

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. LETTERER).

Experimentelle Untersuchungen über Transsudat und Exsudat.

Von

W. MASSHOFF, W. GRANER und H. HELLMANN*.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Juli 1948.)

Die Ergebnisse früherer Untersuchungen, die das Schicksal transfundierten Blutes zum Gegenstand hatten, ließen die Annahme berechtigt erscheinen, daß der effektiv nachgewiesene schnelle Abbau der Erythrocyten nach einer Transfusion auf humorale Kräfte zurückgehe (MASSHOFF¹). Weitere Arbeiten haben diese Annahme bekräftigt (MASSHOFF²) und außerdem zeigen können, daß es gelingt, vermittels nur flüssiger Medien den Erythrocytenabbau herbeizuführen. Erythrocyten, die in für Zellen undurchlässige Cellafilter eingehüllt und in die Bauchhöhle von Mäusen versenkt waren, wurden in kurzer Zeit zur Auflösung gebracht (MASSHOFF³, GÖTZ). Dieses Experiment kann mit gewissen Einschränkungen auf den Erythrocytenabbau überhaupt übertragen werden und als Stütze für die früher schon von ASCHOFF, HUECK, LUBARSCH, LAUDA u. a. geäußerte Vermutung gelten, daß auch im strömenden Blut durch besondere ihm innewohnende Stoffe der Abbau bewerkstelligt werden kann. Es liegt in der Natur des Blutsystems, d. h. eines flüssigen Gewebes, begründet, daß der exakte Beweis hierfür nur schwer zu erbringen ist, wie wir ja auch den humoralen Abbau nach Transfusionen in seiner morphologischen Unsichtbarkeit nur erschließen, aber nicht beweisen konnten.

Das genannte Experiment hat aber gleichzeitig noch ein anderes Problem deutlich werden lassen, nämlich die Frage, welcher Art die flüssigen Medien sein müssen, um eine Erythrocytenauflösung zu bewirken. Sind dazu alle physiologisch und pathologisch vorkommenden bzw. auftretenden gelösten Stoffe in der Lage, oder gibt es besondere im Erythrocyten selbst zu suchende Bedingungen, die dabei von Bedeutung sind? Es versteht sich von selbst, daß diese Frage zunächst nur im Modell erfolversprechend angegangen werden und daß ferner

* Dr. H. HELLMANN vom Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie (Direktor Prof. Dr. A. BUTENANDT) hat die Untersuchungen durch Überlassung von isolierten Fermenten wesentlich gefördert und den Fortgang der Arbeit durch Beratung in dankenswerter Weise unterstützt.

vorerst nur eine Gruppe einigermaßen charakterisierter Flüssigkeiten geprüft werden konnte. Wir beschränkten deshalb die Untersuchungen auf das Blutplasma, das Exsudat und Transsudat und testeten ihre Wirksamkeit an zugesetzten Erythrocyten aus. Die bekannten und leicht bestimmbareren Erscheinungen der *Hämolyse* und des Hämoglobinabbaues schienen uns die beste Gewähr dafür zu bieten, gegebenenfalls auch abgestufte und feinere Grade der Wirksamkeit zu erfassen. Das Verhalten der drei Arten von Flüssigkeiten gegenüber Erythrocyten sollte also, abgesehen von dem Erythrocytenschicksal selbst, in erster Linie Aufschluß darüber geben, ob diese Flüssigkeiten entsprechend ihrem verschiedenen Vorkommen auch verschiedene Eigenschaften besitzen, womit nicht nur eine Bereicherung der noch lückenhaften Kenntnisse über die biologische Natur dieser Stoffe, sondern gleichzeitig auch eine Vertiefung des Verständnisses einiger pathologischer Mechanismen erhofft werden konnte.

Experimenteller Teil.

Im ersten Abschnitt unserer Untersuchungen richteten wir das Augenmerk zunächst auf die *Hämolyse*, d. h. wir suchten zu bestimmen, ob zeitliche oder sonstige Verschiedenheiten bei den zu prüfenden Medien gegenüber der Fähigkeit zur Erythrocytenauflösung festzustellen waren. Wenn wir für die Versuche Trans- und Exsudate auswählten, so ließen wir uns dabei von folgender Überlegung leiten: Beide entstammen zwar der Blutflüssigkeit, sind aber sowohl hinsichtlich ihrer Entstehung als auch ihrer stofflichen Zusammensetzung nach durchaus verschieden, letzteres der Klinik vom unterschiedlichen Eiweißgehalt hinlänglich bekannt. Dem mechanisch infolge geänderter Hydrostatik entstandenen Transsudat, das der Zusammensetzung nach dem Blutplasma ziemlich nahekommen sollte, steht das Exsudat, ein unter entzündlichen Bedingungen aufgetretener Erguß, gegenüber, über dessen qualitative Beziehungen zum Blutplasma wir noch nicht hinreichend orientiert sind. Man konnte erwarten, daß die Verschiedenartigkeit der Zusammensetzung von Trans- und Exsudat sich auch in einer verschiedenen Wirksamkeit gegenüber der Hämolyse ausdrücken mußte. Bei den Exsudaten legten wir Wert darauf, rein seröse Ergüsse zu verwenden, um den etwaigen störenden Einfluß von fermentativ besonders tätigen Zellen, vor allem Leukocyten, auszuschließen, ebenso mußte die Zahl der Erreger möglichst gering gehalten werden. Diese Bedingungen schienen uns in dem bei der Tuberkulose auftretenden Erguß am besten erfüllt. Von den steril gewonnenen Ergüssen, deren Überlassung wir dem Entgegenkommen von Herrn Prof. BOCK (Med. Univ.-Klinik) verdanken, wurden die spezifischen Gewichte bestimmt und das Zentrifugat auf Art und Zahl der Zellen und Bakterien

mikroskopisch untersucht. Bakterienhaltige Transsudate schieden aus, ebenso, wenn sich nachträglich im Kulturverfahren eine bakterielle Verunreinigung ergeben hatte, ferner wurden tuberkulöse Ergüsse ausgeschieden, wenn sie außer Tuberkelbacillen andere Erreger enthielten, oder außer Lymphocyten andere Zellen, vor allem Leukocyten, in nennenswerter Zahl aufwiesen. Die gewöhnlich nur sehr geringe Zahl von Lymphocyten wurde abzentrifugiert. Das auf diese Weise eingeschränkte oder abgegrenzte Material schien uns die besten Voraussetzungen für den beabsichtigten Zweck zu bieten.

Unter streng sterilen Kautelen wurden je 10 cm³ Flüssigkeit in ein Reagensglas gegeben und zu jedem Röhrchen 1 cm³ Citratblut eines gesunden Menschen zugesetzt und bei Zimmertemperatur von 18—20° stehengelassen. Als Kontrolle wurde der Einfachheit halber physiologische Kochsalzlösung verwandt, nachdem sich erwiesen hatte, daß diese zwar nur hinsichtlich der Isotonie physiologische Kochsalzlösung keine Nachteile gegenüber der Ringer- und Tyrodelösung für die gewünschten Zwecke hatte. Als vergleichbares Kriterium diente jeweils der Zeitpunkt der ersten sichtbaren Hämolyse.

Die ersten orientierenden Versuche ergaben einen sehr bedeutenden Unterschied in der hämolysierenden Fähigkeit zwischen Trans- und Exsudat; die Hämolyse trat nämlich auf

in der physiologischen NaCl-Lösung nach	17 Tagen,
im Stauungstranssudat nach	15 „ „
im Exsudat nach	5 „ „

Konnte man nach diesem Ergebnis vermuten, daß vor allem dem Exsudat Stoffe eigen sein müssen, die den beschleunigten Erythrocytenzerfall bewirken, so zeigte sich andererseits aber auch, daß in der „indifferenten“ NaCl-Lösung die Integrität der Erythrocyten nur von beschränkter Dauer ist. Hier scheinen die roten Blutkörperchen passiv, d. h. aus sich heraus geschädigt zu werden, wobei man sich vorzustellen hat, daß das Gerüst dieser Zellen, das Strukturprotein Stromatin, welches im Gegensatz zum Hämoglobin ein sehr labiler Körper sein soll (JUNG), in seinem Gefüge Schaden leidet und durchlässig wird. Dieser endogenen, offenbar auf die Anwesenheit intraerythrocytärer Fermente (s. später) zurückführbaren Schädigung des Stromatins kommt das Exsudat offensichtlich vermittels besonderer Stoffe zuvor, während sich beim Transsudat schwer sagen läßt, was auf das Konto der Hetero- und der Autolyse geht. Im übrigen stellte sich heraus, daß die Art der Erythrocytenzerstörung in jedem Falle dieselbe ist, daß sie sich nur im Tempo unterscheidet; soweit sich nämlich diese Verhältnisse lichtoptisch verfolgen lassen, beginnt der Auflösungsprozeß an der Membran, die zunächst feinste Unebenheiten und Ausziehungen zu erkennen gibt, dann quillt der Erythrocytenleib

auf, verliert seine zentrale Eindellung und allmählich seine Doppelkontur, das Hämoglobin blaßt ab, der Erythrocyt büßt allmählich unter zunehmender Unregelmäßigkeit der Membran an Volumen ein, bis die Membran als leere, verformte Hülle erscheint und schließlich unsichtbar wird. Die gleichen Vorgänge hat LEUPOLD bereits 1914 bei der sterilen Autolyse beschrieben, den fermentativ autolytischen Zerfall der Erythrocyten aber nur sehr gering veranschlagt. Die Form der endogen und der durch Exsudat exogen bedingten Zerstörung scheint sich also ziemlich einfach zu gestalten. JUNG hat das Phänomen der Zerstörung bei einer Anzahl toxischer Prozesse elektronenoptisch verfolgt und dabei das Wesen dieses Prozesses als eine irreversible Denaturierung der Eiweißkörper, also des Hämoglobins oder des Stomatins gekennzeichnet. Wahrscheinlich ist die Deutung von JUNG auf die Abbauvorgänge der Erythrocyten ganz allgemein und damit auch auf die von uns beobachteten übertragbar.

