

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität zu Münster in Westf.
[Direktor: Prof. Dr. W. Gross].)

Über Phagocytose in Capillarendothelien.

Von

Wilhelm Klostermeyer.

(Eingegangen am 14. November 1932.)

Injiziert man in die Blutbahn des lebenden Tieres Aufschwemmungen von Bakterien, Kohle oder saure kolloidale Farbstoffe, so werden diese kreisenden Teilchen vom Reticuloendothel abgefangen und phagocytiert. Zum reticuloendothelialen System gehören vor allem die *Kupfferschen* Sternzellen der Leber, die Endothelien der Sinus der Milz und der Lymphknoten, der Capillaren des Knochenmarks, der Nebenniere und des Hypophysenvorderlappens, außerdem noch die retikulären Gerüstzellen der Milz und der Lymphknoten.

Ob auch noch andere Teile des Capillarsystems sich an der Phagocytose beteiligen, ist noch nicht sichergestellt. Besonders strittig ist die Beteiligung der Endothelien der Lungencapillaren, die nach der Auffassung von *Aschoff*, *Seemann*, *Westhues*, *Siegmund*, *Gerlach* u. v. a. nicht wesentlich an der Phagocytose teilnehmen. Andere Forscher dagegen, wie *Boerner-Patzelt*, *Foot*, *Domagk* und *Oeller* sind nach ihren Untersuchungen zu der Ansicht gekommen, daß sich die Phagocytose auch in ausgedehntem Maße auf die Endothelien der Lungencapillaren erstreckt.

Unter den Kräften, die eine Aufnahme von kleinen Teilchen in Zellen bewirken, spielen sicher die Oberflächenkräfte die bedeutendste Rolle. Diese Oberflächenkräfte, die nicht gemessen werden können, bestehen aus Oberflächenspannung und wahrscheinlich auch aus Oberflächenladung. Das Reticuloendothel besitzt wegen seiner Phagocytosefähigkeit wahrscheinlich auch besondere elektrische Oberflächeneigenschaften, die es vor den anderen Zellen im Organismus auszeichnet. Man hat in Vitalfärbeversuchen mit sauren Farbstoffen, wie Carmin, gesehen, daß diese Farbstoffe elektiv von den Zellen des Reticuloendothels gespeichert werden. *Keller* bezeichnet diese Zellen als anodisch, während er die übrigen Capillarendothelien für Kathoden hält. Daher könnte man annehmen, daß auch der Oberflächenladung von Bakterien, Kohle und dergleichen, die auch vom Reticuloendothel aufgenommen werden, eine besondere Bedeutung zukommt. Außerdem glaubt *M. Schmidtman*, daß

sich das Reticuloendothel und ebenfalls die übrigen Capillarendothelien durch eine besonders saure Reaktion gegenüber den anderen Zellen des Organismus auszeichnet. Allerdings ist die Methode des Nachweises nicht einwandfrei und überhaupt fraglich, ob die Anschauungen über Dissoziation usw. auf das Zellinnere anwendbar sind.

Alle Partikel, die für eine Phagocytose im Tierkörper in Frage kommen, wandern, wenn sie in Wasser suspendiert sind, im elektrischen Strom zur Anode. Diese Ladung gegenüber reinem Wasser wird durch die *Coehnsche* Regel bestimmt, nach der ein Körper mit großer Dielektrizitätskonstante sich positiv auflädt gegenüber einem Stoff mit niedriger Dielektrizitätskonstante. Wasser besitzt gegenüber allen darin aufgeschwemmten Teilchen die größere Dielektrizitätskonstante, und deshalb laden sich alle Stoffe dagegen negativ auf. Hierzu gesellt sich der Einfluß der elektrolytischen Dissoziation des im Wasser verteilten Stoffes, durch die die Ladung des suspendierten Teilchens mitbestimmt wird. Es kommt zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht, deren äußere Schicht abdissoziierte Ionen bilden. Eiweiß, das als Ampholyt saure und basische Valenzen besitzt, ist im Wasser fast immer als Anion vorhanden, da es im Wasser stärker sauer dissoziiert.

Die Bakterien, die wir für unsere Untersuchungen benutzen wollen, haben nach *Beckhold* eine eiweiß- oder gelatineartige Hülle, außerdem haften ihnen vom Nährboden noch sicher Eiweißteilchen an. So erklärt sich aus den oben angeführten Möglichkeiten einer Aufladung gegen das Wasser die Anodenwanderung der Bakterien im elektrischen Strom. Negatives Eiweiß, das im Wasser zur Anode wandert, ist aber durch Zusatz von Säure oder dreiwertigen Metallsalzen in positives umzuwandeln.

Die Erklärung für die Phagocytose im Reticuloendothel gegenüber anderen Capillargebieten und die Tatsache, daß unter bestimmten Umständen auch nicht zum Reticuloendothel gehörige Capillargebiete phagocytieren können, könnte entweder im Zustande des phagocytierten Teilchens, besonders ihrer Ladung, oder in Änderungen der phagocytierenden Endothelien gesucht werden.

Zunächst sollte der erste Punkt, der allein unmittelbar im Versuch geprüft werden kann, untersucht werden.

Die erste Aufgabe der Arbeit war also, alle Umladungsmöglichkeiten von Bakterien zu untersuchen und zu sehen, ob sie im Blutserum ihre veränderte Ladung beibehalten. Falls das zutraf, sollten derartig in ihrer Ladung veränderte Bakterien in die Blutbahn von Mäusen eingebracht und untersucht werden, ob diese umgeladenen oder in ihrer Ladung veränderten Bakterien noch vom Reticuloendothel allein oder vielleicht auch an anderen Stellen aufgenommen werden.

Ausgangspunkt für die eigenen Versuche war die Arbeit von *Püschel* über die Umladung von Bakterienaufschwemmungen.

