

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie und Therapie der kgl. ungar. Franz Josef-Universität in Szeged-Ungarn [Direktor: Dr. A. v. Jeney, o. ö. Prof.].)

Weitere Beobachtungen an überlebenden blutbildenden Organen *.

Von

Prof. Dr. A. v. Jeney.

Mit 5 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 2. August 1934.)

Zuletzt hatte ich vor Jahresfrist Gelegenheit, in dieser Zeitschrift über meine Beobachtungen am überlebenden Knochenmark zu berichten¹. Das von mir benützte Verfahren wurde in seinen Einzelheiten sowohl dort wie auch in meinen früheren einschlägigen Mitteilungen beschrieben. Die ungefähr 3×5 mm großen Knochenmarkstückchen wurden 48 Stunden in heparinhaltigem Eigenplasma gehalten. Als eine der auffallendsten Erscheinungen war zu verzeichnen, daß auf die Einwirkung von Arginin und Histidin mehr normale, reife, rote Blutkörper erschienen waren als bei irgendeinem der früheren Versuche. Dieser Versuch wurde seither von mir mehrmals wiederholt und der seinerzeit beschriebene Befund konnte immer wieder bestätigt werden. Von neueren Erfahrungen sei erwähnt, daß diese Wirkung durch Prolin gefördert zu werden scheint; ähnlich verhielt sich auch ein Extrakt, der die unverseifbaren Bestandteile der Leber enthält.

Um auf diesem Wege weiter zu gelangen, untersuchte ich nunmehr die Argininderivate sowie die Wirkung der mit diesen in irgendeinem Zusammenhang stehenden Verbindungen. Sowie bisher das Arginin, wurden auch diese biochemischen Produkte in einer Konzentration von m/10 verwendet; je 0,1 ccm der verwendeten Verbindungen wurden mit je 3 ccm doppelt verdünntem Kaninchenplasma vermengt, so daß die in Frage stehenden Stoffe in einer Konzentration von m/300 zur Wirkung gelangten.

Vor allem untersuchte ich die Wirkung des *Agmatins*, das bekanntlich durch die Decarboxylierung des Arginins entsteht. Diese Verbindung erwies sich als wirkungslos.

Ferner wollte ich Argininderivate untersuchen, die weniger N₂ enthalten als Arginin. Den N₂-Gehalt des Arginins versuchte ich dadurch zu vermindern, daß ich dieses in der Gegenwart von Natriumnitrit mit Schwefelsäure vermengte. Auf die Einwirkung des nascierenden HNO₂ entfernte sich unter lebhafter Dampfbildung N₂. Der so entstandene, keine überschüssige Schwefelsäure enthaltende Stoff wies ebenfalls nicht

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

die ursprüngliche Wirkung des Arginins auf. Auf die 10 Min. dauernde Einwirkung ultravioletter Strahlen blieb die Wirkungskraft des Arginins unverändert.

Da Arginin bekanntlich eine Guanidin enthaltende Verbindung darstellt (Guanidin- α -Aminovaleriansäure) und dieses durch die Oxydation mit Kaliumpermanganat aus demselben gewonnen werden kann, wurde auch die Wirkung des *Guanidins* geprüft: auf die Einwirkung dieser Verbindung waren auf der einen Seite der Organstückchen etwas mehr rote Blutkörper zu finden. *Kreatinin* lässt sich als Guanidinderivat

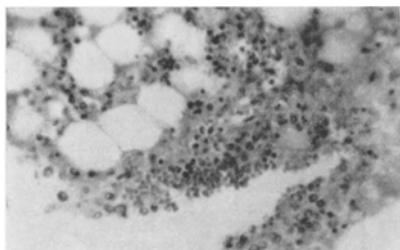


Abb. 1a. 24. Cs. 21. Cadaverin.