Es lag natürlich nahe, bei der besonders hämolysierenden Aktivität des Exsudates an die Wirkung von Fermenten zu denken. Wir gingen daher dazu über, dem Transsudat und der Kochsalzlösung kleine sterile Stücke frischer Leber von Schlachttieren zuzusetzen. Dabei setzte die Hämolysen bei der Kochsalzlösung bereits nach 3 Tagen, beim Stauungstranssudat bereits nach 4 Tagen ein. Die Aktivität des Exsudates wurde also übertroffen durch den Zusatz von Frischorganen. Die Hämolysen setzt noch schneller ein, bereits nach 24 Stunden, wenn an Stelle von Leber eine winzige Menge (eine Öse von einer Schräglkultur) von Hefepilzen zugesetzt wird. Der verglichen mit dem Exsudat träge hämolysierende Effekt des Transsudates und die passive Rolle, die die physiologische Kochsalzlösung bei der Hämolysen spielt, wird durch ein „aktives Prinzip“, verkörpert durch ein zugesetztes Organstück oder durch einen pflanzlichen Kleinorganismus beim Transsudat, beschleunigt bzw. die Passivität bei der NaCl-Lösung in einen aktiven Prozeß umgewandelt. Dieses „aktive Prinzip“ kann nach Lage der Dinge nur von Fermentnatur sein.

Die weiteren Versuche zielten darauf ab, den fermentbedingten Charakter des Hämolysenvorganges zu beweisen. An Stelle des Citratblutes verwendeten wir nunmehr gewaschene Erythrocyten, da das eigene Plasma eine hemmende Wirkung auf die Hämolysen zu entfalten vermag. Das verdeutlicht am besten folgender Versuch. Von dem Citratblut zweier gesunder Menschen, die der Blutgruppe A angehören, wird steril das Plasma abpipettiert (Plasma $a_1 a_2$), die sedimentierten Erythrocyten werden durch mehrfaches vorsichtiges Waschen vom anhaftenden Plasma befreit (Ery $a_1 a_2$). Nach Kreuzung von Plasma und Erythrocyten und nach Zugabe der dem ursprünglichen Plasma zugehörenden Erythrocyten ergibt sich folgendes:

Erythrocyten	a_1	Plasma	a_1	Hämolyse nach 7 Tagen
„	a_1	„	a_2	„ „ $4\frac{1}{2}$ „
„	a_2	„	a_2	„ „ $6\frac{1}{2}$ „
„	a_2	„	a_1	„ „ 4 „

Aus der Beschleunigung der Hämolyse nach Kreuzung der Blutanteile scheint hervorzugehen, daß das den Erythrocyten gemäße Plasmamilieu einen besseren, d. h. eine Art spezifischen Schutz gegen die Hämolyse bietet. Daß das Waschen der Erythrocyten für die Hämolyse ohne Bedeutung ist, erweisen die Kontrollen, auch das bei Zimmertemperatur sich überlassene Vollblut zeigt ebenfalls zwischen dem 6.—7. Tag den Beginn der Hämolyse.

Es ist daher nicht überraschend, wenn gewaschene Erythrocyten in Kochsalzlösung nach 8 Tagen bereits hämolysieren, also im Gegensatz zur NaCl-Vollblutlösung nur die Hälfte der Zeit bis zur Auflösung brauchen. Mit einer etwaigen mechanischen Alteration durch das Waschen kann also auch dieses Verhalten nicht erklärt werden.

Erhitzt man Transsudat und Exsudat vorsichtig auf etwa 75^0 und setzt ihnen dann gewaschene Erythrocyten zu, so zeigt die Hämolyse des Transsudates gegenüber dem nicht erhitzten keinen Unterschied, während beim Exsudat eine deutliche Änderung der Wirksamkeit eintritt, das unbehandelte Exsudat erzeugt die Hämolyse nach 3 bis 4 Tagen, im erhitzten setzt die Auflösung erst nach 7—8 Tagen ein. Das bedeutet, daß die thermolabilen Fermente im Exsudat durch das Erhitzen inaktiviert worden sind und an Stelle der Heterolyse die Autolyse wie beim Kochsalz und anscheinend auch beim Transsudat getreten ist. Die hämolysierenden Fähigkeiten des Blutplasmas erleiden durch die Inaktivierung des Plasmas eine Verzögerung, der Beginn der Auflösung ist nach der Inaktivierung des Plasmas erst nach 10 Tagen feststellbar.

Die aus den Exsudatversuchen erwiesene fermentative Hämolyse versuchten wir zu reproduzieren mit Hilfe von bestimmten Fermenten. Folgende Fermentpräparate gelangten zur Verwendung:

1. Krystallisiertes Trypsin (M. KUNITZ und J. H. NORTHROP).
2. Krystallisierte Ribonuklease (M. KUNITZ).
3. Alkalische Darmphosphatase, Glycerinextrakt aus Dünndarmschleimhaut (W. KLEIN).
4. Cholesterinesterase, Acetontrockenpulver aus Schweineleber (R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ).

Unter der Voraussetzung, daß das Stromatin der Erythrocyten aus Eiweiß und Lipoiden zusammengesetzt ist, sollte man eine Auflösung dieses Stromatins unter Wirkung des Trypsins erwarten, hingegen nicht vermittle der Ribonuklease. Das Experiment hat diese Erwartungen bestätigt. Die krystallisierten Fermente wurden in Kochsalz gelöst (etwa 0,9 mg in 5 cm³ physiologischer NaCl) und gewaschenen

Erythrocyten zugesetzt. Trypsin bewirkte bereits nach $1\frac{1}{2}$ Tagen eine Hämolyse, während bei der Ribonuklease die Hämolyse gleichzeitig mit der fermentfreien NaCl-Kontrolle eintrat.

Auch die Phosphatase- und Cholesterinesterasepräparate sollten hämolytische Wirksamkeit besitzen, da Cholesterin mit Bestimmtheit am Stromatinaufbau beteiligt ist und Phosphatidbindungen anzunehmen sind. Auch für diese Annahme erbrachte das Experiment Bestätigungen: Phosphatase bewirkte nach 3 Tagen, Cholesterinesterase nach $3\frac{1}{2}$ Tagen Hämolyse. Wir sind uns darüber im klaren, daß es sich bei den beiden letztgenannten Fermentpräparaten um keine rein isolierten Fermente mit spezifischer Wirkung handelt, ihre Wirkung kann also möglicherweise auch auf Beimengungen beruhen.

Am zuverlässigsten und deutlichsten sind jedenfalls die Ergebnisse mit den reinen krystallisierten Fermenten, die beide zuvor auf volle Aktivität an entsprechenden Substraten geprüft wurden, nämlich Trypsin an Casein und Ribonuklease an Hefenucleinsäure. Der fermentative Charakter der Hämolyse wird noch unterstrichen durch die angestellten Hemmungsversuche. Inaktiviert man das Trypsin durch Erhitzen und hemmt man die Phosphatase durch Vergiftung mit Natriumfluorid, so wird in beiden Fällen die Hämolyse bis zum 6. Tag hintangehalten. Bei der durch Hitze inaktivierten Cholesterinesterase fällt die Hämolyse zeitlich mit der im Kontrollversuch zusammen.

Nach den bisherigen Feststellungen scheint das Exsudat besonders reich an Fermenten zu sein und im Hinblick auf die Hämolyse auch solche zu enthalten, die nach Art etwa des Trypsins auf das Erythrocytengerüst einzuwirken vermögen. Das Transsudat ist offenbar an solchen Substanzen arm, jedenfalls treten sie nicht eindrucksvoll hämolyseauslösend zutage. Die Verzögerung der Hämolyse durch Inaktivierung des Blutplasmas weist ebenso wie die Plasmakreuzung bei gruppengleichem Blut darauf hin, daß zur Hämolyse befähigte Fermente auch im Plasma vorhanden sein müssen; ferner zeigt der Kreuzungsversuch aber auch, daß die Wirksamkeit dieser Fermente von anderen wesensmäßig noch nicht faßbaren Faktoren — im Falle der Kreuzung von fördernden — abhängig ist. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß es bereits gelungen ist, einen physiologischen Hemmstoff des krystallisierten Trypsins aus dessen biologischem Milieu in krystallisierter Form zu isolieren (KUNITZ und NORTHROP).

