

Untersuchung der Atmung einzelner Gewebekulturen mit Radiokohlenstoff.

Von

L. Sverak, O. Suschny, G. Manner, E. Broda, R. Stark,

I. Chemisches Laboratorium der Universität Wien,

und

L. Stockinger und H. Enzl,

Histologisch-embryologisches Institut der Universität Wien.

(Eingelangt am 24. Dezember 1954.)

In Embryonalextrakt gehaltenen Kulturen von Hühnerfibroblasten wurde radioaktive Glukose zugeführt und die Aktivität des erzeugten Kohlendioxyds bestimmt. Aus dieser Aktivität wurde auf die veratmete Glukosemenge geschlossen. Deckglaskulturen veratmeten bei Zufuhr von 6 γ oder mehr Glukose 1 γ . Nach einigen Stunden wurde ein Maximum der Atmung erreicht, nach wenigen Tagen kam die Atmung praktisch zum Stillstand. Auch Embryonalextrakt allein (ohne Kultur) entwickelt eine geringe Menge Radiokohlendioxyd. *Roller*-Kulturen veratmen viel mehr (unter Umständen hundertmal mehr) Glukose als Deckglaskulturen; auch in diesem Falle ist die Kohlendioxydentwicklung der Kultur viel größer als die des Nährmediums. Deckglas- und *Roller*-Kulturen veratmen Glukose auch in isotoner Salzlösung ohne Zusatz von Embryonalextrakt.

In früheren Veröffentlichungen wurde eine Methode zur Bestimmung des Stoffwechsels individueller Deckglas-Gewebekulturen (Trockengewicht größenordnungsmäßig $\frac{1}{100}$ mg) beschrieben^{1, 2}. Der Kultur wird radioaktive Glukose als Nährstoff zugeführt; nach Abschluß einer Wachstumsperiode (Passage) von normalerweise 3 Tagen wird das

¹ O. Suschny, E. Broda, L. Sverak, O. Feldstein, H. Bilek, L. Stockinger und H. Madl, Mh. Chem. **83**, 1091 (1952).

² L. Stockinger, H. Enzl, E. Broda, O. Suschny und L. Sverak, Mh. Chem. **85**, 327 (1954).

Gewebe unter Trägerzusatz chemisch in Fraktionen zerlegt und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Diese Aktivität zeigt an, in welchem Maß das Gewebe den zugeführten Zucker zur Erzeugung von Stoffen verwendet hat, die zu der betreffenden Fraktion gehören.

Bei Verwendung von Fibroblastenkulturen konnten wir in den ersten Versuchsreihen nur etwa 1% des zugeführten Radiokohlenstoffes in Form von Stoffwechselprodukten wiederfinden. Dies entsprach trotz sehr hoher spezifischer Aktivität der zugeführten Glukose³ und trotz großer Empfindlichkeit der Messung mit dem Gas-Geiger-Zählrohr⁴ im Durchschnitt bloß 5000 Stößen pro Minute und Kultur. Allerdings war bei den ersten Bestimmungen, wie schon damals betont wurde, nur ein verhältnismäßig kleiner Teil der gebildeten Karbonsäuren erfaßt worden. Inzwischen ist das Aufarbeitsverfahren vor allem insofern verbessert worden, als die Karbonsäuren nicht mehr als Bariumsalze teilweise gefällt, sondern an einem schwach basischen Ionenaustauscher, und zwar Dowex 3, abgeschieden wurden. Dadurch ergab sich eine Steigerung der Gesamtausbeute an Radiokohlenstoff in den Stoffwechselprodukten um etwa 150%. Die Verteilung des Radiokohlenstoffes über die Fraktionen der Fibroblasten bei Anwendung der verbesserten Aufarbeitungsmethode ist der Tabelle I zu entnehmen.

Tabelle I. Verteilung des Radiokohlenstoffes über die Fraktionen der Stoffwechselprodukte.