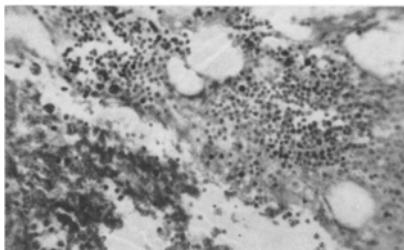


Abb. 1b. 27. Cs. 9. Arginin + Prolin + Carotin.

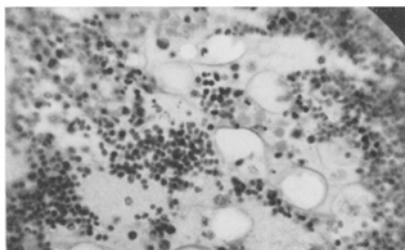


Abb. 1c. 28. Cs. 10. Arginin + $FeCl_2$ + $CoCl_2$.

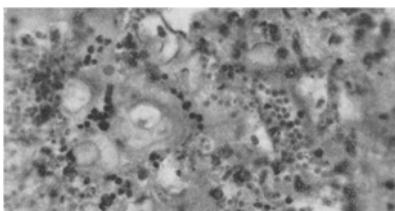


Abb. 1. Kaninchenknochenmarkstückchen nach 48 Stunden.

am einfachsten aus Arginin ableiten. Durch die Beimengung dieses Stoffes entstanden an den Knochenmarkstückchen keine nennenswerten Veränderungen.

Auch *Ornithin*, das aus Arginin durch die Einwirkung der Arginase entsteht, erwies sich als wirkungslos; ebenso das aus dem Ornithin nach der Abspaltung von CO_2 entstandene *Putrescin*. *Cadaverin* jedoch, das aus dem Lysin auf ähnliche Weise entsteht, ließ eine gewisse Wirkung erkennen: an der einen Seite der Organstückchen waren zahlreiche normale rote Blutkörper zu finden (Abb. 1 a).

Da die Spermapräparate reich an Protaminen bzw. Diaminosäuren sind (Arginin, Lysin, Ornithin), untersuchte ich auch die Wirkung des *Spermins* und des *Spermidins*. Das erstere zeigte sich wirkungslos, bei

der Verwendung des letzteren war an der Zahl der Normoblasten eine Vermehrung zu beobachten.

In den zum Vergleich dienenden Kontrollversuchen waren nach 48 Stunden normale rote Blutkörper in größerer Anzahl nicht anzutreffen. Auch diese meine neueren Versuche scheinen dafür zu sprechen, daß die roten Blutkörper leicht der Autolyse anheimfallen, wenn sie durch einen „anderen Faktor“ nicht etwa daran gehindert werden.

In meinen früheren Versuchen hatte ich Gelegenheit, den fördernden Einfluß der Ferrosalze auf die Erythrocytenbildung zu beobachten; nun untersuchte ich den Einfluß anderer *Metallsalze*. Wie bisher, wurden auch nun die Metallsalze in 0,1%igen Lösungen verwendet. Das zur Untersuchung gelangte Material (3×5 mm große Organstücke in 3 ccm Plasma) wurde mit je 0,1 mg versetzt. Außer durch FeCl_2 konnte auch durch Cu_2Cl_2 , MnCl_2 und insbesondere durch CoCl_2 eine wesentliche Steigerung der Erythrocytenbildung erzielt werden, die noch deutlicher war, wenn zugleich auch Globin und Hämatoporphyrin oder Arginin allein oder zusammen mit Prolin hinzugefügt worden war (Abb. 1 c und 1 d). Cu_2Cl_2 übte in Gegenwart von FeCl_2 eine gesteigerte Wirkung aus.

Von den bekannten *Blutgiften* versuchte ich auch die Wirkung einiger *in vitro* festzustellen:

Acid. pyrogallicum. 1 Tropfen der 1%igen Lösung wurde mittels der Pasteurschen Pipette zu 3 ccm Plasma hinzugefügt und das Organstückchen (Milz!) in diese Mischung gelegt. Nach 48 Stunden war an den Rändern eine Vermehrung der Normoblasten sowie Myeloblasten zu sehen. Die Kerne der Normoblasten ließen starke Karyopyknose erkennen (Abb. 2); hyperchromatische Erythrocyten bloß in mäßiger Anzahl. Normale, reife Erythrocyten waren nur dann in größerer Zahl vorhanden, wenn der Reaktionsmischung Cholesterin beigemengt worden war.