Püschel hat versucht, Bakterien unter dem Gesichtspunkt der Injizierbarkeit umzuladen. Zunächst berichtet er über die ersten Umladungen, die *Höber* an roten Blutkörperchen und Hefezellen vorgenommen hat, dann über Untersuchungen von *Beckhold* und *Buxton* und seinem Mitarbeiter *Tague*, die Bakterien entladen und umgeladen haben, um die Frage der Agglutination näher zu klären, weiter über Versuche von *Loeb*, der Casein, denaturiertes Eiereiweiß, Kolloidiumteilchen, die mit denaturiertem Eiweiß überzogen waren, mit LaCl_3 umgeladen hat.

Püschel hat dann selbst in eigenen Versuchen Bakterien umgeladen. Die von ihm gebrauchten Einrichtungen, die ich in gleicher Weise auch für meine Untersuchungen verwandte, waren nach *Michaelis* angeordnet. Es wurden 2 Gefäße mit CuSO_4 , 2 Gefäße mit 10%iger NaCl -Lösung, ein Winkel-Zeiß-Mikroskop (Okular 2, Objektiv 4) und eine Kammer zur Bestimmung der elektrischen Wanderung gebraucht. Die Kammer bestand aus einem Objektträger und zwei darauf mit Paraffin angeklebten parallelen Deckglasstreifen. Die Deckglasstreifen hatten einen Abstand von 0,5—0,75 cm. Die Verbindung der Kammerflüssigkeit mit dem elektrischen Strom wurde durch zwei spitz zulaufende Glasheber, die mit 10%iger NaCl -Lösung enthaltendem Agar gefüllt waren, hergestellt. Diese Heber tauchten beiderseits in das Gefäß mit NaCl . Diese Gefäße wurden wiederum durch Heberpaare mit den CuSO_4 -Lösung enthaltenden Gefäßen verbunden. In die Gefäße mit CuSO_4 -Lösung tauchte an beiden Seiten eine Kupferelektrode, durch einen Stromschlüssel wurde der Gleichstrom von 110 V unterbrochen.

Die von *Püschel* geprüften Bakterienarten waren: Streptokokken, Staphylokokken, Gärtner-, Coli- und Tuberkelbacillen und *Pyocyaneus*. Weder in verdünnten HCl - oder Essigsäurelösungen noch in Puffergemischen von pH 1—5 konnte eine Wanderung der eingebrachten Bakterien zur Kathode erzielt werden.

Auffallenderweise waren auch Salze mit dreiwertigen Kationen, z. B. LaCl_3 nicht alle wirksam; nur bei AlCl_3 und FeCl_3 wurden entsprechend den Angaben von *Bechhold* Umladungen beobachtet. Besonders wirksam waren Lösungen von $\text{m}/64$, $\text{m}/128$ AlCl_3 und $\text{m}/64$, $\text{m}/128$ FeCl_3 . Alle vorhin angegebenen Bakterien wurden geprüft. Nur Gärtner und Tuberkelbacillen zeigten Abweichungen, sonst wanderten alle übrigen Bakterien zur Kathode.

Diese Lösungen waren nicht injizierbar, daher wurden die Bakterien in diesen Lösungen aufgeschwemmt, 10 Min. zentrifugiert und der Bodensatz dann in physiologischer NaCl -Lösung aufgeschwemmt. Der Schleudersatz löste sich in NaCl auf. Der Kataphoreseversuch ergab, daß die Bakterien ihre positive Ladung nicht aufgeben hatten. Die Bakterien waren also umgeladen und injizierbar. Die Aufgabe *Püschels* war hiermit gelöst.

Damit war aber noch nicht bewiesen, daß die so umgeladenen Bakterien ihre positive Ladung auch im Blute beibehalten würden. Nach der Auffassung *Freundlich's* rühren Änderungen der Grenzpotentiale bei der Berührung von festen Stoffen und Elektrolytlösung von der ungleichen Adsorption der Kationen und Anionen der Elektrolyte her. Besonders stark werden H^- , OH^- , Ag^- , Al^- und Fe^- -Ionen adsorbiert. Je mehrwertiger das adsorbierte Ion ist, desto leichter wird die ursprüngliche Ladung des Adsorbens geändert.

Eigene Versuche.

Für die Untersuchungen wurden Staphylokokken und Streptokokken als zur grampositiven Gruppe gehörig benutzt und von der gramnegativen das Bacterium Coli. Es wurde jeweils eine möglichst feine Aufschwemmung von Bakterien, die in Stärke zweier Normalösen einer 24stündigen Schrägagarkultur entnommen wurden, in 1 cm H_2O hergesetzt. Sollte die Verdünnung durch H_2O vermieden werden, dann wurden die Bakterien sofort an der Wand des mit 2 cm der Lösung gefüllten Reagensglases verrieben, abgeschwemmt und geschüttelt.

Die Wanderung der Bakterien wurde immer in der Mittelschicht der Kammer beobachtet. An der unteren und oberen Fläche der Kammer wandern die Bakterien nämlich entgegengesetzt der Mittelschicht, da sie von den Flüssigkeitsschichten unten und oben, die sich gegen das Glas aufgeladen haben und zum entgegengesetzten Pol wandern, mitgerissen werden.

Zur Prüfung der Methode wurden nochmals Säuren in verschiedenen Verdünnungen versucht, und zwar Essigsäure und Salzsäure. Dabei zeigte sich die schon beschriebene Erscheinung, daß die Bakterien in den konzentriertesten Lösungen überhaupt nicht wanderten. In Verdünnungen wanderten sie zur Kathode. In sehr starker Verdünnung zeigten sie dann wieder Anodenwanderung. Diese Umladung von Bakterien durch Säuren entspricht den neueren Untersuchungen. Der isoelektrische Punkt von Bakterien liegt nach *Winslow* beim $p_H = 3$. Bei stärkerer Säuerung gehen sie dann zur Kathode, um bei p_H von 1 wieder Stillstand zu zeigen. Praktisch kommen diese Umladungen mit Säure nicht für uns in Betracht, da bei stärkerer Verdünnung die Kathodenwanderung wieder verschwindet.