	Prozent
Kohlendioxyd.....	24
Freie Basen und Aminosäuren...	4
Karbonsäuren.....	67
Eiweißkörper	3
Fettstoffe	2

Angesichts der Kleinheit der Aktivität der Stoffwechselprodukte bestand die Besorgnis, daß bei weiterer Aufteilung der Fraktionen in individuelle chemische Verbindungen die Messung Schwierigkeiten bereiten würde. Wir haben daher die Abhängigkeit der Aufnahme von Radiokohlenstoff von den Versuchsbedingungen, besonders von der Glukosemenge, von der Zusammensetzung des Nährbodens und von der Züchtungsmethode geprüft. Diese Prüfung hat tatsächlich zu einer erheblichen Verbesserung der Versuchsbedingungen geführt.

Als Maß der Kohlenstoffaufnahme wurde die Entwicklung von Kohlendioxyd, also die *Atmung* des Gewebes gewählt. Erstens hatten nämlich Vorversuche gezeigt, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen der Anteil des Radiokohlenstoffes im Kohlendioxyd am gesamten umgesetzten Radiokohlenstoff nur innerhalb enger Grenzen schwankt.

³ L. Sverak, O. Suschny und E. Broda, Mh. Chem. 84, 931 (1953).

⁴ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. 58, 634 (1954).

(Dies würde allerdings bei Verwendung verschiedenartiger Kulturen, also etwa beim Vergleich von gesundem und Krebsgewebe, gewiß nicht gelten.) Zweitens läßt sich das Kohlendioxyd rasch und leicht messen. Man braucht dazu das Wachstum der Kultur nicht einmal zu unterbrechen, so daß man die Atmung auch laufend untersuchen kann.

Zur Bestimmung der Atmung von Deckglaskulturen wurden Gefäße verwendet, durch die ein Luftstrom geleitet werden kann. Die Gefäße bestehen aus Wäggläsern mit eingeschlifftem Deckel und haben je zwei mit Hähnen verschließbare gläserne Zuleitungen, durch die Luft gesaugt werden kann. Die Kultur hängt in einer ebenen Vertiefung des Deckels von 9 mm Durchmesser. Diese Vertiefung verhindert ein Auseinanderlaufen des flüssigen Nährmediums. Die Oberflächenspannung reicht aus, um Nährmedium und Kultur am Deckel festzuhalten.

Später wurde das Kohlendioxyd nicht mehr durch Durchsaugen von Luft bestimmt. Statt dessen wurde ein Kubikzentimeter alkalischer isotoner Salzlösung in das Wägglas gebracht; wie in Kontrollversuchen festgestellt wurde, absorbiert diese Lösung das gebildete Kohlendioxyd quantitativ. Die dabei entstandene Karbonatlösung kann jederzeit durch einfaches Austauschen des unteren Gefäßteiles gewonnen werden.

Um nun Stoffwechselprodukte von möglichst hoher Aktivität zu erhalten, muß vor allem eine Verdünnung des Radiozuckers durch inaktiven Zucker so weit als möglich vermieden werden. Der ursprüngliche Nährboden war aus drei Bestandteilen zusammengesetzt, nämlich isotoner Salzlösung mit Radioglukose, Hühnerembryonaleextrakt und Hühnerplasma. Leider enthalten die beiden letzteren Bestandteile, besonders das Plasma, beachtliche Mengen Glukose.

Wir haben daher das Plasma, das nur dazu dient, ein unterstützendes Netzwerk zu erzeugen, durch Nylongewebe ersetzt⁵. Es zeigte sich, daß Müllergaze, wie sie zur Trennung von grobem und feinem Mehl verwendet wird, geeignet ist. Die Kulturen wachsen gut, und das Wachstum kann ebenso wie bei der Verwendung von Plasma durch die Vertiefung des Deckels hindurch mit dem Mikroskop beobachtet werden.

Auf den Embryonaleextrakt kann hingegen nicht ganz verzichtet werden. Jedoch wurde das der einzelnen Deckglaskultur zugesetzte Volumen auf 0,02 ml — mit einem Glukosegehalt von ungefähr 0,004 mg — vermindert. Der genaue Gehalt des Extrakts an Glukose wurde jeweils nach *Kowarsky* kolorimetrisch bestimmt⁶. Daher wurde beispielsweise die Radioglukose, wenn 0,001 mg für ein Experiment eingesetzt wurde, durch inaktive Glukose nur noch fünffach verdünnt. Durch den

⁵ *K. F. Bauer*, Methodik der Gewebezüchtung. Zürich. 1954.

