

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin
[Direktor: Prof. Dr. R. Rössle].)

Der Blutfarbstoff und die lebende Zelle¹.

I. Mitteilung.

Über den Hämoglobinabbau in Gewebskulturen.

Von

L. Doljanski und O. Koch.

Mit 3 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 1. August 1933.)

In den letzten Jahren ist die Erforschung der Chemie des Hämoglobins und seiner Derivate zu einem der glänzendsten Kapitel der Biochemie geworden. In einer Reihe grundlegender Arbeiten konnten Küster, H. Fischer, Willstätter u. a. die chemische Struktur des Blutfarbstoffes und seiner Abkömmlinge nahezu vollkommen klären und ihre Synthese teilweise verwirklichen, teilweise in den Bereich der Möglichkeit rücken.

Demgegenüber sind unsere Kenntnisse über das Verhalten des Hämoglobins im lebenden Körper wenig bereichert worden. Die Wege des Blutstoffwechsels liegen nach wie vor großenteils im Dunkeln. Wir wissen wenig oder nichts über die Kräfte, die ihn auslösen und fördern und ebensowenig über die Stufen, die zu den für uns erfaßbaren Zwischen- und Endprodukten des Blutfarbstoffumbaus führen.

So stellen die wenig übersichtlichen und äußerst verwickelten Vorgänge des Hämoglobinabbaus und der Hämoglobinsynthese im lebenden Körper der Erforschung größte Schwierigkeiten entgegen. Diese zu überwinden war der Reagensglas- und auch der Tierversuch nicht imstande.

Eine Möglichkeit zur Lösung dieses biologischen Grundproblems scheint uns in der Vereinfachung der Bedingungen zu liegen, unter denen sich ein physiologischer Blutfarbstoffabbau vollzieht. Es mußte der Versuch gemacht werden, das Hämoglobin aus den völlig unübersichtlichen und wenig einheitlichen Verhältnissen des lebenden Organismus herauszunehmen und der funktionierenden Zelle als primärer biologischer Einheit unmittelbar gegenüberzustellen.

¹ Ausgeführt mit Unterstützung der Goldmann-Stiftung.

Das Problem des Blutstoffwechsels ist sicher zu seinem größten Teil ein zellphysiologisches Problem und als solches sollte es vorläufig in erster Linie behandelt werden. Nur aufbauend auf Tatsachen, die Schritt für Schritt durch Klärung der Einzelbeziehungen zwischen dem Blutfarbstoff und den verschiedenartigsten Zellen des Körpers gewonnen sind, können wir hoffen, zum Verständnis eines wesentlichen Teiles des Blutstoffwechsels im lebenden Organismus selbst zu gelangen.

Die Methode der Gewebezüchtung scheint uns in hohem Maße geeignet, die Frage der Beziehungen zwischen Blutfarbstoff und lebender Zelle unter diesem Gesichtspunkte anzugreifen. Nur die Gewebskultur erlaubt uns, die verschiedenen Zellarten in Reinkultur dem Hämoglobin und seinen Derivaten gegenüberzustellen, diesen Kontakt beliebig lange aufrechtzuerhalten und die eintretenden Veränderungen unter den Bedingungen des exakten Experimentes zu analysieren.

In dieser I. Mitteilung unserer Untersuchungsreihe berichten wir über die einleitenden Veränderungen, die das Hämoglobin unter der Einwirkung der *in vitro* lebenden Zellen erfährt.

Das Problem der Beziehungen zwischen dem Hämoglobin und der lebenden Zelle ist als solches zwar mehrmals aufgeworfen, aber nie vom Standpunkt seines Ab- und Umbaues unmittelbar in Angriff genommen worden.