Phenylhydrazin. 1 Tropfen der 1%igen Lösung auf 3 ccm Plasma. Im Knochenmark finden sich neben ziemlich viel Normoblasten viel normale rote Blutkörper, wenn der Reaktionsmischung auch Cholesterin beigefügt worden war.

Toluylendiamin. 0,1 ccm der 0,05%igen Lösung auf 3 ccm Plasma. An den Rändern der Knochenmarkstücke gelöstes Hämoglobin sowie zahlreiche Myelocyten mit groben eosinophilen Körnern.

Benzol. 1 Tropfen auf 3 ccm Plasma. Das Knochenmark erscheint zellenarm, rote Blutkörper sind kaum zu finden.

Desoxycholsäure. 0,1 ccm der 1%igen Lösung auf 3 ccm Plasma. In dem Knochenmarkstückchen bleibt sozusagen bloß das Reticulum bestehen.

Schon in meiner ersten einschlägigen Mitteilung² konnte ich darauf hinweisen, daß die Erythrocyten auf die Einwirkung der Äther- oder Acetonextrakte aus Rindergalle Hyperchromasie und Anzeichen der

Pachydermie erkennen lassen. Auch die erythropoetische Wirkung des käuflichen Bilirubins wird vermindert, wenn es vorher mit Äther extrahiert worden war³. Seinerzeit dachte ich an den Einfluß hämolytischer Lipoide, die infolge gesteigerten Blatabbaus zu einer gesteigerten Erythrocytenbildung und zur Hyperchromasie führen. Später schienen mir die ätherlöslichen, wachsartigen Stoffe eine Rolle zu spielen. Ich bereitete daher aus *weißem* und *gelbem Wachs* 0,5%ige Lösungen und gab von diesen je 0,2 ccm zu 3 ccm Plasma. Der Äther wurde durch mäßige

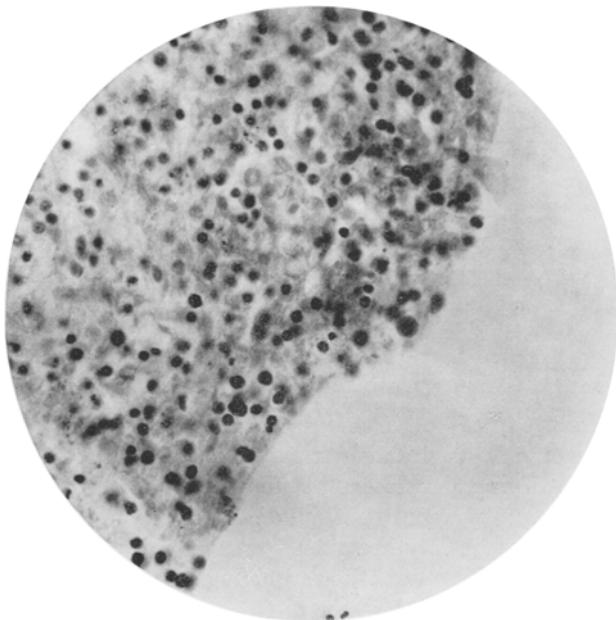


Abb. 2. Kaninchenmilz nach 48 Stunden. 23. L. 4. Acid. pyrogall.

Erwärmung⁷ (50°, 1/2 Stunde) aus dem Plasma vertrieben und die Organstückchen erst dann eingelegt. Das Ergebnis war überraschend (Abb. 3 und 4): An den Rändern sowohl der Milz- wie auch der Knochenmarkstücke waren normale reife rote Blutkörper in großer Zahl zu sehen, die Hyperchromasie aufwiesen. Diese Beobachtung war im Vergleiche zu den Kontrollen sehr auffallend.