Konnte nach den bisherigen Ergebnissen kein Zweifel daran bestehen, daß an der in der Hämolyse erkennbaren Blutauflösung ein heterolytischer Fermentvorgang beim Exsudat und beim Blutplasma maßgeblich beteiligt ist, so blieb aber noch die Frage zu klären, ob auch *das in Lösung gegangene Hämoglobin fermentativ* angegangen

werden kann. Am einfachsten mußte sich der Beweis erbringen lassen, wenn man die Aufspaltung des Häms oder die Abspaltung des Eisens aus dem Häm nachweisen konnte. Für letzteres schien uns die Mikro-eisenanalyse nach der Methode von HEILMEYER und PLÖTNER am geeignetsten. Von jedem Versuch wurde, wie auch in den bisher geschilderten, zur Bestimmung des Hämolyseeintrittes eine aus bis zu 12 Reagensgläsern bestehende Reihe angesetzt und fortlaufend der Eisengehalt stufenphotometrisch errechnet. Die Ergebnisse sind unter Verzicht auf die eingehendere Wiedergabe der Versuchsprotokolle im folgenden übersichtlich zusammengestellt.

Übersichtstabelle.

Versuch	Hämolyse- beginn nach Tagen	Eisengehalt in $\gamma\%$		Fluoreszenz und Porphyrin- spektrum
		Ausgangs- wert	Endwert	
1. NaCl-Lösung und gewaschene Erythrocyten	8	65	75	negativ
2. Erythrocyten in eigenem inaktiviertem Plasma	10	90	105	negativ
3. Transsudat und gewaschene Erythrocyten	8	90	105	negativ
4. Inaktiviertes Exsudat und gewaschene Erythrocyten	7	110	125	negativ
5. Phosphatase und gewaschene Erythrocyten	3	50	60	negativ
6. Trypsin und gewaschene Erythrocyten	1 $\frac{1}{2}$	65	70	negativ
7. Nuklease und gewaschene Erythrocyten	7	45	50	negativ
8. Acetontrockenpulver aus Leber inaktiviert und gewaschene Erythrocyten	7 $\frac{1}{2}$	70	80	negativ
9. Unbehandeltes citriertes Vollblut	7	95	305	positiv
10. Austausch gruppengleicher gewaschener Erythrocyten				
1. Erythrocyten a_1 u. Plasma a_1	7	90	290	positiv
2. Erythrocyten a_2 u. Plasma a_2	8	100	295	positiv
3. Erythrocyten a_1 u. Plasma a_2	5 $\frac{1}{2}$	—	330	positiv
4. Erythrocyten a_2 u. Plasma a_1	5	—	320	positiv
11. Defibriniertes Blut	—	100	300	positiv
12. Exsudat und gewaschene Erythrocyten	3	120	320	positiv
13. Acetontrockenpulver aus Leber und gewaschene Erythrocyten .	3 $\frac{1}{2}$	70	310	positiv

Das Ergebnis dieser mehrfach durchgeführten und in den wesentlichen Punkten stets übereinstimmenden Versuche ist sehr eindrucksvoll bezüglich der Fähigkeit der verschiedenen geprüften Substanzen, den Farbstoffanteil des Hämoglobins so zu beeinflussen, daß das Eisen aus dem Porphyrinskelet freigemacht wird.

In den Versuchen 1—8 der Übersicht wird keine oder eine nur unwesentlich über der Fehlerbreite der Methodik liegende Erhöhung des Eisenspiegels festgestellt. Unter den in den Versuchen 1—8 verwandten Medien sind solche, von denen man von vornherein die besagte Funktion nicht erwartet hatte, z. B. die NaCl-Lösung und die Ribonuklease; daß nach Hemmung aller Fermente die Erhöhung des Eisenspiegels ausbleibt, darf als Beweis dafür gelten, daß die Isolierung des Eisens aus dem Häm nur fermentativ, und zwar heterolytisch möglich ist. Die rein isolierten Fermente erweisen sich in dieser Hinsicht als wirkungslos. Von besonderer Bedeutung scheint uns aber die Tatsache zu sein, daß auch dem Transsudat diese Fähigkeit nicht innewohnt. Daß sehr lebhaft hämolysierende Fermente dem Blutfarbstoff nichts anhaben, beweist, daß für die verschiedenen Abbauvorgänge besondere, d. h. spezifisch fermentative Leistungen erforderlich sind.

Die Versuchsreihen 9—13 umfassen die Erythrocyten-Medien-gemische, in denen dank besonderer Fermente das Hämoglobineisen freigemacht werden konnte. In diese Gruppe gehört das Exsudat und das Blutplasma. Auch das defibrinierte Blut ist dazu in der Lage. Der Eisenanstieg richtet sich nach dem Grad bzw. der Schnelligkeit der Hämolysen, bei schnell einsetzender Erythrocytenauflösung wie beim Exsudat steigt der Eisengehalt während der Beobachtungszeit kontinuierlich, annähernd geradlinig, d. h. in linearer Abhängigkeit, an, während er im unbehandelten citrierten Vollblut bis zur sichtbaren Hämolysen langsam, danach aber schnell zunimmt. Das besagt, daß erst nach Auflösung der Erythrocyten das Häm erschlossen werden kann. Dieser Vorgang ist augenscheinlich nur heterolytisch möglich, jedenfalls ergeben sich für eine autolytische Komponente keine gesicherten Anhaltspunkte.

Diese mit Hilfe der Eisenbestimmung erzielten Resultate schienen uns so wichtig, daß wir sie durch methodisch andere Untersuchungsverfahren zu erhärten trachteten*.

Der Blutfarbstoff gehört wohl zu den meiststudierten Stoffen, und ein beträchtlicher Teil der Kenntnisse, die wir von ihm besitzen, wurde spektroskopisch gewonnen. Gerade für die Differenzierung des eisenhaltigen und eisenfreien Farbstoffanteiles des Hämoglobins leistet die Bestimmung der quantitativen Absorptionsspektren vorzügliche Dienste. Es stand uns allerdings nur ein einfaches KIRCHHOFF-BUNSENSches Spektroskop zur Verfügung, das sich für diesen Zweck als unzulänglich erwies. Wir benutzten statt dessen das Spektralphotometer des

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Die Methode der Eisenbestimmung wurde inzwischen weiter ausgebaut und zur Bewertung von Trans- und Exsudaten herangezogen. Siehe Arbeit MASSHOFF-GRÄNER: Klin. Wschr. 1949, im Druck.

Zeißschen Stufenphotometers (nach PULFRICH), über dessen universelle Anwendungsmöglichkeiten das Buch von HEILMEYER über „Medizinische Spektrophotometrie“ erschöpfend Auskunft gibt.

Wird das Hämoglobin in einem Teil der eben besprochenen Versuche offensichtlich nicht in seinem Farbstoffanteil alteriert, in dem anderen Teil jedoch das Eisen aus dem Blutfarbstoff abgespalten, dann muß in dem letztgenannten Falle ein neuer Körper entstehen,

nämlich das *Porphyrin* oder eine ihm nahestehende Substanz. Im Falle des Auftretens von Porphyrin mußte ein sehr charakteristisches Absorptionsspektrum zu erkennen sein.

Die orientierende Vorbestimmung der verschiedenen Hämolysate im KIRCHHOFF-BUNSENSchen Spektroskop zeigte, daß nur einige wenige Absorptionsspektren eine Rolle spielen konnten. Die festgestellten Absorptionsmaxima deuteten auf das Oxyhämoglobin bzw. reduzierte Hämoglobin und Porphyrin hin.

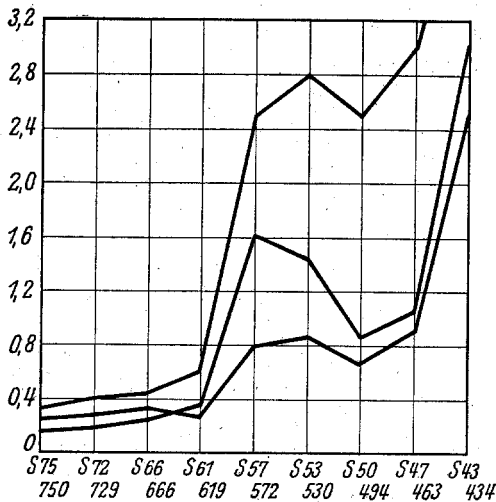


Abb. 1. Stufenphotometrisch gewonnene Absorptionskurven von Oxyhämoglobin, reduziertem Hämoglobin und salzsaurem Porphyrin. Normalkurven. Oben Oxyhämoglobin, Mitte reduziertes Hämoglobin, unten Porphyrin.