Die ersten Arbeiten über eine Veränderung des Hämoglobinkomplexes unter der Einwirkung von Zellen oder Zellextrakten im Reagensglasversuch verdanken wir der Schule Alexander Schmidts. *A. Schwarz*¹ und *E. Anthen*² konnten zeigen, daß weiße Blutzellen, Milz-, Lymphdrüsen- und Leberzellbrei mit Blutfarbstofflösung *in vitro* zusammengebracht imstande sind, das Hämoglobin zu zerstören. Die Oxyhämoglobinstreifen verschwinden nach ungefähr 3 Tagen und gleichzeitig mit dem Unsichtbarwerden der Blutfarbstoffbanden tritt ein neuer Absorptionsstreifen auf „Teilstrich 20“ auf, dessen Zugehörigkeit Verfasser nicht sicherstellen konnten. *Hess* und *Saxl*³ zeigten 1909, daß Leberautolysate imstande sind, den Blutfarbstoff fast vollständig zu zerstören. Bei Nachprüfung ihrer Versuche kam aber *Miura*⁴ zu dem Schluß, daß der von *Hess* und *Saxl* beschriebene autolytische Hämoglobinschwund nicht als eine echte Blutfarbstoffzerstörung aufzufassen sei, sondern als eine durch die zugesetzten Chemikalien (Toluol-Chloroform) bewirkte „koagulative Ausflockung“. Von der Vorstellung ausgehend, daß der Leber und Milz neben einer hämolytischen auch eine hämoglobinabbauende Wirkung zukommen müsse, haben *Asher* und *Ebnöther*⁵ Extrakte dieser Organe auf den Blutfarbstoff einwirken lassen. Es zeigte sich, daß das Hämoglobin durch Milz- und Leberauszüge in geringem Maße abgebaut wird und daß der Zusatz von Milz- zu Leberextrakt den Abbau erheblich verstärkt. Das wirksame Prinzip erwies sich als hitzebeständig. Diese Befunde konnten von *Calvo-Criado*⁶ bestätigt und erweitert werden, indem er zeigte, daß die blutfarbstoffabbauende Fähigkeit auch Extrakte von Haut-, Muskel-, Nieren- und Lungengewebe eiger ist. Sie begnügten sich im wesentlichen mit der Feststellung, daß der Blutfarbstoff (beobachtet an seinem Spektrum) unter der Einwirkung der Gewebeauszüge verschwindet. Hinsichtlich des Schicksals des Blutfarbstoffes berichten *Asher* und *Ebnöther*, daß der Abbau über die Häminstufe hinausgeht, ohne daß „nichtmaskiertes Eisen“ nachweisbar wird. *Bingold*⁷ nahm an, daß der Blutfarbstoffabbau unter dem Einfluß von

lebendem Gewebe zur Hämatinabspaltung führen kann. Er kam zu dieser Vorstellung durch die Berichte über das gelegentliche Auftreten von Hämatin in Cystenflüssigkeiten, Hämatomen, blutigen Ergüssen (*Bingold*⁸, *H. van den Bergh*⁹) und im Liquor cerebrospinalis nach hämorrhagischen Prozessen im Zentralnervensystem (*Schumm*¹⁰), also überall da, wo der Blutfarbstoff direkt mit der lebenden Zelle in Berührung treten kann.

Die Umwandlungen an dem Oxyhämoglobinmolekül unter dem Einfluß von lebendem Gewebe, die ohne tiefere Zerstörung seiner chemischen Struktur einhergehen, beziehen sich im wesentlichen auf seine Überführung in reduziertes Hämoglobin und Methämoglobin. Der Mechanismus der Umwandlung von Oxyhämoglobin in seine reduzierte Stufe ist leicht deutbar. Von jeder lebenden, atmenden Zelle ist eine reduzierende Wirkung auf das Oxyhämoglobin zu erwarten (*Barkan*¹¹). Demgegenüber scheint der Vorgang der Methämoglobinbildung ein verwickelter, chemisch-biologischer Prozeß zu sein. Mehrfach wurde beobachtet, daß durch Zusatz von sterilem Gewebe (*Neill*¹², *Brooks*¹³), von Organextrakten und Filtraten (*Ray* und *Isaac*¹⁴, *Duesberg* und *Koll*¹⁵) zu Blut oder Hämoglobinlösung sowie auch in Bakterienkulturen auf bluthaltigen Nährböden (*Rieke*¹⁶, *Grüter*¹⁷, *Cole*¹⁸) eine Methämoglobinbildung stattfinden kann. Während ein Teil der Untersucher (*Schnabel*¹⁹, *Morgan* und *Neill*²⁰, *Neill* und *Avery*²¹) nicht nur die Zellen oder das Gewebe selbst, sondern auch ihre Extrakte imstande finden, den Blutfarbstoff zu Methämoglobin zu oxydieren, nehmen *Cole* und *Rieke* an, daß diese Umwandlung innig mit dem Lebensprozeß der Bakterienzelle verbunden ist und ihre unmittelbare Anwesenheit erfordert.

Wenn auch die Natur des biologischen methämoglobinbildenden Faktors bis heute unklar geblieben ist, hat man wenigstens in der letzten Zeit einige Kenntnisse über die Bedingungen gewonnen, unter denen eine Methämoglobinbildung stattfindet. Man ist heute der Ansicht, daß die Methämoglobinbildung unbedingt von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig ist, denn unter Sauerstoffausschluß verlaufen die Prozesse anders, indem reduziertes Hämoglobin gebildet wird. Wir müssen annehmen, daß ein ineinanderspielendes, kombiniertes System die Vorgänge der Methämoglobinbildung bewirkt, deren mögliche Zusammenhänge vielleicht am besten die Auffassung von *Neill* wiedergibt. Er nimmt in der Zelle, bzw. in dem Extrakt oder Filtrat ein Oxydations-Reduktionssystem an, das aus zwei Komponenten besteht, von denen die eine thermolabil ist; innerhalb eines biologischen Verbandes wird dieses System — was das Überwiegen der Wirkung des reduzierenden oder oxydierenden Anteils betrifft — durch die jeweilige Sauerstoffspannung des Milieus gesteuert.

