

(Aus dem Pathologischen Institut Marburg [Direktor: Prof. Dr. M. Versé].)

Chemisch-analytische Untersuchungen zur Frage der Herkunft der Fettstoffe in den Gewebskulturen.

Von

Privatdozent Dr. Erich Rix.

(Eingegangen am 10. Januar 1936.)

Ein wesentliches Merkmal des normalen Zellebens innerhalb des Wachstumshofes der Gewebsexplantate ist die gewöhnlich nach zweitägigem Kulturleben ins Auge fallende starke Verfettung. Ihre Ausdehnung ist einmal abhängig von mannigfachen, äußereren, beispielsweise in der Zusammensetzung des Nährmediums bedingten Faktoren. Sie ist wechselnd nach der Art des zur Explantation verwandten Gewebes, im übrigen schwankend bei den einzelnen Tierarten.

Die chemische Zusammensetzung der Fettstoffe ist nicht einheitlich. Im großen und ganzen überwiegen die Neutralfette, die sich in einem bestimmten Mischungsverhältnis mit Cholesterin bzw. Cholesterinestern und Lipoiden im engeren Sinne, insbesondere Phosphatiden, befinden. Dieses Neutralfett-Cholesterin-Lipoidverhältnis wird in großen Zügen während der Dauer des „normalen“ Ablaufs des Explantatlebens gewahrt, verschiebt sich aber wahrscheinlich zum Zeitpunkt des *Alterns* und *Absterbens* der Kulturen mehr zugunsten der Lipoide. Ich möchte daher den Fettstoffwechsel der Gewebsexplantate in zwei an sich fließend ineinander übergleitende Phasen einteilen. Die erste findet sich in Kulturen mit guten Lebensäußerungen, also in der ersten Zeit des Kulturlebens, zeitlich betrachtet etwa vom 1.—4. Tage. Die zweite Phase ist durch das reichlichere Auftreten von Lipoiden chemisch in etwa charakterisiert und ein Zeichen des Überalters und Absterbens der Kulturen. Hier wirken zweifellos die nekrobiotischen und autolytischen Myeline mit, und zwar um so mehr, je älter die Kulturen werden.

Besonders ins Auge fallend ist schon nach 1—2tägigem Kulturleben das starke Mißverhältnis zwischen der Größe der Einzelzellen und den ihnen eingelagerten Fettropfen, mit anderen Worten zwischen sichtbarem Fett und Zellmaterial. Bei unbefangener Betrachtung kann man sich des Eindrucks nicht erwehren, daß die Fettmassen in diesem Ausmaße gar nicht in dem Explantat bzw. seinem Kulturmedium vorhanden gewesen sein können. Rein theoretisch ist daher die Vermutung sehr wohl berechtigt, daß eine fettige Transformation, also eine Umwandlung der Kohlehydrat- wie Eiweißverbindungen in Fettstoffe für dieses Mißverhältnis verantwortlich zu machen ist. Von den meisten Autoren — wir können im Rahmen unserer Fragestellung davon absehen, näher

darauf einzugehen — wurde demgegenüber auf Grund morphologischer Kriterien bereits die größere Wahrscheinlichkeit des reinen infiltrativen Charakters der Explantatverfettung betont. Nachdem schon *Nordmann* die Beziehungen zwischen Fett- und Glykogenstoffwechsel innerhalb der Gewebskulturen eingehend beobachtet hatte, wendet sich neuerdings *Haszler* im speziellen gegen die Annahme einer Fettsynthese aus Kohlehydraten innerhalb der Gewebskulturen. Restlos befriedigend und endgültig entscheidend sind diese Untersuchungen aber nicht, da sie auf rein morphologischen Untersuchungen beruhen.

Lauche versuchte andererseits auf experimentellem Wege dem Problem näherzukommen, indem er Hühnerzellen in einem Hammelplasma in der Erwartung züchtete, eine Verfettung der Hühnerzellen mit Hammelplasma zu erzielen. Da der Schmelzpunkt des Hammelfetts sehr viel höher liegt als der des Hühnerfetts, glaubte er unter Zuhilfenahme des Mikromanipulators eine genaue Identifizierung der Fettstoffe vornehmen zu können. Überraschenderweise wiesen nun die Hühnerfibroblasten in dem Hammelplasma *nicht* die übliche starke Verfettung auf, dagegen im menschlichen Plasma. Immerhin scheint mir aus der Tatsache, daß zur Verfettung überhaupt resorbierbare und speicherungsfähige Fette vorhanden sein müssen, zum mindesten der Schluß berechtigt, daß eine fettige Transformation bei dem Fettstoffwechsel der Gewebsexplantate stark in den Hintergrund treten muß.

