

(Aus dem II. Pathologisch-anatomischen Institut der kgl. ungar. Pázmány Péter-Universität in Budapest [Direktor: Dr. *Ernst v. Balogh*, o. ö. Prof.].)

Weitere Untersuchungen über Gallenfarbstoffbildung in Milzgewebeskulturen.

Von

St. Sümegi, M. Csaba und E. v. Balogh.

(Eingegangen am 11. Juli 1934.)

Am 2. internationalen Kongreß für Zellforschung in Amsterdam, 1930, teilten wir (*Sümegi* und *Csaba*) Untersuchungen mit, in denen eine Bildung von Gallenfarbstoff in Gewebeskulturen der Milz von 18- bis 19tägigen Hühnerembryonen und von erwachsenen Fröschen mit der Hilfe einer Modifikation des *van den Bergh*schen Diazoverfahrens festgestellt werden konnte. Die Gallenfarbstoffbildung wurde auf Grund der Untersuchungen als eine vitale Funktion der Milz gedeutet. Die Versuche wurden dann auf die Anregung von Herrn Prof. *v. Balogh* auch auf andere Organe erweitert, die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden von ihm an der 26. Tagung der Deutschen Pathologischen Gesellschaft in München, 1931, mitgeteilt. Laut diesen konnte eine Gallenfarbstoffbildung außer der Milz auch in Gehirn und Rückenmarksfragmenten mit oder ohne Meningen, Herzbeutel, Iris und Lungen der wenigstens 18—20tägigen Hühnerembryonen nachgewiesen werden. Kulturen von Meerschweinchenorganen ergaben ebenfalls ein positives Resultat bei Milz, Gehirn, Iris, Nebennierenmark und Knochenmark. Die Kulturen ohne Hämoglobinangebot, außerdem die leeren Tropfen der bebrüteten Ingredientien ergaben außer einzelnen Kulturen von blutreichen Milzstückchen negatives Resultat.

Die Versuche schienen uns nach den bekannten Untersuchungen von *Mann* und *Magath* über Bilirubinbildung an leberlosen Tieren und von *Ernst* und *Szappanyos* über Bilirubinbildung in der 3—4 Stunden lang überlebenden und durchströmten Hundemilz den endgültigen Beweis zur extrahepatischen Gallenfarbstoffbildung durch die Zellen des reticuloendothelialen Systems zu liefern.

Im folgenden soll über Untersuchungen kurz berichtet werden, welche hauptsächlich wegen verschiedener Einwände gegen diese Auffassung, teils auch wegen widersprechender Nachprüfungen gemacht worden sind.

I.

Es wird schon lange von manchen Autoren behauptet, daß die Gallenfarbstoffbildung ein fermentativer Prozeß sei. *Aschoff*, *Leschke*, *Makino*,

Rich u. a. nehmen im allgemeinen ein extracelluläres Ferment an, mittels dessen das Hämoglobin in Bilirubin umgewandelt werden soll. *Recklinghausen* fand im steril aufbewahrten Blute, *v. Czike* im Menschenserum, unter denselben Kautelen, nach einigen Tagen eine Vermehrung des Gallenfarbstoffes und schließen daraus auf das Vorhandensein eines Fermentes im Blute. Dies scheint auch durch die interessanten Liquoruntersuchungen von *Leschke* bestätigt zu werden; er injizierte rote Blutkörperchen in den Duralsack seiner Patienten, erlangte nach 2 bis 3 Tagen eine Xanthochromie und glaubte in dem xanthochromen und vermutlich Ferment enthaltenden Liquor nach Beimischung von frischem Blute in einigen Tagen die Vermehrung des Gallenfarbstoffes nachweisen zu können. Leider fehlen jegliche Angaben sowohl über die Methodik der quantitativen Bestimmung als auch über die Menge des produzierten Farbstoffes. Die positiven Befunde der bebrüteten Blutproben konnten von *Leupold*, *Hueck*, *Rich*, *Makino*, *Soejima*, *Ernst* nicht bestätigt werden. Wir selbst versuchten hämolysiertes Blut, Citratblut und gewaschene rote Blutkörperchen in Ringerlösung aufgeschwemmt in sterilen Epruvetten 8 Tage lang teils zur Kontrolle im Eisschrank, teils im Thermostat bei 37° aufzubewahren. Die Blutproben stammten von Menschen, Hühnern, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen und Hunden. Hühner, Meerschweinchen, Hunde und Katzen zeigten in ihren Blutproben eine negative Diazoreaktion, in den übrigen wurde der Gallenfarbstoffgehalt quantitativ bestimmt. Zu einem Teil der Proben wurde auch arteigener Liquor beigemischt. Bei diesen neulich wiederholten Untersuchungen war in keinem der diazonegativen Proben ein positiver Umschlag derselben festzustellen, die übrigen zeigten nur minimale Schwankungen des Gallenfarbstoffgehaltes. Im Bodensatz der mit Liquor aufbewahrten Proben waren Hämatoidinkristalle nicht nachweisbar. Das Spektrum des Oxyhämoglobins blieb unverändert, Methämoglobinbildung konnte nicht erzielt werden. Die Frage wurde zuletzt ausführlich von *Ernst* und *Hallay* behandelt. Ihre Untersuchungen mit Hundeblut decken sich mit den unseren. Sie erklären die in etwa 15% der Fälle nachweisbare Erhöhung von oder über 10% des Bilirubingehaltes der Proben mit einer Erniedrigung des Plasmavolumens um 3—16%, was der Erhöhung der Konzentration des Bilirubins entspricht. Sie konnten weder in hämorrhagischen Exsudaten ein Ferment nachweisen, noch konnten sie ein solches in der Milz bzw. Milzextrakten finden (s. auch *Rich* und *Bumstead*).

