

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

Der Blutfarbstoff und die lebende Zelle*.

II. Mitteilung.

Zur Frage der Bilirubinbildung in vitro.

Von

L. Doljanski und O. Koch.

(Eingegangen am 1. August 1933.)

Das im Brennpunkt des allgemeinen Interesse stehende Problem der Gallenfarbstoffbildung hat in den letzten Jahren bedeutende Wandlungen erfahren. Eine Zeitlang schien es, daß die neuen, verfeinerten Methoden der biologischen Untersuchung und die Errungenschaften der operativen Technik imstande sein würden, wenigstens die Frage nach dem *Ort* der Entstehung des Bilirubins zu klären. Viele geistreich angelegte Experimente konnten zwar die Vorstellung von dem Primat der Leberzelle für die Gallenfarbstoffbildung erschüttern, sie waren aber nicht imstande, bestimmte Vorgänge oder Zellsysteme aufzuzeigen, die für den Prozeß der Bilirubingenese unumstritten verantwortlich sind. Bis heute sind alle Möglichkeiten der Entstehung des Bilirubins (Leberzelle, Reticuloendotheliales System, „irgendwo in den Geweben“, Blutplasma) völlig offen geblieben.

Von der Methode der Gewebezüchtung, die uns erlaubt, in klarem Versuch Zellen jeglichen Ursprungs dem Blutfarbstoff gegenüber zu stellen, könnte man eine weitgehende Förderung des Problems der Gallenfarbstoffbildung erwarten.

Die bis jetzt an Zellkulturen ausgeführten Untersuchungen schienen auch grundsätzliche Fragen der Blutfarbstoffwechselvorgänge eindeutig beantworten zu können, und Ergebnisse von größter Tragweite beizubringen. Die Bilirubinbildung in Zellkulturen durch indifferenten Zelltypen konnte als erwiesen gelten.

Zuerst soll *Ishibashi*¹ die Bildung von Bilirubin in Gewebskulturen beobachtet haben. ** *Rich*² fand in Deckglaskulturen phagocytierender, mesenchymaler Zellen,

* Ausgeführt mit Unterstützung der *Goldmann*-Stiftung.

** Aus den Zitaten der Arbeit ist leider nicht ersichtlich, welcher Art die benutzten Kulturen waren, wie der Blutfarbstoff zugeführt wurde und auch nicht wie das Bilirubin nachgewiesen werden konnte.

denen er Blutkörperchen zugefügt hatte, neben Eisenpigment „typische rhombische und nadelförmige Bilirubinkristalle“, die „die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Gallenfarbstoffes aufweisen“. *Symegi* und *Czaba*³ konnten Bilirubin mit der *H. v. d. Berghschen* Reaktion in Gewebskulturen nachweisen. Sie setzten dem Nährmedium ihrer Deckglaskulturen von Hühner- und Froschmilzgewebe einen Tropfen hämolysierten Hühner- bzw. Froschblutes zu. Zur Bilirubinbestimmung sogen sie am 4.—5. Bebrütungstage mit einer Capillarpipette einen Tropfen Flüssigkeit aus dem Plasmakoagulum, extrahierten mit der 4fachen Menge Alkohol und sahen nach Zusatz von *Ehrlichs* Diazoniumlösung zu dem unfiltrierten Auszug in einer feinen Glasküvette, in der die Reaktion ausgeführt wurde, einen Farbenumschlag nach Rosa, der bei „gewisser Übung“ immer deutlich feststellbar sein soll. *von Balogh*⁴ teilte auf der Pathologentagung 1931 ergänzend mit, daß wie die Milz auch Kulturen von Gehirn, Rückenmark, Meningen, Herzbentel und Lunge in gleichem Sinne zur Gallenfarbstoffbildung befähigt sein sollen. Die Mengen des auftretenden Bilirubins wurden auf ungefähr 0,05 mg-% errechnet.