Mit den gewöhnlichen morphologischen Methoden war also, um das Ergebnis der bisherigen Untersuchungen nochmals kurz zusammenzufassen, eine Klärung nach der Herkunft der Fettstoffe innerhalb der Explantatzellen nicht endgültig zu erzielen. Ich entschloß mich daher, auf dem Wege chemischer Analyse dem Problem näherzutreten. Die Fragestellung war von vornherein begrenzt durch den Mangel an brauchbaren Methoden, jedenfalls weitgehend abhängig von der Möglichkeit der Anwendung schon vorhandener Fett- bzw. Lipoidbestimmungsmethoden. Erste Aufgabe war daher die Ausarbeitung geeigneter Methoden, die auch in den Explantaten vorhandenen relativ geringen Mengen quantitativ erfassen.

In früheren ausgedehnten eigenen Fettstoffwechseluntersuchungen hatte sich zur Bestimmung der Neutralfette die *Bloorsche* Modifikation der *Bangschen* Mikromethode besonders bewährt¹. Bei der Bestimmung der Gesamtfette in den Gewebskulturen gingen wir so vor, daß wir jeweils 40 Kulturen sofort nach dem Ansetzen, weitere 40 Kulturen nach 4tägigem Aufenthalt im Brutschrank analysierten. Die in dieser großen Summe von Kulturen vorhandenen Fettmassen genügten vollkommen, um ein einigermaßen genaues, quantitativ zuverlässiges Ergebnis zu gewährleisten. Die Nährmediummischungen wurden mit

¹ Arch. exper. Zellforsch. **13**, 581 (1932/33). Siehe auch *Rona*: Praktikum der physiologischen Chemie, 2. Teil.

graduierten Pipetten vorgenommen, so daß eine ganz gleichmäßige Zusammensetzung sämtlicher Plasmatropfen gewährleistet war. Natürlich besteht ein gewisser Fehler darin, daß die einzelnen explantierten *Gewebsstücke* nicht gleich groß, die Wachstumstendenz und damit die in Erscheinung tretenden Fettmassen unterschiedlich sind. Dieser an sich geringfügige Unterschied scheint sich bei der großen Zahl von jeweils 40 Kulturen einigermaßen auszugleichen, jedenfalls fällt er bei der Auswertung der Ergebnisse nicht sonderlich ins Gewicht.

Die Fragestellung dieser ersten, auf der Bestimmung der Gesamt-fette der Gewebskulturen sofort nach dem Ansetzen und nach 4tägiger Explantatdauer beruhenden Versuchsreihe zielt nach der Feststellung hin, ob innerhalb der Gewebsexplantate (Mutterstück + Wachstums-hof + Nährmedium) eine Zu- oder Abnahme der Fettstoffe meßbaren Ausmaßes erfolgt. Das Ergebnis ist aus der Tabelle I ersichtlich. Unter a) sind die Bestimmungen an den Explantaten, unter b) sog. Leer-bestimmungen verzeichnet, die sich auf einfache Mediumtropfen be-ziehen, deren Gesamtfettgehalt unter vollkommen analogen Verhältnissen direkt nach dem Ansetzen und nach 4tägigem Aufenthalt im Brutschrank festgestellt wurde.

Tabelle 1. Gesamtfett in %.

a) Explantate				b) Leerbestimmungen			
Serie	Frisch	Nach 4 Tagen	Bemerkung	Serie	Frisch	Nach 4 Tagen	Bemerkung
7	0,33	0,46	Frisch sofort	9	0,34	0,39	Frisch sofort
8	0,38	0,40	nach dem	12	0,18	0,32	nach dem An-
10	0,26	0,44	Ansetzen				setzen best.
11	0,14	0,29	bestimmt				
13	0,20	0,21		16	0,16	0,16	
15	0,22	0,26		18	0,15	0,15	
17	0,15	0,17		20	0,17	0,16	
19	0,15	0,15		22	0,15	0,14	
21	0,15	0,15		Durch-	0,158	0,153	
23	0,15	0,15		schnittl.			— 3 %
Durch-schnittl.	0,17	0,18					
		+ 6 %					