Zur genaueren Differenzierung nahmen wir Absorptionskurven im Stufenphotometer auf und gingen so vor, daß die Kurven präparierter Lösungen bestimmt und den nachfolgenden vergleichenden Untersuchungen zugrunde gelegt wurden. Die Abb. 1 gibt die Absorptionskurve von Oxyhämoglobin; reduziertem Hämoglobin und salzsaurem (5%) Porphyrin wieder. Auf der Abszisse sind die jeweilig benutzten Filter des Stufenphotometers und darunter die wirksamen Filterschwerpunkte in μ angegeben, in der Ordinate die Extinktionswerte. Die erzielten Absorptionskurven entsprechen im wesentlichen, d. h. in ihren Absorptionsmaxima den von HEILMEYER u. a. mit viel exakterer Methodik ermittelten. Es kam uns in erster Linie auf einen möglichst exakten Vergleich an von Spektren bestimmter Lösungen mit solchen von zu identifizierenden Lösungen; einer möglichst präzisen Darstellung der spezifischen Absorptionsspektren standen von vornherein apparative Mängel im Wege, abgesehen davon, daß die von uns untersuchten Lösungen keine reinen Lösungen, sondern

Gemische darstellten. So kommt z. B. das Minimum zwischen den beiden bei 576 und 540 $m\mu$ liegenden Maxima des Oxyhämoglobins nicht zur Darstellung, weil für das bei 560 $m\mu$ gelegene Minimum (nach HEILMEYER) kein geeignetes Filter zur Verfügung stand.

Vergleicht man die von den verschiedenen Versuchen angefertigten Spektren, die als primäre Absorptionsspektren angesprochen werden müssen, da sie von den Originallösungen, d. h. ohne Zusatz von chemischen Agentien (mit Ausnahme des reduzierenden $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) gewonnen sind, so ergeben sich in der Tat zwei charakteristische Typen, der eine Typ repräsentiert nach vorausgegangenem Schütteln an der

Luft das Spektrum des Oxyhämoglobins, nach Reduktion mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ läßt sich das Spektrum des reduzierten Hämoglobins erzielen. Der andere Typ ergibt das Absorptionsspektrum des Porphyrins, das sich auch nach Reduktion praktisch nicht verändert. In den Versuchen 1—8, die nach dem Verhalten des Eisens ein weitgehend unverändertes Hämoglobin hatten erwarten lassen, entsprechen die Absorptionskurven denen des Oxy- bzw. reduzierten Hämoglobins (mit Ausnahme des Trypsinversuches, bei dem infolge Hämatinbildung ein anderes Spektrum erzielt wurde), während bei den

Versuchen 9—13 ein Porphyrinspektrum gewonnen wurde. Die Abb. 2 zeigt das spektroskopische Verhalten des Blutfarbstoffes im Transsudat

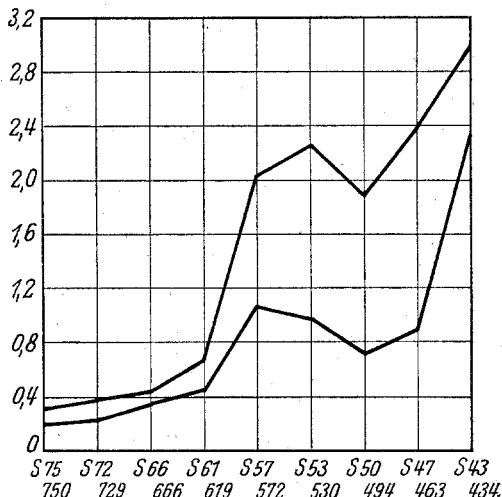


Abb. 2. Absorptionskurve von Transsudaterythrocytengemisch nach 10 Tagen. (Kein Eisenanstieg, keine Fluorescenz.) Obere Kurve nach Schütteln in Luft = Oxyhämoglobin. Untere Kurve nach Reduktion mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

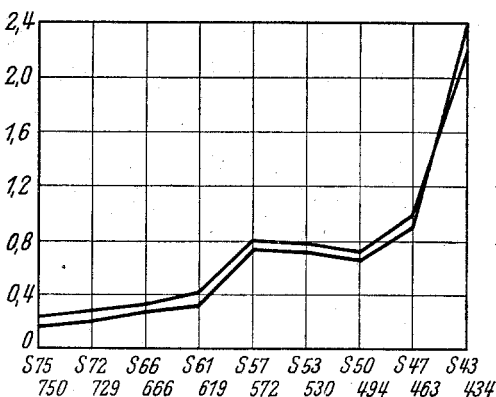


Abb. 3. Absorptionskurve von Exsudaterythrocytengemisch nach 8 Tagen. (Höchster Eisen-gehalt 320 $\gamma\%$, positive Fluorescenz.) Primäre Absorptionskurve oben, untere Kurve nach Reduktion.

(Versuch 4) nach 10 Tagen, zum Vergleich in Abb. 3 die Kurven vom Exsudat.

Eine wichtige Unterstützung erfährt dieses spektrophotometrisch ermittelte Resultat durch die Fluoreszenzuntersuchung. Von den Abkömmlingen des Blutfarbstoffes zeigen nur das Porphyrin und von den Gallenfarbstoffderivaten das Urobilin und das Mesobilirubinogen eine Fluoreszenz (BORST-KÖNIGSDÖRFFER), während das Hämoglobin und seine eisenhaltigen Derivate nicht fluorescieren, eine Tatsache, auf die zuerst STÜBEL hingewiesen hat. Die Fluoreszenzfarbe des Porphyrins liegt nach BORST und KÖNIGSDÖRFFER allgemein zwischen Rot und Gelborange. Sie ist abhängig von der Natur des Lösungsmittels und der Art des Porphyrins. Alkalische Lösungen zeigen eine carminrote bis rötlichorange, saure eine orange bis gelborange Fluoreszenz. Unsere porphyrinhaltigen Lösungen zeichneten sich durch eine primäre Fluoreszenz aus, sie leuchteten, ohne daß sie mit chemischen Agentien in Berührung gekommen waren, rötlichbräunlich, zeigten aber mit der Dauer des Versuches außerdem eine leichte Grünstichigkeit. Die hämolytischen Lösungen, in denen, wie angenommen, der Farbstoff unverändert geblieben war, leuchteten nicht; Trypsin verändert das Hämoglobin durch Abspaltung des Eiweißanteiles, erzeugt aber keinen fluoreszierenden Körper.

Damit schien uns der schlüssige Beweis dafür erbracht, daß das Exsudat und das Blutplasma nach der fermentativen Hämolyse auch den Farbstoffanteil des in Lösung gegangenen Hämoglobins angehen und aus ihm das eisenfreie Porphyrin entstehen lassen. Das Transsudat besitzt diese Fähigkeit überhaupt nicht. Citriertes Exsudat und Blutplasma verlieren diese Eigenschaft nach Hitzeeinaktivierung. Die Grünstichigkeit des Fluoreszenzeffektes scheint ebenso wie das spektroskopische Verhalten im kurzwelligen Bereich des Spektrums dafür zu sprechen, daß das Auftreten von Porphyrin im Experiment wenigstens unmittelbar übergeht in die Bildung von Gallenfarbstoffen. Wir sind dieser Frage aber nicht weiter nachgegangen.

Die vorliegenden Untersuchungen, die auf das Ziel abgestimmt waren, die biologische Differenziertheit von Transsudaten und Exsudaten zu bestimmen, haben über den ursprünglichen Zweck hinaus infolge der Verwendung von Erythrocyten als Versuchssubstrat auch einen Einblick gestattet in die Bedingungen und Vorgänge des Abbaues von roten Blutkörperchen.

Wir knüpfen hier gleich an die vieldiskutierte Frage an, ob Erythrocyten im strömenden Blut einen Abbau erfahren können, d. h. ob das flüssige Blutmedium in der Lage ist, sie zu zerlegen ohne unmittelbare Mitwirkung von Zellen. Auf die erneute Diskussion der an anderer Stelle (MASSHOFF³) bereits besprochenen verschiedenen Auffassungen

kann hier verzichtet werden. Wir möchten in den jetzt vorgelegten Versuchsergebnissen eine neue Stütze für die prinzipielle Möglichkeit des Erythrocytenabbaues im strömenden Blut sehen, denn die Versuche haben gezeigt, daß das Plasma Stoffe besitzt, mit deren Hilfe allein der Abbau vorgenommen werden kann. Damit ist also die Frage zu beantworten möglich, *wie* abgebaut werden kann, viel schwieriger ist aber eine Antwort darauf zu geben, *warum* der Erythrocyt abgebaut wird. Gewisse Schlüsse lassen sich aus den Versuchen auch für diese Frage ziehen. Es scheinen erst bestimmte Bedingungen erfüllt sein zu müssen, bevor der eigentliche Abbauvorgang eintreten kann. In unseren Modellversuchen sind solche Bedingungen offensichtlich gegeben, wenn man die spät einsetzende Hämolyse des Vollblutes mit der beschleunigten nach der Kreuzung von Blutplasma und Erythrocyten vergleicht. Dabei scheinen Individualeigentümlichkeiten des Blutes von Bedeutung zu sein, für deren tatsächliches Bestehen wir früher schon experimentelle Beweise erbracht haben (MASSHOFF²). Solche Individualfaktoren können für transfundiertes Blut von Bedeutung sein, für den normalen Blutabbau sind sie aber sicher bedeutungslos. Der Vergleich zwischen Vollblut und gekreuztem Blut kann also die Ursache oder einen Faktor aus dem Ursachenkomplex beleuchten für die Tatsache des schnellen Abbaues des Transfundates, andererseits läßt sich an Hand dieser Befunde für die physiologischen Abbauverhältnisse die Frage diskutieren, ob nicht zwischen den Erythrocyten und dem ihnen entsprechenden Plasma bestimmte Beziehungen bestehen, etwa in dem Sinne, daß die Erythrocyten normaliter über gewisse Schutzvorrichtungen gegenüber den zum Blutzerfall befähigten Plasmastoffen verfügen. Ein solcher Schutz könnte aber nur beschränkt sein, da ja der Zerfall der Erythrocyten eine unabänderliche Tatsache ist. Die Frage nach dem *Warum* des Zerfalls ist damit aber noch keinen Schritt der Beantwortung näher gebracht.

