dgl. während der letzten zwei Tage verlorengehen muß. Das Gesamtergebnis ist also, daß die chemische Aufnahme des Radiozuckers durch die Gewebekulturen eindeutig nachgewiesen worden ist.

Es mußte noch geprüft werden, ob Nährboden allein Zucker chemisch assimilieren kann. Die mit je einem Tropfen Ringerlösung (mit 0,1% Glukose der sp. A. $28 \cdot 10^6$) versetzten Nährböden wurden einen Tag bebrütet und dann ebenso wie die Kulturen aufgearbeitet. Die bei diesen Versuchen eingesetzten Stücke Nährboden waren bedeutend größer als die sonst den Kulturen anhaftenden Stücke. Die Aktivitäten waren: 0, 19, 4 (Mittel: 7). Es folgt, daß Nährboden allein im Gegensatz zur lebenden Kultur keine Zucker chemisch aufnehmen und daher auch keine Aufnahme durch die Kultur vortäuschen kann.

Man kann nun die Zuckermenge abschätzen, die während eines Tages in unlöslicher Form chemisch in das Gewebe eingebaut wird. Dem mittleren Meßwert von 41 (siehe oben) entspricht bei 75%iger Ausbeute des Zählrohres eine Zerfallszahl von 55 und — unter Berücksichtigung der sp. A. $63 \cdot 10^6$ — ein Zuckergewicht von $8,3 \cdot 10^{-10}$ g, also rund ein Milliardstel Gramm. Das Gewicht des derart aufgenommenen Zuckers beträgt daher größenordnungsmäßig $10^{-3}\%$ des Gewichtes der Kultur selbst und $10^{-2}\%$ des Gewichtes des dargebotenen Zuckers (10^{-5} g). Dieser Wert stellt aber nur einen Mindestwert des Stoffwechsels einzel-

ner Gewebekulturen dar, weil einerseits das zweitägige Weiterwachstum nach der Entfernung der aktiven Lösung zu einer Aktivitätsabnahme führen mußte, und weil andererseits — was zweifellos viel mehr ausmacht — die löslichen Zellbestandteile ausgewaschen worden waren.

Durch einfache Rechnung³ läßt sich zeigen, daß die Strahlungs-dosis der Gewebe < 1 Röntgen/Tag war, eine Schädigung also nicht zu fürchten ist.

In den folgenden Versuchen soll nun die Aktivität der einzelnen chemischen Fraktionen untersucht werden.

Wir danken Herrn Prof. Dr. L. Ebert, Prof. Dr. V. Patzelt und Prof. Dr. E. Schmid für ihr förderndes Interesse, den Österreichischen Stickstoffwerken A. G., Linz, sowie der Österreichischen Gesellschaft zur Erforschung und Bekämpfung der Krebskrankheit für finanzielle Unterstützung (im letzteren Falle aus den Mitteln der *Sonnleithner*-Stiftung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften), unserem Kollegen Herrn G. Rohringer für den Bau des erforderlichen Hochspannungszählgerätes und unseren Kollegen Herrn Dr. T. Schönfeld und H. Schönfelliger für wertvolle Diskussion.

Über zwei Isomere der 3,7,12-Triketocholansäure (Dehydrocholsäure) mit verschiedener biologischer Aktivität.

(Kurze Mitteilung.)

Von

A. Lindner und W. Schneider,

Pharmakologisches Institut der Universität Wien,

und

G. Friedrich, E. Kerschbaum und F. Wessely,

II. Chemisches Laboratorium der Universität Wien und wissenschaftliches
Laboratorium der Fa. „Sanabo“, Wien.

(Eingelangt am 10. Juli 1952. Vorzulegen in der Sitzung am 16. Okt. 1952.)

Anlässlich der Prüfung neuer synthetischer Verbindungen mit vermuteter choleretischer Wirkung am pharmakologischen Institut ist uns (A. L. und W. Sch.) aufgefallen, daß zwei aus verschiedenen Quellen stammende, als chemisch rein bezeichnete Na-Salze der Dehydrocholsäure, die wir als Vergleichssubstanzen verwenden wollten, keine Wirkung auf die Gallenproduktion zeigten. Die choleretische Wirkung wurde an Ratten mit kanüliertem Ductus choledochus in Urethannarkose durch

³ Siehe z. B. E. Broda, Österr. Chemiker-Ztg. 52, 95 (1951).