

(Aus dem Institute für allgemeine Pathologie und Therapie
der Kgl. ung. Franz Josef-Universität in Szeged, Ungarn
[Direktor: o. ö. Professor Dr. A. v. Jeney].)

Weitere Beobachtungen an den blutbildenden Organen in Gewebekulturen¹.

Von

Prof. Dr. A. v. Jeney.

Mit 5 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 3. Juli 1933.)

Über meine Erfahrungen bei ähnlichen Versuchen hatte ich Gelegenheit zuerst in Paris gelegentlich der Tagung des Mikrobiologenkongresses, ferner im Jahre 1932 vor der Ungarischen Physiologischen Gesellschaft zu berichten. Nach meinen bisher mitgeteilten Schlußfolgerungen schien bei derartigen Versuchen am überlebenden Organ der Nachweis des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Entwicklung der Blutzellen bloß bis zum Stadium der Normoblasten gelingen zu wollen. Bei Anämien wurde durch wirksame Leberpräparate die Bildung der primitiven Blutzellen, durch alkoholische Milzextrakte — in Gegenwart von Bilirubin und Eisenverbindungen — die Entwicklung der Normoblasten sichtlich gefördert. Es erschien mir auch wahrscheinlich, daß man zur Züchtung der reifen roten Blutkörper der Mitwirkung eines neueren chemischen Faktors bedarf und ich rechnete ferner auch mit der Möglichkeit, daß die verwendeten Versuchseinrichtungen im übrigen etwa ungünstig auf die Entwicklung der roten Blutkörper einwirken könnten. Diese letztere Annahme schien in erster Linie deshalb berechtigt, da es auch bei den der Kontrolle dienenden Knochenmarkstückchen zu den seltenen Erscheinungen gehörte, daß nach einer Inkubation von 48 Stunden normale Erythrocyten in größeren Gruppen zu sehen waren. Alle Anzeichen sprachen für die Mitbeteiligung eines hämolytischen Vorganges; in den blutbildenden Organen waren meist bloß die Trümmer der roten Blutkörper innerhalb der Makrophagen zu finden.

Auch bei unseren Versuchen am überlebenden Organ zeigte sich in besonders regelmäßiger und auffallender Weise die fördernde Wirkung auf die Blutbildung bei artgleichem Hämoglobin (s. Abb. 1b und 2). Es

¹ Die Versuche wurden mit Hilfe der *Rockefeller-Stiftung* ausgeführt.

war daher angezeigt, die Wirkung jener Stoffe und deren Derivate, die durch die Spaltung des Hämoglobinmoleküls entstehen, an der Hand von ähnlichen Organversuchen zu erforschen. Bei meinen Versuchen verwendete ich auch jetzt Kaninchenorgane, hauptsächlich das Knochenmark.

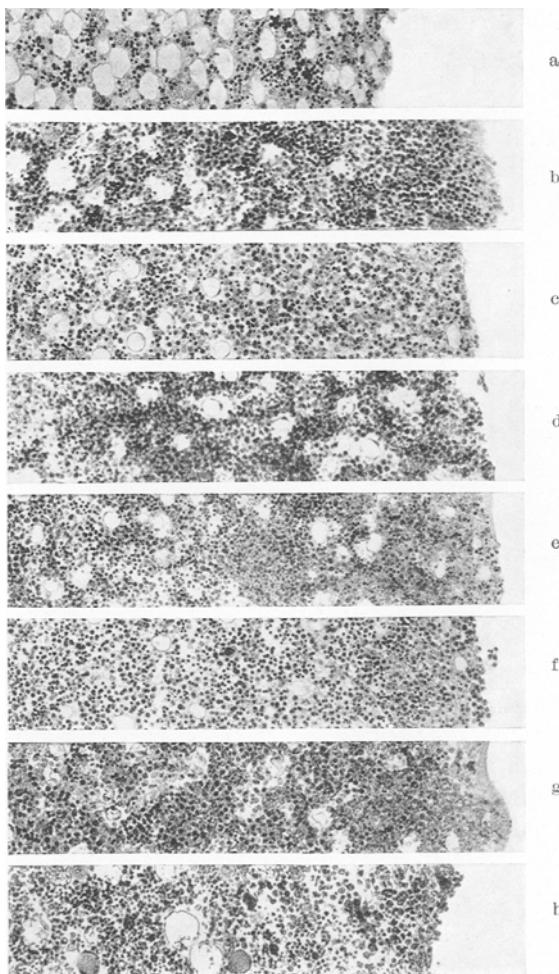


Abb. 1. Knochenmarkstückchen nach 48 Stunden. a Kontrolle. b Hämoglobinbehandlung. c Histidin und Ferrochlorid. d Histidin und Arginin. e Histidin und Leucin. f Histidin und Cystin. g Histidin und Tryptophan. h Pyrrol und Globin.