Experimenteller Teil.

Versuchsanordnung.

a) Gewinnung des Hämoglobins. Das den Tieren unter peinlichster Asepsis aus der Carotis entnommene und in eisgekühlten, paraffinierten Gefäßen aufgefangene Blut wurde sofort nach der Entnahme zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Plasmas wurden die Blutkörperchen 10mal mit Thyrodelösung gewaschen und so von Plasmabeimengungen restlos befreit, von neuem in Thyrode aufgeschwemmt und zur Erzielung der Hämolyse 45 Min. mit Glasperlen kräftig geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der Erythrocytentrümmer wurde die hämoglobinhaltige Thyrodelösung bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Alle diese Vorbereitungen müssen unbedingt unter strengster Asepsis durchgeführt werden.

b) Technik der Gewebezüchtung. Zur Anwendung kamen frisch ange- setzte Herz- und Milzfragmente, Leberkulturen, sowie ältere Stämme von reinen Fibroblastenkulturen. Die Gewebsstückchen wurden als *Carrel*-Flaschenkulturen angesetzt und bebrütet. Die feste Phase bestand aus 0,5 ccm Plasma und 1,0 ccm 5 %igem Embryonalextrakt, die flüssige Phase aus 0,5 ccm 33 %igem Embryonalextrakt. Wir waren bemüht, in jede Flasche eine größere Anzahl von Kulturen zu bringen, um auf diese Weise möglichst reichliche Zellproliferationen zu erzielen. Alle 4 bis 5 Tage wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt, und frische Extraktlösung zugefügt. Die Züchtung geschah im allgemeinen nach den Regeln der klassischen *Carrelschen* Technik ²².

c) Spektroskopische und spektrophotometrische Technik. Die Untersuchung der Blutabbauvorgänge in den Züchtungsflaschen wurde fort- laufend spektroskopisch und spektrophotometrisch durchgeführt.

Zur spektroskopischen Untersuchung benutzten wir ein Prismenmeß- spektroskop (Schmidt & Hänsch, Berlin)*, und das Gittermeßspektroskop nach *Lowé* und *Schumm* (C. Zeiß, Jena). Als Lichtquelle diente eine Punktlichtlampe; die Spaltbreite war bei allen Messungen 0,03—0,08 mm breit eingestellt.

Die Beobachtung des Flascheninhaltes geschah in zweierlei Weise. In den Versuchen, in denen wir die Veränderungen des Blutfarbstoffes in ein und derselben Züchtungsflasche spektroskopisch verfolgen wollten, brachten wir den Flascheninhalt nicht in einen Absorptionstrog, sondern untersuchten in der Flasche selbst, da es kaum durchführbar ist, täglich die flüssige Phase von den Kulturen zur Ausführung der Messungen abzusaugen, ohne sie zu infizieren. Hält man die *Carrelsche* Züchtungs- flasche mit der Bodenfläche parallel zur Spalteinheit, so sammelt sich in den tiefliegenden Teilen genug Flüssigkeit an, um die ganze Spalthöhe zu bedecken und so kann man in konstanter Schichtdicke zwischen den annähernd planparallelen Wandflächen den Flächeninhalt spektroskopisch beobachten.

Zur spektrophotometrischen Untersuchung benutzten wir ein *König- Martenssches* Spektralphotometer, Modell 1 (Schmidt & Hänsch, Berlin). Die zu untersuchenden Flüssigkeiten wurden in zerlegbare Tröge mit *Schulzschem* Klotz gegeben: Trogdurchmesser 51 mm, Klotz 50 mm. Die Ablesung der Nicoldrehung bis zur gleichen Helligkeit beider Gesichtsfelder wurde in zwei Quadranten vorgenommen; jeder Einzelwinkel wurde zweimal bestimmt und das Mittel aus beiden Werten der Berechnung des Extinktionskoeffizienten

$$\varepsilon = - \log. \tan. \frac{I_1}{I_0}$$

* Herrn Prof. Dr. Cremer, Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Tierärztlichen Hochschule Berlin, sind wir für die liebenswürdige Überlassung des Spektroskopes zu großem Dank verpflichtet.

zugrunde gelegt, bezogen auf die Einheit der Schichtdicke. Die Ablesung wurde für das Hämoglobin im Bereich seines ersten Absorptionsmaximums bei etwa $578 \mu\mu$ gemacht.