Wir versuchten die etwaige fermentative Wirkung in unseren Milzkulturen, wie das schon an der Münchener Tagung von Herrn Prof. *v. Balogh* kurz erwähnt wurde, durch ein „Fermentgift“ aufzuheben. Dazu verwendeten wir eine 1/1000 Mol-Lösung von KCN. 1 Tropfen dieser Lösung verhinderte die Gallenfarbstoffbildung in den Kulturen nicht. Diese Versuche wurden seit der Zeit ergänzt und es stellte sich

folgendes heraus: Wenn die Milzkulturen des 18tägigen Hühnerembryos sowohl in den Kontrollen als auch mit 1 Tropfen (0,05 ccm) KCN-Lösung ein gutes Wachstum zeigten, so konnte die positive Diazoreaktion immer nachgewiesen werden. Wurde aber durch KCN das Wachstum des Milzfragmentes verhindert, so konnte zwar in den gut gedeihenden Kulturen derselben Milz ohne KCN eine Gallenfarbstoffbildung nachgewiesen werden, doch blieb dieselbe in den nicht auswachsenden Cyankulturen aus. Um unsere KCN-Lösung als Fermentgift bezeichnen zu können, vermengten wir 1 ccm derselben mit 0,3% NaCl abgestuften Mengen einer Speichellösung (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 usw.); zu den Röhrchen kam noch außerdem der *Wohlgemuths*chen Versuchsanordnung entsprechend je 5 ccm einer 1%igen Stärkelösung. Der Kontrollversuch wurde ebenso, nur ohne KCN, ausgeführt. Nach 20 Min. Aufbewahrung bei 37° konnten im Kontrollversuch 160, im Cyanversuch nur 40 Diastaseeinheiten nachgewiesen werden. Hiermit ist die Herabsetzung der Fermenttätigkeit durch die Cyanlösung nachgewiesen und die obigen Versuche sprechen für den Zusammenhang der vitalen Funktion der Zellen mit der Gallenfarbstoffbildung.

Die H-Ionen üben, wie bekannt, einen sehr ausgesprochenen Einfluß auf die Fermentwirkung aus. Das Wirkungsoptimum der Diastase liegt z. B. ungefähr bei p_H 6,8, das des Pepsins bei p_H 1,7 usw. Hierbei kann die Wirkung der H-Ionen sowohl auf die elektrolytische Dissoziation wie auch auf den kolloidalen Zustand der Fermente entfaltet werden (*Michaelis*). Wir untersuchten den Einfluß der H-Ionen auf die Bilirubinbildung in 8 Versuchsreihen. Explantiert wurden Milz und Gehirn des Hühnerembryos und von Meerschweinchen. Die Kulturen wurden mittels Bakterienfilter sterilisierten Phosphatpuffermischungen von p_H 5,5 mit p_H 0,02 steigend bis p_H 7,80 angesetzt. In den Hühnerversuchen ergab sich sowohl für Milz als auch für Gehirn ein Bildungsoptimum des Farbstoffes von p_H 6,66—7,38. In dieser Breite ist das Wachstum nicht beeinträchtigt, die Diazoreaktion ist gleich so stark wie in den Kontrollen ohne Phosphatzusatz. Die Gallenfarbstoffbildung hört sowohl nach der saueren als auch nach der alkalischen Seite zu auf, zugleich wird aber das Wachstum und das Auswandern in den Explantaten stark beeinflußt, meist ganz verhindert. In den Meerschweinchenversuchen zeigte sich folgendes: *Gehirn*: In den Kulturen von p_H 5,6—6,8 ist die Diazoreaktion negativ. Von p_H 7,0—7,4 ist die Reaktion stark positiv, von p_H 7,6—7,8 wieder negativ. Das Wachstum der Kulturen geht mit diesen Resultaten ganz parallel. *Milz*: Die Kulturen wuchsen von p_H 5,8—7,8 sehr gut; die *van den Berghs*che Reaktion war in sämtlichen stark positiv. Hämatoidinkrystalle waren auch in allen Kulturen zu finden. Das empfindlichere Gehirn wächst also nur in einer bestimmten p_H -Breite, die lebensfähigere Milz dagegen trotz dem Unbehagen des Milieus und zeigt ein ausgezeichnetes Wachstum

in allen Explantaten. Da die Gallenfarbstoffbildung überall mit dem Wachstum parallel geht, können diese Versuche ebenfalls im Sinne eines Zusammenhanges zwischen Vitalität der Zellen und ihrer bilirubinbildende Fähigkeit gedeutet werden.

Im selben Sinne ist folgender Versuch aufzufassen: Wird die 18tägige Hühnermilzkultur ohne hämolysiertes Blut angelegt, bebrütet und am 4. Tage der Bebrütung das Blut erst zugetropft, so sehen wir 1 Tag später gar nichts, 2 Tage später Spuren und am 3. Tage erst eine ausgesprochene Gallenfarbstoffbildung. Wird der Versuch wiederholt mit dem Unterschied, daß das Blut erst am 8. Tag der Leerbebrütung — also zu einer Zeit, wo schon sehr ausgeprägte Degeneration und Verfettung der ausgeschwemmten Zellen und eine weit fortgeschrittene Degeneration und Nekrose des Mutterstückes zu finden ist — so können wir trotz des früher stattgefundenen guten Wachstums 4 bis 5 Tage später nicht einmal Spuren vom Gallenfarbstoff nachweisen. Wird das Mutterstück ausgewaschen und in frischem Nährboden mit hämolysiertem Blut umgesetzt und auf erfolgreicher Weise weitergezüchtet, so findet nach der entsprechenden Latenzzeit wieder eine, wenn auch im Vergleich zu den früheren schwächere Farbstoffbildung statt.

II.

Es wurde schon oft, besonders von *Retzlaff* u. a., die Frage erörtert, ob die Gallenfarbstoffwirkung nicht etwa einer Bakterienwirkung zuzuschreiben wäre. Außer an Luftbakterien wurde besonders auch an Pneumokokken gedacht, wegen der noch immer nicht genügend erklärten biliären Pneumonie. Zwar hat die Theorie der Bakterienwirkung wenig Verlockendes an sich, doch können gewisse Resultate verzeichnet werden, was bei den großen Fehlerquellen der in vitro-Versuchen — wie wir sahen — auch nicht zu bewundern ist (*Herzfeld* und *Steiger*, *Soejima*, *Rich*, *Retzlaff*). *Ernst* und *Hallay* nahmen die ganze Frage an der I. Medizinischen Klinik unserer Universität noch einmal auf und untersuchten die Wirkung von 17 pathogenen Bakterienarten auf die Gallenfarbstoffwirkung. Eine solche war aber weder von Pneumokokken, noch von den anderen Bakterien aufzuzeigen, auch die Wirkung der Luftbakterien konnte ausgeschlossen werden.