Die sterilen Organteilchen wurden in heparinhaltiges Eigenplasma gebracht, welches mit Tyrodelösung zweimal verdünnt war. Vorher waren in die einzelnen Reagensröhrchen verschiedene Hämoglobinbestandteile und Derivate gesetzt worden. Die Organteilchen blieben

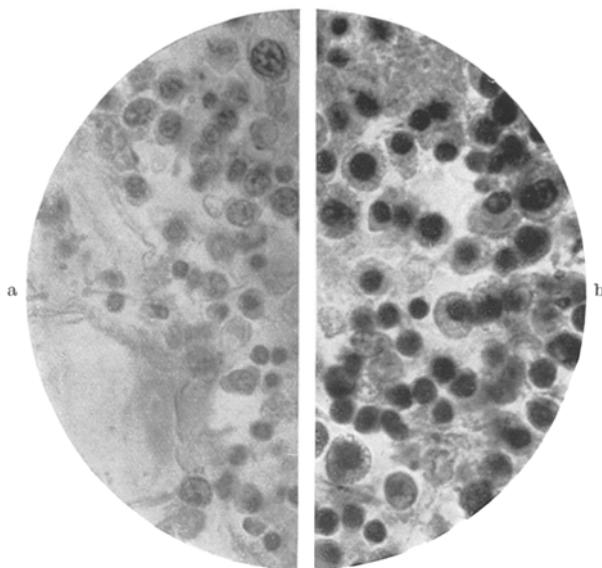


Abb. 2. Knochenmarkstückchen nach 48 Stunden. a Kontrolle. b Hämoglobinbehandlung.

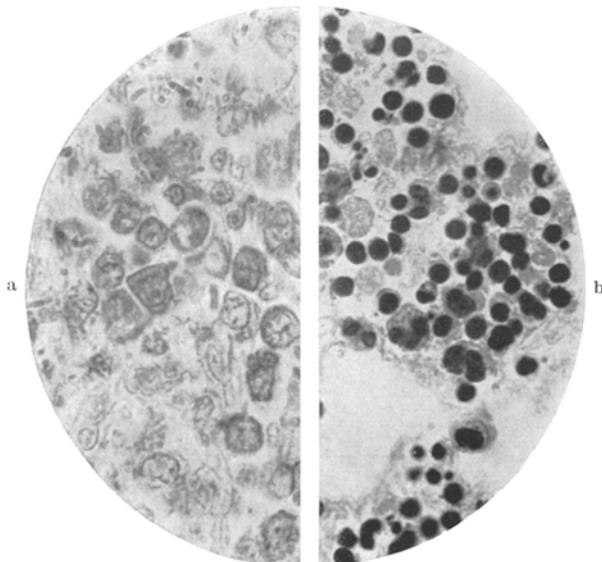


Abb. 3. Knochenmarkstückchen nach 48 Stunden. a Die Wirkung von Globin. b Die Wirkung von Hämatin.

48 Stunden hindurch bei $37,5^{\circ}\text{C}$, wurden dann in Formalin fixiert und histologisch untersucht.

Die Wirkung des eisenfreien Eiweißes des Hämoglobins und jene des eisenhaltigen Blutfarbstoffes wurden getrennt voneinander untersucht. Aus dem im Handel erhältlichen Hämoglobin konnten wir selbst das Globin und Hämatin herstellen. Zwischen der Wirkungsweise dieser beiden Stoffe zeigte sich bei meinen Versuchen ein scharfer Unterschied (s. Abb. 3).

Globinwirkung. Die Ränder des Knochenmarkstückchens sind zellreich. Die Stelle der ursprünglich vorhanden gewesenen verschiedenen Blutzellen wird hauptsächlich — stellenweise sogar sozusagen ausschließlich — durch junge Blutzellen, durch „große primitive Lymphocyten, eingenommen. Myeloblasten und Myelocyten sind bloß in geringerer Menge zu sehen, ganz vereinzelt finden sich auch Normoblasten. In zahlreichen Reticulumzellen findet sich grünes Pigment. Die polynukleären Leukocyten sind in das Plasma ausgewandert. Diese Wirkung erinnert im wesentlichen an jene der Leberextrakte, worüber ich vor 1 Jahre berichtete.

Hämatinwirkung. In dem Knochenmarkstückchen von mittlerem Zellreichtum sind jugendliche Blutzellen kaum zu sehen. Neben wenigen eosinophilen Myelocyten und normalen roten Blutkörpern finden sich vornehmlich Normoblasten mit pyknotischem Kern. Die farblosen Zell-elemente zeigen Fragmentation.

Gemeinsame Globin- und Hämatinwirkung. In dem Organstückchen sind ziemlich viel „primitive große Lymphocyten“, weniger Myeloblasten und Normoblasten anzutreffen. Ähnlich gestaltete sich der Befund, wenn wir statt Hämatin Hämin verwendeten.