Die Anwesenheit von Methämoglobin konnte während der Dauer derjenigen Versuche, in denen die Flüssigkeit in der Züchtungsflasche verbleiben mußte, nur an dem ihm zugehörigen Streifen im Rot (Maximum: etwa $635 \mu\mu$) verfolgt werden: Da aber ein Streifen in diesem Spektralbezirk nicht unbedingt dem Methämoglobin oder nur ihm allein zugehören muß, wurde zur Sicherstellung des Befundes der Inhalt der Flasche nach Beendigung des Versuches mit Soda alkaliert sowie durch Schwefelammonium reduziert. Gehörte der beobachtete Streifen im Rot nur dem Methämoglobin an, so zeigte sich nach kurzer Zeit sein alkalisches Spektrum bzw. das breite Band des reduzierten Hämoglobins. Hämatin, mit dessen Anwesenheit nach den eingangs besprochenen Befunden am ehesten zu rechnen war, würde sich bei diesen Proben durch das Erhaltenbleiben eines Rotstreifens nach Sodazusatz und das Auftreten des Hämo-chromogenspektrums nach Reduktion nachweisen lassen. Die spektrophotometrische Bestimmung der Methämoglobinabsorption im Rot geschah bei etwa $635 \mu\mu$; dabei wurde aber täglich das Maximum der Auslösung nachgeprüft, da eine p_H -Änderung des Nährmediums zur Verschiebung der Absorptionsmaxima führt.

Um die spektroskopischen und spektrophotometrischen Werte der einzelnen Flaschen sicher vergleichen zu können, mußte ihr Inhalt vor der Untersuchung auf die gleiche p_H gebracht werden, da sich das Methämoglobinspektrum einem Indicator gleich mit der p_H verändert. Wir puffernd mit einem Sörensen'schen Phosphatpuffer auf p_H 7,2 eine Wasserstoffionenkonzentration, wie wir sie in der Nährflüssigkeit unserer Kulturen am 5.—7. Bebrütungstage fanden.

Die Veranlassung zu folgenden Untersuchungen war ursprünglich die Beobachtung des einen von uns (D), daß frische Kulturen von Knochenmark, wie sie in der Arbeit von *H. Rasmussen* aus unserem Institut¹ beschrieben worden sind, in kurzer Zeit ihre rötliche, vom Hämoglobin herrührende Farbe verlieren.

Versuche.

1. *Hämoglobinabbau und Methämoglobinbildung in Kulturen von Bindegewebe.*

Ein Satz Fibroblastenkulturen wurde in *Carrel*-Flaschen angelegt. In jede Flasche setzten wir wenigstens zehn Gewebsfragmente, die gleichmäßig verteilt wurden, um eine die ganze Bodenfläche bedeckende Zellschicht zu erzielen. Hatten die bei 37° im Brutschrank wachsenden Kulturen eine größere Ausdehnung angenommen, so wurde ihnen statt

¹ Arch. exper. Zellforsch. **14**, 285 (1933).

reinen Embryonalextraktes eine Mischung desselben mit Hämoglobin zugeführt. Nach wenigen Stunden hat sich der Blutfarbstoff gleichmäßig über den gesamten Flascheninhalt verteilt, das Plasmakoagulum durchtränkt und ist in innige Berührung mit der Zelle getreten.

Im hämoglobinhaligen Medium entwickeln sich die Gewebsstückchen offenbar ungestört. Da keine Messungen von uns ausgeführt wurden, können wir nicht sagen, ob das Hämoglobin eine wachstumsbeeinflussende Wirkung hat, wie es verschiedentlich angenommen wurde; jedenfalls kann sie nur sehr gering sein und nur durch genaueste, quantitative Bestimmungen festgestellt werden.

In regelmäßigen Abständen (nach je 4—7 Tagen) wurde die flüssige Phase abgesaugt, und neuer hämoglobinhaliger Extrakt zugesetzt. Die Kontrollflaschen enthielten keine Gewebsfragmente, also nur Embryonal-extrakt, Plasma und Hämoglobin. Täglich zu bestimmter Stunde wurde der Inhalt der Flaschen spektroskopisch und spektrophotometrisch untersucht, sowie das Aussehen des Nährmediums aufgezeichnet.

Schon nach 24 Stunden deuten die mit bloßem Auge sichtbaren Veränderungen auf die Verschiedenheit der sich in den Versuchs- bzw. Kontrollflaschen abspielenden Umsetzungen hin. Der Inhalt der gewebehaltigen Flaschen hat bereits einen leicht braunen Farbton angenommen, während die Hämoglobinlösung der Kontrollflaschen kaum blasser erscheint. Während des nächsten und übernächsten Tages verstärkt sich die braune Verfärbung in den gewebehaltigen Flaschen und nach Ablauf dieser Zeit ist von der eigentlichen Blutfarbe kaum noch etwas zu sehen. Schließlich mischt sich am 4. und 5. Beobachtungstage der braunen Verfärbung ein schmutzig-grünlicher Ton bei. Die Kontrollen lassen auch eine Veränderung des ihnen zugesetzten Blutfarbstoffes erkennen. Mit dem Verblassen der Farbe des Hämoglobins, die schon am ersten Tage beginnt, sehen wir aber nicht eine Beimischung eines braunen bis schmutzig braun-grünen Farbtones einhergehen. Nachdem am 2. Tage das Verblassen der Blutfarbe in allen gewebefreien Versuchsflaschen zu sehen ist, tritt zunehmend dagegen ein leicht gelblicher Farbton neben dem Blutrot auf. Am 4.—5. Tage des Versuches ist schließlich der Flascheninhalt eine — manchmal ganz wenig trübe — leicht gelbe Flüssigkeit, die aber noch deutlich Reste der ursprünglichen Hämoglobinfarbe hat. Dabei hat jetzt die rote Farbe meist einen leicht blauroten, etwas ins Violette spielenden Ton.