Wir selbst machten einige Versuche mit Toxinen von Typhusbacillen. Dieselben bezweckten eigentlich nicht etwa den Nachweis der Wirkung dieser Noxe direkt auf die Gallenfarbstoffbildung, sondern es sollte eher auf die etwaige Gewebsschädigung geachtet werden.

Wir benützten bei diesen Versuchen toxinhaltige, aber bakterienfreie Bouillonfiltrate der Typhuskulturen. Es wurden Milz-, Iris- und Gehirnkulturen der Hühnerembryonen mit hämolysiertem Blut +

1 Tropfen Typhustoxin angesetzt. — 1. Milz: Kulturen ohne Toxin zeigten gutes Wachstum, Bilirubin stark positiv. Kulturen mit Toxin: schlechtes oder gar kein Wachstum, Bilirubin negativ oder nur in Spuren nachweisbar. — 2. Gehirn: Kulturen ohne Toxin zeigen gutes Wachstum, Bilirubin stark positiv; Kulturen mit Toxin: keine Ausschwemmung der Zellen nachweisbar, Bilirubin negativ. — 3. Iriskulturen ohne Toxin: gutes Wachstum, Bilirubin stark positiv; Kulturen mit Toxin: schlechtes Wachstum, Bilirubin negativ. Der Zusammenhang zwischen der Vitalität der Zellen und ihrer Fähigkeit den Farbstoff zu bilden ist also auch aus diesen Versuchen klar zu ersehen.

III.

Zuletzt untersuchten wir noch, ob eine vorausgegangene Blockade der Milz die Gallenfarbstoffbildung beeinträchtigt (*v. Balogh*). Auf die umfangreiche Literatur kann hier nicht eingegangen werden. Es wird im allgemeinen angenommen, daß, wenn eine Blockade überhaupt möglich ist, sich dieselbe nur auf mehr oder weniger umfangreiche Teile des betreffenden Organs erstrecken kann. Wegen der sehr großen Regenerationsfähigkeit des reticuloendothelialen Systems werden sofort große Mengen von neuen Zellen gebildet, die sogleich ihre Funktion beginnen und praktisch genommen unendliche Mengen eines einverleibten Materials aufnehmen können. Es ist andererseits fraglich, ob, wenn auch Zellen mit einem Material vollgespeichert erscheinen, ihre anderen Funktionen (Abwehrfunktion, Immunkörper- und Bilirubinbildung usw.) dadurch beeinflußt werden. *Rosenthal* und Mitarbeitern sahen nach Eisenspeicherung noch die Aufnahme von Tuscheteilchen. *Sümegi* konnte in seinen mit *Weiß* vorgenommenen Untersuchungen die phagocytierende Tätigkeit der Reticuloendothelialzellen gegenüber kernhaltigen roten Blutkörperchen nach einer hochgradigen vorausgehenden Behandlung der Tiere mit Eisenzucker nachweisen. Das Verschwinden der kernhaltigen roten Blutkörperchen aus dem Kreislauf erfuhr aber eine Verzögerung von etwa 12 Stunden. Dasselbe fand zuletzt *Margarete Hesse* bei *Anitschkow*. Sie sah in der Leber nach Carmineinspritzung eine maximal 48 Stunden lang dauernde, in der Milz nach Kollargol oder Tusche eine etwa 24 Stunden lang dauernde vollständige Blockade gegen Trypanblau. Nach dieser Latenzzeit wurde aber infolge der lebhaften Regeneration und „Selbstreinigung“ der Reticuloendothelialzellen die transitorische Blockade durchbrochen und Trypanblau wieder aufgenommen.

Was die Gallenfarbstoffbildung blockierter Tiere betrifft, so seien außer den bekannten und ziemlich widersprechenden Versuchsergebnissen von *Lepéhne*, *Eppinger*, *Rosenthal* und Mitarbeitern, *Bieling-Isaac*, *Elek* u. a. nur die von *Ernst* und *Förster* erwähnt. Sie fanden,

daß die Milz von kollargol- oder eisengespeicherten Hunden im 4-Stunden-Versuch mit hämolysiertem Blut durchströmt dieselbe Menge von Gallenfarbstoff (0,6—2,2 mg-%) erzeugte als die Milz von nicht blockierten Kontrolltieren. Sie schließen daraus, daß die Blockade die Gallenfarbstoffbildung der Hundemilz nicht beeinflußt.

Zu den eigenen Untersuchungen wählten wir als Versuchsobjekte Meerschweinchen, da wir über die Gallenfarbstoff- und Hämatoidinkrystallbildungsfähigkeit ihrer Milz schon genügend unterrichtet waren (*v. Balogh*). Die Tiere wurden mit Tusche 10 Tage lang täglich intraperitoneal gespritzt (1 ccm einer 20%igen Lösung). Die Milz war makroskopisch tiefschwarz und wurde, wie gewöhnlich, mit hämolysiertem Blut explantiert. Die Versuche wurden in 5 Serien mit einer genügenden Menge von nicht blockierten Kontrollen unternommen. Die Ergebnisse sind folgende: In drei Serien der blockierten Milzexplantate (alle von verschiedenen Tieren) konnte keine Gallenfarbstoffbildung nachgewiesen werden, während in den zugleich angesetzten, nicht tuschegespeicherten Milzkulturen der Kontrolltiere eine ausgesprochen positive Diazoreaktion erzielt wurde. In den zwei übrigen Serien war eine schwach positive Diazoreaktion zu verzeichnen, während die Milzkulturen der Kontrolltiere auch hier stark positiv waren.