Eine bleibende, auch im Blute beständige Umladung war nur dann zu erwarten, wenn das Eiweiß der Bakterien mit löslichen Metallsalzen eine feste Verbindung einging oder die positiven Metallionen fest adsorbiert würden. Zunächst wurden ein- und zweiwertige Salze mit positivem Metallion versucht. Vom Silber, Blei, Calcium, Quecksilber nimmt man an, daß sie mit Eiweiß Albuminate bilden.

Die Bakterien wurden also in verschiedenen Lösungen von $AgNO_3$, $CuCl_2$ und Bleiacetat suspendiert. In den konzentriertesten Lösungen zeigten sie Stillstand im elektrischen Strom, in weiter verdünnten Lösungen Anodenwanderung. Bakterien, die mit den konzentriertesten Lösungen behandelt waren, wurden ausgewaschen. Diese ausgewaschenen Bakterien wurden dann auf ihre Wanderungsrichtung geprüft, sie wandern zur Anode, obwohl man bei den mit Bleiacetat behandelten durch ihre Schwarzfärbung mit Schwefelblei nachweisen konnte, daß sie Blei angenommen hatten.

Nun wurden die dreiwertigen Salze $FeCl_3$ und $AlCl_3$ auf ihre Wirkung untersucht. *Püschel* hatte in Konzentrationen dieser Salze von $m/64$ und $m/128$ ausgesprochene Kathodenwanderung von Bakterien festgestellt. Diese Resultate konnten bestätigt werden. Die Bakterien wurden ausgewaschen und in physiologische $NaCl$ -Lösung gebracht. Nach einmaligem Zentrifugieren wanderten sie, wie *Püschel* angegeben hatte, noch zur Kathode. Nach wiederholtem gründlichen Auswaschen wanderten sie aber wieder zur Anode. Dieses Resultat ist mit der starken Wirksamkeit der dreiwertigen Metallionen leicht zu erklären. Es waren in dem zentrifugierten und in 1 ccm $NaCl$ wieder aufgelöstem Schleudersatz noch $FeCl_3$ und $AlCl_3$ adsorbiert und auch am Glas noch vorhanden; diese

geringen Mengen genügten, eine Kathodenwanderung zu bewirken, da die Bakterien durch feste chemische Bindung oder Adsorption sicher in ihrer Ladung schon herabgesetzt worden waren.

Auch in konzentrierten Lösungen von FeCl_3 und AlCl_3 wurden Bakterien aufgeschwemmt, dann mehrmals ausgewaschen zeigten sie wieder Anodenwanderung. Die Wanderung war aber nicht mehr so klar und trat erst ein, nachdem die konzentrierte Salzlösung wirklich ausgewaschen war. Anscheinend war doch eine starke Herabsetzung der Ladung eingetreten. An den mit Eisenchlorid vorbehandelten und vollkommen rein aus zentrifugierten Bakterien ließ sich Eisen durch Schwarzfärbung mit Hämatoxylin nachweisen.

Auch *Beckhold* konnte in Bakterien, die mit Bleiacetat oder FeCl_3 vorbehandelt und dann gründlich ausgewaschen worden waren, Blei und Eisen nachweisen. Trotzdem zeigten sie Wanderung zur Anode.

Es wurde auch ein Goldsäurepräparat Indusin geprüft, das sehr starke bactericide Eigenschaften besitzen soll. In einer 1%igen Lösung wanderte das Indusin selbst schon zur Anode; so wurde durch Indusin auch keine Änderung der Bakterienladung erzielt.

Brachte man mit FeCl_3 und AlCl_3 vorbehandelte und nur einmal ausgewaschene Bakterien, die noch Wanderung zur Kathode zeigten, in Blutserum, so klumpten dieselben teilweise zusammen und wanderten in Serum in der elektrischen Kammer zur Anode. Auch in anderen Eiweißlösungen zeigten so vorbehandelte Bakterien Wanderung zur Anode. Es war hier leicht, durch Zusatz von Säure oder geringer Mengen FeCl_3 -Lösung eine Wanderung der Bakterien und des Eiweißes zum negativen Pol hin zu bewirken.

Auch alle weiteren Versuche, durch Behandlung der Bakterien mit Säuren oder Salzen eine positive Ladung zu erhalten, die sie auch im Blutserum beibehielten, waren ergebnislos. Es waren auch keine Unterschiede in der Entladung und Umladung zwischen den einzelnen Bakterien gruppen festzustellen.

Nach dem die anorganischen Mittel versagt hatten, war noch zu prüfen, ob bei Anfärbung der Bakterien mit positiven Farbstoffbasen eine bleibende feste Umladung erzielt werden konnte.

Nach *Freundlich* laden sich die basischen Farbstoffe Krystallviolett und Neufuchsin gegen das Wasser stark positiv auf. So haben die Untersuchungen *Kellers* ergeben, daß viele dieser basischen Farbstoffe zur Kathode wandern. Bakterien färben sich mit basischen Farbstoffen gut. Und zwar geht nach *Unna* die Bakteriensubstanz mit Farbstoffen eine leicht lösliche Doppelsalzverbindung ein. Man nimmt an, daß die negativen Bakterien besonders stark den positiven Farbstoff adsorbieren, während sie mit saueren Farbstoffen kaum oder nur schlecht färbbar sind. Es ist einleuchtend, daß durch Farbstoffadsorption die Bakterien in ihrer Ladung stark verändert werden müssen.

Zur Färbung wurden die im Wasser positiv geladenen Farbstoffe Krystallviolett, Bismarckbraun und Kresylviolett benutzt. Die Bakterien wurden vorher durch Erhitzen auf 60° abgetötet und darauf ausgewaschen, um möglicherweise auch aus den Nährböden stammende Elektrolytbeimengungen auszuschalten. Diese Bakterien wurden dann in 1/2%ige Lösungen der angegebenen Farbstoffe gebracht. Sie färbten sich gut und wanderten im elektrischen Strom wirklich zur Kathode. Auch in stärkeren Verdünnungen war immer noch eine Wanderung zum negativen Pol vorhanden. Die Umladung verschwand, wenn die Bakterien aus der Farbstofflösung ausgeschleudert und dann ausgewaschen wurden. Nach zweimaligem Auswaschen erwiesen sie sich wieder als negativ geladen trotz deutlicher guter Färbung.