Dem groben Aussehen entsprechen die spektroskopischen Befunde. In den ersten 24—48 Stunden, wenn nur eine leichte bräunliche Tönung der Medien der gewebehaltigen Flaschen sichtbar ist, nimmt das Oxyhämoglobin in gewebehaltigen Flaschen bereits deutlich ab. Seine charakteristischen Streifen, die ursprünglich scharf begrenzt als breite, massive, sich recht nahe rückende Verdunkelungen sichtbar waren, grenzen sich deutlich voneinander ab und erscheinen weniger

tiefschwarz. Am 2. und 3. Tage blaßt der erste Oxyhämoglobinstreifen weiter stark ab, seine Auslöschungsstärke wird zunehmend geringer. Am 4. und 5. Tage ist der α -Streifen in manchen Flaschen nur eben noch, in anderen überhaupt nicht mehr zu sehen, während im Bereich des β -Streifens eine deutliche Auslöschung sichtbar bleibt, die an Stärke zunimmt. In den Kontrollflaschen ist das nicht unter der Zellwirkung stehende Hämoglobin auch verändert worden. Langsamer als in den gewebehaltigen Flaschen werden seine Streifen während der ersten Tage des Versuches zunehmend unschärfer und blasser. Eine allgemeine Verdunkelung breitet sich im Bereich der Oxyhämoglobinstreifen aus, aber bis zum letzten — 5. — Versuchstage sind die Blutfarbstoffstreifen zwar abgeschwächt, aber immer noch deutlich sichtbar.

Das Spektrum des Kontrollflascheninhaltes zeigt eine von dem ersten Hämoglobinstreifen zum Rot bis etwa $610-612 \mu\mu$ hinziehende leichte, eben sichtbare Vorverschattung. Sie gehört dem alkalischen Methämoglobinspektrum an. Nach der Pufferung auf p_H 7,2 (die p_H der Nährflüssigkeiten liegt um 7,6—7,8), hellt sich der entsprechende Spektralbezirk auf und es erscheint im Rot um das Maximum $635 \mu\mu$ eine entsprechende Verdunkelung des neutralen Methämoglobins. In gewebehaltigen Flaschen, deren p_H durchweg am Neutralpunkt (7,0 bis 7,2) lag, konnten wir diesen Vorschatten nie beobachten.

Über die erwähnte Vorverschattung hinaus konnten wir bei längerer Züchtung eine allmählich zunehmende, ins Rot vorrückende Verschattung beobachten, die bis etwa $635-645 \mu\mu$ reichte. (Auf die Zugehörigkeit und die Bedeutung dieser Verschattung werden wir später einzugehen haben.)

In den gewebehaltigen Versuchsfaschen wird dem Hämoglobinschwund entsprechend die Absorption des Methämoglobins sichtbar. Schon nach 24 Stunden, wenn die Auslöschung des Oxyhämoglobins — insbesondere die des α -Streifens — blasser und schmäler geworden sind, ist in den kulturhaltigen Flaschen eine schwache Verdunkelung mit verwaschenem Übergang zum Rot und Gelb hin zwischen $640-645 \mu\mu$ und $628-632 \mu\mu$ feststellbar. Am 2. und 3. Tage tritt der Streifen gut, in manchen Flaschen schon stark hervor, um am 5. Tage als deutliche, massive, unscharf begrenzte Verdunkelung des entsprechenden Spektralbereiches zu erscheinen. Das Spektrum der gewebehaltigen Flaschen unterscheidet sich auch nach Pufferung auf die gleiche p_H durchaus von dem Inhalt der gewebsfreien Flaschen. Die Methämoglobinmengen, die unter der

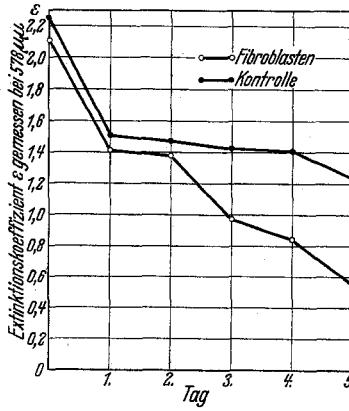


Abb. 1.

Einwirkung der lebenden Zellkolonien auftreten, sind unvergleichlich größer als die, die in den gewebsfreien Flaschen entstehen.