Ein Teil der Kulturen wurde fixiert und mit ihnen nachher teils eine *Perls*-Reaktion durchgeführt, teils wurden Schnittpräparate verfertigt. In allen Serien der blockierten Milzen war ein gutes Wachstum zu verzeichnen. In der Auswanderungszone sind Zellen zu sehen, die mit Tuschekörnchen ganz übergefüllt sind, daneben auch solche, die nur einige Körnchen enthalten oder ganz frei davon sind. Im Mutterstück sind die meisten Zellen voll von schwarzen Körnchen, die Zellen aber, die weniger Körnchen oder gar keine enthalten, sind auch hier in großer Zahl zu sehen. Hämosiderin ist in vielen Zellen sowohl der blockierten wie auch der nicht behandelten Milzen zu sehen. Hämatoidinkrystalle sind in sämtlichen Kontrollmilzen zu finden, von den fünf Serien der blockierten Milzen sind sie in dreien nachweisbar, in zweien nicht. Von den letzteren zweien war die Diazoreaktion einmal schwach positiv, einmal negativ. Auch in der Menge der Krystalle konnte zwischen blockierten und unbehandelten Tieren kein Unterschied gefunden werden.

Nach diesen Versuchen sollte also eigentlich auf eine gewisse Beeinträchtigung der Gallenfarbstoffbildung der mit Tusche blockierten Milzen gefolgert werden, was ja tatsächlich der Fall ist, was aber mit den Angaben des Schrifttums in Widerspruch steht. Die Tatsache ist wie folgt zu erklären: Es ist klar, daß die Lebensfähigkeit und das Wachstum der Milzfragmente trotz der Tuschespeicherung nicht vermindert ist, trotzdem ist die Diazoreaktion negativ oder höchstens sehr schwach.

Die Ursache kann also wahrscheinlich nur quantitativer Natur sein, und zwar kann als solche die Verminderung der gallenfarbstoffbildenden Oberfläche angenommen werden. Die mit Tuschkörnchen überfüllten Zellen sind unfähig Bilirubin zu bilden, der Farbstoff wird nur von den weniger gefüllten und von den tuschefreien Zellen erzeugt, die aber zu wenig sind, um die genügende Menge und Konzentration des durch Diazotierung wahrnehmbaren Bilirubins herzustellen. In manchen Fällen entsteht nur, wie wir sahen, in 5 Tagen diese Menge, wodurch eine ganz schwache Diazoreaktion festzustellen ist. Daß jedoch auch in den diazonegativen Serien eine Gallenfarbstoffbildung vor sich geht, kann ganz genau aus dem Erscheinen der Hämatoidinkristalle festgestellt werden¹. Ähnliche Versuchsbedingungen haben wir im Jahre 1931 mitgeteilt, bei welchen statt der üblichen $\frac{1}{7}$ Teil der Milz von Hühnerembryonen nur ein $\frac{1}{12}$ Teil davon eingesetzt wurde. Hier konnten wir keine Gallenfarbstoffbildung nach dem Ablauf der Latenzzeit feststellen, jedenfalls deshalb, weil die produzierte Menge des Farbstoffes infolge der Kleinheit des Fragmentes den Schwellenwert der *van den Berghschen* Reaktion nicht erreichte. Wurden nämlich zwei $\frac{1}{12}$ Teile (= $\frac{1}{6}$ Teil der Milz) in *eine* Kultur eingesetzt, so war die Reaktion wie gewöhnlich wieder positiv. Es geht aus diesen Untersuchungen in entscheidender Weise hervor, daß die Blockade unter entsprechenden Umständen zu einer Funktionsprüfung des reticuloendothelialen Systems taugen kann. In den explantierten Fragmenten der Milz ist die Gallenfarbstoffbildung infolge der Speicherung nicht verhindert, aber deutlich gehemmt. Dieser Unterschied kam in den Versuchen von *Ernst* und *Förster* bei Durchblutung der ganzen kollargolgespeicherten Milz nicht zum Vorschein, da die ganze Milz in genügender Größe aktive Zellgebiete besitzt und die Unterschiede sich ausgleichen². Die Verschiedenheit und die Unregelmäßigkeit der Ausbreitung derselben und die zufällige Quantität in dem betreffenden Fragment erklärt auch die manchmal schwach positive Diazoreaktion einzelner Kulturen der blockierten Milzen. Der Zusammenhang zwischen Gallenfarbstoffbildung und Gewebsvitalität einerseits und Gallenfarbstoffbildung und reticuloendothelialem System andererseits gewinnt durch diese Untersuchungen neuartige und beachtenswerte Beleuchtung.

Es sei noch erwähnt, daß die letzterwähnten Meerschweinchenkulturen, wie auch die der jetzt noch zu beschreibenden Experimente nicht nur wie früher spektroskopisch, sondern auch mit Hilfe der mikroskopischen *Fluoreszenzeinrichtung* (*Reichert*) auf ihren Gehalt an Porphyrin untersucht wurden, doch war Porphyrin niemals zu finden.

¹ Näheres darüber s. bei *v. Balogh*: Verh. dtsch. path. Ges. 1931.

² Die morphologischen Belege ihrer Auffassung, auf histologischen Untersuchungen fußend, sind im Original nachzulesen.

IV.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen erschienen im Virchows Archiv, Bd. 291, die interessanten Arbeiten von *Doljanski* und *Koch* über den „Blutfarbstoff und die lebende Zelle“. Da sie sich auf unsere früheren Arbeiten berufen und besonders, weil ihre Ergebnisse mit den unseren einigermaßen in Widerspruch stehen, soll auf diese noch kurz eingegangen werden.

Den ersten Teil ihrer Untersuchungen, in welchem sie eine Methämoglobinbildung in bebrüteten *Carrel*-Flaschen-Explantaten von Fibroblasten und Milz fanden, können wir vollkommen bestätigen; auch wir sahen die Methämoglobinbildung und deren charakteristisches spektroskopische Verhalten in unseren Hängetropfenkolonien, nur wurden diese Untersuchungen nicht veröffentlicht. In den Kontrolltropfen, die nur die Ingredientien enthalten, kann bis zum 5. Tage nur das Oxyhämoglobinspektrum nachgewiesen werden. Eine beginnende Absorption zwischen λ 630—650 konnten wir nur sehr selten beobachten.