⁶ Siehe *Tillmans-Ohnesorge*, Praktikum der klinischen Untersuchungsmethoden. Berlin. 1948.

Verzicht auf das Plasma und die Herabsetzung der Menge des Embryonal-extrakts gelang es, bei Einsatz von 0,001 mg Radioglukose für eine Deckglaskultur die veratmete Radiokohlenstoffmenge auf etwa ein Fünftel der eingesetzten Menge zu steigern. Vergleich mit Tabelle 1 zeigt, daß dann der Großteil der Glukose verwertet wird.

Bei der Auswertung der Beobachtungen an Kulturen ist zu berücksichtigen, daß eine geringe Menge von Stoffwechselprodukten unabhängig von der Kultur bloß unter der Einwirkung der im Nährboden vorliegenden Enzyme entsteht. Tabelle 2 gibt die „veratmeten“ Glukosemengen, wenn 0,02 ml Embryonal-extrakt mit 0,004 mg Glukose und 0,005 mg Radioglukose in Abwesenheit einer Kultur zwei Tage bebrütet wurden.

Im Vergleich zur Atmung der Kulturen, die unter ähnlichen Verhältnissen etwa 20% beträgt, ist die „Atmung“ des Nährbodens also unbedeutend.

In einer weiteren Versuchsreihe (0,020 ml Tyrodelösung, 0,001 ml Radioglukose, 0,020 ml Embryonalextrakt mit 0,004 mg Glukose, Nylon) wurde die Abhängigkeit der Atmung der Deckglaskulturen von der Zeit bestimmt (Tabelle 3). Die (viel geringere) „Atmung“ des Nährbodens ist stets von der gemessenen Gesamtatmung abgezogen.

Tabelle 2. „Atmung“ des Nährbodens (Deckglas).

Experiment Nr.	Glukose angeboten (Stöße/Min.)	CO ₂ erzeugt (Stöße/Min.)	Prozent Radiokohlenstoff „veratmet“
1	6,85 · 10 ⁵	1130	0,17
2	6,85 · 10 ⁵	1220	0,18
3	6,85 · 10 ⁵	1230	0,18
4	6,85 · 10 ⁵	1150	0,17
Mittelwert	6,85 · 10 ⁵	1180	0,18

Tabelle 3. Abhängigkeit der Atmung von der Zeit (Deckglas).

Zeit seit Überpflanzung (Tage)	Kultur Nr.				Mittelwert
	1	2	3	4	
Prozent Radiokohlenstoff veratmet					
1	10,6	13,6	12,0	10,0	11,5
2	10,8	6,2	6,6	5,2	7,2
3	1,6	1,2	2,6	1,8	1,8
4	—	0,0	0,1	—	0,1
Summe	23,0	21,0	21,3	17,0	20,6

Schon der Augenschein hatte gezeigt, daß das Wachstum der in Tabelle 3 angeführten Kulturen nach 2 Tagen praktisch beendet war.

Allerdings wurde in einer weiteren Serie, die langsamer wuchs und daher auch den Zucker nicht so rasch erschöpfte, noch nach 3 Tagen

beträchtliche Atmung festgestellt. Bei dieser Serie (4 Fibroblastenkulturen) wurde die Atmung in Abständen von je 4 Stdn. gemessen. Bei allen Kulturen dieser Serie wurde etwa 10 bis 12 Stdn. nach der Transplantation ein breites Maximum der Atmung aufgefunden.