Die Rolle des *Hämatoporphyrins* wurde ebenfalls näher untersucht. Dies erschien um so notwendiger, als Porphyrin, wenn auch in kleinen Mengen, am Orte der Hämoglobinbildung im Knochenmark fast immer vorkommt und nach *H. Fischer* nicht als Spaltungsprodukt des Hämoglobins, sondern bei dessen Aufbau als intermediäres Produkt eine Rolle spielt. Das Auftreten des Porphyrins im Harn wurde von mehreren Autoren mit der Störung der Hämoglobinbildung in Zusammenhang gebracht, z. B. *Duesberg* bei der Bleivergiftung der Kaninchen. Nach *Schreus* und *Carriè* soll in der Leber in beschränkter Menge ein Stoff vorhanden sein, mit dessen Hilfe der Leberbrei imstande sei, das Porphyrin aus dem Harn zu entfernen. Die Wirksamkeit des sog. „Leberstoffes“ bei Anämien könnte demnach auch auf diese Weise zu erklären sein.

Wirkung des *Hämatoporphyrins* (*Schuchardt*). Das Organstückchen zeigt mittleren Zellreichtum. Die granulopoetischen Elemente sind darin vermindert und auch diese geringe Menge zeigt Fragmentation. Ziemlich viel Normoblasten, an den Rändern fallen eosinophile Myelocyten in größerer Zahl auf. Verhältnismäßig ziemlich viel reife Erythrocyten in kleineren Gruppen und unter den übrigen Zellen verstreut. Im Protoplasma eines Teiles dieser kann man auch basophile Gebiete erkennen,

man ist somit zu der Annahme berechtigt, daß es sich hier um frisch gebildete rote Blutkörperchen handelt.

Wird neben dem Hämatoporphyrin auch noch *Ferrochlorid* verwendet, dann zeigt das Organstückchen stärkeren Zellreichtum. Unter den Zellen finden sich mehr Normoblasten, diese sind stärker entwickelt, ihre Kerne sind deutlicher pyknotisch.

Wird das Plasma außer mit den beiden eben genannten Stoffen auch noch mit *Globin* vermengt, dann kommt es insofern zu einer Veränderung, daß die Zahl der Normoblasten abnimmt und daß außer den Myeloblasten auch noch primitive Blutzellen in reichlicher Menge anzutreffen sind. Globin führt demnach auch hier die Bildung der jugendlichen Zellen herbei. Reife rote Blutkörperchen finden sich bloß in geringer Anzahl; dies ist um so auffallender, da hier die Bedingungen zur Resynthese des Hämoglobinmoleküls besonders günstig erscheinen, denn es ist doch auch überschüssiges Eisen vorhanden. Das Globinmolekül ist bekanntlich mit Hilfe des Eisenatoms an den Farbstoffkomponenten gebunden. Es wäre noch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das verwendete Globin während der Herstellung oder Lagerung eine Denaturisierung erfahren habe, was nach *Hill* und *Holden* sehr leicht eintreffen kann. Diesen Forschern war die Hämoglobinresynthese auch nur mit Globin im nativen Zustand gelungen. Die wichtige Rolle des Globins erhellt auch aus dem Umstand, daß dieses den artspezifischen Bestandteil des Hämoglobins darstellt, während der Farbstoffkomponent — das Protohämin — bei allen höherstehenden Lebewesen derselbe ist (*Haurowitz*). *Hári* und seine Schule fand auch einen Unterschied in der chemischen Zusammensetzung der Globinmoleküle verschiedener Herkunft.

Wenn man nun im *Globin* den Träger der Artspezifität des Hämoglobinmoleküls zu erblicken hat, dann wirft sich die Frage auf, wie die Aminosäuren, aus denen das Globin besteht, auf die blutbildenden Organe wirken.

Das *Globin* ist bekanntlich ein labiles Albumin, dessen isoelektrischer Punkt bei $p_H = 7,0$ liegt. Seine Bindung im Hämoglobin- und Oxyhämoglobinmolekül ist fester als im Methämoglobin. Unter den an seinem Aufbau beteiligten Aminosäuren sind in auffallender Menge vorhanden: Leucin (29%) und Histidin (11%). Von anderen bekannten Eiweißverbindungen weicht es insbesondere durch seinen hohen Histidin gehalt ab. Auffallend ist ferner noch, daß im Globinmolekül das Leucin und die sog. Hexonbasen (Arginin, Lysin, Histidin) 49,7% sämtlicher Aminosäuren betragen. Es war nun interessant feststellen zu können, daß wir — mit Ausnahme des Lysins — eben mit den genannten Aminosäuren die auffallendsten Ergebnisse erzielen konnten.

Leucinwirkung. Das Organstückchen zeigt stärkeren Zellreichtum. An der einen Seite sieht man in der Form einer breiten Schicht und auch zwischen den Zellen verstreut in großer Zahl reife rote Blutkörper. Bei

einem großen Teil dieser zeigt das Protoplasma dunklere Färbung und enthält auch basophile Elemente.

Isoleucinwirkung. In dem etwas zellreicherem Organstückchen finden sich untereinander vermengt Normoblasten und granulopoetische Elemente. Im Inneren sieht man hämolytische Flecke mit zerfallenden Erythrocyten. Normale, reife rote Blutkörper sind nicht zu sehen.

Auffallender war die Wirkung des Arginins und Histidins.