Im zweiten Teil ihrer Untersuchungen kommen *Doljanski* und *Koch* zu dem merkwürdigen Ergebnis, daß die mit 16tägigen Hühnerembryonen-Milzfragmenten angesetzten und gut proliferierenden *Carrel*-Kulturen, die 3—6 Tage und auch länger bebrütet wurden, zu keiner Gallenfarbstoffbildung fähig sind, sondern einen neuartigen Farbstoff, das „Xanthorubin“, bilden. Sie finden dagegen in den Kontrollflaschen, welche nur Hühnerplasma, Extrakt und hämolysiertes Blut enthalten, eine positive Diazoreaktion, also Bilirubin. Da diese Versuche in grundsätzlichem Widerspruch mit unseren früheren und den jetzt beschriebenen stehen, wurde von uns die Frage noch einmal aufgerollt und *Doljanskis* und *Kochs* Versuche teils nachgeprüft, teils durch neue ergänzt.

Es muß zu allererst ausdrücklich betont werden, daß bei ausschlaggebenden Nachuntersuchungen unserer Veröffentlichungen vollkommen dieselben Versuchsbedingungen und Kautelen strengstens eingehalten werden müßten, die wir genau angegeben haben (*v. Balogh*). Das vermissen wir jedoch bei *Doljanski* und *Koch*, da sie 16tägige Hühnerembryonen benützten, weiterhin an Stelle unserer Deckgläserkulturen *Carrel*-Kulturen anlegten und das hämolysierte Blut erst nach 2—3 Tagen dazugaben. Wir haben aber mit 18—20tägigen Embryonen, Hängetropfenkulturen und mit sogleich beim Einsetzen dazugeträufeltem Blut gearbeitet. Die Diazoreaktion führten sie im Zentrifugat des alkoholischen Extraktes durch, trotzdem wir zeigten, daß damit viel Bilirubin mitgerissen wird, was ein negatives Resultat vortäuschen kann. Trotzdem wiederholten wir sowohl ihre wie auch unsere Versuchsanordnung und arbeiteten nun mit 16tägigen, aber auch mit 19tägigen Embryonen, außerdem gaben wir das hämolysierte Blut zu den Explantaten nach 2 Tagen, bzw. sofort und benützten *Carrel*-Flaschen, aber auch Hängetropfenkulturen.

Ergebnisse.

Nr.	Methode	16tägige Embryonen, <i>Carrel</i> -Flasche	16tägige Embryonen, Hängetropfen	18tägige Embryonen, <i>Carrel</i> -Flasche	18tägige Embryonen, Hängetropfen
1	<i>Doljanski</i> u. <i>Koch</i> Eigene	negativ	— negativ	negativ stark positiv	— stark positiv
2	<i>Doljanski</i> u. <i>Koch</i> Eigene	schwach positiv negativ	— negativ	negativ „	— stark positiv
3	<i>Doljanski</i> u. <i>Koch</i> Eigene	schwach positiv negativ	negativ —	stark positiv „	stark positiv —
4	<i>Doljanski</i> u. <i>Koch</i> Eigene	schwach positiv	schwach positiv	„ „	stark positiv

Es zeigt sich also, daß die Milzen der 16tägigen Embryonen nach der Methode von *Doljanski* und *Koch* und auch nach der eigenen untersucht, im allgemeinen ihren Ergebnissen entsprechend sich negativ verhalten, es kann aber doch hier und da eine sehr schwache Diazoreaktion gefunden werden, während die der 18tägigen Hühnerembryonen mit der eigenen Methode immer stark positiv gallenfarbstoffbildend sind. In den *Carrel*-Flaschen kann mit der eigenen Methode in drei Serien, einmal sogar auch nach Zentrifugieren, die Diazoreaktion nachgewiesen werden. Dieser auffallende Unterschied zwischen 16- und 18tägigen Embryonen, kann nicht mit Bestimmtheit erklärt werden. Die Leber und die Gallenblase des 16tägigen Embryos sind schon bilirubinhalzig. Wird der Chloroformauszug des Leberbreies verdunstet und in Alkohol aufgenommen, so ergibt sich eine positive Diazoreaktion. Es muß aber auf die große Veränderung und Umschwung des ganzen Stoffwechsels betreffend speziell Atmung und Kreislauf, die der Hühnerembryo gerade am 18. Tage der Bebrütung erfährt, aufmerksam gemacht werden. „Am 3. Tage der Bebrütung ist schon das Herz mit den großen endoembryonalen Gefäßen sichtbar, welche mit den Gefäßen der Area vasculosa in Zusammenhang treten, füllen sich daher mit Blut und die Zirkulation beginnt. Diese ‚circulatio vitellina‘ wird später vom Allantoiskreislauf verdrängt. Die Allantois vereint sich aber bald mit dem amniogenen Chorion, ihre Flüssigkeit wird immer weniger, die Gefäße werden immer enger, viele thrombosieren auch, der Kreislauf hört auf, der Embryo durchbricht mit seinem Schnabel die Hüllen und am 18. Tage der Bebrütung beginnt die Lungenatmung. Das Ausschlüpfen erfolgt am 21. Tage¹.“ *Diesem Umschwung am 18. Tage muß sich die Milz auch anpassen und erst zu dieser Zeit scheint ihre Entwicklung soweit fortgeschritten zu sein, daß sie der Bilirubinbildung in nachweisbaren Mengen fähig ist.*

Mit der 18tägigen Milz konnte in den Hängetropfenkulturen immer eine positive Reaktion erzielt werden, während in den *Carrel*-Flaschen Kulturen die Unterschiede zwischen den beiden Methoden augenfällig

¹ Sümegi: Kupferhaushalt des Hühnerembryos. Frankf. Z. Path. 43.

sind. Hier kann nur an die mitgerissenen Mengen des Bilirubins im Eiweißkoagulum gedacht werden, worauf wir schon in unserer ersten Mitteilung hinwiesen. Es muß aber auch der Umstand beachtet werden, daß das an dem 2.—3. Tag zugetropfelte Blut nur mit den ausgeschwemmten Zellen in inniger Berührung tritt, während die Mutterstücke, in denen schon regressive Veränderungen auftreten, in der festen Phase eingeschlossen nur oberflächlich oder gar nicht genügend mit den hämolysierten Blutkörperchen in Verbindung kommen können. Daß die in Explantaten ausgewanderten Zellen im allgemeinen der Bilirubinbildung kaum fähig sind, wurde schon ebenfalls in unserer ersten Mitteilung gezeigt. Daß die Methodik von *Doljanski* und *Koch* den Forderungen nicht gewachsen ist, zeigt übrigens ihr Ergebnis mit der 16tägigen Embryonenleber, welche nach ihrer Methode kein Bilirubin bildet, obwohl, wie wir oben beschrieben haben, aus derselben schon in vitro Bilirubin zu extrahieren ist, es muß also auch das eingesetzte Stückchen schon Gallenfarbstoff enthalten.