Von wesentlicher Bedeutung für die Gewinnung hinreichend aktiver Stoffwechselprodukte ist die Kenntnis der Abhängigkeit der Atmung der Kultur von der angebotenen Zuckermenge. (Die Konzentration des Zuckers ist der Menge proportional, da das Volumen konstant bleibt.) Fibroblasten wurden als Deckglaskulturen in Nährmedien gezüchtet, die stets die gleiche Menge aktiver Glukose, aber verschiedene Mengen inaktiver Glukose enthielten. Zur Berechnung der veratmeten Gesamtmenge aus der gemessenen Aktivität der Kohlendioxydfraktion wurde diese durch die jeweilige, nunmehr von Versuch zu Versuch verschiedene spezifische Aktivität des Gesamtzuckers dividiert (Tabelle 4).

Tabelle 4. Atmung in Abhängigkeit von Menge und Konzentration der Glukose (Deckglas).

Glukosemenge		Glukosekonzentration (%)	Radiokohlenstoff veratmet (%)	Glukose veratmet (mg)
Aktiv (mg)	Gesamt (mg)			
0,001	0,005	0,0125	20,0	0,0010
0,001	0,050	0,1250	2,3	0,0012
0,001	0,100	0,2500	1,2	0,0012

Es ergibt sich also, daß bei Deckglaskulturen die Menge des veratmeten Zuckers durch Vergrößerung der angebotenen Zuckermenge bzw. -konzentration über den in der ersten Horizontalreihe gegebenen Wert hinaus kaum gesteigert werden kann. Unter der Annahme, daß sich wieder 24% der Aktivität der Stoffwechselprodukte im Kohlendioxyd finden, kann man schließen, daß die Kultur 0,0042 mg Gesamtglukose (bzw. 0,0007 mg Radioglukose) assimiliert hat. Diese Gesamtglukosemenge ist von derselben Größenordnung wie das ursprüngliche Trockengewicht der Kultur.

Die Atmung von Deckglaskulturen wurde dann mit der von *Roller*-Kulturen verglichen. Die *Roller*-Röhren befanden sich in einer langsam rotierenden Trommel (eine Umdrehung in 4 Min.) und wurden — ebenso wie die Deckglaskulturen — bei 37 bis 38° gehalten. Die Röhren waren mit Gummistöpseln verschlossen und geneigt befestigt, so daß die Stöpsel nicht benetzt wurden. Jedes Röhren enthielt auf einem Objektträger 3 bis 4 Kulturen; das Nährmedium bestand aus 0,4 ml Embryonal-extrakt, 0,6 ml Aszitesflüssigkeit und 1 ml Ringerlösung mit Radioglukose. Zur Bestimmung der Atmung war der Gummistöpsel doppelt

durchbohrt, so daß zwei während des Wachstums der Kulturen verschlossen gehaltene Glasröhrchen eingeführt werden konnten. Nach einer Wachstumsperiode von z. B. 4 Tagen wurde Luft durch die Röhrchen gesaugt. Das vom Luftstrom mitgeführte Kohlendioxyd wurde in Lauge absorbiert und die Aktivität wie gewöhnlich bestimmt.

Wie erwartet, zeigte sich, daß *Roller*-Kulturen viel stärker atmen als Deckglaskulturen, weil durch die Bewegung des Nährmediums Zucker leichter zugeführt wird und Stoffwechselprodukte leichter abgeführt werden. Aus diesem Grunde kann man für *Roller*-Röhrchen größere Gewebsstücke verwenden und sie auch länger wachsen lassen. Offenbar werden in einem Röhrchen unter günstigen Umständen einige hundert Mikrogramm Zucker assimiliert. Daher ist die Radioaktivität der Stoffwechselprodukte der von Deckglaskulturen selbst dann überlegen, wenn aus wirtschaftlichen Gründen der Radiozucker mit inaktivem Zucker verdünnt werden muß. Die Tabelle 5 gibt Durchschnittswerte von je 2 Röhrchen, deren jedes 3 Kulturen enthielt.

Tabelle 5. Atmung von *Roller*-Kulturen als Funktion der Glukosemenge.