Bemerkenswert ist zunächst, daß die Werte der Kulturserien 7, 8, 10, 11 (Explantate), wie 9 und 12 (Leerbestimmungen) außerordentlich schwanken, vor allem scheint innerhalb des 4tägigen Kulturlebens eine ganz erhebliche Zunahme des Gesamtfettes erfolgt zu sein. Diese scheinbare Zunahme des Gesamtfettes war in Wirklichkeit durch einen methodischen Fehler vorgetäuscht. Ich ging nämlich bei diesen ersten Kulturserien so vor, daß ich die frisch bestimmten Kulturen wohl auf Deck-gläsern zur Gerinnung kommen ließ, sie aber nicht erst auf die Objekt-träger auflegte und nicht die verschlossenen Kulturmämmern auf 38°

erwärmte. Der im Sinn einer Fettzunahme stark positive Ausschlag wurde nun durch die infolge der Erwärmung im Brutschrank erfolgende Wasserverdunstung innerhalb der Kulturmänteln und die dadurch bewirkte Konzentrierung des Mediums der 4 Tage alten Kulturen vorgetäuscht. So änderte sich das Ergebnis von dem Augenblicke an, wo auch die frisch bestimmten Kulturen zunächst 2 Stunden in den geschlossenen Kulturmänteln der Brutschranktemperatur ausgesetzt wurden. Die nunmehr bestimmten Gesamt fettmengen stimmen weitgehend mit den Anfangswerten überein. Der Durchschnittswert beträgt nach 2 Stunden 0,17%, nach 4 Tagen 0,18%, das würde eine Gesamtzunahme von 6% bedeuten, eine Zahl, die sicherlich innerhalb der methodischen Fehlergrenzen liegt, zumal wenn man berücksichtigt, daß durch die nicht absolut gleichgroßen Mutterstücke keine vollkommene Gleichheit zwischen den frisch und den nach 4 Tagen bestimmten Kulturen besteht. Jedenfalls kann von einer erheblichen absoluten Fettvermehrung auf Kosten von andersartigen Bestandteilen nicht die Rede sein.

Zum Vergleich wurden die gleichen Bestimmungen an einfachen Plasmatropfen ohne Zusatz von Gewebsstücken gemacht. Hier ergibt sich eine geringe Fettabnahme von durchschnittlich 3%, die ebenfalls in den wahrscheinlichen Fehlerbereich der angewandten Bestimmungsmethode fallen. Andererseits zeigen diese Zahlen, mit welcher Genauigkeit die verwandte chemische Methode arbeitet, da ja wegen des Fehlens der Gewebsstücke die früher wie später bestimmten Plasmatropfen in bezug auf den Fettgehalt eine vollkommene Gleichheit aufweisen müssen.

In Übertragung dieser exakt chemisch gewonnenen Zahlen auf das Problem der Herkunft der Fettstoffe innerhalb des Wachstumshofes der Explantate würde das also aussagen, daß die Möglichkeit einer fettigen Transformation, also eine Umwandlung aus Kohlehydraten oder Eiweißstoffen wenigstens in einigermaßen beachtlicher Ausdehnung zu verneinen ist, daß es sich mit aller Wahrscheinlichkeit um eine Fettinfiltration handelt. Dahingestellt muß allerdings auch jetzt noch bleiben, ob dabei der Fettpolyphagozytose oder der Fettsynthese der Vorrang gebührt. Aber nach allen Erfahrungen morphologischer Art dürfte die letztere bei weitem überwiegen.

Weiter erschien mir die chemische Analyse der Gewebskulturen geeignet, der Frage der Cholesterinentstehung innerhalb der Explantate nachzugehen. An sich lehnt ja die Mehrzahl der Untersucher die introrganismäre Bildung ab, wenn auch Thannhauser am bebrüteten wie unbebrüteten Ei eine zwar geringe, aber eindeutige Zunahme des Gesamtcholesterins feststellte. Jedenfalls scheint mir die Gewebekultur mehr als das Experiment am Tierkörper mit seiner nur schwer kontrollierbaren Cholesterinbilanz berufen, zur Klärung der Frage beizutragen, ob die tierische Zelle zur Cholesterinsynthese bzw. Cholesterin-

bildung aus andersartigen Stoffen befähigt ist. Von der Tatsache der starken Beteiligung des Cholesterins und seiner Ester bei der Explantatverfettung schlechthin konnte ich mich in früheren ausgedehnten Untersuchungen bereits überzeugen.