Ich hatte wiederholt Gelegenheit zu beobachten, daß bei zufälligen Verunreinigungen der Präparate in der Nähe der Bakterienkolonien in den Knochenmarkstückchen massenhaft rote Blutkörper erschienen (Abb. 5). Diese meine Beobachtung erschien auch schon dadurch interessant, weil einige Forscher (z. B. *Portier*) in bezug auf höherstehende Lebewesen einen Zusammenhang zwischen der Rolle der Bakterien und der Vitamine suchen, ferner auch deshalb, weil sich im Laufe meiner

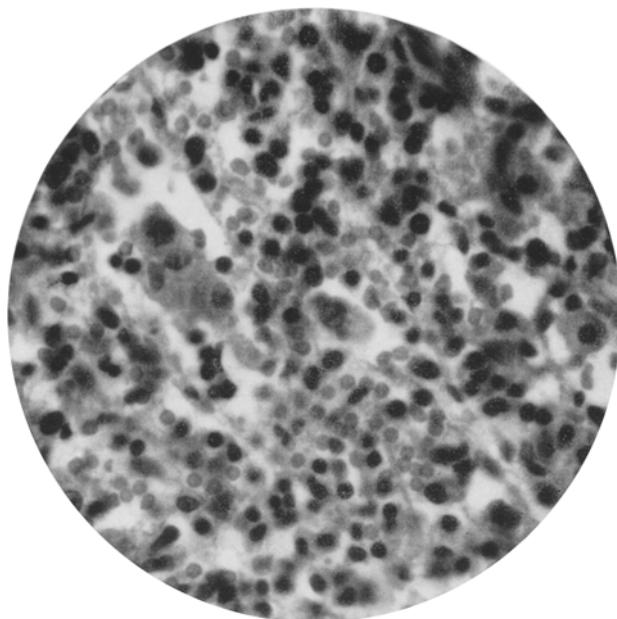


Abb. 3. Kaninchenmilz nach 48 Stunden. 23. L. 19. Cera alba.

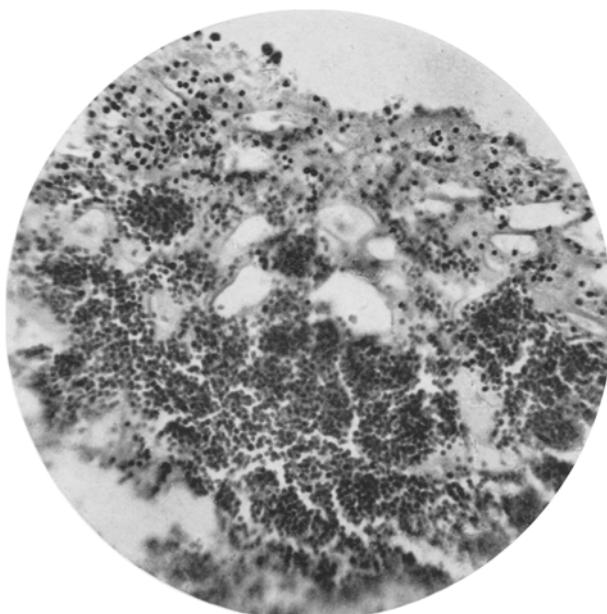


Abb. 4. Kaninchenknochenmarkstückchen nach 48 Stunden. 26. Cs. 7. Cera alba.

Versuche die Nachforschung über die Rolle der Vitamine als beachtenswerte Frage darbietet.

Die Versuche wurden in ähnlicher Weise wie die bisher beschriebenen ausgeführt. Die überlebenden Organstückchen wurden mit folgenden Vitaminpräparaten behandelt: 1. *Carotin*, Ätherlösung, als Provitamin des Vitamin A; 2. Bäcker-*Hefe*, verdünnter saurer Alkoholextrakt ($p_H = 4,5$) als Vitamin B; 3. *Ascorbinsäure* als Vitamin C und 4. *Ergosterin*, mit ultraviolettem Licht bestrahlte Ätherlösung als Vitamin D.