Nach dem Gesagten sind an dem fermentchemisch deutbaren Abbau im strömenden Blut die zwei Partner Erythrocyten und Plasma beteiligt. In welcher Weise das Plasma in das Geschehen eingreifen kann, wurde bereits dargetan, wie verhält sich aber der zweite Partner? Wir haben früher schon betont (MASSHOFF), daß die Störung der Membranfunktion für das Schicksal des Erythrocyten von entscheidender Wichtigkeit ist, und nahmen an, daß aus im Erythrocyten selbst gelegenen Gründen, etwa infolge von Alterung der Kolloide, die Membran ihre Funktion einstellt. Neuere Untersuchungen, besonders von amerikanischer Seite, haben in den Erythrocyten eine Reihe von Fermenten ergeben, mit deren Hilfe der endogene autolytisch bedingte Zerfall leichter erklärbar wird. Außer der schon länger bekannten

Phosphatase (BAMANN und MEISENHEIMER) wurden von TAUBER 1941 die Lipase und verschiedene Esterasen, von LINEWEAVER und JENSEN 1945 die Urease und die Kohlensäureanhydratase und von STETTEN 1947 kohlenhydratspaltende Fermente nachgewiesen. Ihr Vorhandensein macht es leichter verständlich, daß Erythrocyten in indifferenten und fermentativ inaktiven, aber sonst ihnen gemäßen Medien allmählich autolytisch zugrunde gehen. Der autolytische Zerfall geht

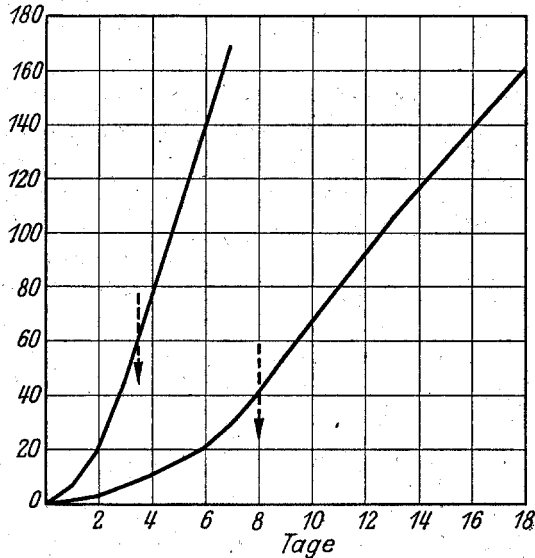


Abb. 4. Stufenphotometrisch verfolgter Verlauf der Hämolyse. Rechte Kurve: Kochsalzerthrocytengemisch. Linke Kurve: Exsudaterthrocytengemisch. Die gestrichelten Linien bezeichnen den Beginn der mit bloßem Auge sichtbaren Hämolyse.

viel langsamer vor sich als der heterolytisch bedingte. RÖSSLE ist zu gleichen Feststellungen gekommen. Verfolgt man den Verlauf der Hämolyse photometrisch und stellt ihn graphisch dar, so resultiert eine Kurve, wie sie die Abb. 4 für das NaCl und das Exsudat-Blutkörperchengemisch zeigt. Sämtliche Gemische präsentieren diesen Kurventyp, die heterolytisch hämolysierenden lassen nur die Kurven steiler verlaufen. Auf die biologischen Verhältnisse übertragen bedeutet dieser Befund, daß die Hämolyse in solchen Lösungen, die aktiv zur Hämolyse führen können, die Summe von heterolytischem und autolytischem Zerfallsanteil der roten Blutkörperchen ist. Den heterolytischen Anteil haben wir in unseren Versuchen zu variieren vermocht, der autolytische ist unbeeinflußbar geblieben. Ein derartig komplexes Geschehen wird wahrscheinlich auch für den physiologischen Blutabbau zutreffen, wann aber und warum letzten Endes dieses Geschehen Platz greift, läßt sich vorerst noch nicht sagen. Mit der Annahme, daß

am Erythrocytenzerfall unter physiologischen Bedingungen ein endo- und ein exogener Faktor beteiligt ist, ergeben sich als Grund für den Abbau folgende beiden Möglichkeiten: entweder beginnt die Auflösung des Erythrocyten bereits unmittelbar nach Ausstoßung seines Kernes, und in der Blutbahn wird der endogen eingeleitete Abbau, unterstützt durch den exogenen, langsam fortgesetzt bis zur völligen Auflösung; eine solche Annahme würde allerdings voraussetzen, daß der Erythrocyt trotz des eingeleiteten Abbaues seinen physiologischen Aufgaben noch gerecht werden könnte. Oder die Entfaltung der endogenen und exogenen Abbaukräfte wird durch einen besonderen zusätzlichen Schutzmechanismus hintangehalten, bei welcher Annahme aber gleich zwei neue Unbekannte auftauchen, nämlich welcher Art dieser Schutzmechanismus sein soll und aus welchen Ursachen er unwirksam wird. Zu der Annahme solcher Schutzvorrichtungen kommen auch DOLJANSKI und KOCH, sie fordern diese Vorrichtungen für das Hämoglobin auf Grund ihrer Feststellung, daß *in vitro*, offensichtlich aber nicht intravasal, das Serum eine starke Aktivität gegen Hämoglobin entfalten kann.

Das Schicksal des Blutfarbstoffes ist öfters Gegenstand von Experimentalstudien gewesen, hauptsächlich wurde der Einfluß isolierbarer biologischer Substanzen wie Blutplasma, Organextrakt, Organbrei, Blutzellen, Gewebeskultur und anderes auf Hämoglobin im Reagensglas untersucht, aber unseres Wissens noch nicht dem Verhalten von Ex- und Transsudat gegenüber dem Hämoglobin nachgegangen. DOLJANSKI und KOCH geben eine Übersicht über die einschlägigen Arbeiten. Die Genannten haben sich auch selbst experimentell mit diesem Problem befaßt und den Einfluß von Zellkulturen und Blutserum auf den Farbstoff studiert. Eine Fibroblastenkultur oder eine Kultur von Milzgewebe verändert nach DOLJANSKI und KOCH das zum Nährboden zugesetzte Hämoglobin und läßt Methämoglobin entstehen, durch Gewebsextrakte wird die eisenhaltige Gruppe aus dem Hämoglobin abgespalten. Es ist von besonderem Interesse im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen, daß DOLJANSKI und KOCH den Nachweis einer Gallenfarbstoffbildung aus Hämoglobin erbringen konnten, ohne daß dabei nach Anlage ihrer Versuche irgendwelche Zellen beteiligt waren. Ferner, daß sie auch eine Beeinflussung des Hämoglobins durch das Blutserum feststellen konnten. Spektroskopisch verfolgbar wandelte sich das Hämoglobin im Blutserum in Methämoglobin um, also in die höhere Oxydationsstufe, außerdem wird das Hämoglobinmolekül tiefgreifender verändert, indem die eisenhaltige Gruppe abgespalten wird, somit Hämatin entsteht. Diese Fähigkeit wird von DOLJANSKI und KOCH einem hämoglobintoxischen Faktor des Serums zugesprochen.