Die methodische Schwierigkeit bestand wiederum darin, daß die in den Kulturen vorher wie nachher vorhandenen Cholesterinmengen so gering sind, daß eine Zu- oder Abnahme der analytischen Feststellung leicht entgehen kann. Es mußte daher jeweils eine Gesamtmenge von 80 Kulturen frisch wie nach 4tägiger Bebrütung der chemischen Analyse unterworfen werden. Die guten Erfahrungen, die wir mit der Bloor-schen Modifikation der Bangschen Mikromethode gemacht hatten, veranlaßte uns — vor allem im Hinblick auf den Mangel an besseren Methoden —, die auf die Bestimmung des Gesamtcholesterins im Rahmen fraktionierter Fettstoffanalyse hinzielenden Teile dieser Methode zur Anwendung zu bringen. Der Gang ist kurz folgender: Gesamtfettstoffe und Lipoide werden aus dem Plasma durch eine Alkoholäthermischung extrahiert. In diesem Extrakt wird das Cholesterin colorimetrisch bestimmt. Von der quantitativen Genauigkeit der Methode konnten wir uns in früheren Vergleichsversuchen im Blutserum mit der Autenrieth-Funkschen Methode überzeugen.

Das Ergebnis ist aus der Tabelle 2 ersichtlich. Die hier verzeichneten Zahlen dürften zunächst einmal ein recht anschauliches Bild von der Genauigkeit der Methode abgeben. Weiter ist klar und eindeutig ersichtlich, daß eine Änderung des Gesamtcholesteringehalts nicht stattfindet, da der Durchschnittswert vor wie nach 0,016 % beträgt und auch die Einzelbestimmungen beachtlich übereinstimmend gefunden wurden.

Tabelle 2. Cholesterin in %.

Serie	Frisch	Nach 4 Tagen
24	0,014	0,015
25	0,016	0,015
26	0,016	0,016
27	0,016	0,016
Durchschnittl.	0,016	0,016

Wir müssen also auf Grund unserer Untersuchungen den Explantatzellen die Fähigkeit der Cholesterinsynthese trotz sicher bestehender Möglichkeit der Cholesterinspeicherung absprechen.

Sehr lohnend wäre es, der Frage nach der Veresterungsmöglichkeit des Cholesterins durch die Explantatzellen nachzugehen, zumal Rohrschneider bereits früher an unserem Institut durch Injektion von Cholesterin-Öl-Gemischen in die Augenvorderkammer des Kaninchens diese Fähigkeit der Makrophagen unter Beweis stellte. Leider sind die in den Kulturen vorhandenen Mengen für die chemische Trennung des Cholesterins und seiner Ester zu klein.

Wie ich schon eingangs erwähnte, ist nach allen eigenen Erfahrungen und nach Angaben anderer (Krontowski und Poleff) die Fettstoffzusammensetzung innerhalb der Zellen des Wachstumshofes in dem Sinne

wohl charakterisiert, daß mit dem Überaltern der Kulturen die Lipoidkomponente erheblich an Umfang zunimmt. Auch hier interessiert vor allem die Frage, ob es sich dabei lediglich um eine Lipoidinfiltration oder eine wirkliche, zahlenmäßig faßbare Lipoidentstehung und absolute Vermehrung handelt. Da erfahrungsgemäß unter den Lipoiden die Phosphatide das Hauptkontingent darstellen und ihr Phosphorgehalt (Lipoidphosphor) ein Spiegelbild ihrer Zu- oder Abnahme ist, versuchten wir auf diesem Umwege eine Klärung zu ermöglichen.

