

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

Der Blutfarbstoff und die lebende Zelle*.

III. Mitteilung.

Über die Bildung eines gelben Farbstoffes in Gewebskulturen.

Von

L. Doljanski und O. Koch.

(Eingegangen am 1. August 1933.)

In der I. Mitteilung unserer Untersuchungsreihe¹ konnten wir über die ersten Umwandlungen des zu dem Nährmedium von Gewebskulturen zugesetzten Blutfarbstoffes berichten. Unter der Einwirkung der lebenden Zellen verschwindet das Oxyhämoglobin und der Blutfarbstoff wird teilweise zu Methämoglobin oxydiert. Weitere Wege der Hämoglobinzerstörung zu zeigen, war unsere nächste Aufgabe.

Die Untersuchungen, über die wir in der vorliegenden Mitteilung berichten wollen, wurden an dem flüssigen Nährmedium von in *Carrel*-Flaschen angelegten Milz-, Leber- und Fibroblastenkulturen ausgeführt. Die flüssige Phase wurde, nachdem sie zusammen mit dem ihr zugefügten Blutfarbstoff mehrere Tage in inniger Berührung mit den lebenden Zellen geblieben war, zur weiteren Untersuchung entnommen. Die schmutzig-bräunliche Flüssigkeit enthält zu diesem Zeitpunkt — am 6.—8. Bebrütungstage — durchweg kein Oxyhämoglobin mehr; dagegen ist Methämoglobin in beträchtlichen Mengen vorhanden. Die Methämoglobinemengen, die während der ersten Bebrütungszeit ständig zunehmen, erleiden, nachdem einmal am 5.—6. Tage ein Maximum erreicht ist, eine allmähliche Abnahme. Die fortlaufend durchgeführte spektroskopische Beobachtung ist nicht imstande Aufschluß über den Verbleib des verschwundenen Methämoglobinanteiles und über die weiteren Wege zu geben, der die Hämoglobinzerstörungsvorgänge folgen. Mit dem Schwinden des Spektrums des Oxy- und Methämoglobins geht nicht das Auftreten irgendeiner neuen Auslöschung einher.

Im Gegensatz zu den negativen spektroskopischen Befunden zeigt das Verhalten des flüssigen Flascheninhaltes bei chemischen Prüfungen Besonderheiten, die auf die Anwesenheit eines neu aufgetretenen Farbstoffes schließen lassen. Alkoholische Auszüge der Versuchsflüssigkeit deuten darauf hin, daß außer dem Methämoglobin ein weiterer Farbstoff

* Ausgeführt mit Unterstützung der *Goldmann*-Stiftung.

unter der Zelleinwirkung aus dem Hämoglobin gebildet worden sein muß. Der Alkoholextrakt zeigt nämlich eine sehr deutliche, eigenartig gelbrote Färbung, die durch die Anwesenheit des Methämoglobins nicht bedingt sein kann. Da wir nachweisen konnten, daß die in der Gewebekultur lebenden Zellen nicht imstande sind aus dem ihnen zugefügten Blutfarbstoff Bilirubin zu bilden², mußten wir annehmen, daß die Färbung des Auszuges vielleicht durch die Anwesenheit eines anderen Farbstoffes bedingt sein könnte.

Zur Bestimmung der Natur des Farbstoffes untersuchten wir seine Löslichkeitsverhältnisse und das spektrale Verhalten seiner Lösungen.

Von einer größeren Anzahl von 6—8 Tage alten Milz-, Leber- und Fibroblastenkulturen in *Carrel*-Flaschen, die genau so angelegt waren wie wir es in unserer I. Mitteilung beschrieben haben¹, sammelten wir getrennt für jede Zellart die Nährflüssigkeit. Das Ausgangsmaterial ist eine braune, oft leicht schmutzig gefärbte, klare Flüssigkeit. Spektroskopisch zeigt sie besonders die unscharfe Auslöschung des Methämoglobins im Rot und in größerer oder geringerer Stärke die Streifen seines Mischspektrums. In einzelnen Fällen traten noch die Reste der Oxyhämoglobinauslöschungen hervor.