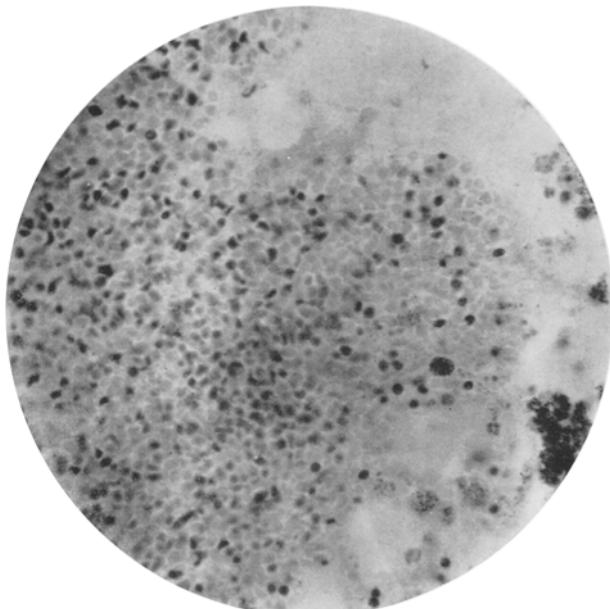


Abb. 5. Kaninchenknochenmark nach 48 Stunden. Verunreinigung mit Bakterienkolonien (*).
28. Cs. 80.

Zunächst wurden die Vitaminpräparate auf Reagensröhren verteilt: Je 0,1 ccm der 0,1%igen Ätherlösung des Carotins; je 0,1 ccm des Hefeextraktes; je 0,1 ccm der 0,1%igen Ascorbinsäure ($p_H = 5,2$) und je 0,1 ccm der 0,1%igen Ätherlösung des bestrahlten Ergosterins. Die Ascorbinsäure wurde mit Hilfe des *Seitzschen* Filters, die anderen Präparate durch Erwärmung auf $60^{\circ} 1/2$ Stunde lang im sterilen Reagensröhren fraktioniert sterilisiert; bei letzteren genügte die Erwärmung auch, um den Äther- bzw. Alkoholgehalt zu vertreiben. Die die verschiedenen Vitamine enthaltenden Röhrchen wurden dann mit je 3 ccm des doppelt verdünnten Kaninchenplasmas versetzt und schließlich wurden die Organstückchen hinzugefügt.

Die Präparate wurden 48 Stunden lang bei 37° gehalten und in der üblichen Weise verarbeitet. An den Schnitten ließ sich folgendes feststellen:

1. *Vitamin A.* An den Rändern der Knochenmark- und Milzstückchen sind zwischen den normalerweise vorhandenen Zellelementen, zum Teil in größeren Gruppen angeordnet, zahlreiche normale, reife, teilweise hyperchromatische rote Blutkörper zu finden; ein ähnliches Bild wie es bei der Verwendung der Wachspräparate zu sehen war. In einem Falle, in dem außer Carotin auch Arginin und Prolin zur Verwendung gelangt war, war die Zahl der reifen Erythrocyten besonders auffallend groß (Abb. 1 b).

2. *Vitamin B.* In den Organstückchen sind an *einzelnen Stellen* größere Gruppen von roten Blutkörpern zu sehen. Der Hämoglobin gehalt dieser ist sehr verschieden. Ein Teil ist blaß, ein anderer enthält mehr Hämoglobin als normalerweise. Mitunter zeigen die roten Blutkörper unscharfe Grenzen.

3. *Vitamin C* zeigte keine erythropoetische Wirkung.

4. *Vitamin D.* An den Rändern der Organstücke normale rote Blutkörper in geringerer Anzahl.

Die Wirkung des Vitamin A auf die Blutbildung wurde von *Binet* und *Strumza*⁶ zuerst untersucht. Diese Forscher verabreichten anämischen Hunden täglich 1500—2500 Ratteneinheiten krystallisierten Carotins in Olivenöl und konnten die Beschleunigung der Blutregeneration beobachten. An meinem Institute versuchte *T. Lovász* diese Frage an Ratten nachzuprüfen. Die bisherigen Ergebnisse gestatten jedoch keinerlei Schlußfolgerungen.