Zur Frage, inwieweit sich *in vitro* Hämoglobin in das eisenfreie Derivat Porphyrin umwandeln läßt, liegen in der Literatur einige Angaben vor. SCHUMM hat in steril aufbewahrtm defibriniertem Blut schon nach einigen Tagen spektroskopisch Porphyrin nachgewiesen. Von SCHUMM, H. FISCHER u. a. wird angegeben, daß unter Einwirkung von Fäulnisbakterien Hämoglobin zu Porphyrin abgebaut wird. SCHREUS und CARRIÉ experimentierten mit Organextrakten und stellten fest, daß der Leberextrakt besonders befähigt ist, aus Hämoglobin Protoporphyrin zu bilden. Von ASHER und EBNÖTHER sowie von CALVO-CRIADO, die mit dem

gleichen Ausgangsmaterial arbeiteten, wird von einer Porphyrinbildung nichts erwähnt, sie beobachteten aber, wie DOLJANSKI und KOCH, einen gallenfarbstoff-ähnlichen Körper. Ebenso ist auch bei DOLJANSKI und KOCH von einer Porphyrinentstehung nicht die Rede. SCHREUS und CARRIÉ fanden, daß auch dann, wenn die Hämoglobininlösung durch präparativ gewonnenes Hämatin ersetzt wird, Protoporphyrin gebildet wird. Dieser Effekt soll auf ein eisenabspaltendes Ferment zurückgehen. Ebenfalls auf eine Fermentwirkung wird ein bei mehr alkalischer Reaktion auftretender, aus Leberbrei und Hämoglobininlösung gebildeter Farbstoff bezogen, der nach seinem Verhalten in naher Beziehung zum Gallenfarbstoff stehen soll.

Es ist hier nicht der Ort, den Hämoglobinabbau im allgemeinen und die Gallenfarbstoffbildung im besonderen zu erörtern, es sei zu diesem Zweck auf die ausgezeichnete Übersicht von DUESBERG und auf die Arbeit von M. ENGEL verwiesen. Angemerkt sei nur die auch von DUESBERG hervorgehobene Tatsache, daß der biologische Vorgang des Hämoglobinabbaues grundsätzlich von dem außerhalb des Körpers stattfindenden Zerfall des Blutfarbstoffes verschieden ist. Bei Fäulnis oder autolytischen Vorgängen oder bei künstlichen Einwirkungen tritt eine Trennung in die beiden Komponenten Globin und Hämatin ein. Daß bei bakterieller Zersetzung aus dem Farbstoffanteil als weitere Derivate Proto- und Deuteroporphyrin entstehen können, ist durch die Arbeiten von SCHUMM bekannt. Protoporphyrin kann nach den Untersuchungen von H. FISCHER, KÄMMERER und KÜHNER auch bei der sterilen Autolyse des Fleisches gebildet werden.

Mit unseren eigenen Untersuchungen haben wir nicht beabsichtigt, experimentell den überaus komplizierten physiologischen Hämoglobinabbau zu reproduzieren, es lag uns vielmehr daran, die verschiedene Wirksamkeit biologischer Substrate gegenüber Erythrocyten bzw. Hämoglobin zu zeigen. Mit Hilfe der nachweisbaren Zerstörung der Erythrocyten bzw. der Umwandlung des Hämoglobins wollten wir uns des Reaktionsproduktes als eines Gradmessers für die Wirksamkeit der zu prüfenden Stoffe bedienen.

Die Untersucher, die sich dem Studium des Hämoglobinabbaues in vitro widmeten, nehmen übereinstimmend an, daß das Auftreten von Hämoglobinderivaten an die Anwesenheit und Wirksamkeit von Fermenten geknüpft ist. Auch in unseren Versuchen muß die Fähigkeit zur Hämoglobinumwandlung Fermenten zugeschrieben werden, das geht aus der Tatsache eindeutig hervor, daß in den Flüssigkeiten, bei denen durch vorsichtiges Erhitzen auf etwa 75° erfahrungsgemäß die fermentwirksamen Substanzen ausgeschaltet werden, die Eigenschaft der Hämoglobinzerstörung verlorengeht.

Die Fähigkeit der Hämoglobinumwandlung im Sinne der Eisenabspaltung kommt in unserer, stets sterile Bedingungen einhaltenden Versuchsanordnung dem Vollplasma, dem Plasma nach Defibrinierung

und dem Exsudat zu, sie geht dem nativen Transsudat* und dem inaktivierten Exsudat und Plasma ab. Damit wird der bezüglich der Hämolyse schon hervorgehobene Unterschied zwischen Transsudat und Exsudat noch wesentlich unterstrichen, es zeigt sich aber ferner, daß zwischen dem Blutplasma und dem Exsudat höchstens ein quantitativer Unterschied bestehen kann. Der Abbau des Hämoglobins ist auch experimentell an die vorausgegangene Hämolyse gebunden, in dieser Hinsicht scheint eine weitgehende Analogie zu den physiologischen Verhältnissen zu bestehen, von denen DUESBERG behauptet, daß das Hämoglobin für die Dauer seiner Einlagerung in die roten Blutkörperchen unantastbar sei. Auch ENGEL fordert als Voraussetzung für den Hämoglobinabbau die vorherige Zerstörung des Erythrocyten und nimmt damit ausdrücklich gegen die Ansicht von BARKAN Stellung, daß eine Öffnung des Häm-Ringes auch innerhalb der roten Blutkörperchen möglich sei. Das bedeutet eine Ablehnung der auch nach unseren Versuchen zu verneinenden Möglichkeit, daß das Hämoglobin auf autolytischem Wege abgebaut werden könne. Der experimentelle Hämoglobinabbau geht wie unter physiologischen Bedingungen heterolytisch vor sich, wobei aber beide Male verschiedene Reaktionsprodukte erzielt werden; das kann unseres Erachtens nur daran liegen, daß die physiologischen Vorgänge mit ihren komplex ineinandergreifenden fördernden und hemmenden Faktoren, die sich aus der gestaltlichen und funktionellen Einheit der jeweiligen Systeme ergeben, im Reagensglas nicht reproduzierbar sind. Das ändert indessen nichts an der experimentell erwiesenen verschiedenen stofflichen Zusammensetzung und Wirksamkeit der hier in erster Linie interessierenden Trans- und Exsudate, die — unter gleichen Bedingungen geprüft — am gleichen Substrat zu ganz differenten Reaktionsprodukten geführt haben.

Besprechung.

Durch einen wesentlichen Gehalt an Fermenten also ist das Exsudat gekennzeichnet und unterschieden vom Transsudat. Diese Feststellung ist geeignet, das Wesen einiger pathologischer Vorgänge dem Verständnis näherzubringen. Daß die Fermente zu den beherrschenden Stoffen des Lebens unter gesunden wie krankhaften Bedingungen gehören, braucht ebensowenig besonders betont zu werden wie die Tatsache, daß ihr Vorkommen ubiquitär ist. Für die Zustände, die unter krankhaften Bedingungen mit dem Austritt von Blutflüssigkeit aus dem Gefäßsystem verbunden sind, wie bei der Transsudation und

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Die seit Abschluß dieser Arbeit fortgeführten Untersuchungen haben ergeben, daß die Fähigkeit zur Hämoglobinzerstörung nur bestimmten Transsudaten völlig abgeht. (MASSHOFF-GRANER, Klin. Wschr. 1949, im Druck.

Exsudation, ist die Frage aber durchaus nicht entschieden, welche Mengen von im Blute zweifellos überreichlich vorhandenen Fermenten gleichzeitig dem Gefäß entströmen. Die Bedeutung dieser Frage zeigt sich deutlich am Problem der *serösen Entzündung*.

Die Erörterung der Trans- und Exsudation führt unmittelbar in das Gebiet der *Permeabilitätspathologie*. Der Austritt des „eiweiß-armen“ Transsudates und des „eiweißreichen“ Exsudates, im Resultat bedingt durch die Beziehungen von Blutbahn und umgebendem Gewebe, ist gebunden an den Zustand der Capillare, in spezie ihres Endothels, dessen Funktion sich nach der Art dieser Beziehungen richtet. Dieses Endothel muß sich anders verhalten, wenn die Blutflüssigkeit etwa aus Gründen des onkotischen Druckausgleiches oder wenn sie bei Anwesenheit eines bakteriellen Prozesses die Blutbahn verläßt. Die Bildung von „entzündlichem“ Ödem des letztgenannten Beispielen geht unter dem Einfluß der Zirkulationsstörung vor sich, zum Wesen der gestörten Zirkulation gehört aber nicht nur eine Änderung der Strömungsgeschwindigkeit im Bereich der terminalen Strombahn, sondern annehmbar auch ein besonderes Verhalten des Endothels. Dieses muß nämlich Elemente des Plasmas permeieren lassen, die ausweislich unserer Versuche qualitativ den im Gesamtplasma vorkommenden entsprechen. Einen anderen Durchlässigkeitsgrad muß indessen das Endothel bei der Transsudation besitzen, da das Transsudat sich durch das Fehlen hochwirksamer Stoffe des Plasmas wie des Exsudates auszeichnet. Unter diesen Stoffen befinden sich Fermente, also Eiweißkörper. Alle Fermente sind, soweit man sie zu isolieren vermochte, wasserlösliche Proteine, und alle, bei denen der Reaktionsmechanismus bisher aufgedeckt werden konnte, sind zusammengesetzte Proteine, sog. Proteide (KUBOWITZ). Die Molekulargewichte der bisher isolierten Fermente liegen zwischen 17000 und 500000. Das Auftreten hochmolekularer Substanzen im Exsudat hat also zur Voraussetzung, daß die Durchlässigkeit des Endothelrohres so abgewandelt sein muß, daß die zuvor im Blutplasma befindlichen Stoffe auch tatsächlich in nennenswerter Menge permeieren können. Bezüglich der Wirksamkeit des Blutplasmas, auch nach seiner Defibrinierung, und des Exsudates hat sich in unseren Versuchen eine weitgehende Parallelität ergeben, die beiden Flüssigkeiten unterscheiden sich offenbar nur in quantitativer Hinsicht. Worauf die besondere Anreicherung hochmolekularer Stoffe im Exsudat zurückgeht, ist eine Frage, über die wir nichts auszusagen vermögen.