Was zuletzt die Behauptungen der Gallenfarbstoffbildung in den Kontrollkulturen ohne Gewebstücke anbelangt, so können wir ihnen auch in diesem Punkt nicht beistimmen. Wir prüften in fünf Serien ihre Ergebnisse nach, fanden aber niemals eine positive Diazoreaktion in den *Carrel*schen Flaschen ohne Gewebsfragmente. Eines stimmt mit ihren Untersuchungen überein, daß, wenn dem Alkoholauszug Diazo-reagens zugetropft wird, schlägt dieser sofort in den schwach roten Farbenton des Azobilirubins um und täuscht so im Vergleich mit den gelblichen Vergleichsröhrchen die positive Diazoreaktion vor. Das wurde von uns schon früher auch gefunden. Wird aber nach unserer Vorschrift dem Vergleichsröhrchen Diazo I (also nur der salzsaure Sulphanylkomples) zugefügt in derselben Menge als dem anderen Röhrchen der fertige Diazo-reagens, so erhält man sofort denselben Farbenton und zwischen den beiden Röhrchen ist keine Farbdifferenz feststellbar. Fügt man nun HCl beiden Röhrchen zu, so entsteht langsam im Kontrollröhrchen die bräunlichgelbe Farbe des HCl-Hämatins; der Inhalt des Diazoröhrchens bleibt dagegen unverändert. Die Reaktion muß also als negativ bezeichnet werden. Es entsteht wohl die grünlichgelbe Farbe, wenn wir Lauge (20%) zu den Diazoröhrchen fügen — wie wir das schon in den allerersten Untersuchungen sahen —, das muß aber in ganz anderem Sinne gedeutet werden und hängt mit *Doljanskis* und *Kochs* dritter Mitteilung zusammen, in welcher sie über einen Farbstoff, das Xanthorubin, berichten, der sich in den *Carrel*-Flaschen mit verschiedenen Organen der 16tägigen Embryonen nach 6—8 Tagen bilden soll, in den Kontrollflaschen aber nicht nachzuweisen sei. Die Bildung des Xanthorubins hängt also — ihrer Meinung nach — mit der Funktion lebender Zellen zusammen. Als Reaktionen dieses Farbstoffes führen sie unter anderem folgende an: 1. den gelben

Farbenton des Chloroformauszuges, 2. die negative Diazoreaktion und den Umschlag derselben nach Alkalisierung in eine „satt-goldgelbe Farbe“ und 3. die rote Farbe des Ätherextraktes nach Salzsäurebehandlung des Ausgangsmaterials und das Übergehen dieser Farbe in eine Sodalösung nach Ausschütteln.

Es würde den Rahmen dieser Auseinandersetzungen überschreiten, wenn wir uns noch ausführlich mit diesen Erscheinungen befassen würden. Hier soll nur noch folgendes angeführt werden:

ad 2. Einer von uns (*Sümegi*) arbeitete eine Methode aus, um den Gallenfarbstoff in Gefrierschnitten nachweisen zu können. Die Resultate sind von *Láng*¹ veröffentlicht worden. Es stellte sich heraus, daß die Empfindlichkeit der Reaktion eine derartige ist, daß der rosa Farbenton des Azobilirubins und dessen Umschlag ins Blaue nach Salzsäurebehandlung nur bei ausgesprochenem Ikterus (auch dynamischer Ikterus nach Alkoholbehandlung) zustande kommt. Der Umschlag ins Gelblichgrüne nach NaOH kann dagegen auch bei dem *normalen* Bilirubingehalt der menschlichen Organe immer beobachtet werden. Wir äußerten dabei die Meinung, daß das alkalische Azobilirubin für das Auge viel leichter zu beobachten ist als die Farbe des einfachen (neutralen) Azobilirubins. Wir gewannen noch mehr den Eindruck, als wir die Flüssigkeit von 5 Tage lang bebrüteten Milzkulturen untersuchten, denen aber hämolysiertes Blut nicht zugesetzt wurde. Hier war die Diazoreaktion negativ, nach Alkalisierung trat aber immer ein leicht grünlich gelblicher Farbumschlag ein. Dasselbe ist zu beobachten an solchen Kulturen, die zwar mit Blut bebrütet waren, aber eine negative Diazoreaktion aufwiesen, so z. B. bei den 16tägigen Hühnerembryonen. Die Konzentration und die Bildung des Bilirubins ist also in den Kulturen ein derartiger Prozeß, bei dem zuerst das alkalische Azobilirubin und erst später der neutrale Farbstoff wahrnehmbar wird.

Untersuchen wir einfaches frisches Hühnerplasma, das an und für sich citronengelb ist, so sehen wir, daß nach Zusatz von Aceton die Farbe der überstehenden Flüssigkeit noch immer gelblich ist. Die Diazoreaktion ist negativ, auf HCl keine Veränderung, auf NaOH ein deutlicher Umschlag ins Goldgelbe. Hier allein ist kein grünlicher Farbenton zu beobachten. Dasselbe ist zu sehen, wenn wir die Reaktion mit hämolysiertem Hühnerblut entweder frisch oder auch 5 Tage lang im Thermostaten bebrütet anstellen. Doch ist hier der Farbumschlag grünlichgelb. Dasselbe ist zu beobachten, wenn alle Ingredientien in *Carrel*-Flaschen oder in Hängetrophen bebrütet werden, und dasselbe, wenn sie frisch zusammengemischt sind. Bezeichnen wir diese Reaktionen mit „+“, so sind diese Kulturen, die Gewebsfragmente enthalten — auch wenn die Diazoreaktion noch negativ ist — mit „+++“ zu bezeichnen.