Argininwirkung. An den Rändern des ziemlich zellreichen Schnittes finden sich unzählige normale rote Blutkörper. Die erythropoetischen

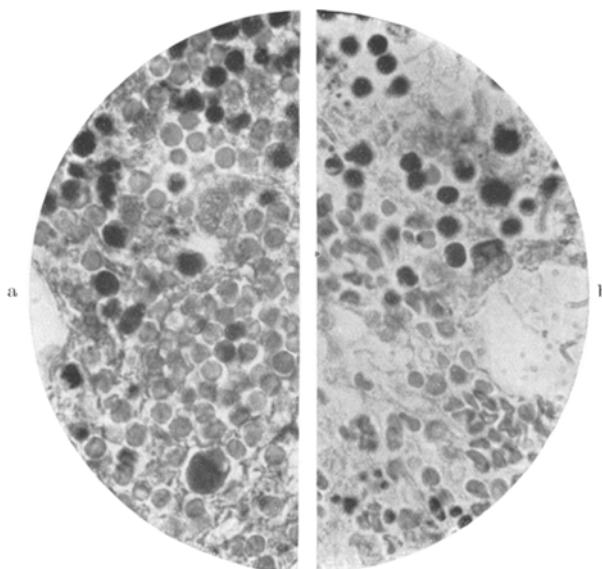


Abb. 4. Knochenmarkstückchen nach 48 Stunden. a Die Wirkung von Arginin. b Die Wirkung von Histidin.

Elemente sind auch sonst in der Überzahl (s. Abb. 4a). In einem Schnitte, der nach der Verwendung von Arginin und Hämatin hergestellt worden war, kann man an einer Stelle des ziemlich zellreichen Präparates auch bei schwacher Vergrößerung deutlich einen roten Fleck erkennen, der durchwegs aus roten Blutkörperchen besteht. Ein großer Teil der letzteren enthält auch basophile Elemente.

Ähnliche Erscheinungen sind bei der *Histidinwirkung* noch häufiger anzutreffen. Ein auf diese Weise behandeltes Knochenmarkpräparat z. B. enthält kaum granulopoetische Elemente, sondern bloß Normoblasten und Erythrocyten. Auffallend ist (insbesondere an den Rändern) die große Zahl von normalen Erythrocyten, zum Teil mit basophilem Protoplasma. Bei einigen von diesen kann man eben die Lösung vom Kern beobachten; dabei finden sich ziemlich viel in Teilung

begriffene Normoblasten. Unter den roten Blutkörpern lassen viele die Pessarform erkennen, einige zeigen grünliche Schattierung bei der Färbung mit Methylenblau-Eosin (s. Abb. 4b).

Sehr zellreich sind die Präparate bei der gemeinsamen Verwendung von *Histidin* und *Ferrochlorid*. Neben den vielen Normoblasten kann man auf der einen Seite in größeren Gruppen angeordnete normale, reife rote Blutkörper erkennen. Im Vergleiche zu dem ursprünglichen Organstückchen finden sich in diesen Schnitten weniger eosinophile Myelocyten. In den Reticulumzellen sieht man viel grünliches Pigment (s. Abb. 1c).

Wird *Histidin* zugleich mit *Arginin* verwendet, dann zeigt das Organstückchen starken Zellreichtum: neben zahllosen Normo- und Megaloblasten finden sich viel pessarförmige rote Blutkörper, zum Teil mit basophillem Protoplasma (s. Abb. 1d).

Besonders zellreich gestalteten sich die Präparate bei der gleichzeitigen Verwendung von *Histidin* und *Leucin*. Neben zahlreichen gut entwickelten Normoblasten an den Rändern des Präparates sieht man (insbesondere auf der einen Seite) sehr viel reife rote Blutkörper, zum Teil in Gruppen angeordnet, zum Teil unter die fixen Elemente verstreut. Die Zahl der eosinophilen Myelocyten ist im Vergleiche zum unbeeinflußten Zustand vermindert. Auffallend viel grünes Pigment enthalten die reticuloendothelialen Elemente (s. Abb. 1e).

Bei der gleichzeitigen Verwendung von *Histidin* und *Cystin* zeigte das Organstückchen ebenfalls außerordentlich starken Zellreichtum (s. Abb. 1f.). Dies ist um so auffallender, da Cystin bekanntlich im Globinmolekül nicht enthalten ist. In neuerer Zeit wurde allerdings das Vorkommen einer S enthaltenden Verbindung im Eiweiß, das *Thiohistidin*, beschrieben, welches die Vorstufe des auch im menschlichen Blute in geringer Menge vorkommenden schwefelhaltigen *Ergothionein* sein soll. In unserem Versuche fanden sich auf die gemeinsame Einwirkung von Histidin und Cystin verhältnismäßig viel gut entwickelte Normoblasten mit breitem Protoplasma und etwas mehr eosinophile Myelocyten als gewöhnlich. Man kann sich auch vorstellen, daß das Cystin als H⁻-Acceptor durch die Förderung der Gewebsatmung wirkt.

Zu erwähnen ist noch, daß die gleichzeitige Verwendung von *Histidin* und *Ornithin* im überlebenden Milzstückchen die Entstehung einer großen Menge von grün umränderten, nadelförmigen, braunen Krystallen (Hämatoïdin) herbeiführt, die zum Teil intracellulär, zum Teil außerhalb der Zellen in kleineren Gruppen angeordnet liegen.