Bei unseren Untersuchungen über die Beziehungen der lebenden Zelle zu dem Blutfarbstoff *in vitro* befaßten wir uns eingehend mit der Frage, ob neben anderen Umwandlungsprodukten des Hämoglobins auch Gallenfarbstoff unter der Einwirkung der Zellkolonien aus dem Blutfarbstoff gebildet werden kann.

Obwohl bei diesen Experimenten die Bedingungen für eine Bildung von Bilirubin und seinen Nachweis möglichst günstig gestaltet waren, stehen unsere Ergebnisse in klarem Gegensatz zu den Befunden der oben erwähnten Forscher.

Wir legten unsere Versuchskulturen in *Carrel*-Flaschen an, in denen es möglich ist, größere Zellmengen 5—6 Tage ohne Erneuerung des Nährmediums voll lebensfähig zu erhalten, im Gegensatz zu Deckglas-Kulturen mit ihrem erheblich kürzeren Lebenszyklus. Setzt man in der Züchtungsflasche möglichst viele — etwa zwölf — Gewebsstückchen an, so wird erreicht, daß schon nach etwa 3 Tagen das gesamte feste Nährmedium von lebhaft wachsenden Zellen durchsetzt ist. Die Beschickung der Kulturen mit einer flüssigen Phase macht es dazu möglich, nicht nur größere Blutfarbstoffmengen in die Flasche zu bringen, sondern sie auch zu jeder Zeit, in jedem Entwicklungszustand der Zellkolonien, mit diesen in Berührung zu bringen. Wird die Nährflüssigkeit nach Versuchsbeendigung oder beim Wechsel der flüssigen Phase den Flaschen entnommen, so stehen genügend große Mengen zur Verfügung, um einen chemischen Gallenfarbstoffnachweis — insbesondere die Kuppelung als Azofarbstoff nach *H. v. d. Bergh* — ohne Abänderungen der Originalvorschrift durchzuführen.

Versuche.

Die Technik der Gewebezüchtung und die Gewinnung der Blutfarbstofflösung ist in der ersten Mitteilung unserer Untersuchungsreihe ausführlich beschrieben.

Zum Gallenfarbstoffnachweis bedienten wir uns neben der *H. v. d. Berghschen* Reaktion, der *Gmelinschen* und *Hammarstenschen* Probe.

Wir setzten eine größere Anzahl von *Milzstückchen* in *Carrel-Flaschen* an. In das Nährmedium, das aus 0,1 ccm Tyrodelösung und 0,5 ccm Hühnerplasma — durch einen Tropfen Embryonalextrakt zur Gerinnung gebracht — bestand, brachten wir je zehn Milzstückchen von 16tägigen Hühnerembryonen. Als flüssige Phase wurde $\frac{1}{2}$ ccm 33%iger Embryonalsaft in die Züchtungsflasche gegeben. Nach 2 spätestens 3 Tagen haben die lebhaft proliferierenden Zellen das gesamte feste Nährmedium durchsetzt. Zu diesem Zeitpunkt wird die Nährflüssigkeit abgesaugt und durch $\frac{1}{2}$ ccm einer Mischung von einem Teil unverdünnten Embryonal-extraktes und zwei Teilen Hämoglobinlösung in Tyrode ersetzt. Der Blutfarbstoff verteilt sich nach etwa 1—2 Stunden gleichmäßig über den ganzen Flascheninhalt, der kräftig, frisch-blutrot gefärbt erscheint.

Eine Beschreibung der mit bloßem Auge sichtbaren Veränderungen und der Beobachtungen bei täglicher spektroskopischer Verfolgung der Blatabbauvorgänge, die wie in früheren Untersuchungen durchgeführt wurden, ersparen wir uns. Wir konnten unsere Ergebnisse bestätigen, indem unter zunehmender Braufärbung der Nährmedien die Blutfarbe verschwindet, und die spektroskopische Untersuchung zeigt, wie entsprechend dem allmählichen Verschwinden der Oxyhämoglobinstreifen das Spektrum des Methämoglobins erscheint. Das Auftreten anderer Auslösungen konnte nicht beobachtet werden.