¹ *Láng*: Verh. ung. path. Ges. 1, (1932).

ad 3. Zur Klärung dieser interessanten Reaktion führten wir folgende Untersuchungen aus:

a) Normales Menschenblut mit wenig NaFl. Bilirubingehalt 0,68 mg-%. Nach Zufügen von etwas konzentrierter HCl entsteht ein dicker Niederschlag. Ausschütteln mit Äther: binnen etwa 15 Min. ist die überstehende Flüssigkeit deutlich blaßrosa. Dekantieren wir ein wenig davon und fügen anstatt Sodalösung 20% NaOH dazu, so entfärbt sich die Flüssigkeit und es entsteht an der Grenze von Äther-NaOH ein deutlicher grüner Ring. Wird ein anderer Teil des rosafarbigem Ätherextraktes mit Alkohol behandelt und fügen wir dann etwa $\frac{1}{10}$ Teil Diazoreagens hinzu und alkalisieren es nachher, so sehen wir nach der Diazotierung keine Änderung der Farbe, der grüne Ring wird aber viel breiter und intensiver.

b) Fluoridblut von einem Fall mit Cholecystitis. Fieberfrei. Serum-Bilirubingehalt 1,68 mg-%. Direkte Diazoreaktion prompt positiv. Nach Ausschütteln des salzsauren Niederschlages wurde der Äther schon nach einigen Minuten schön rosafarbig. Die übrigen Reaktionen verlaufen alle wie bei a) geschildert, nur ist der grüne Ring viel intensiver und breiter.

c) Urin von demselben Patienten. Eiweiß in Spuren, Bilirubin positiv, er enthält außerdem sehr viel Urobilinogen und auch Urobilin. Schütteln wir den HCl-Niederschlag mit Äther aus, so wird letzterer rötlichgelb; die Farbe ändert sich nach einer halben Stunde nicht, dieselbe Farbe kann in NaOH überschüttelt werden; der grüne Ring ist nicht sichtbar. Wird der Urin zuerst mit Chloroform extrahiert, so wird er citronengelb. Fügen wir nun zum Chloroformextrakt HCl zu und schütteln jetzt den neuen Niederschlag mit Äther aus, so wird dieser in einigen Minuten schön rosafarbig, auf NaOH ist ein schöner, dünner, grüner Ring sichtbar.

d) Frisches diazonegatives Hühnerblut, durch etwas destilliertes Wasser hämolysiert, zeigt im Äther eine kaum wahrnehmbare rosa Farbe nach etwa 30 Min. Wird Alkohol, dann Diazoreagens und dann NaOH zugefügt, so wird der grüne Ring schön sichtbar, wenn auch viel schwächer als im Menschenblut.

e) *Thannhausersche* Standardbilirubinlösung (5 mg-%) in Chloroform. Verdunsten in einer Epruvette im Wasserbad. Der Rest wird in konzentrierte HCl aufgenommen, welche sich gelb färbt. Schütteln wir jetzt dies mit Äther aus, so wird im Gegensatz zu den Körpersäften die Salzsäure schwach rot, der Äther dagegen „cholesteringrün“. (Die Farbe vom Cholesterin + Schwefelsäure + Essigsäureanhydrid.) An der Grenze von Salzsäure-Äther ist ein schöner rosalila Ring sichtbar. Auf NaOH tritt eine Entfärbung ein und der Ring wird kaum wahrnehmbar grünlich. Wird der ganze Komplex zuerst mit Alkohol behandelt und auch Diazoreagens zugefügt, so erreicht der grüne Ring ungefähr die Intensität des Hühnerblutringes.

V.

Kurz zusammenfassend sehen wir also, daß die Gallenfarbstoffbildung im 16tägigen Hühnerembryo zwar schon im vollen Gange ist, da die Gallenblase schon mit dunkelgrüner Galle gefüllt erscheint, und die Leber und auch andere Organe eine positive Diazoreaktion geben, doch kann zu dieser Zeit die Milz unter den Verhältnissen in der Gewebeskultur noch nicht eine genügende Menge Bilirubin bilden. Die Verhältnisse entwickeln sich derart, daß in diesen Kulturen zuerst nur nach Alkalisierung des Diazoröhrchens die goldgelbe Farbe des ebenso behandelten frischen Hühnerplasmas zutage tritt, dann folgt die Beimischung eines grünlichen Farbentons und nur erst am 18. Tage der Bebrütung wird auch die Diazoreaktion meistens positiv. Dabei müssen aber die quantitativen Verhältnisse der Ingredientien, besonders die Menge des sofort zuzuträufelnden hämolysierten Blutes eingehalten werden¹, da die Anwesenheit von größeren Mengen nicht abgebauten Hämoglobins auf die Beurteilung der Reaktion störend einwirken kann. Auch darf keine Zentrifugierung vorgenommen werden.

Die genaue Beurteilung unserer in Gewebskulturen ausführbaren Mikroreaktion beansprucht keine besondere Begabung, jedoch gewisse Übung und einen guten individuellen Farbensinn. Einer von uns (*v. Balogh*) charakterisierte sie an der vorjährigen Tagung der Pariser Anatomischen Gesellschaft mit diesen Worten: „Cette méthode mikro-chimique de *Sümegi* ne s'offre malheureusement pas à la pratique courante, parce que le jugement des nuances extrêmement délicates demande une routine considerable, et avant tout un sens visuel individuel de premier ordre.“

Die Frage des Xanthorubins und überhaupt jene der Zwischenstufen von Hämoglobin-Bilirubin und der weitere Abbau des letzteren ist unserer Meinung nach noch lange nicht gelöst. Wir wollten nur zeigen, daß gewisse Zusammenhänge mit den beschriebenen Farbenreaktionen doch gefunden werden können, wenn wir uns auch vorläufig mit der Kenntnisnahme der Tatsachen begnügen müssen. Die Reaktionen können — wie wir sahen — auch im frischen Material ausgeführt werden und es müssen weitere Versuche entscheiden, ob da nicht auch andere Farbstoffe oder Produkte (Urobilin, Urobilinogen usw.) mit im Spiele sind, da reines Bilirubin dieselben Reaktionen ziemlich schwach gibt. Mag aber auch Bilirubin in den allein bebrüteten Ingredientien (Plasma + Extrakt + Blut) entstehen — was ja prinzipiell nicht geleugnet werden kann und darf — so müssen wir doch auf Grund der obigen Untersuchungen über Ferment-, Bakterien- bzw. Toxin- und Cyanwirkung, außerdem auf Grund der Konzentrationsveränderungen des p_H des Milieus und der Blockadeversuche darauf bestehen, daß der Gallenfarbstoff extrahepatisch entstehen kann und daß in seiner Bildung den Zellen und deren

¹ Siehe *v. Balogh*: 26. Tagg dtsh. path. Ges. 1931.