Kurve 1 gibt die Extinktionskoeffizienten einer Versuchsreihe von Fibroblastenkulturen und Kontrollen wieder, gemessen bei $578 \mu\mu$.

Fibroblastenkulturen: H 198, H 199, H 200, H 201, H 203
Kontrollen: H 220, H 221, H 222, H 223, H 224

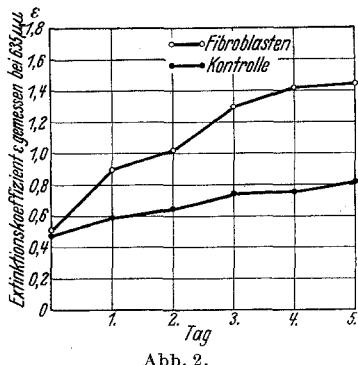


Abb. 2.

Kurve 2 zeigt den Verlauf der Absorptionsverhältnisse im Bereich des MHB-Streifens in Rot einer Versuchsreihe von Fibroblastenkulturen und gewebefreien Kontrollflaschen.

Fibroblastenkulturen:
H 198, H 199, H 200, H 201, H 203
Kontrollen:
H 220, H 221, H 222, H 223, H 224

In vitro wachsende Fibroblasten vermögen also das zum Nährmedium zugesetzte Hämoglobin weitgehend zu verändern; sein Spektrum schwindet und es werden beträchtliche Mengen Methämoglobin nachweisbar. Den Gewebeextrakten kommt die Fähigkeit der Hämoglobinbildung in viel geringerem Maße zu.

2. Hämoglobinabbau und Methämoglobinbildung in Milz- und Leberkulturen.

Bei den mannigfach vermuteten und teilweise bewiesenen Beziehungen der Milz und Leber zum Blutstoffwechsel lag es nahe zu prüfen, ob Milz- und Lebergewebe in der Kultur in besonderem Maße hämoglobinangreifende Eigenschaften besitzt.

Fragmente von Hühnerembryonalmilz und -leber wurden, wie oben beschrieben, in mehreren Flaschensätzen angelegt. Zur Kontrolle dienten wieder gewebsfreie Carrel-Flaschen. Als das feste Nährmedium ganz von lebhaft wachsenden, spindeligen und freien amöboiden Zellen reticuloendothelialen Ursprungs durchsetzt war, fügten wir den Kulturen blutfarbstoffhaltigen Embryonalextrakt zu. Die weitere Behandlung und Beobachtung geschah in gleicher Weise wie bei den Fibroblastenkulturen. Die mit bloßem Auge sichtbaren Veränderungen und spektroskopischen Befunde an ihrer Nährflüssigkeit entsprechen grundsätzlich denen von Bindegewebskulturen, so daß wir auf ihre nähere Besprechung im einzelnen verzichten können.

Bei dem Vergleich des Aussehens des Nährmediums von Fibroblastenkulturen einerseits mit milzgewebshaltigen Flaschen, andererseits fiel uns auf, daß der Flascheninhalt unter der Einwirkung des Milzgewebes etwas schneller die Blutfarbe verliert und einen etwas satteren braunen bis

schmutzigen Farbton annimmt, als in den fibroblastenhaltigen Züchtungsflaschen. Bei der spektroskopischen Beobachtung konnten wir dementsprechend auch meist feststellen, daß die Auslöschen des Blutfarbstoffes in den Flaschen mit Milzgewebe etwas schneller verschwinden und gleichzeitig das Methämoglobinspektrum früher und stärker auftritt. Kurve 3 gibt zum Vergleich der blutabbauenden Fähigkeit von Milz- und Fibroblastenkulturen die Abnahme der Oxyhämoglobinauslöschen (bei 578 $\mu\mu$) einer Versuchsreihe wieder.

Fibroblastenkulturen: H 198, H 199, H 200, H 201, H 203

Milzkulturen: H 209, H 210, H 211, H 212, H 213

Diese Unterschiede zwischen der Wirksamkeit von Milzgewebe und Fibroblasten in der Kultur ließen sich in vielen Versuchsreihen immer wieder bestätigen. Sie sind aber nur mit Vorbehalt zu verwerten, denn verschiedene Gesichtspunkte lassen die Beweiskraft derartiger zwar deutlicher, aber immer geringer Unterschiede fraglich erscheinen. Obwohl beim Ansetzen der Flaschen darauf geachtet wurde, daß Zahl und Größe der Mutterstückchen übereinstimmten, werden geringe Unterschiede der Ausgangszellmengen schon kaum zu vermeiden sein. Außerdem wachsen die frisch angesetzten Milzkulturen mit besonderer Intensität und schwemmen schon am 1. Tage reichlich Zellelemente aus. Die Unterschiede also, die in den Flaschen verschiedener Gewebsarten zu beobachten sind, könnten sich vielleicht aus der ungleichen Wachstumsgeschwindigkeit erklären lassen.