Glukosemenge		Glukosekonzentration (%)	Radiokohlenstoff veratmet (%)	Glukose veratmet (mg)
Aktiv (mg)	Gesamt (mg)			
0,002	1,40	0,070	16,7	0,234
0,002	1,88	0,094	14,3	0,269
0,002	3,20	0,160	9,6	0,307
0,002	7,40	0,370	8,4	0,622

Auch bei *Roller*-Röhrchen ist die Glukosemenge, die durch die Enzyme des Nährmediums in Abwesenheit von Gewebe „veratmet“ wird, im Vergleich zu der durch die Kultur veratmeten Glukosemenge sehr klein (Tabelle 6).

Tabelle 6. „Atmung“ des Nährmediums in *Roller*-Röhrchen.

Experiment Nr.	Glukose angeboten (Stöße/Min.)	CO ₂ erzeugt (Stöße/Min.)	Bruchteil „veratmet“ (%)
1	2,74 · 10 ⁵	530	0,19
2	2,74 · 10 ⁵	660	0,24
Mittelwert	2,74 · 10 ⁵	595	0,22

Bekanntlich bietet die *Roller*-Methode gegenüber der Deckglasmethode außer dem vergrößerten „Volumen“ des Stoffwechsels noch weitere

Vorteile. Die Kulturen sind widerstandsfähiger, was sich besonders bei der Züchtung von Tumoren günstig auswirkt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß jedes *Roller*-Röhrchen gleichzeitig mehrere Kulturen enthält, so daß individuelle Unterschiede bei gemeinsamer Aufarbeitung weitgehend ausgeglichen werden. Daher sollen die vergleichenden Untersuchungen über den Stoffwechsel von gesunden und Krebskulturen mit *Roller*-Röhren angestellt werden.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde schließlich die Atmung der Fibroblasten in radioglukosehaltiger isotoner Salzlösung ohne Zusatz von Embryonalextrakt oder Aszitesflüssigkeit untersucht. Gewebe kann in Tyrodelösung eine Weile am Leben bleiben, Zellen können auch wandern, aber echtes Wachstum findet, wie man glaubt, nicht statt. Versuche wurden nun mit Deckglas- und *Roller*-Kulturen ausgeführt. Die Ergebnisse waren schlecht reproduzierbar; die veratmete Glukosemenge war wohl in manchen, aber nicht in allen Versuchsreihen geringer als die von Kontrollkulturen in Embryonalextrakt (mit Aszitesflüssigkeit) veratmete Menge. Es wurde daher zunächst vermutet, daß die Kulturen anhaftenden Embryonalextrakt mitschleppten, obwohl sie bei der Überpflanzung in isotoner Salzlösung gebadet wurden. In einer zusätzlichen Versuchsreihe, bei der die *Roller*-Kulturen während einer „Vorphase“ einige Tage in inaktiver glukosehaltiger Lösung gehalten und dann erst einerseits in radioaktive isotone Lösung, andererseits in radioaktiven Embryonalextrakt überpflanzt wurden, konnten jedoch ebenfalls keine klaren Ergebnisse erzielt werden. Es kann daher aus der Gesamtheit dieser Versuche gegenwärtig nur geschlossen werden, daß in Abwesenheit von Embryonalextrakt beträchtliche, wenn auch großen Schwankungen unterliegende Atmung stattfindet. Die Intensität der Atmung von in Embryonalextrakt gehaltenen, besonders gut wachsenden Kulturen wurde allerdings ohne Embryonalextrakt nie erreicht.

Schließlich sei bemerkt, daß die Messung der Radioaktivität des von Gewebekulturen nach Zufuhr markierter Verbindungen gebildeten Kohlendioxyds eine leistungsfähige Methode zur eindeutigen, raschen und empfindlichen Bestimmung darstellt, ob solche Gewebe Enzyme zur Veratmung der betreffenden Verbindungen enthalten. Reihenversuche in dieser Richtung sind geplant.

Wir danken Herrn Prof. Dr. L. Ebert und Herrn Prof. Dr. V. Patzelt für ihr Interesse an dieser Arbeit. E. Broda, O. Suschny, R. Stark und L. Stockinger danken dem *Damon-Runyon*-Fonds für Krebsforschung für finanzielle Unterstützung, L. Sverak der Österreichische Stickstoffwerke A. G., Linz, für dauernde Förderung.