Am 3., 4., 5. und 6. Versuchstage wurde zur Untersuchung auf Gallenfarbstoff von einem Teil der Flaschen die oben stehende Flüssigkeit abgesaugt und das feste Koagulum mit 1 ccm 96%igem Alkohol zur Auslaugung überschichtet.

$\frac{1}{2}$ ccm der abgesaugten Nährflüssigkeit, die eine schmutzig braune Farbe hat, wurde mit 1 ccm 96%igem Alkohol versetzt. Es tritt eine starke Ausflockung ein, so daß das ganze Gemisch eine gleichmäßig trübe, braunrote Flüssigkeit darstellt, die nach 2—3 Min. abzentrifugiert wird. Der obenstehende alkoholische Auszug hat eine deutliche gelbrote, manchmal goldgelbe Farbe. 1 ccm des Extraktes wurde mit $\frac{1}{4}$ Volumen *Ehrlichs* Diazoniumlösung versetzt und gut vermischt. Die Flüssigkeit verfärbt sich nach Zusatz des Reagens nicht; auch nach längerer Zeit tritt keine Verfärbung nach rosa im Sinne des Azobilirubins auf. Nur in manchen Flaschen konnten wir eine leichte Verstärkung der gelbrot Farbe des Alkoholauszuges beobachten, aber niemals eine rosa Tönung. Auch die *Gmelinsche* Probe zeigt nur einen schwachen braunroten Ring an der Berührungsfläche mit dem Gemisch von rauchender und konzentrierter Salpetersäure aber nie eine typische Ringfolge oder einen grünen Ring. Die *Hammarstensche* Probe fiel ebenfalls negativ aus.

In genau der gleichen Weise wurde der alkoholische Auszug des zerkleinerten festen Flascheninhaltes untersucht: Gallenfarbstoff konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.

Um die Zellwirkung auf das Hämoglobin auch längere Zeit beobachten zu können, wurde in anderen Versuchsreihen nach dem Absaugen der flüssigen Phase von den Milzgewebskulturen am 5.—6. Bebrütungstage das feste Plasmakoagulum nicht mit Alkohol zur Extrahierung

überschichtet, sondern neuerlich mit dem Gemisch von Embryonalextrakt und Hämoglobinlösung beschickt und weiter bei 37° bebrütet. Die Untersuchung auf Gallenfarbstoff, die an den verschiedensten Versuchstagen (8.—12.) vorgenommen wurde, verlief auch jetzt stets negativ.

Kulturen aus frisch angesetzten Herzfragmenten, sowie aus älteren Fibroblastenstämmen, die unter denselben Bedingungen mit Blutfarbstoff zusammengebracht wurden, verhielten sich genau wie die Milzexplantate. Sie blieben ständig bilirubinfrei.

Bemerkenswert ist das Verhalten von Leberzellen. Niemals ist es uns gelungen, in den Nährmedien der Leberkulturen mit lebhaft proliferierenden Leberepithelmembranen, spindeligen oder amöboiden Retothelementen oder beiden zusammen, Bilirubin nachzuweisen. Die *in vitro* lebende Leberkultur ist, wie alle anderen untersuchten, in hämoglobinhaltigem Medium gezüchteten Gewebe zur Bilirubinbildung, völlig unfähig.

*Die Kulturen von Milz, Fibroblasten und Leber sind unter den Bedingungen des Lebens *in vitro* nicht imstande, aus dem zu dem Nährmedium zugefügten Blutfarbstoff Bilirubin in nachweisbaren Mengen zu bilden.*

Gleichlaufend mit den beschriebenen Versuchen stellten wir Kontrollexperimente in Carrel-Flaschen an, deren Inhalt (Plasma, Thyrodelösung und Embryonalextrakt) völlig dem der Versuchsflaschen entsprach, die aber keine Gewebe enthielten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe waren überraschend und veranlaßten uns, unsere Aufmerksamkeit von der Frage der Rolle der Zelle selbst für die Bilirubinentstehung abzulenken.