Zur chemischen Untersuchung wurde zuerst ein Teil der Flüssigkeit mit Chloroform ausgeschüttelt, wobei ein gelber bis gelbroter Farbstoff in dasselbe übergeht. Die Farbe des Chloroformauszuges ist schon nach 2 Stunden, wenn er dem Tageslicht ausgesetzt wird, merklich abgeblaßt und nach 12 Stunden ist die Flüssigkeit fast völlig entfärbt und zeigt nur noch einen ganz geringen grauen bis grau-grünen Farbton. In Äther kann der Farbstoff nicht direkt übergeschüttelt werden. Ein anderer Teil der Versuchsflüssigkeit wurde mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure angesäuert: Es erfolgt eine sofortige Ausflockung zu einer breiigen, gelbroten Masse, die mit dem zweifachen Volumen Äther ausgeschüttelt wurde. Jetzt geht der Farbstoff in den Äther über, der sich zuerst gelbrot färbt. Im Verlaufe von kurzer Zeit aber (10—15 Min.) wird die Farbe dieser ätherischen Lösung immer deutlicher rot, so daß nach 10 Min. von der Gelbfärbung nichts mehr zu sehen ist. Ein Teil des Ätherauszuges wurde weiterhin mit $\frac{1}{4}$ Volumen *Ehrlichs* Diazoniumlösung versetzt: Der Farbstoff kuppelt nicht zur Azoverbindung, der schon leicht röte Farbton der Lösung wird nicht stärker und zeigt auch keine andersartige rote oder rosa Farbtonung. Die Diazoniumlösung findet sich ungefärbt unter der Ätherschicht. Ein anderer Teil des Ätherextraktes wurde mit verdünnter Sodalösung ausgeschüttelt. Dabei entfärbt sich der Ätherextrakt und der Farbstoff geht in die alkalische Lösung über: Die Sodalösung erscheint gelbrot danach fast rein gelb mit einem ganz leicht rötlichen Ton. Nach diesem Übergang in alkalische Lösung ist es nicht mehr möglich, den Farbstoff neuerlich in Äther zu übernehmen auch nicht nach Ansäuerung mit Salzsäure.

Spektroskopisch zeigt der gelbrot gefärbte Chloroformauszug der Versuchsflüssigkeit keine Absorption. Dagegen läßt der anfänglich gelbrote später rein rote Ätherextrakt ein deutliches Streifenspektrumerkennen:

Ein unscharf begrenzter Streifen im Grün zwischen $550\ \mu\mu$ und $535\ \mu\mu$
 Einen zweiten Streifen im Blau zwischen $510\ \mu\mu$ und $480\ \mu\mu$
 Endabsorption von etwa $435\ \mu\mu$ an.

Obwohl die Alkoholauszüge keine *H. v. d. Berghsche* Reaktion zeigen, verdient ihr eigenartiges Verhalten nach Zusatz von Diazoniumlösung besondere Erwähnung. Die gelbroten Extrakte werden nach Vermischung mit dem *Ehrlichschen* Reagenz höchstens etwas klarer; bei Alkalisierung mit Natronlauge nimmt die Flüssigkeit aber schlagartig eine starke satt-goldgelbe Farbe an, die sich in den nächsten Minuten noch verstärkt und beständig ist.

Zur Bildung des gelben Farbstoffes sind Milzkulturen, wie auch einfache Bindegewebszellen in gleichem Maße fähig. Bei der getrennten Untersuchung der Kulturflüssigkeit der beiden Gewebsarten konnten wir keine Unterschiede feststellen. Dagegen scheinen manche Versuche an Lebergewebskulturen dafür zu sprechen, daß die Leberzelle zur Bildung des Farbstoffes besonders befähigt ist. In den Flaschen mit Leberzellexplantaten tritt er oft in besonders reichlichen Mengen auf.

Die alkoholischen Auszüge des Inhaltes von Kontrollflaschen, die ohne Gewebe, aber mit genau den gleichen Plasma- und Embryonal-extraktmengen angelegt und denen zu gleicher Zeit wie den kulturhaltigen Flaschen Blutfarbstofflösung zugefügt wurde, zeigen ein *grundsätzlich anderes Verhalten*. Schon die Farbe ihres flüssigen Inhaltes ist viel schwächer und blasser als die der gewebehaltigen Flaschen und dazu nicht braun und schmutzig, sondern mehr gelbbraun bis gelbrot. Sie unterscheiden sich aber nicht nur durch ihre Farbe von den gewebehaltigen Flaschen. Beim Ausschütteln mit Chloroform geht aus ihrem flüssigen Nährmedium nichts in Lösung, wie auch die salzsauren Ätherauszüge sich meist nur leicht braun anfärben. In Äther allein kann auch aus ihnen nichts übergeschüttelt werden.