Der formal einheitlich erscheinende Permeationsvorgang erweist sich als ein Phänomen, das — erst im submikroskopischen Bereich oder mit indirekter Methodik einer genaueren Analyse zugänglich — je nach den vorherrschenden Bedingungen abgewandelt werden kann.

Denn der jeweilige Grad der Durchlässigkeit der Capillaren und in Abhängigkeit davon die Qualität des Permeierten entscheidet, ob das Ergebnis der geänderten Permeabilität den Charakter eines Exsudates oder Transsudates besitzt.

Mit der Frage, wodurch die Funktion des Endothels bzw. die Qualität des Permeates bestimmt wird, wird die kausale Seite der gesteigerten Permeabilität berührt. Sie läßt sich unseres Erachtens am besten erläutern am Beispiel der serösen Entzündung, trotz ihrer auch heute noch umstrittenen Bedeutung. RÖSSLE selbst hat in der ASCHOFF-Vorlesung 1943 und bei der Dienstbesprechung der deutschen Pathologen 1944 seinen Standpunkt über die seröse Entzündung noch einmal umrissen, gegenüber seinen früheren Auslegungen präzisiert und die seröse Entzündung als eine histo- und kausalgenetisch bestimmt gekennzeichnete krankhafte Erscheinungsform gegen die verschiedenen Angriffe verteidigt, andererseits aber auch vor der kritiklosen Annahme serös-entzündlicher Vorgänge gewarnt.

Diese Warnung ist berechtigt, denn nicht jedes zellfreie Permeat darf als Effekt eines entzündlichen Vorganges betrachtet werden; wie andererseits ihm auch nicht jede entzündliche Entstehung abgesprochen werden kann. Die Erörterung dieses Gegenstandes hat zur selbstverständlichen Voraussetzung, daß die seröse Entzündung als Äußerung einer entzündlichen Reaktion überhaupt anerkannt wird. Nach den exakt morphologisch und biologisch fundierten Erläuterungen RÖSSLES kann man — ohne den konventionellen Begriff „Entzündung“ in seiner heute meist gebrauchten Fassung anzutasten — der serösen Form unter den entzündlichen Vorgängen ihre Berechtigung nicht versagen. Die schwierige histologische Unterscheidbarkeit von Transsudat und Exsudat stellt sich, wie RÖSSLE mehrfach mit Recht hervorgehoben hat, der genaueren Erkennung solcher Entzündungsformen, die nur mit flüssigen Entzündungsprodukten einhergehen, hemmend in den Weg. Eine morphologische Unzulänglichkeit kann indessen aber nicht die Tatsache verhüllen, daß Transsudation und Exsudation zwei verschiedene Prozesse sind, bewertet nach den sie verursachenden Faktoren und nach dem von uns erwiesenen, deutlich unterschiedenen Charakter des Ergossenen. Der Flüssigkeitsaustritt aus den Capillaren mag uns formal als einheitlicher Vorgang vorkommen, in Wirklichkeit ist dieser Vorgang aber nur scheinbar einheitlich, denn die verschiedenen zur Permeation führenden Bedingungen führen zu Modifikationen des Permeationsvorganges in Abhängigkeit von dem jeweiligen Verhalten der Capillare. Wie wäre es sonst erklärbar, daß das unter entzündlichen Gegebenheiten auftretende Permeat ganz andere Folgen zeitigt als der transsudative Erguß. Die Verschiedenartigkeit der Folgen von Transsudation und

Exsudation darf deshalb auch auf eine verschiedene Verursachung schließen lassen.

Die Ursachen der abgeänderten Permeation entziehen sich durchweg der histologischen Nachweisbarkeit, die Folgen geben sich jedoch mehr oder weniger eindringlich zu erkennen. Als wesentliches Kriterium der serösen Entzündung hat RÖSSLE die durch den Austritt von zellfreier Flüssigkeit hervorgerufenen geweblichen Folgeerscheinungen, wie Zelldissoziation, Desmolyse, Zellmobilisation und trübe Schwellung bezeichnet, damit den Weg gewiesen, morphologisch das Exsudat vom Transsudat, dem solche Eigenschaften abgehen, zu trennen. Die aus der morphologischen Analyse gezogenen Schlüsse, daß nämlich Transsudat und Exsudat zwei verschiedene Medien sein müssen, werden durch die vorliegenden experimentellen Untersuchungen eindeutig bekräftigt. Die besondere vom Transsudat verschiedene Qualität des Exsudates, nämlich der reichliche Gehalt an Fermenten, Stoffen also, denen die schädigende Wirkung auf Zellen und Gewebe im wesentlichen zuzuschreiben ist, hat einen ganz anderen Grad der Durchlässigkeit und somit ein anderes Verhalten der Capillaren zur Voraussetzung als bei der Transsudation. Daß die Fermente tatsächlich dem Blutplasma entstammen und nicht etwa erst jenseits der Capillaren gebildet bzw. aktiviert werden, möchten wir nach unseren Versuchen als höchstwahrscheinlich, wenn nicht gar als gesichert annehmen. Gerade aus dem Nachweis von im Prinzip gleich wirksamen Stoffen auch im Plasma ergibt sich für die Durchtrittsweise der berechnigte Schluß, daß das Verhalten des Endothels bzw. der Capillaren entscheidend ist für den Charakter des Permeierten.

Damit rückt der Schwerpunkt der Betrachtung auf die Capillarfunktion. Während die pathologische Transsudation nur eine Steigerung der physiologischen in dem Sinne darstellt, daß bei gleichbleibendem Permeationsmechanismus nur die Quantität des Ergossenen erhöht ist, liegt der Exsudation ein Mechanismus zugrunde, der den Durchtritt eines qualitativ anderen Permeates erlaubt; wie für letzteren bereits ausgeführt, handelt es sich bei den die Blutbahn verlassenden Stoffen hauptsächlich um Eiweißkörper mit größerem Molekulargewicht. Von der Permeation dieser Art bis zum Austritt von geformten Elementen bestehen nur gradweise abgestufte Unterschiede. Man hat kaum Bedenken, in ausgetretenen Zellen des Blutes — ausgenommen etwa die Hämorrhagie auf dem Boden einer gestörten Kreislaufdynamik — ein histologisches Äquivalent für eine Entzündung zu erblicken, mit welchem Recht sträubt man sich gegen die Annahme einer Entzündung, wenn die Permeabilität der Capillaren gewissermaßen nur um einen biologischen Größengrad verringert ist, wenn außerdem der Austritt von Stoffen der besagten Qualität einen

unphysiologischen und somit einen krankhaften Vorgang repräsentiert? Diese Vorstellung verstößt gegen den übereinkunftsgemäß festgelegten Begriff „Entzündung“, denn sie strebt seine Erweiterung an. Das ist nur möglich unter Bruch der Konvention. Aber sollte das nicht erlaubt sein in einer Zeit, in der die Strukturen jenseits der mikroskopischen Sichtbarkeit für den Biologen theoretisch wie praktisch zunehmend an Bedeutung gewinnen?

Die Capillardurchlässigkeit hat man sich also als eine Funktion der Größenordnung des Permeierbaren vorzustellen. Die physiologische und pathologische Transsudation — etwa beim Stauungserguß — bewegt sich im Bereich des Niedermolekularen, die Exsudation im Bereich des Höhermolekularen und umfaßt auch den Austritt geformter Blutbestandteile. Die Exsudation aber wird nur bei einem bestimmten Zustand der Capillaren ermöglicht, der bei der Transsudation nicht vorkommt. Dieser Zustand wird erzielt durch eine Alteration der Capillaren, wahrscheinlich unter Einbeziehung und Vermittlung des Nervensystems, er ist das *funktionelle Merkmal* entzündlicher Vorgänge. Die capilläre Schädigung kann ebensogut vom Blut wie vom Gewebe ausgehen, sie ist in erster Linie Ausdruck krankhaften Geschehens, kann aber auch physiologische Prozesse begleiten, hierfür hat RÖSSLE die Bezeichnung „physiologische Entzündung“ geprägt, wie uns scheint mit Recht, denn auch dort müssen Stoffe permeieren, die dank ihrer Fähigkeit zur Auflösung unbrauchbar und unnütz gewordenen Materials, also zur Gewebsreinigung, offensichtlich Fermentcharakter besitzen. Der Durchtritt von hochmolekularen, das Exsudat kennzeichnenden Stoffen hat also ein Verhalten der Capillaren zur Voraussetzung, das unter Bedingungen gegeben ist, die den entzündlichen adäquat sind. Diesen Überlegungen aus dem Bereich des Funktionellen und der Kolloidchemie darf sich der um die Klärung von Abläufen krankhafter Mechanismen bemühte Histologe und Biologe nicht verschließen, wenn nicht der biologisch ohnehin unbefriedigende Entzündungsbegriff Gefahr laufen soll, im Schematismus zu erstarren.