Wie wir in unserer Arbeit über den Abbau des Hämoglobins in Gewebskulturen⁵ kurz angedeutet haben, verläuft der Prozeß der Blutfarbstoffzerstörung in gewebsfreien Flaschen anders als in denen, wo der Blutfarbstoff in direkte Berührung mit der lebenden Zelle treten kann. Während in den Flaschen mit Milz-, Leber- oder Fibroblastenkolonien nach vorangegangener Methämoglobinbildung ein eigenartiger gelblicher Farbstoff² auftritt, geht der Hämoglobinabbau in Abwesenheit von lebendem Gewebe andere Wege. Der Hämoglobinschwund geht mit dem Auftreten bedeutender Hämatinmengen einher. Der Inhalt der gewebsfreien Flaschen, in denen der Blutfarbstoff durch Sprengung des Hämoglobinkomplexes in Eiweißanteil und eisenhaltige Gruppe abgebaut wird, ist eindeutig bilirubinhaltig. Es erfolgt also unter der Einwirkung von Gewebsextrakt und Plasma eine Hämoglobinzerstörung, die entweder direkt zur Gallenfarbstoffbildung führen oder doch die Grundlage für die Entstehung des Bilirubins schaffen kann.

Versuche.

Die alkoholischen Auszüge des flüssigen und festen Anteils des Nährmediums sind im Gegensatz zu solchen aus gewebehaltigen Flaschen

nur schwach gelb bis gelbgrün gefärbt. Bei Zusatz von *Ehrlichs* Reagens schlägt ihre Farbe eindeutig nach Rosa um. Dieser Farbenumschlag erreicht nach etwa 3—4 Min. seinen Höhepunkt, um danach allmählich abzublassen. Die Stärke der Rosafärbung ist gering, sie ist aber immer und sicher feststellbar. Bei Zusatz von Alkali geht die Farbe in Blaugrün über und die Lösung weist dann spektroskopisch in einer Schicht von 5—10 mm die unscharf begrenzte Auslöschung des alkalischen Azo-bilirubins zwischen etwa 540 und 630 $\mu\mu$ auf. Die *Gmelinsche* Probe ist deutlich positiv: Bei Unterschichtung mit salpetriger Säure tritt an der Berührungsebene eine charakteristische Ringbildung auf; ebenso ist die Probe nach *Hammarsten* positiv.

Bei dem Versuch, die Bilirubinmengen quantitativ zu erfassen, bekamen wir Werte von etwa 0,2—0,3 mg-%. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung können wir aber nur mit Zurückhaltung verwerten. Wie von den verschiedensten Seiten eingewendet wurde (*Thannhauser* und *Andersen*, *Holzer* und *Mehner*, *Ernst* und *Förster*, *Lepehne*) ist die quantitative Bestimmung von Bilirubinwerten unter 0,5 mg-% mit der *H. v. d. Berghschen* Methode nur sehr annähernd möglich. Wir konnten uns wiederholt überzeugen, wie schwer die Versuchslösung mit der Keilflüssigkeit im *Authenriethschen* Colorimeter, bei den in unserem Substrat immer vorhandenen Farbtonabweichungen zu vergleichen ist. Die Bestimmung des Bilirubingehaltes nach *Ernst* und *Förster* ergab etwas höherliegende Werte (um etwa 0,4 mg-%) als die, die nach der *H. v. d. Berghschen* Methode erhalten wurden.

Der positive Bilirubinbefund in gewebefreien Flaschen, d. h. der Nachweis einer Gallenfarbstoffbildung aus Hämoglobin als rein humoralem Vorgang reiht sich den Beobachtungen über eine Bilirubinbildung ohne jegliche Beteiligung von Zellen an.

Neben dem Streit über die Frage, welchen Zellen das Prinzip der Gallenfarbstoffbildung zukommt — ob hauptsächlich Leberzellen oder auch anderen Zellen und Zellsystemen — ist von vielen Forschern die Annahme offen gelassen worden, ob nicht auch eine Umwandlung des Blutfarbstoffes in Gallenfarbstoff innerhalb der Blutbahn oder irgendwo im Gewebe extracellulär, ohne unmittelbare Mitwirkung der Zelle möglich sein könne.