Es ergaben sich auch keine anderen Befunde, wenn die Bakterien vorher mit NaOH behandelt worden waren, um die Färbung zu verstärken. Auch Bakterien, die im Ausstrichpräparat gefärbt worden waren, wanderten im Wasser zur Anode. Nach *Gram* gefärbte Staphylokokken, deren Färbung, wie man annimmt, durch eine feste chemische Verbindung des Jods mit dem Pararosanilinfarbstoff bedingt wird, wandern suspendiert nicht mehr klar und deutlich zur Anode.

Die Umladung der Bakterien hängt also davon ab, daß noch eine genügende Menge Farbstoff an ihnen haftet. Wenn ein Teil des Farbstoffes sich von den Bakterien wieder getrennt hat, sind sie wieder negativ geladen. Sicher ist aber bei diesen gefärbten Bakterien die ursprüngliche Ladung durch Aufnahme von positiven Farbstoffteilchen stark geändert, und es wird vielleicht ihre zur Anode gerichtete Wanderung überwiegend durch die verschiedenen Dielektrizitätskonstanten bedingt. Eine quantitative Bestimmung der Stärke der Ladung war nicht möglich. Da man nun ohne wesentliche Schädigung der Versuchstiere gefärbte Bakterien zusammen mit der Farblösung ins Blut einspritzen kann, kann man Ort und Schnelligkeit der Phagocyten solcher Bakterien untersuchen.

Zuerst wurden Farbstofflösungen, in denen Bakterien suspendiert worden waren, mit Blutserum zusammengebracht und ihre Wanderungsrichtung beobachtet. Dabei ergab sich, daß sowohl der Farbstoff wie die umgeladenen Bakterien zur Anode gingen. *Freundlich* und *Abramson* haben bei Messungen von kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten darauf hingewiesen, daß schon kleine Proteinmengen stark auf die Kataphorese einwirken, und daß im Serum Quarzpartikel sich mit einer Eiweißhülle umgeben, so daß die Wanderungsrichtung allein vom Eiweiß bestimmt wird. Im Serum wandern alle positiv geladenen Teilchen wegen ihrer Eiweißadsorption zur Anode.

Für die Phagocytoseversuche wurden von den Farbstoffen Kresylviolett und Bismarckbraun benutzt, von den Bakterien Staphylokokken und Coli. Sie wurden in 1%igen Lösungen aufgeschwemmt und 12 Stunden in den Lösungen stehen gelassen. Von diesen Lösungen wurden dann

Mäusen 0,5 ccm in die Schwanzvenen injiziert. Die Mäuse vertrugen die Injektion gut und wurden nach 8 Min. getötet. Bei der histologischen Untersuchung ergaben sich aber keine Unterschiede in der Örtlichkeit und Stärke der Phagocytose gegenüber den Vergleichstieren, die mit der gleichen Menge unvorbehandelter Bakterien gespritzt worden waren. Zum größten Teil waren sie in den *Kupfferschen* Sternzellen der Leber und in der Milz phagocytiert, vereinzelt auch in den Endothelien der Lungencapillaren. Öfter sah man auch in den Lungencapillaren freiliegende Leukocyten, die Bakterien aufgenommen hatten.

Nachdem so kein Unterschied in der Örtlichkeit der Phagocyten gefunden wurde, sollte noch geprüft werden, ob zeitliche Unterschiede in der Schnelligkeit der Aufnahme von unbehandelten und in ihrer Ladung veränderten Kokken bestanden. Diese Versuche wurden mit Staphylokokken gemacht, da diese sehr schnell und regelmäßig phagocytiert werden. Außerdem wurden zu diesen Versuchen auch mit Eisenchlorid vorbehandelte Bakterien hinzugezogen. Dabei ist es wichtig, immer die gleiche Menge einzuspritzen, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Die Methode, gleich dichte Aufschwemmungen zu erhalten, war folgende: Es wurden Staphylokokken in Stärke von 8 Normalösen in 4 ccm H_2O aufgeschwemmt. Je 1 Kubikzentimeter von dieser Aufschwemmung wurde in 3 verschiedene Reagensgläser gefüllt und dann zur ersten Aufschwemmung 1 ccm 1%ige Kresylviolett-, zur zweiten 1 ccm $\frac{1}{2}$ m $FeCl_3$ - und zur dritten 1 ccm 1,8%ige NaCl-Lösung hinzugesetzt. Die Aufschwemmung in der $FeCl_3$ -Lösung wurde 20 Minuten zentrifugiert, die überstehende Lösung vorsichtig abpipettiert und der Bodensatz in 2 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung aufgelöst. So erhielt man in allen 3 Reagensgläsern gleich dichte injizierbare Aufschwemmungen.

Es wurden nun je 2 Mäusen gefärbte, mit $FeCl_3$ beladene und vorbehandelte Bakterien, und zwar in einer Dosis von 0,8 ccm in die Schenkelvene injiziert. Nach 5 Min. wurden sie getötet. Im Blutausschlag der einzelnen Mäuse waren kaum noch Bakterien vorhanden. Bei der histologischen Untersuchung waren die Bakterien bei allen Tieren in gleicher Verteilung und an den gleichen Stellen phagocytiert worden.

Darauf wurden 2 Mäusen verdünnte Lösungen von NaH_2PO_4 und 2 anderen $NaHCO_3$ intravenös injiziert. Es wurde gewartet, bis nach einigen Minuten der Urin anfang, stärker sauer bzw. alkalisch zu werden. Dann wurden mit Kresylviolett und $FeCl_3$ vorbehandelte Bakterien in die Blutbahn gebracht. Auch bei diesen Mäusen ergaben sich trotz der Verschiebung des p_H des Blutes zur sauren und alkalischen Seite und der stark veränderten Ausscheidungstätigkeit der Nieren keine Unterschiede in der Phagocytose gegenüber den Kontrolltieren.