Das Milzgewebe bringt bei Züchtung in einem blutfarbstoffhaltigen Nährmedium im gleichen Sinne, aber im höheren Grade wie die Fibroblasten das Hämoglobinspektrum zum Schwinden; gleichzeitig werden beträchtliche Methämoglobinkörper gebildet.

Die mehrfach aufgestellten Versuche haben gezeigt, daß die Leberkulturen in bezug auf die Methämoglobinbildung sich ähnlich wie die Fibroblastenkolonien verhalten.

Auf Grund dieser Ergebnisse glauben wir annehmen zu dürfen, daß bei Anwesenheit von Sauerstoff das Hämoglobin in Berührung mit der in Kultur lebenden Zelle durch diese größtenteils oxydiert wird.

Daß es sich hierbei um eine hauptsächlich von der Zellkolonie ausgehende Wirkung handelt, läßt sich auch im folgenden Versuch zeigen.

Setzt man Gewebskulturen statt Hämoglobinlösung, Erythrocyten zu, so tritt das Methämoglobin nicht im ganzen Nährmedium verteilt

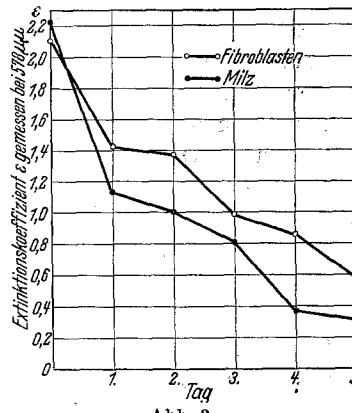


Abb. 3.

auf, sondern wird besonders in unmittelbarer Umgebung der Kultur selbst gebildet. Das Mutterstück umgibt schon kurze Zeit nach dem Ansetzen ein scharf umgrenzter, intensiv braunroter Ring. Diese Verfärbung, die sich mit Schwefelammonium in die purpurrote Farbe des reduzierten Hämoglobins überführen und durch Oxydationsmittel nicht beeinflussen läßt, beruht auf der Anwesenheit von Methämoglobin, das infolge seiner Gebundenheit an die Erythrocyten nicht in das umgebende Medium diffundieren kann. So sehen wir den Unterschied in dem Verhalten des Blutfarbstoffes, der unter dem unmittelbaren Einfluß der lebenden Zelle steht und dem, der nur mit Gewebsextrakten in Beziehung kommt, besonders klar und eindeutig.

Es scheint uns wichtig an dieser Stelle zu betonen, daß die unmittelbare Anwesenheit der Zelle für den grundsätzlichen Ablauf der Vorgänge nichts wesentlich Neues beiträgt, sondern nur den Vorgang der Methämoglobinbildung erheblich beschleunigt. Wie zahlreiche Versuche uns gezeigt haben, sind Gewebsextrakte in gleicher Weise wirksam. Die Unterschiede der methämoglobinbildenden Wirkung zwischen letzterem und den Zellen selbst möchten wir als rein quantitative betrachten. Das Grundproblem spitzt sich zu der Frage zu, ob die methämoglobinbildende Wirkung der Zellen und ihrer Extrakte nur eine Beschleunigung der Autoxydationsvorgänge ist, oder eine als solche grundsätzlich zelleigene Wirkung darstellt.

Während unter der Einwirkung der lebenden Zelle sich die unmittelbar spektroskopisch erfaßbaren Umwandlungen mit der Methämoglobinbildung erschöpfen, zeigen gewebsfreie Flaschen — d. h. Hämoglobin unter dem Einfluß von Gewebsextrakten stehend — weitere Umwandlungen von erheblicher prinzipieller Bedeutung.

Bei der spektroskopischen Untersuchung ihres Inhaltes lassen sich erhebliche Hämatinmengen nachweisen.

Wie oben beschrieben, zeigte das Spektrum, daß sich die schwache Absorption des Methämoglobins im Rot bei längerer Bebrütung immer weiter nach rechts erstreckt und sich allmählich im Bereich von 620 bis $630 \mu\mu$ eine Verschattung ausbildet, deren Zugehörigkeit zum Hämatin sich spektrochemisch leicht nachweisen läßt. Die Alkalisierung der Flüssigkeit mit Sodalösung läßt zwar während der ersten Versuchstage den Rotstreifen völlig verschwinden. Die Reduktionsprobe mit Schwefelammonium zeigt demgegenüber schon bei diesen Untersuchungen das Auftreten des Hämochromogenstreifens als strichförmige Verdunkelung innerhalb der breiten, verwaschenen Methämoglobinabsorption. Abhängig von der Menge des gebildeten Hämatins schwankt die Stärke der Hämochromogenstreifen erheblich. Bei langdauernder Bebrütung (bis 15 Tage) lassen sich die beiden Hämochromogenstreifen als starke Auslöschen bei 5 mm Schichtdicke wahrnehmen.