Seit *Virchow*⁷ zum erstenmal in alten Blutergüssen und im Leichenblut innerhalb der Gefäße Hämotoïdinkristalle gesehen und die humorale Gallenfarbstoffbildung zur Diskussion gestellt hat, sind eine Reihe von Beobachtungen und Experimente gemacht worden, die für eine extracelluläre Bilirubingenese sprechen.

Jones und *Jones*⁸ konnten an einem Patienten mit paroxysmaler Hämoglobinurie eine Beobachtung machen, die kaum anders als durch eine humorale Gallenfarbstoffbildung erklärt werden kann. Tauchte der Patient den am Oberarm abgebundenen Arm in kaltes Wasser, so fanden die Untersucher nach 33 Min. in dem Blut dieses Armes nicht nur freies Hämoglobin, sondern auch Gallenfarbstoff, der in den Capillaren gebildet worden sein soll. *Leschke*⁹ beobachtete, daß nach

Injektion von Blutkörperchen in den Lumbalsack in dem Liquor Bilirubin auftritt. Die Anwesenheit des Fermentes, das von den Endothelien gebildet werden und die Umwandlung bewirken soll, versuchte er in folgender Weise zu bestätigen: Längere Zeit, nachdem er Blutkörperchen in den Lumbalsack eingespritzt hatte, entnahm er Liquor, der jetzt das fragliche Ferment enthalten sollte, vermischt ihn zur Hälfte mit Erythrocyten und konnte nach Bebrütung feststellen, daß sich unter der Wirkung des fermenthaltigen Liquors das Bilirubin der Rückenmarksflüssigkeit im Reagensglas vermehrte. Von *Czike*¹⁰ beobachtete beträchtliche Vermehrungen des Bilirubins im Citrat- und Hirudinplasma, das hauptsächlich von Blut- und Leberkranken stammte, nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank. Die Wirksamkeit des Fermentes, das er für die Gallenfarbstoffbildung in Anspruch nimmt, kann durch Chinin und Natriumcyanit gehemmt werden. *Soejima*¹¹ konnte eine Bilirubinbildung bei aseptischer Autolyse des Blutes nicht feststellen; dagegen traten erhebliche Gallenfarbstoffmengen in Citrat- oder defibriniertem Blut auf das er bei Zimmertemperatur offen stehen ließ oder mit Luftkeimen infizierte. *Kirkowic* und *Russew*¹² die das zu- und abfließende Blut von Organen und einzelnen Kreislaufgebieten eben getöteter Pferde auf ihren Bilirubingehalt prüften und eine allmähliche Gallenfarbstoffzunahme in den großen Gefäßen parallel mit der Zunahme des Abstandes von einem Capillargebiet fanden, sowie in der Aorta mehr Bilirubin als in der Arteria pulmonalis, schließen, daß das Gallepigment im Herzen und in den großen Gefäßen gebildet werden müsse. Auch die Untersuchungen von *Whipple* und *Hooper*¹³ können hier angeführt werden. Sie schalteten nicht nur Milz und Leber, sondern die gesamten Bauchorgane aus der Zirkulation aus und konnten in dem Thorax-Kopfkreislauf nach Hämoglobininjektion in die Blutbahn immer noch eine Bilirubinbildung beobachten. *Mann* und Mitarbeiter¹⁴ kamen bei Experimenten von Organausschaltungen ebenfalls zu dem Schluß, daß die Gallenfarbstoffbildung in hervorragendem Maße in dem Blute und im Knochenmark vor sich geht. Auf Grund der *Lepelneschen* Versuche¹⁵ an kollargolgespeicherten Kaninchen kommt *Aschoff* zu der Ansicht, daß für diese Tiere die Hauptstätte der Bilirubinbildung in dem Blutplasma gesucht werden muß. Darauf hinaus betont *Aschoff*¹⁶ wiederholt die wichtige Rolle, die das Blut selbst für die Gallenfarbstoffbildung spielt. Sein Schüler *Bock*¹⁷ geht noch weiter, indem er schließt, daß sicherere Beweise und Beobachtungen für eine Gallenfarbstoffbildung im Blute vorliegen, als für irgendein anderes Organ- oder Zellsystem.