Aus diesen Ergebnissen darf man schließen, daß die Ladung der Bakterien nicht maßgebend sein dürfte für den Ort der Phagocytose, ebenso unwahrscheinlich ist es, daß das Reticuloendothel positive Oberflächenladung besitzt, die für die Phagocytose maßgebend wäre. Es hätten sich dann doch gewiß gröbere Zeitunterschiede zwischen der

Aufnahme vorbehandelter und normaler Staphylokokken ergeben müssen. *Moellendorf* ist durch seine zahlreichen Untersuchungen über Speicherung von Farbstoffen und Phagocytose größerer Teilchen zu der Ansicht gekommen, daß die Phagocytose von größeren Partikeln ein biologisches mit cellulärer Lebenstätigkeit verknüpftes Phänomen ist, während Speicherung hochdisperser Teilchen einen rein physikalischen Vorgang darstellt. *Schulemann* macht zwischen Speicherung und Phagocytose keinen Unterschied. *Ponder*, der in neueren Untersuchungen gefunden hat, daß Rattenleukocyten Carbon-, Quarz- und Magnesiumdioxidteilchen in stärkerem Ausmaß phagocytieren als Magnesiumsilicat, weist darauf hin, daß der Unterschied der ungleichen Phagocytose nicht an der Oberflächenladung liegt.

Weiter haben diese Versuche ergeben, daß bei Injektionen einer kleinen Dosis Bakterien die *Kupfferschen* Sternzellen der Leber und die Reticuloendothelien der Milz als Phagocyten am stärksten in Tätigkeit treten. Die Endothelien der Lungencapillaren beteiligen sich nur unwesentlich, vereinzelt nehmen auch Endothelien der Glomeruluschlingen der Niere Bakterien auf.

Da eine örtliche Verschiebung in der Phagocytose von Bakterien durch Ladungsänderung derselben nicht zu erzielen war, sollte auf anderen Wegen versucht werden, sonst gewöhnlich nicht phagocytierende Endothelien zur Aufnahme von Bakterien zu veranlassen.

Weil im folgenden Abschnitt mit verschiedenen großen Dosen von Bakterienaufschwemmungen gearbeitet wird, soll hier ungefähr angegeben werden, wie die einzelnen hergestellt worden sind. Unter geringer Konzentration möchte ich Aufschwemmungen in Stärke von 1—2 Normalösen in 1 ccm Flüssigkeit, unter mittlerer die Aufschwemmung von einer halben Schrägagarkultur in 5 ccm Flüssigkeit, unter großer die Aufschwemmung von 2 Schrägagarkulturen in 4 ccm Flüssigkeit verstehen.

Zuerst wurde einer Maus, die mit Urethan narkotisiert war, sofort nach einer Staphylokokkeninjektion die Trachea langsam zugeedrückt; hierdurch wird der p_H des Blutes bis zur möglichen Grenze geändert und besonders aber treten starke Zirkulationsstörungen in den Lungen auf. Es stellten sich keine wesentlichen Veränderungen der Phagocytose heraus.

Da es aber nach den Versuchen von *Domagk* und *Oeller* nicht zweifelhaft ist, daß unter bestimmten Umständen auch die Endothelien der Lunge phagocytieren und außerdem *Domagk* und *Neuhaus* gezeigt hatten, daß bei Einspritzung von Bakterienaufschwemmungen unmittelbar in die Nierenarterien auch eine Phagocytose im Glomerulus zustande kommt, sollte zunächst untersucht werden, ob nicht die Menge der eingebrachten Kokken dafür verantwortlich ist, daß das Gebiet der eigentlichen Reticuloendothelien überschritten werden kann.

Diese Annahme lag auch deshalb nahe, weil schon in den bisherigen Versuchen immer vereinzelt auch in den Lungen- und Nierencapillaren Phagocytose beobachtet worden war. Es wurde eine konzentrierte Aufschwemmung von Staphylokokken hergestellt. Diese Aufschwemmung wurde dann in einzelne Reagensgläser mit 0,9 % igem NaCl verschieden verdünnt. Von den einzelnen Aufschwemmungen, die entstanden waren, wurden je 2 Mäusen 0,8 ccm in die Schenkelvene langsam injiziert. Die Mäuse wurden darauf nach 15 Min. getötet.

Aus dem Blut der bei der Dekapitation angeschnittenen Gefäße wurden Ausstriche gemacht und nach *May-Giemsa* gefärbt. Bakterien waren besonders bei den Mäusen, die mit höheren Dosen gespritzt worden waren, noch vereinzelt in kleinen Häufchen vorhanden. Leukocyten waren kaum noch zu finden. In den Blutausstrichen der mit den stärker verdünnten Aufschwemmungen gespritzten Mäusen waren keine Bakterien mehr zu sehen.

Bei der histologischen Untersuchung zeigte sich zur Überraschung, daß zu einer ausgesprochenen Phagocytose in Leber und Milz sich eine sehr starke Phagocytose der Endothelien der Lungencapillaren hinzugesellt hatte. Es lagen allerdings außerdem auch Bakterien noch in der Lichtung der Capillaren entweder frei oder in Leukocyten eingeschlossen. Bei den Mäusen, die mit größter Dosis gespritzt worden waren, waren auch zahlreiche Capillarembolien zu beobachten. Außerdem fanden sich reichlich Staphylokokken in den Glomeruli teilweise frei in der Lichtung, häufig aber auch in Endothelzellen, weiter auch in Endothelien von Capillaren zwischen den Harnkanälchen und vereinzelt in Endothelien von Capillaren des Herzmuskels und des Gehirns.