Unter Zugrundelegung der nephelometrischen Methode von *Kleinmann*¹ extrahierten wir zunächst aus den Gesamtexplantaten mit Äther-Alkohol den Lipoidphosphor. Das Filtrat wurde dann im Platintiegel eingedampft und der Rückstand verascht. Nach Aufnahme der Asche mit Schwefelsäure wurde die Phosphorsäure mittels des Nephelometers nach Erzeugung einer Trübung mit einem Strychnin-Molybdänreagens bestimmt. Es genügten jeweils etwa 30 Tropfenkulturen. Bei der Schwierigkeit der Methodik ist es unausbleiblich, daß man immerhin mit einem Fehler von etwa 5—10% rechnen muß. Eine größere Genauigkeit läßt sich schwerlich erzielen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache können wir feststellen, daß (Tabelle 3) zwar nach 4-tägigem Kulturleben eine Zunahme von etwa 8% Lipoidphosphor chemisch feststellbar ist, während die Leerbestimmungen eine praktisch außer acht zu lassende Abnahme von 1,6% aufweisen. Doch liegt das meiner Ansicht nach durchaus im Rahmen der Fehlgrenze. Mindestens kann ich mich dahingehend festlegen, daß eine *wesentliche* Zunahme des Lipoidphosphors sicher nicht in Betracht kommt.

Tabelle 3. Lipoidphosphor in %.

a) Explantate			b) Leerbestimmungen		
Serie	Frisch	Nach 4 Tagen	Serie	Frisch	Nach 4 Tagen
29	2,82	3,58	35	3,30	3,21
30	3,52	3,76	36	3,09	3,08
31	2,99	3,30	37	3,00	2,91
33	2,44	2,36	38	3,06	3,02
34	2,70	2,66	Durchschnittl.	3,11	3,06
Durchschnittl.	2,89	3,13 + 8,3%			- 1,6%
		Nach 8 Tagen			
39	2,95	2,99			
40	3,29	3,19			
Durchschnittl.	3,12	3,09 - 1%			

Um nun auch den Anteil festzulegen, den die nekrobiotischen bzw. autolytischen Myeline an der morphologisch faßbaren, verhältnismäßig

¹ Kleinmann: Biochem. Z. 174 (1926).

Lipoidvermehrung haben, wurden weitere Kulturen erst nach 8tägiger Bebrütung chemisch analysiert. Auch hier interessiert insbesondere die Frage nach der absoluten Vermehrung bzw. Neuentstehung des Lipoidphosphors. Es zeigt sich, daß ein verwertbarer Unterschied zwischen den Kulturen, die sofort nach dem Ansetzen und denen, die erst nach 8tägiger Bebrütung bestimmt sind, überhaupt nicht besteht. Eine wirkliche Zunahme liegt also nicht vor, zum mindesten erfolgt keine wesentliche Umwandlung von anorganischem zu organischem Phosphor.

Zusammenfassung. Die vorliegenden chemischen Untersuchungen an Gewebskulturen sollten zur Klärung der Frage dienen, ob die starke Vermehrung der Fettstoffe innerhalb des Wachstumshofes der Gewebs-explantate einer absoluten Vermehrung gleichzusetzen ist, oder ob es sich vielmehr lediglich um eine Fettinfiltration, insbesondere aber nicht um eine fettige Transformation handelt. Diese Frage dürfte auf Grund der vorliegenden Untersuchungen eindeutig im Sinne der Fettinfiltration geklärt sein. Ebenso kann mit Sicherheit eine Cholesterinsynthese innerhalb der Explantate in Abrede gestellt werden, wie auch eine Zunahme an Lipoidphosphor als Ausdruck einer tatsächlichen Lipoidvermehrung sowohl während des besten Kulturlebens wie in überalterten Kulturen in meßbarem Ausmaß auszuschließen ist.

Schrifttum.

- Haszler:* Virchows Arch. **92**, 101 (1933). — *Herzog, G.:* Verh. dtsch. path. Ges. München 1931. — *Krontowski u. Poleff:* Beitr. path. Anat. **58**, 407 (1914). — *Lauche:* Verh. dtsch. path. Ges. Wien 1929. — *Ludwig:* Arch. exper. Zellforsch. **9**, 384 (1930). — *Nordmann:* Arch. exper. Zellforsch. **8**, 371 (1929). — *Rix:* Arch. exper. Zellforsch. **13**, 518 (1932). — *Zbl. Path.* **62**, 119 (1935). — *Rohrschneider:* Virchows Arch. **256** (1925). — *Thannhauser:* Verh. dtsch. path. Ges. Würzburg 1925.
-