Die Wirkung der dritten der erwähnten Hexonbasen, des *Lysins*, war nicht so auffallend. In den etwas zellreicherem Organstückchen sind neben Myelo- und Normoblasten verhältnismäßig viel „primitive große Lymphocyten“ zu sehen. Die im Innern des Organstückchens sichtbaren hämolytischen Flecke erklären den Umstand, daß die reifen roten Blutkörper fehlen.

Bei unseren genügend oft wiederholten Versuchen fanden wir in keinem Falle normale rote Blutkörper in so großer Zahl wie bei der gleichzeitigen Behandlung mit *Histidin* und *Arginin*. Bei dem Versuche diese Erscheinung zu erklären, hat man mit dem Umstande zu rechnen, daß diese Aminosäuren den Zerfall der im Knochenmark ursprünglich vorhandenen normalen reifen roten Blutkörper verhindern, da ein Blutkörperchenzerfall auch bei Kontrollversuchen ziemlich häufig zu beobachten ist. Es könnte sein, daß sie als basische Stoffe etwa durch die Beeinflussung der chemischen Reaktion ihre Wirkung ausüben. Es ist jedoch auffallend, daß die Gruppen der normalen Erythrocyten an den Rändern der Organstückchen, oft bloß auf einer Seite, erscheinen. Noch auffallender ist der Umstand, daß im Protoplasma dieser roten Blutkörper stets auch basophile Elemente zu sehen sind (Zeichen der Jugendform). Insbesondere das *Histidin* scheint eine wichtige Rolle zu spielen, da von diesem bloß noch die Protamine soviel enthalten, wie das Globin. Auch *Küster* schrieb (1926) dem Histidinmolekül bei der Zusammensetzung des Globins eine spezifische Eigenschaft zu. Er nahm an, daß die Bindung des „*Hämins*“ an das Globin mit Hilfe des Histidin gehaltes des letzteren bewerkstelligt werde. Dies könnte vielleicht auch die kräftige Wirkung des „*Ferrohistidins*“ erklären. Die Rolle des Histidins bei der Behandlung der Anämien wurde in neuester Zeit von mehreren Forschern untersucht. *Fontès* und *Thivolle* (1930) verabreichten Hunden und Kaninchen täglich 200 mg Histidin und erzielten damit eine Zunahme der Hämoglobinwerte, sowie der Erythrocytenzahl. Auch mit *Tryptophan* gelangten diese Forscher zu günstigen Ergebnissen. Nach ihrer Meinung dürfte das Histidin bei dem Aufbau des Globins, das Tryptophan bei dem Aufbau des Pyrrolkernes des Hämatins die Rolle eines Bausteines spielen. Dieselben Autoren berichteten (1931) über einen Fall von perniziöser Anämie, den sie 30 Tage hindurch mit einer Tagesdosis von 100 mg Tryptophan und 200 mg Histidin mit glänzendem Erfolg behandelt hatten. Über ähnliche Heilerfolge berichten *Cuthbertson*, *J. Flemming* und *E. M. R. Stevenson* (1931), ferner *Ciampi* (1932). Die ersten neigen zu der Auffassung, daß die Wirkung des „Leberstoffes“ auf die darin enthaltenen Pyrrol- und Imidazolkerne zurückzuführen sei. Auf ähnliche Weise erklärt *Bergami* die Wirksamkeit seines Polypeptide enthaltenden Präparates „*Eparaema*“ (1931). Die genannten günstigen Ergebnisse konnten von *Fischer* und *Verzár* (1932) weder in bezug auf das Tryptophan noch auf das Histidin bestätigt werden, auch von Glutaminsäure, Oxyprolin und Pyrrolidincarbonsäure sahen sie keinen Erfolg. Bei denselben Versuchstieren erwies sich jedoch die perorale und subcutane Einverleibung von Bilirubin als wirksam.

Mit unseren Feststellungen scheinen im Einklang zu stehen die Mitteilungen von *Drabkin*, *L. David* und *H. H. Miller* (1931). Diese Autoren fanden nämlich nicht bloß das Histidin, sondern auch das Arginin wirksam.

Die Milchanämie der Ratten konnte nach der Behandlung mit diesen beiden Verbindungen günstig beeinflußt werden. Auch nach der Fütterung mit Arginin und Glutaminsäure kam es zu einer Steigerung der Hämoglobinbildung.