Obwohl die Färbung und das Verhalten des salzsauren Ätherauszuges auch durch die gleichzeitige Anwesenheit von Methämoglobin, bzw. Hämatin bedingt sein könnte, sprechen doch die grundsätzliche Unterschiede der Färbung des Ätherauszuges von gewebehaltigen und gewebefreien Flaschen dafür, daß die in ihnen enthaltenen Farbstoffe nicht die gleichen sind. Darüber hinaus zeigt die Chloroformlöslichkeit und das spektrale Verhalten dieser Lösung eindeutig, daß es sich um keines der bekannteren Blutabbauprodukte handeln kann.

Die eigenartige Farbe und das Verhalten des in den Kulturen auftretenden Farbstoffes legte uns den Gedanken nahe, daß unter der Einwirkung der lebenden Zelle ein Farbstoff entstanden sein könnte, der mit dem von *Rosenthal*, *Melchior* und *Licht*³ sowie *Enderlen*,

Thannhauser und *Jenke* ⁴ beschriebenen, und von den letztgenannten Autoren als „Xantorubin“ bezeichneten, übereinstimmen könnte.

Die ersten Berichte über das Auftreten dieses gelben Farbstoffes im lebenden Körper schließen sich an die Untersuchungen an leberlosen Hunden an. *Mann* und *Magath* ⁵ beobachteten, daß das vorher farblose Serum des Hundes nach der Entfernung der Leber eine zunehmende Gelbfärbung zeigt. Die Autoren führten diese Verfärbung auf die Anwesenheit von extrahepatisch neugebildetem Bilirubin zurück. Bei Wiederholung der Versuche der amerikanischen Forscher durch *Rosenthal*, sowie *Thannhauser* beobachteten beide aber gleichzeitig und unabhängig voneinander, daß die starke Gelbfärbung des Serums der Hunde nach der Leberentfernung in auffälligem Widerspruch zu dem geringen Bilirubingehalt steht. Die aufgetretenen Gallenfarbstoffmengen sind meist so gering, daß sie allein die hochgradige Gelbfärbung keinesfalls erklären können. Auch die Zunahme der Gelbfärbung des Serums, bzw. seiner alkoholischen Auszüge hält nicht Schritt mit den nachweisbaren Bilirubinmengen, sondern wie *Rosenthal*, *Melchior* und *Licht* beobachtet haben, nimmt sie rascher zu als es dem Anschwellen der Bilirubinämie entspricht. Mit der Ausschaltung der Leber mußte also noch ein anderer Farbstoff in der Blutbahn aufgetreten sein, der das Serum wie auch die Gewebe der Tiere gleich dem Gallenfarbstoff gelb färbt, aber nicht mit diesem übereinstimmt. *Hans Fischer* und *Reindel* ⁴ verdanken wir die erste chemische Charakterisierung des Xantorubins. Danach stimmen Löslichkeitsverhältnisse und das spektrale Verhalten der Lösungen des gelben Farbstoffes unserer Kulturen weitgehend mit denen des Xantorubins überein.

Bei den unter der Einwirkung von lebenden Zellen in der Gewebeskultur bewirkten Hämoglobinabbauvorgängen tritt nach einiger Zeit ein gelber Farbstoff auf, der näher gekennzeichnet wird. Seine Eigenschaften stimmen in vielen Beziehungen mit denen des „Xantorubins“ (*Enderlen*, *Thannhauser* und *Jenke*) überein. Die Bildung dieses Farbstoffes aus dem Hämoglobin scheint eine grundlegende Eigenschaft der lebenden Zelle zu sein, denn in Berührung mit den üblichen Nährmedien allein (ohne Zellkulturen), findet die Bildung des Farbstoffes nicht statt.

Schrifttum.

- ¹ *Doljanski, L. u. O. Koch*: Über den Blutfarbstoffabbau in Gewebeskulturen. *Virchows Arch.* **291**, 379 (1933). — ² *Doljanski, L. u. O. Koch*: Zur Frage der Bilirubinbildung in vitro. *Virchows Arch.* **291**, 390 (1933). — ³ *Rosenthal, F., E. Melchior u. H. Licht*: Untersuchungen am leberlosen Säugetier. *Arch. f. exper. Path.* **107**, 238 (1925). — ⁴ *Enderlen, E., S. J. Thannhauser u. M. Jenke*: Beobachtungen über ein gelbes Pigment im Blute nach Leberexstirpation (Xantorubin). *Arch. f. exper. Path.* **120**, 16 (1927). — Siehe auch *Thannhauser*: Diskussionsbemerkung, *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **37**, 277 (1925). — ⁵ *Mann, Fr. C. u. Th. B. Magath*: Die Wirkungen der totalen Leberexstirpation. *Erg. Physiol.* **23 I**, 212 (1924).