Meiner Ansicht und meiner Erfahrung nach ist die Wirkung des Carotins, des gelben und weißen Wachs sowie des Ätherextraktes aus der Rindergalle darauf zurückzuführen, daß durch diese ätherlöslichen Stoffe die Bindung der Hämoglobinteilchen innerhalb der roten Blutkörper gefördert bzw. ermöglicht wird. Hätte das Vitamin A tatsächlich eine erythropoetische Wirkungskraft, dann müßte sich bei Vitamin A-Mangel ein anämischer Zustand einstellen. Bei Ratten, die an A-Avitaminose leiden, stellt sich zwar mitunter Anämie ein, jedoch nur dann, wenn die Tiere gleichzeitig auch an Bartonellose erkrankt sind (*Ruyter*⁵). Daß es sich hier um eine Vitamin A-Wirkung handeln könne, wird durch den Umstand widerlegt, daß bei unseren Versuchen durch weißes bzw. gelbes Wachs dieselbe Wirkung erzielt werden konnte wie durch Carotin. Wenn man auch noch annehmen könnte, daß das gelbe Wachs Vitamin A enthalte, so fehlt dieses mit größter Wahrscheinlichkeit im weißen Wachs, da dieses aus dem ersten durch lang dauerndes Bleichen an der Sonne dargestellt wird. Durch dieses Verfahren wird die Wirkungskraft des gegen Oxydation besonders empfindlichen Vitamin A bestimmt zerstört. Wir müssen uns demnach einstweilen mit der Annahme begnügen, daß die wachsartigen Stoffe und die Lipochrome (?) eine einfache, mechanische Rolle spielen. Scheinbar bedarf es solcher Stoffe, damit Hämoglobin in den roten Blutkörpern aufgestappelt und dort

gebunden werden kann. Die Rolle dieser Stoffe wäre auch bei hypochromatischen Anämien zu beachten. Unter physiologischen Verhältnissen wird diese Rolle vielleicht durch die „Lipochrome“ erfüllt und es ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß der Zusammenhang, der bei Frauen zwischen der Blutbildung und der Ovarialfunktion bei Chlorose besteht — zumindest zum Teil — hierdurch eine Erklärung finden kann. Die bekannte Tatsache, daß diese Krankheit durch Eisenpräparate günstig zu beeinflussen ist, ist mit unserer Annahme nicht absolut unvereinbar.

Noch auffallender war die Wirkung, die bei den Versuchen mit Vitamin B zu beobachten war, um so mehr, da wir — wie erwähnt — auch in der Nähe der Bakterienkolonien zahlreiche reife Erythrocyten finden konnten. Bekanntlich konnte Tauben-Beriberi von mehreren Forschern^{7, 8, 9} durch die Trockensubstanz verschiedener Bakterien günstig beeinflußt werden. Vor allem drängte sich die Frage auf, welcher Zusammenhang zwischen dem Vitamin B und dem in ähnlichen Versuchen wirkungsvollen Arginin bestehen mag. Ferner fragte sich, welche Ähnlichkeit zwischen der Wirkung dieser Stoffe und der Wirkung der bei Anämien verwendeten Leber- und Magenextrakten zu finden sei. Diese Frage wird in einer anderen Mitteilung eingehender besprochen.

Die Frage, warum sich das Vitamin C-Präparat (Ascorbinsäure) bei diesen Versuchen wirkungslos erwies, läßt sich einstweilen noch nicht beantworten.

* * *

Scheinbar hat auch das Vitamin D bei der Blutbildung keine spezifische Bedeutung. Wahrscheinlich werden durch diesen Stoff die Erythrocyten der Organstückchen bloß in gewissem Maße konserviert. Es soll hier erwähnt werden, daß *Dolfini* und *Guarneri*⁴ auf Grund klinischer Erfahrungen die Verabreichung von Vigantol bei Anämien entschieden ablehnen.