Leucin wirkt offenbar auf andere Weise als die Hexonbasen. *Fontès* und *Thivolle* sahen davon bloß vorübergehende Erfolge.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Drabkin*, *L. David* und *Miller*, ferner von *Dakin*, *West* und *Howe* konnten auch wir keinen Anhaltspunkt

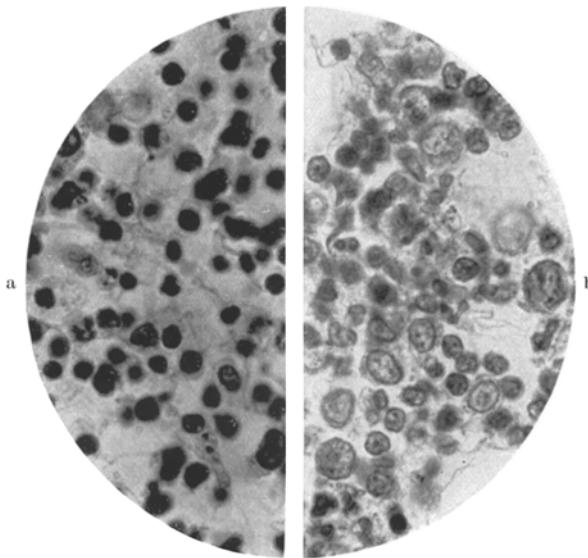


Abb. 5. Knochenmarkstückchen nach 48 Stunden. a Die Wirkung von Prolin. b Die Wirkung von Asparaginsäure:

für die blutbildende Fähigkeit der *Glutaminsäure* finden. Zu demselben Ergebnis gelangten bei der Milchanämie der Ratten *Elvekejeen*, *C. A. H. Steenboek* und *E. B. Hort*. Auch bei der Verwendung von *Tryptophan* blieben die Versuche dieser Forscher erfolglos, während *Fontès*, *Thivolle*, *Y. Kotake* und *Matsuo* dem *Tryptophan* eine günstige, die ersten sogar eine spezifische Wirkung zuschreiben. Bei einem unserer Versuche fiel uns dennoch der große Zellreichtum eines Knochenmarkstückchens auf, das mit *Histidin* und *Tryptophan* gleichzeitig behandelt worden war. Dieses Präparat zeigte zahlreiche Normo- und Megaloblasten, sowie die Fragmentation der granulopoetischen Elemente (s. Abb. 1g).

Auch bei der Verwendung von *Phenylalanin* konnten wir keine charakteristische Wirkung wahrnehmen. Auffallend war hingegen die Wirkung der *Asparaginsäure*. Nach der Behandlung der Organstückchen mit dieser waren in mehreren Versuchen bloß jugendliche granulopoetische

Elemente zu sehen. Die randständigen Teile ließen aus nadelförmigen Hämatoidinkristallen bestehende Rosetten erkennen (s. Abb. 5b).

Prolinwirkung. Das Knochenmark ist an den Rändern etwas zellreicher. Die Normoblasten sind im Vergleiche zu den Kontrollen deutlich vermehrt. Ziemlich viel Teilungsfiguren, jedoch bloß ganz vereinzelte normale reife rote Blutkörper (s. Abb. 5a).

Die Rolle des Prolins erweckte sehr bald das Interesse der Forscher, nachdem die Wirksamkeit der Leberpräparate auf die Anämien bekanntgeworden war. Der im Hämatoporphyrin und Bilirubin vorhandene Pyrrolkern enthält nämlich die Aminosäuren Prolin, Oxyprolin und Tryptophan. Nach *Dakin*, *West* und *Howe* soll unter den wirksamen Bestandteilen des „Leberstoffes“ neben der Glutaminsäure dem γ -Oxyprolin die größte Bedeutung zukommen. Von *Fontès* und *Thivolle* wird hingegen die Bedeutung des Prolins und Oxyprolins für die Blutbildung abgelehnt; sie fütterten ihre anämischen Versuchstiere mit Gelatine, ohne daß sich deren Zustand verbesserte, obwohl die Gelatine sowohl Prolin wie auch Oxyprolin enthält.

Die Rolle des Prolins und Tryptophans bei der Blutbildung ließe sich feststellen, wenn es gelänge nachzuweisen, daß diese Aminosäuren mit Hilfe ihres Pyrrolkernes an dem Aufbau des eisenhaltigen Farbstoffkomponenten des Hämoglobins beteiligt sind. Es erschien demnach als wichtig, als nächstes die Frage zu lösen, inwiefern die Blutbildung bzw. die Synthese des Blutfarbstoffes durch *Pyrrol* und seine Derivate beeinflußt werde. Nach *Bergmann* und seiner Schule wäre es allerdings möglich, die Aminosäuren durch Dehydrierung in die Pyrrolreihe überzuführen und im Organismus entstehen sie evtl. auch auf diese Weise; dennoch erschien es uns nicht überflüssig diese Frage auf dem Versuchswege zu klären.

Nach dem heutigen Stand unserer Kenntnisse ist der Farbstoffkomponente des Hämoglobins ein Eisensalz des Porphyrins, welches von *H. Fischer* den Namen *Protoporphyrin* erhalten hat. Das charakteristische Spektrum des Porphyrins ist der Gegenwart einer gemeinsamen Grundsubstanz, dem *Porphin*, zuzuschreiben. Die Struktur des Porphinkernes wurde durch die epochemachenden Versuche *H. Fischers* aufgedeckt. Demnach besteht der Porphinkern aus 4 Pyrrolringen, die durch 4 Methingruppen (= CH-) miteinander verbunden werden. Werden die Porphyrine mit Eisensalzen gekocht, dann entstehen Hämine. Aus dem Protoporphyrin kann man z. B. auf diese Weise das *Protohämin* gewinnen, welches dem „Hämin“ älterer Bezeichnung entspricht. Das Einführen von Eisen in die Porphyrine gelingt meist mit Hilfe der Ferrosalze (*Starkenstein*, *Haurowitz*). Durch die Gegenwart des Eisenatoms wird dann die Bindung des Globinmoleküls an den Farbstoffkomplex ermöglicht.