Vitalität eine hochwichtige Rolle beigemessen werden muß. Die Verhältnisse scheinen uns dieselben zu sein, wie sie gerade von *Doljanski* und *Roulet* betreffend der argyrophilen Substanz¹ experimentell in einleuchtender Weise geschildert wurden. Die Blockade mag die Gallenfarbstoffbildung zwar hemmen, aber wegen ihrer Unvollständigkeit nicht ganz aufheben (negative Diazoreaktion, aber positiver Befund von Hämatoidinkrystallen). Auf Grund der letzteren Ergebnisse scheint uns auch der Satz gerechtfertigt, daß nicht den Zellen im allgemeinen, sondern den Zellen des reticuloendothelialen Systems die höchste Bedeutung zugeschrieben werden muß.

Zusammenfassung.

1. In steril aufbewahrten Blutproben von Menschen und Versuchstieren mit oder ohne Cerebrospinalflüssigkeit kann auch nach 1 Woche weder eine Vermehrung, noch die Bildung von Gallenfarbstoff und auch nicht das Erscheinen von Hämatoidinkrystallen festgestellt werden.

2. Kaliumcyanid beeinträchtigt die Gallenfarbstoffbildung in Milzkulturen nur insofern, als es auch manchmal das Wachstum derselben verhindert.

3. Die Veränderung der H-Ionenkonzentration der Gewebeskulturen verhindert die Gallenfarbstoffbildung nur dann, wenn nach der sauren oder auch nach der alkalischen Seite zu das Wachstum der Zellen ebenfalls gehemmt ist.

4. Dieselben Ergebnisse sind mit Typhustoxin zu erzielen.

5. Die vorausgegangene Tuscheblockade verhindert das Wachstum der Explantate von Meerschweinchenmilz nicht, die Bilirubinbildung wird aber wegen der Verminderung der Zahl der farbstoff erzeugenden Zellen gehemmt. Hämatoidinkrystalle können meistens auch in diesen Fällen gefunden werden.

6. Zur Gallenfarbstoffbildung in Gewebeskulturen ist die Milz des Hühnerembryos erst nach dem Aufhören des Allantoiskreislaufes und nach Beginn der Lungenatmung fähig. Trotz der in der Leber schon vorhandenen Gallenfarbstoffbildung in vivo gelingt das Experiment früher nur sehr selten.

7. Mit den bebrüteten, wie auch mit den frischen Ingredientien angestellte Diazoreaktion fällt negativ aus. Die scheinbar positiven Resultate können mit einer nachträglichen Säuerung bzw. Alkalisierung richtiggestellt werden und sind im Sinne der wahrscheinlichen ständigen Anwesenheit einer solchen Menge von Bilirubin zu deuten, welche den Schwellenwert einer positiven *van den Bergh*schen Reaktion nicht erreicht. Es können noch Farbenreaktionen des verwendeten Ausgangsmaterials (Plasma bzw. hämolysiertes Blut) und auch von anderen

¹ *Doljanski* u. *Roulet*: Virchows Arch. 291.

Körpersäften nachgewiesen werden, die scheinbar außer vom Gallenfarbstoff auch von der Anwesenheit anderer Abbauprodukte abhängen.

8. Aus den Untersuchungen wird auf die überwiegende Rolle der Zellen des reticuloendothelialen Systems bei der Gallenfarbstoffbildung gefolgert.

Schrifttum.

- Aschoff*: Erg. inn. Med. **1924**. — Klin. Wschr. **1924**; **1926**. — Acta path. scand. (Københ.) **5** (1928). — *v. Balogh*: Verh. dtsch. path. Ges., **26**. Tagg **1931**. — Ann. d'Anat. path. **10**, No. 8 (1933). — *Czike*: Dtsch. Arch. klin. Med. **164**, 236 (1929). — *Doljanski* u. *Koch*: Virchows Arch. **291**, 3. Mitt. (1933). — *Doljanski* u. *Roulet*: Virchows Arch. **291**. — *Elek*: Klin. Wschr. **1924**. — *Ernst*: Biochem. Z. **157** (1925). — *Ernst* u. *Förster*: Klin. Wschr. **1924**. — *Ernst* u. *Hallay*: Z. exper. Med. **78** (1931). — *Herzfeld* u. *Steiger*: Med. Klin. **1910**. — *Hesse*: Beitr. path. Anat. **93**, 36—100 (1934). *Hueck*: Zit. n. *Ernst-Hallay*. — *Láng*: Verh. ung. path. Ges. **1932**. — *Lepehne*: Beitr. path. Anat. **64**; **65**. — Dtsch. Arch. klin. Med. **135**. — *Leschke*: Dtsch. med. Wschr. **1921**. — *Leupold*: Beitr. path. Anat. **59**. — *Makino*: Beitr. path. Anat. **72**. — *Michaelis-Róna*: Physikalische Chemie. Berlin: Julius Springer 1930. — *Recklinghausen*: Zit. n. *Rich*. — *Retzlaff*: Z. exper. Med. **34** (1924). — *Rich*: Bull. Hopkins Hosp. **34**; **35**; **36**. — Physiologic. Rev. **5** (1925). — *Rich* and *Bumstead*: Bull. Hopkins Hosp. **36**. — *Rosenthal* u. Mitarbeitern: Arch. f. exper. Path. **94**; **107**. — Klin. Wschr. **1924**. — *Soejima*: Arch. klin. Chir. **149** (1928). — *Sümegi*: Frankf. Z. Path. **43** (1932). — *Sümegi-Csaba*: Arch. exper. Zellforsch. **11** (1931). — *Sümegi-Weiß*: Wien. Arch. inn. Med. **10** (1925).