Um einwandfreie und schöne Bilder zu bekommen, darf man nicht zu große Dosen spritzen. Die Bakterien müssen fein verteilt in der Lösung und dürfen nicht verklumpt sein; außerdem ist die Injektion sehr langsam zu machen, damit es nicht zu starken Überladungen der Lungen und durch viele Embolien zu unklaren Bildern kommt.

Diese Befunde stimmen mit den Untersuchungen der Autoren überein, die der Lunge eine bedeutende Rolle bei der Phagocytose zuerkennen wollen. Und jetzt erklären sich vielleicht auch die gegenteiligen Ansichten. Bei der Injektion von kleinen Dosen findet man die Bakterien hauptsächlich in der Leber und Milz, während sich bei Injektion größerer Dosen auch andere Capillargebiete besonders aber die Lunge an der Phagocytose beteiligen. Da nun bei jeder intravenösen Einspritzung die Kokken zunächst in die Lunge kommen und eine Phagocytose da aber nur bei Einspritzung größerer Mengen beobachtet wird, muß man wohl annehmen, daß diese Endothelien in kurzer Zeit auf einen Reiz hin ihre Oberflächeneigenschaften so geändert haben, daß sie in Funktion treten und Bakterien aufnehmen können.

Die Frage der Phagocytose in den Lungencapillaren ist aber stark umstritten (vergleiche vor allem *Seemann*) und die histologischen Bilder sind in der Tat schwer zu deuten, da neben phagocytierten Kokken auch frei in der Lichtung liegende und in Leukocyten phagocytierte Kokken gefunden waren.

Die Verschleppung von mit Kokken beladenen Histiocyten in die Lunge, die bei anderer Versuchsanwendung sicher auch eine Rolle spielt, dürfte bei meinen Versuchen, in denen die Tiere immer wenige Minuten nach der Einspritzung getötet wurden, kaum in Betracht kommen. Das histologische Bild der Alveolarwand der Lunge ist auch so wenig klar und übersichtlich, daß man bei bestimmten Bildern nicht immer mit Sicherheit entscheiden kann, ob die Kokken in Gefäßwandzellen liegen oder in Leukocyten oder nur frei in der Lichtung der Capillaren, deshalb sollten durch nachträgliche Ausspülung der Lungengefäße klare Verhältnisse geschaffen werden.

Es wurden Mäuse mit 1 ccm einer Staphylokokkenaufschwemmung von mittlerer Konzentration gespritzt und dieselben nach 20 Min. mit Ringerlösung durchspült. In die Schenkelvene des einen Beines wurde Ringerlösung injiziert und die Schenkelarterie des anderen Beines aufgeschnitten. So wird das Blut möglichst weitgehend verdünnt. Dann wurde das noch schlagende Herz der Maus freigelegt und durch den rechten Ventrikel in die Arteria pulmonalis Ringerlösung injiziert, der linke Ventrikel durch einen Schnitt eröffnet und so die Lunge blutfrei gespült. Um die Capillaren zu dehnen und dadurch übersichtlicher zu machen, ließ ich O_2 ebenfalls vom rechten Herzen aus unter geringem Druck in die Arteria pulmonalis einströmen und spritzte dann 4%ige Formalinlösung ebenfalls in die Pulmonalis nach. Makroskopisch war die Lunge ganz weiß geworden. Mikroskopisch zeigte sich, daß die Lungen fast völlig blutleer gespült waren. Es lagen keine Bakterien mehr frei oder in Leukocyten eingeschlossen in den gedehnten und übersichtlichen Capillaren. Vereinzelt fand sich noch ein Leukocyt in den Capillaren, der aber nicht phagocytiert hatte. Die Endothelien waren deutlich zu erkennen und hatten zahlreiche Staphylokokken aufgenommen. In solchen Präparaten ist dann ganz klar und deutlich zu sehen, daß die Endothelien der Lungencapillaren sehr lebhaft Kokken phagocytieren können. Es hatten allerdings nicht alle Endothelien gleichmäßig Kokken aufgenommen, so daß Stellen mit stärkerer Phagocytose mit solchen, die schwächer phagocytiert hatten, abwechselten. Die Capillaren waren gedehnt und übersichtlich, eingeschwemmte Histiocyten waren nicht vorhanden, da sie bei der Durchspülung hätten mit ausgeschwemmt werden müssen.

Aus diesen Befunden ergab sich die Frage, durch welchen Reiz die Endothelien der Lungencapillaren zur Phagocytose angeregt werden und ob sie bei bestimmten Einwirkungen schon nach Einspritzung kleiner

Kokkenmengen sich schon so verhalten können, wie sonst nur die Reticuloendothelien in engerem Sinne.

Domagk fand bei sensibilisierten Tieren eine hochgradig gesteigerte Phagocytose intravenös eingespritzter Staphylokokken von seiten sämtlicher Capillarendothelien, besonders auch in der Lunge. Sehr schön kommt auch die gesteigerte phagocytäre Tätigkeit des sensibilisierten Tieres gegenüber der Wiedereinführung des spezifischen Antigens in den Versuchen *Oellers* und *Gerlachs* über die Verarbeitung artfremden Blutes zur Geltung. *Siegmund* berichtet über erhebliche Vermehrung von Zellen des reticuloendothelialen Systems beim Immuntier und *Dietrich* und *Siegmund* haben in ihren Arbeiten über Thrombose und Herzklappenentzündung die starke Reaktionsfähigkeit von Endothelien sensibilisierter Tiere gezeigt.

Da bei der Injektion großer Dosen von Bakterien in die Blutbahn unvorbehandelter Mäuse ebenfalls Auftreten von Phagocytose in sonst nur in geringem Maße phagocytierenden Capillargebieten festgestellt war, konnte die Steigerung der phagocytierenden Tätigkeit der Lungen und Nierenendothelien bei sensibilisierten Tieren nur dann bewiesen werden, wenn sich bei Einspritzung kleiner Kokkenmengen bei sensibilisierten und unvorbehandelten Tieren deutliche Unterschiede zeigten.