Um diesen Vorgang soweit als möglich nachzuahmen, wurden die Organstückchen zuerst mit Pyrrol allein, dann mit Globin und schließlich gleichzeitig mit Globin und Ferrooverbindungen behandelt.

Pyrrolwirkung. Das Knochenmark ist zellreich. Es enthält viel Normoblasten mit hyperchromatischem Protoplasma und pyknotischen Kernen. An den Rändern sind zwischen den Zellen rote Farbstoffkörnchen in großen Mengen zu sehen. Die granulopoetischen Elemente sind im Zerfallen begriffen.

Gemeinsame *Pyrrol-* und *Globinwirkung*. Das Knochenmark ist sehr zellreich. Ziemlich große Mengen primitiver Blutzellen, weniger Normoblasten als in dem vorhergehenden Versuche. Zwischen den Zellen viel gelblichbraune Körnchen. An den Rändern große mononukleäre Zellen mit gelblichbraunem Pigment, breitem Protoplasma und dunklem Kern (man dürfte diese vielleicht „Pyrrolzellen“ benennen). Nach dem Hinzufügen von Eisenverbindungen nimmt der Zellreichtum zu (s. Abb. 1h).

Da die *Hämatinsäure* eine Verbindung darstellt, die sowohl aus Hämatin wie auch aus Hämatoporphyrin, Phylloporphyrin, Biliprasin und Bilirubin hergestellt werden kann, und da ihr Aufbau auch an das *Hämopyrrolmolekül* erinnert, interessierte uns die Frage, wie sich das Knochenmark bei der kombinierten Verwendung von Hämatinsäure mit Pyrrol und Eisenverbindungen verhalten werde. Die Hämatinsäure wurde von uns aus Hämatin nach dem Verfahren (beschrieben von v. Reinbold, s. in Abderhaldens Biochemischen Handlexikon) hergestellt. Es gelang uns diese (wenn auch bloß in geringen Mengen) in der Form von farblosen feinen, nadelförmigen Krystallen zu gewinnen; die Umkrystallisierung wurde mit Äther bewerkstelligt.

Bei der gemeinsamen Verwendung der Verbindungen in verschiedenen Kombinationen ließen sich folgende Wirkungen feststellen:

Pyrrol und *Hämatinsäure*. Zellreiche Knochenmarkstückchen. Normoblasten in überwiegender Zahl, die einzelnen Normoblasten enthalten reichlich Farbstoff. Zwischen den Zellen sehr viel rote Farbstoffkörnchen.

Pyrrol, *Hämatinsäure* und *Ferrochlorid*. Das Organ ist zellreich und mit hyperchromatischen Normoblasten gefüllt. Zahlreiche direkte Teilungsfiguren.

Pyrrol, *Hämatoporphyrin* und *Ferrochlorid*. Starker Zellreichtum, sonst ähnliches Bild wie bei dem vorhergehenden Versuche.

Pyrrol, *Bilirubin* und *Ferrochlorid*. Fast ausschließlich besonders schön entwickelte Normoblasten mit pyknotischem Kern im zellreichen Organstückchen.

Durch Pyrrol wird demnach sowohl allein wie auch in den erwähnten Kombinationen die Bildung der Normoblasten gefördert. Italienische Autoren untersuchten die Rolle des Pyrrols bei anämischen Zuständen. Ferrari (1932) behandelte anämische Frösche mit Pyrrol und Ferropyrrol erfolgreich, noch wirksamer zeigten sich jedoch Hämoglobin-

injektionen. *Polacci* und *Oddo* konnten mit pyrrolecarbonsaurem Magnesium bei Pflanzen eine gute Chlorophyllbildung erzielen. *Villa* ging auf diesem Wege weiter und fand nach Ferropyrrolinjektionen eine starke Steigerung der Blutbildung; bloß bei der perniziösen und der aplastischen Anämie waren die Ergebnisse unbefriedigend.

In einigen unserer Versuche wurde die Verabreichung von Ferropyrrol mit Globin kombiniert. In diesen Fällen konnten wir braune, grobe Körner in scharf begrenzten bräunlichen Flecken angeordnet vorfinden. Das Organ zeigte ziemlichen Zellreichtum und enthielt außer Normoblasten auch primitive Blutzellen in größerer Menge. Globin kann also auch neben Pyrrol kräftig wirken, es ruft die Bildung jugendlicher Zellelemente hervor und hemmt die Produktion der Normoblasten mit pyknotischem Kern.