Eine gleiche Umwandlung des Blutfarbstoffes läßt sich auch durch einfachen Zusatz von Embryonalextrakt zu einer Blutfarbstofflösung

bewirken, so daß wir dem Gewebsextrakt neben der hämoglobin-oxydierenden auch eine blutfarbstoffzerstörende Wirkung zusprechen müssen¹. Unter der Einwirkung von Gewebsextrakten wird unter unseren Versuchsbedingungen die eisenhaltige Gruppe aus dem Blutfarbstoff abgespalten und wird als Hämatin in beträchtlichen Mengen nachweisbar. In Anwesenheit der lebenden Zelle, die den Blutfarbstoff zum großen Teil in Methämoglobin umwandelt, kommt diese blutfarbstoffspaltende Kraft der Gewebsextrakte nicht zur Wirkung.

Schrifttum.

¹ Schwarz, A.: Über die Wechselbeziehungen zwischen Hämoglobin und Protoz. Inaug.-Diss. Dorpat 1888. — ² Anthen, E.: Über die Wirkung der Leberzelle auf das Hämoglobin. Inaug.-Diss. Dorpat 1889. — ³ Hess, L. u. P. Saxl: Hämoglobinzerstörung in der Leber. Biochem. Z. **19**, 274 (1909). — ⁴ Miura, S.: Über das Wesen der Hämoglobinzerstörung bei der Organautolyse. Biochem. Z. **49**, 137 (1913). — ⁵ Asher, L. u. E. Ebnoüther: Fortgesetzte Beiträge zur Lehre von der Funktion der Milz: Das Zusammenwirken von Leber und Milz. Biochem. Z. **72**, 416 (1916). — ⁶ Calvo-Criado, V.: Untersuchungen über den Hämoglobinabbau durch Gewebsextrakte. Biochem. Z. **164**, 61 (1925). — ⁷ Bingold, K.: Abspaltungsvorgänge am Hämoglobinmolekül unter dem Einfluß von Gewebszellen. Dtsch. Arch. klin. Med. **154**, 53 (1927). — ⁸ Bingold, K.: Hämolyse, Blutfarbstoffabbau, Hämatinämie und Ikterus. Z. klin. Med. **97**, 257 (1923). — ⁹ H. van den Bergh, A. u. J. Snapper: Über anhepatische Gallenfarbstoffbildungen. Berl. klin. Wschr. **42**, 1081 (1915). — ¹⁰ Schumm, O.: Hämatin als pathologischer Bestandteil des Blutes. Z. physik. Chem. **97**, 32 (1916). — ¹¹ Barkan, G.: Der normale rote Blutfarbstoff. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 6, 2, S. 76. — ¹² Neill, J. M.: Studies on the oxydation-reduction of hemoglobin and methemoglobin. I. The changes induced by pneumococci and by sterile animal tissue. J. of exper. Med. **41**, 299 (1925). — ¹³ Brooks, D.: Post-mortem formation of methemoglobin in red muscle. Biochemic. J. **23 VI**, 1391 (1929). — ¹⁴ Ray, G. B. and L. A. Isaac: Chemical studies on the spleen. III. The action of spleenic and other tissues upon the removal of hemoglobin-methemoglobin-solutions. J. of Physiol. **91 II**, 377 (1930). — ¹⁵ Duesberg, R. u. W. Koll: Über Methämoglobinbildung durch antianämisch-wirkende Organextrakte. Arch. f. exper. Path. **162**, 296 (1931). — ¹⁶ Rieke, H.: Beiträge zur Frage der Arteinheit der Streptokokken. Zbl. Bakter. I. Abt. Orig. **36**, 321 (1904). — ¹⁷ Grüter, W.: Die Methämoglobinbildung in bluthaltigen Nährböden durch Streptokokken. Zbl. Bakter. I. Abt. Orig. **50**, 241 (1909). — ¹⁸ Cole, R.: The production of methemoglobin by Pneumococci. J. of exper. Med. **20**, 363 (1914). — ¹⁹ Schnabel, A.: Die Blutgifte der Pneumokokken. Z. Hyg. **93**, 175 (1921). — ²⁰ Morgan, H. J. and J. M. Neill: Methemoglobinformation by sterile culture-filtrates of Pneumococci. J. of exper. Med. **40**, 269 (1924). — ²¹ Neill, J. M. and O. T. Avery: Studies on oxydation and reduction by Pneumococci. VIII. Nature of the oxydation-reduction-systems in sterile Pneumococci-extracts. J. of exper. Med. **41**, 285 (1925). — ²² Fischer, Albert: Gewebezüchtung. Handbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro. München 1930.

¹ Über die Einwirkung des zweiten in den Flaschen enthaltenen Faktors — des Blutserums — auf das Hämoglobin berichten wir in einer besonderen Mitteilung.