Zusammenfassung.

1. Die im vorigen Jahre beobachtete Argininwirkung erfährt durch die weiteren Versuche eine Bestätigung. Nach der Einwirkung ultravioletter Strahlen blieb die Argininwirkung unverändert, sie konnte durch die Beigabe von Prolin oder durch die Verwendung der nicht verseifbaren Teile der Leber gesteigert werden. Auch durch $FeCl_2$, Cu_2Cl_2 und insbesondere durch $CoCl_2$ wird die Wirkung gesteigert. *Agmatin*, das ist die decarboxylierte Form des Arginins zeigte sich wirkungslos. Arginin verlor ferner noch die Wirksamkeit, wenn demselben durch nascierendes $HNO_2 N_2$ entzogen wurde.

2. Von den dem Arginin nahestehenden Verbindungen zeigte sich bloß *Guanidin* insofern wirksam, daß es eine mäßige Vermehrung der

Erythrocyten im Explantat hervorrufen konnte. Nach *Ornithin*, *Putrescin*, *Spermin*, *Spermidin* kam es zu keiner Vermehrung der Erythrocyten. Auf die Einwirkung von *Spermidin* nahm bloß die Zahl der Normoblasten zu. Etwas mehr Erythrocyten waren bei Gegenwart von *Cadaverin* zu sehen.

3. Wirkung der Blutgifte: *Acid. pyrogallicum*. Vermehrung der Normoblasten und Megaloblasten. Viele Normoblasten mit starker Karyopyknose. Wenig hyperchromatische Erythrocyten. Normale Erythrocyten waren nur nach Zugabe von Cholesterin zu sehen.

Phenylhydrazin. Nach Zugabe von Cholesterin ebenfalls größerer Zellenreichtum. Neben ziemlich viel Normoblasten viel normale Erythrocyten.

Toluylendiamin. An den Rändern gelöstes Hämoglobin, viele Myelocyten mit groben eosinophilen Körnern.

Benzol. Zellenarmut, keine normalen Erythrocyten.

Desoxycholsäure. Zellenarmut, bloß das Reticulum bleibt bestehen.

4. Ätherlösung von weißem und gelbem *Wachs*: An den Rändern der Organstücke sehr viel hyperchromatische Erythrocyten.

5. Bakterienkolonien: In der Nachbarschaft ebenfalls viel normale Erythrocyten.

6. Vitamine: Die meisten Erythrocyten auf die Einwirkung von Carotin (A-Provitamin) und von Vitamin B, weniger auf Vitamin D. Durch Carotin und durch die Wachsstoffe werden vielleicht bloß die Hämoglobinteilchen der Erythrocyten fixiert. Die Wirkung des Vitamin B scheint mit dessen Argininegehalt zusammenzuhängen.

Schrifttum.

- ¹ *Jeney, A. v.*: Virchows Arch. **290**, H. 2/3, 675 (1933). — ² *Jeney, A. v.*: Extrait du 1. Congrès International de Microbiologie. Paris 1930. — ³ *Jeney, A. v.*: Die Behandlung von Anämien. Zusammenfassendes Referat. Tagg ung. Ges. inn. Med. Budapest, Juni 1931. — ⁴ *Dolfini, S. u. E. Guarneri*: Rass. Ter. e Pat. clin. **4**, 759—769 (1932). — ⁵ *Ruyter, Th. Hart de*: Nederl. Tijdschr. Geneesk. **1933**, 2672 bis 2679. — ⁶ *Binet, Leon et M. V. Strumza*: Presse méd. **1932 I**, 41, 42. — ⁷ *Sunderlin and C. H. Werkman*: J. Bacter. **16**, 17—33 (1928). — ⁸ *Scheunert u. Schieblich*: Biochem. Z. **139**, 57 (1923). — ⁹ *Fawns, Humphry Theodore and A. Jung*: Biochemic. J. **27**, 918—933 (1933).