Es wurden also Mäuse mit Staphylokokken, die durch Erhitzen auf 60° abgetötet waren, vorbehandelt, und zwar in Abständen von 5 Tagen mit einer ansteigenden Menge von Bakterien zunächst 3mal subcutan, dann 2mal intraperitoneal und schließlich 1mal intravenös geimpft. Nach einer Pause von 8 Tagen erfolgte eine Einspritzung von 0,8 ccm einer nicht zu dichten Aufschwemmung lebender Staphylokokken in die Schenkelvene. Die gleiche Einspritzung erhielten die Kontrolltiere. 8 Min. nach der Einspritzung wurden die Tiere getötet. Beim Vergleich der Präparate der unvorbehandelten Mäuse mit denen der sensibilisierten ergab sich, daß die Bakterien bei den unvorbehandelten Mäusen wie gewöhnlich hauptsächlich in der Leber und Milz sich befanden, während die Endothelien der Lungencapillaren nur wenig phagocytiert hatten. Dagegen hatten bei den sensibilisierten Tieren die Endothelien der Lungencapillaren sehr stark phagocytiert und in den Reticuloendothelien fanden sich nur wenige Kokken, da ein großer Teil schon von den Lungenendothelien abgefangen worden war. Es tritt also eine Aktivierung sonst nicht phagocytierender Endothelien ein. Die Endothelien schienen auch vergrößert zu sein. Außerdem sah man überall in der Leber und Lunge das vor allem von *Siegmund* beschriebene Bild von Zellansammlung, hauptsächlich Lymph- und Plasmazellen, besonders um die kleineren Gefäße, wie man es bei sensibilisierten Tieren antrifft. Sehr schöne Bilder von Phagocytose in den Glomerulendothelien, den Endothelien der Capillaren zwischen den Harnkanälchen ergaben sich, wenn die sensibilisierten Tiere bei der Erfolgsinjektion mit einer großen

Menge Staphylokokken gespritzt wurden und bis zum Tode 20 Min. gewartet wurde. In diesem Falle fand sich auch eine deutlich vermehrte Kokkenphagocytose der Endothelien des Herzmuskels und des Gehirns.

Auch hier wurden bei einzelnen Mäusen die Lungen durchspült und gedehnt. Einwandfrei konnte man dann feststellen, daß es Capillarendothelien waren, die in ausgedehntem Maße in der Lunge phagocytiert hatten.

Beim anaphylaktischen Tier sind die Endothelien aller Capillargebiete geschwollen. So glaubt *Domagk*, daß der Tod von Mäusen im anaphylaktischen Shock wesentlich durch starke Schwellung der Lungencapillarendothelien und der damit einhergehenden Verlegung und Verengerung der Capillaren bedingt sei. *Dietrich* und *Siegmund* haben eine sehr starke Reaktionsfähigkeit des Endothels bei mit Eiweiß sensibilisierten Tieren festgestellt. Da es sicher ähnliche Reaktionen sind, wie die, welche man durch Sensibilisieren mit Bakterien erhält, so sollte versucht werden, ob durch Vorbehandlung mit einfachem Eiweiß die Endothelien, die sonst nur unwesentlich phagocytieren, die Fähigkeit erhalten, bei einer einmaligen Injektion mit einer kleinen Dosis Staphylokokken diese in erhöhtem Maße aufzunehmen.

Die Mäuse sollten also unspezifisch sensibilisiert werden, um dann vielleicht ähnliche Phagocytosebilder zu erhalten, wie bei spezifisch vorbehandelten Tieren.

Es wurden Mäuse in Abständen von 5 Tagen 3mal subcutan, 3mal intraperitoneal, einmal intravenös mit 0,01—0,1 Caseosan gespritzt. Nach einer Pause von 8 Tagen Einspritzung von 0,8 ccm einer Staphylokokkenaufschwemmung von mittlerer Dichte in die Schenkelvene. Unvorbehandelte Kontrolltiere erhielten dieselbe Einspritzung. Tötung nach 8 Min.

Bei den vorbehandelten Tieren waren die Staphylokokken in viel stärkerem Maße in den Endothelien der Lungencapillaren phagocytiert worden als bei den unvorbehandelten Mäusen. In der Leber fanden sich nicht so reichlich Bakterien, da sie von den Lungen in stärkerem Maße abgefangen waren als beim normalen Tier. Die Endothelien der Lungencapillaren waren vergrößert, die Septen waren zellreich und verbreitert. Ebenfalls waren die *Kupfferschen* Sternzellen, die Endothelien der Nieren, Herz und Gehirncapillaren geschwollen. Sonst sah man sehr schön die bei sensibilisierten Tieren bekannten Infiltrationen und Zellansammlungen.

Wurden derartig sensibilisierte Mäuse mit einer großen Dosis Staphylokokken gespritzt und nach einer Zeit von 20 Min. getötet, so erhielt man außer der Phagocytose in Leber und Milz in dem Capillargebiet der Lungen, der Nieren, des Herzens und des Gehirns in absteigender Reihe ausgezeichnete Bilder von Phagocytose. Besonders die Lungenendothelien hatten in hervorragendem Maße phagocytiert, so daß in der Lunge

mehr Bakterien in den Endothelien aufgenommen worden waren als in den *Kupfferschen* Sternzellen der Leber. Es erlangen also auch durch Sensibilisierung mit gewöhnlichem Eiweiß die Capillarendothelien des Organismus die Fähigkeit Bakterien aufzunehmen. Und zwar ergaben sich eindrucksvollere Bilder, als wenn man Mäuse mit Staphylokokken spezifisch vorbehandelt hat, da bei spezifischer Sensibilisierung eine Schädigung durch Staphylokokkentoxine nicht zu vermeiden ist.

Auch wurden verschiedene Lungen von mit Caseosan vorbehandelten Mäusen, denen Kokken injiziert worden waren, mit Ringerlösung durchspült und gedeht. Die Verhältnisse wurden dadurch übersichtlich und einwandfrei lagen die Kokken zum größten Teil in den Capillarendothelien.