Die Wirkung des *Ferropyrrols* wurde auch bei Gegenwart von *Leucin*, *Arginin* und *Histidin* untersucht. Diese Wirkung war dann deutlicher, wenn das überlebende Organstückchen außer mit Aminosäuren auch noch mit Nucleinsäure behandelt wurde. Die Nucleinsäure konnten wir aus der Rindermilz selbst erzeugen (nach dem im Lehrbuche *Hawks* angegebenen Verfahren). Die so behandelten Organstückchen zeigten einen den Durchschnitt stark übertreffenden Zellreichtum und zahlreiche Normoblasten mit pyknotischem Kern. Insbesondere am Rande des Präparates finden sich Normoblasten mit hyperchromatischem Protoplasma; bei vielen von diesen läßt sich die Vollendung der direkten Teilung erkennen.

Zusammenfassung.

Kaninchenorgane. Meist Knochenmark. Heparinhaltiges Eigenplasma mit Tyrodelösung zweifach verdünnt. Inkubation: 48 Stunden bei 37,5° C. Fixieren in Formalin. Färben mit Hämatoxylin-Eosin und Methylenblau-Eosin.

1. Globin. Ruft die Bildung primitiver Blutzellen hervor. Seine Wirkung zeigt Ähnlichkeit mit jener des „Leberstoffes“.

2. Eisenhaltiger Blutfarbstoff (Hämatin) oder dessen eisenfreie Urverbindungen (Hämatoporphyrin, Hämatinsäure, Pyrrol) nach Hinzufügung von Eisen fördern die Bildung der Normoblasten.

3. Reife, normale rote Blutkörper waren meist bei Anwesenheit von Hexonbasen (Histidin, Arginin) zu finden. Die Anordnung der Blutkörper, sowie das Verhalten ihrer basophilen Elemente lassen zwar auf die neuere Bildung der Zellen schließen. Man muß jedoch auch mit der Möglichkeit rechnen, daß sowohl diese Aminosäuren, wie auch das Leucin nicht bloß an dem Aufbau des Globinmoleküls teilnehmen, sondern daß durch diese auch die Konservierung der Erythrocyten im Versuche am überlebenden Organ gefördert werde. Dies gilt in erster Linie für die Hexonbasen.

4. Eine selbständige Rolle des Tryptophans bei der Erythrocytenbildung war nicht nachzuweisen, durch dieses wurde bloß die Histidinwirkung verstärkt.

5. Die Histidinwirkung wurde auch durch Cystin gefördert (Thiohistidin? Ergothionein?). Es wäre möglich, daß dieses als H-Acceptor durch die Verstärkung der Gewebsatmung wirkt.

6. Prolin bewirkte eine Vermehrung der Normoblasten; auf das Erscheinen der reifen roten Blutkörper zeigte dieses keinen Einfluß.

7. Asparaginsäure schien eine Förderung der Granulopoese herbeizuführen.

8. Pyrrol wird — scheinbar — in den blutbildenden Organen gespeichert. Durch diese Verbindung wird der Aufbau des Hämoglobinmoleküls im Knochenmark kräftig unterstützt. Die Urverbindungen der Blutfarbstoffe sind auch unter den Steinkohlenprodukten zu finden. Weitere Forschungen auf diesem Gebiete sind erwünscht.

Schrifttum.

Abderhalden: Biochemisches Handlexikon, Bd. I: *B. v. Reinbold*: Tierische Farbstoffe. A. Blutfarbstoffe. Berlin: Julius Springer. — Bergami: Boll. Soc. Biol. sper. **6**, 716, 717 (1931). — Bergmann, L. Zervas, F. Lebrecht: Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 2315—2322 (1931). — Ciampi, N.: Policlinico, sez. med. **39**, 365—372 (1932). — Cuthberston, J. Fleming and E. M. K. Stevenson: Glasgow med. J. **116**, 201—209 (1931). — Drabkin, David L. and H. H. Miller: J. of biol. Chem. **90**, 531—543 (1931); **93**, 39—48 (1931). — Duesberg: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **162**, 249—279 (1931). — Elvekejeen, C. A., H. Steenbock and E. B. Hort: J. of biol. Chem. **93**, 197—201 (1931). — Ferrari R.: Arch. di Biol. **17**, 25—40 (1932). — Fischer: Hoppe-Seylers Z. **150**, 44 (1925). — Fischer u. Verzár: Z. exper. Med. **80**, 385—394 (1932). — Fontès S. et L. Thivolle: C. r. Soc. Biol. Paris **105**, 967—969 (1930); **106**, 215, 216, 219—221 (1931). — Hill and Holden: Biochemic. J. **20**, 1326 (1926). — Jeney, A. v.: Extrait du 1. Congrès International de Microbiologie. Paris 1930. — Virchows Arch. **287**, 2, 373—378 (1932). — Kotake, Y.: Hoppe-Seylers Z. **195**, 192—202 (1931). — Küster: Hoppe-Seylers Z. **151**, 58 (1926). — Matsuo: Fukuoka-Ikwadaigaku-Zasshi (jap.) **25**, Nr 8, 64—110 (1932). — Schreus, H. Th. u. C. Garriè: Strahlenther. **40**, 340—350 (1931). — Villa, L.: Arch. internat. Pharmacodynamie **41**, 430—442 (1931).