Die Ergebnisse unserer Experimente scheinen uns die immer mehr in den Vordergrund tretende Anschauung der humoralen Gallenfarbstoffbildung stützen zu können. Zum Unterschied von anderen, insbesondere von Tierexperimenten, die zum Beweise dieser Auffassung herangezogen werden, sind die Vorgänge der Bilirubinbildung *in vitro* klar übersichtlich und eindeutig.

Als sichergestellt betrachten wir die Möglichkeit der Gallenfarbstoffbildung ohne unmittelbaren Einfluß von Zellen. Die Frage aber, welche Rolle die Zelle bei der Bilirubinbildung mittelbar spielen kann, bleibt weiterer Arbeit vorbehalten.

Schrifttum.

¹ *Ishibashi*: Zit. nach *Ohno* s. *Klin. Wschr.* **47**, 2188 (1929); *Trans. jap. path. Soc.* **1924**. — ² *Rich, R. A.*: The formation of bile pigment. *Physic. Rev.* **5 II**, 182 (1925). — The formation of bile pigment from hemoglobin in tissue cultures. *Bull. Hopkins Hosp.* **35**, 415 (1924). — ³ *Sümegi, St. u. M. Csaba*: Bilirubinbildung

in Milzgewebskulturen. *Arch. exper. Zellforsch.* **11**, 339 (1931). — ⁴ *Balogh, E. v.:* Bilirubinbildung in Gewebekulturen. *Verh. dtsch. path. Ges.* **26**, 118 (1931). — ⁵ *Doljanski, L. u. O. Koch:* Über den Hämoglobinabbau in Gewebekulturen. *Virchows Arch.* **291**, 379 (1933). — ⁶ *Doljanski, L. u. O. Koch:* Über die Bildung eines gelben Farbstoffes in Gewebekulturen. *Virchows Arch.* **291**, 397 (1933). — ⁷ *Virchow, R.:* Die pathologischen Pigmente. *Virchows Arch.* **1**, 379 (1847). — ⁸ *Jones, Ch. u. B. B. Jones:* A study of hemoglobin metabolism in paroxysmal hemoglobinurie. *Arch. int. Med.* **24**, 669 (1922). — ⁹ *Leschke, E.:* Über die Gelbfärbung (Xanthochromie) der Cerebrospinalflüssigkeit. *Dtsch. med. Wschr.* **14**, 376 (1921). — ¹⁰ *Czike, A. v.:* Über Gallenfarbstoffbildung in vitro. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **164**, 236 (1929). — ¹¹ *Soejima, R.:* Über die extrahepatische Bilirubinbildung. *Arch. klin. Chir.* **149**, 206 (1928). — ¹² *Kirkowic, St. u. R. Russew:* Zur Bilirubinfrage. *Med. Klin.* **5**, 1 (1927). — ¹³ *Whipple, G. H. u. C. W. Hooper:* Icterus. A rapid change of hemoglobin to bile pigment in the circulation outside the liver. *J. of exper. Med.* **17**, 612 (1913). — ¹⁴ *Mann, Fr. C. Sheard, Ch. Bollmann, J. L. u. E. I. Baldes:* The formation of bile pigment from hemoglobin. *Amer. J. Physiol.* **76**, 306 (1926). — ¹⁵ *Lepelne, G.:* Milz und Leber. Ein Beitrag zur Frage des hämatogenen Icterus, zum Hämoglobin- und Eisenstoffwechsel. *Beitr. path. Anat.* **64**, 55 (1918). — ¹⁶ *Aschoff, L.:* Über Gallenfarbstoffbildung und Gelbsucht. *Klin. Wschr.* **39**, 1620 (1932). — Über den Ort der Gallenfarbstoffbildung. *Klin. Wschr.* **22**, 961 (1924). — ¹⁷ *Bock, E.:* Zum Problem der Gallenfarbstoffbildung und des Icterus. *Klin. Wschr.* **14**, 587; **15**, 638 (1924).