Nun war noch festzustellen, ob die phagocytierenden Endothelien dieser sensibilisierten Mäuse auch die Bakterien ebenso vernichten können, wie die *Kupfferschen* Sternzellen und die Reticuloendothelien der Milz.

Zwei mit Caseosan sensibilisierte Mäuse wurden mit einer mittleren Dosis vollvirulenter Staphylokokken intravenös gespritzt. Die eine Maus wurde getötet und festgestellt, daß zahlreiche Lungen, Leber und Milz, vereinzelt auch Glomerulusendothelien Bakterien aufgenommen hatten. Das andere Tier wurde nach 3 Wochen getötet. Es magerte erst ab, fraß nicht und lag schwer krank mit struppigem Fell in seinem Lager. Nach 10 Tagen erholte es sich, fraß wieder, nahm sichtlich an Gewicht zu, das Fell wurde wieder glatt und gepflegt. In keinem Organ waren pathologische Befunde festzustellen. Die Maus hatte die Infektion vollständig überwunden. Auch die Endothelien der Capillaren, die nicht zu dem eigentlichen reticuloendothelialen System gehören, hatten also die Staphylokokken verdaut. Besonders erstaunlich war, daß die Lunge keine Erscheinungen bot, da doch gerade in ihr reichlich Bakterien durch die Capillarendothelien phagocytiert worden waren. Bei diesen Ergebnissen bleibt allerdings zu bedenken, daß die verwandte Staphylokokkenkultur vielleicht für Mäuse nicht wesentlich pathogen war.

Zusammenfassung.

1. Es gelingt, Bakterien durch Säure, dreiwertige Metallsalze, wie AlCl_3 und FeCl_3 und positive basische Anilinfarbstoffe umzuladen. Diese positiven Aufladungen verschwinden wieder, wenn man die Lösungen stark verdünnt oder die Bakterien aus den Lösungen wieder auswäscht. Vorbehandelte und ausgewaschene Bakterien haben aber sicher durch feste Adsorption oder chemische Bindung ihre Ladung verändert; trotzdem wandern solche Bakterien im Serum zur Anode. Vorbehandelte Bakterien mit veränderter (herabgesetzter) Ladung werden nicht an anderen Stellen und ungefähr in derselben Zeit phagocytiert wie unvorbehandelte Bakterien.

2. Bei Einspritzung kleiner Mengen von Bakterien findet man diese hauptsächlich in den Reticuloendothelien der Leber und Milz wieder,

die Endothelien der Lungencapillaren nehmen auch in geringem Ausmaße Bakterien auf, vereinzelt auch Endothelien in den Glomeruluschlingen der Niere. Bei Injektion großer Dosen erstreckt sich die Phagocytose auch auf andere Capillargebiete, hauptsächlich auf die Lungen, in geringem Maße die Nieren, den Herzmuskel und das Gehirn.

3. Behandelt man Mäuse spezifisch oder auch unspezifisch mit Eiweiß vor, so erlangen auch Capillarendothelien, die gewöhnlich nicht zum Reticuloendothel gezählt werden, die Fähigkeit zur Phagocytose. Besonders stark nehmen die Lungencapillarendothelien bei Zufuhr die Bakterien auf, in absteigendem Maße aber auch Nieren-, Herz- und Gehirncapillarendothelien. Diese Endothelien können, ähnlich wie die Reticuloendothelien der Leber und Milz, die Bakterien vernichten.

4. Die Ausdehnung der Phagocytose über das Gebiet des eigentlichen reticuloendothelialen Systems kann daher nicht Folge einer Änderung der Bakterienladung sein, sondern beruht auf einer Änderung der phagocytierenden Endothelien. Ob der Ladungssinn mit der Phagocytose irgend etwas zu tun hat, kann nach den Versuchsergebnissen nicht entschieden werden.

Schrifttum.

- Aschoff*: Erg. inn. Med. **26**, 1 (1924). — *Beckhold*: Z. physik. Chem. **48**, 385 (1904). — *Boerner-Patzelt*: Z. exper. Med. **34**, 336 (1923). — *Buxton u. Shaffer*: Z. physik. Chem. **57**, 59 (1907). — *Dietrich, A.*: Verh. 37. Kongr. dtsh. Ges. inn. Med. Wiesbaden **1925**; Z. exper. Med. **50**, 85 (1926). — *Dietrich A. u. Kurt Schröder*: Virchows Arch. **244**, 425 (1929). — *Domagk*: Virchows Arch. **253**, 594 (1924). — *Freundlich*: Z. physik. Chem. **44**, 143 (1903). — Capillarchemie, 3. Aufl., S. 284. Leipzig 1923. — *Freundlich u. Abramson*: Z. physik. Chem. **133**, 51 (1928). — *Gerlach u. Finkeldey*: Verh. path. Ges. 21. Tagg **1926**, 173. — *Höber*: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, S. 190. 6. Aufl., Leipzig 1926. — *Jungeblut*: Erg. Hyg. **11**, 1 (1930). — *Keller, R.*: Biochem. Z. **1922**, Nr 128, 418. — *Kolle u. Wassermann*: Handbuch für pathogene Mikroorganismen, Bd. 11, S. 109. — *Liesegang*: Biologische Kolloidchemie, S. 65. 1928. — *Michaelis*: Praktikum der physikalischen Chemie, insbesondere der Kolloidchemie. Berlin 1922. — *Oeller*: Dtsch. med. Wschr. **1924**, Nr 11, 357. — *Ponder*: Protoplasma. Internat. Z. phys. Chem. Protoplasma **3**, 611 (1928). — *Püschel*: Untersuchungen über die Änderung der elektrischen Ladung von Bakterienaufschwemmungen. Krkh.forsch. **9**, 43 (1931). — *Schmidtman, M.*: Z. exper. Med. **45**, 714 (1925). — *Seemann*: Histobiologie der Lungenalveole. Jena: Gustav Fischer 1931. — *Siegmund, H.*: Verh. dtsh. path. Ges. **20**, 125 (1925).