Mit der Wirkung von flüssigen Körpermedien haben sich schon früher verschiedene Untersucher beschäftigt. LETTERER sah an Leberstückchen, die in die Bauchhöhle der Maus implantiert waren, eine schnell einsetzende Nekrose in den Randteilen, er führt diesen Effekt auf einen von außen eindringenden Stoff zurück und schließt daraus, daß das lebende Gewebe auch gewebszerstörende Stoffe besitzen muß. Diese Stoffe können nach Anlage der Versuche von LETTERER, die im übrigen von RÖSSLE im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen bestätigt und in einem besonderen Befund detailliert wurden, nur den Charakter eines Exsudates gehabt haben, d. h. es handelt sich um eine

Folge entzündlicher Erscheinungen. Außer diesen fügen sich auch die Untersuchungen von SCHÜRMANN, TERBRÜGGEN und WEHNER in den Rahmen der von uns erzielten Ergebnisse und deren Deutung. Die genannten Autoren untersuchten den Einfluß des Blutserums auf isolierte Organstückchen *in vitro* und stellten übereinstimmend Gewebsschäden im Sinne der Nekrobiose bzw. der Nekrose fest. Während SCHÜRMANN für diese Schädigung eine Aktivierung intracellulärer Fermente durch die Blutflüssigkeit annimmt, meinen TERBRÜGGEN und WEHNER, daß außerdem eine unmittelbar schädigende Wirkung des Serums mitspielen müsse. In diesem Zusammenhange sei auch auf die Untersuchungen von GUILLERY hingewiesen; die an Gewebs-embolie, Trans- und Explantaten aufgetretenen Veränderungen will GUILLERY nicht auf Einwirkungen durch die Blutflüssigkeit zurückführen, sondern als Folgen einer Anoxämie auffassen. Zu dem mit den Versuchen von GUILLERY aufgeworfenen Problem hat LETTERER eingehend im Stoffwechselkapitel der FIAT-Berichte Stellung genommen.

Zu dieser Frage ergibt sich aus den eigenen Untersuchungen, daß für den Abbau des Erythrocyteninhaltes *in vitro* eine Aktivierung erythrocyteneigener Fermente ausgeschlossen werden kann, die Umwandlungen am Blutfarbstoff erfolgen durch Blutplasma und Exsudat heterolytisch. Damit soll nicht ausgeschlossen werden, daß in den Modellversuchen von SCHÜRMANN, TERBRÜGGEN und WEHNER wie in dem Tierexperiment LETTERERS auch autolytische Prozesse beteiligt sein können. Die Analyse des Hämolysevorganges hat deutlich werden lassen, daß die Hämolyse bei gegebenen Bedingungen resultieren kann aus der Summation von auto- und heterolytischen Effekten. Ähnlich wird man sich auch die geweblichen Schäden im Organismus entstanden denken müssen. Störungen im wechselseitig eng verknüpften Fermentgefüge bestimmter Zell- und Organsysteme sind wahrscheinlich die Ursachen für fermentativ verursachte Schädlichkeiten überhaupt. Im physiologischen Blutmilieu beispielsweise gibt es annehmbar ebensoviele Hemmstoffe wie Fermente selbst, dieses System von Fermenten wird vermutlich in seiner Funktion durch das Endothel unterstützt; wie leicht dieses System in Unordnung gebracht werden kann, haben in instruktiver Weise unsere Plasma-Erythrocytenkreuzungen gezeigt, das ergibt sich ferner aus den besagten Modellversuchen serumbehandelter Gewebsstücke. Die Aktivierung im Sinne der genannten Autoren könnte in dem Fortfall von Hemmstoffen zu suchen sein.

Das Vorhandensein von zell- und gewebsschädigenden Stoffen im Blute, ihr offenbar angereichertes Auftreten im Exsudat und ihr Fehlen im Transsudat beweist eindeutig die biologische Verschieden-

artigkeit des Flüssigkeitsaustrittes aus den Capillaren; die Capillardurchlässigkeit ist demnach eine Funktionsäußerung, die sich nach den im Blute oder in den Geweben oder in beiden gelegenen Bedingungen richtet. Dabei ist es ohne Belang, ob dieser Regulationsvorgang mit oder ohne Vermittlung des Nervensystems vor sich geht. Nach dem Grad der Reizintensität regelt sich die Funktion; stärkere Reize, wie sie bei entzündungserregenden Bedingungen vorkommen, gestatten offensichtlich erst den Durchtritt besonders wirksamer hochmolekularer Stoffe und können zum Exsudat, einer besonderen Form der morphologischen Entzündungserscheinungen, führen. Darauf besonders hinzuweisen scheint uns deshalb nötig, weil in neuerer Zeit von ZOLLINGER der Vorschlag gemacht wurde, die seröse Entzündung nicht dem Entzündungsbegriff unterzuordnen, sondern alle Prozesse, deren Kennzeichen die Aufhebung der Blut-Gewebsschranke ist, als Dysorosen zu bezeichnen. Dysorie ist ein umfassender Begriff, wir müssen darunter mit SCHÜRMANN und RÖSSLE alle Formen der Permeabilitätsstörung verstehen, da aber Permeabilitätsstörungen verschieden nach ihren Ursachen und ihren Folgen sind, ist der Name Dysorose als einheitliche pathogenetische Bezeichnung falsch und daher abzulehnen.

Zusammenfassung.

1. Ausgehend von der in früheren Untersuchungen getroffenen Feststellung, daß Erythrocyten durch flüssige Medien abgebaut werden können, wurde der Einfluß von Blutplasma, Transsudat, Exsudat und isolierten Fermenten auf Erythrocyten geprüft zur Bestimmung des Grades ihrer Wirksamkeit.

2. Bezüglich der Hämolyse ergibt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Transsudat und Exsudat. Im Transsudat tritt die Hämolyse zur gleichen Zeit auf wie in der zur Kontrolle verwandten NaCl-Lösung, das Exsudat hat einen weit stärkeren hämolysierenden Effekt. Die Wirksamkeit der präparierten Fermente richtet sich nach dem reaktionsfähigen Substrat im Stromatingerüst der Erythrocyten, Nuklease ist wirkungslos, Trypsin, Phosphatase und die Cholesterinesterase (im Acetontrockenpulver aus Schweineleber) beschleunigen die Hämolyse. Die hämolysierende Wirkung aller Lösungen wird durch Inaktivierung aufgehoben. Die Kreuzung von Erythrocyten und Plasma bei gruppengleichem Blut führt zu einer Beschleunigung der Hämolyse.

3. Das in Lösung gegangene Hämoglobin wird durch Exsudat, durch Blutplasma und durch das aus der Schweineleber gewonnene Fermentgemisch weiter abgewandelt. Die genannten Substanzen spalten Eisen aus dem Hämoglobin ab und lassen den stufenphotometrisch

verfolgbaren Eisengehalt im Versuchsmedium deutlich ansteigen. Transsudat und die übrigen Fermentlösungen besitzen diese Fähigkeit nicht.

4. Die tatsächlich erfolgte Eisenabspaltung aus dem Hämoglobin wird spektrophotometrisch mit dem Nachweis eines Porphyrinkörpers gesichert. Auch die positive Fluoreszenz bestätigt das Vorliegen eines Porphyrins.

5. Auf Grund dieser Ergebnisse zeichnet sich das Exsudat durch seinen erheblichen Gehalt an Fermenten aus, die Erythrocyten *in vitro* in bestimmter Weise zu zerstören vermögen; Fermente von gleicher Wirksamkeit besitzt auch das Blutplasma, während das Transsudat von solchen Stoffen frei ist.

6. Das Schicksal der Erythrocyten in den Versuchsmedien ist eine weitere Stütze für die Annahme der Möglichkeit des Erythrocytenabbaues durch das Blut selbst. Erythrocyten können im Blut heterolytisch zerstört werden, ein autolytischer Prozeß scheint diesen Vorgang unterstützen zu können.

7. An Hand der experimentell nachgewiesenen verschiedenen Eigenschaften des Transsudates und Exsudates wird das Wesen der Permeabilität erörtert, gerade im Hinblick auf Transsudation und Exsudation, und daraus der Schluß gezogen, daß die seröse Entzündung eine besondere, biologisch charakterisierte Form der Permeationsstörungen darstellt, die den unter gewöhnlichen entzündlichen Bedingungen auftretenden Vorgängen gleichzusetzen ist.

Literatur.

- ASCHOFF, L.: *Erg. inn. Med.* **26** (1924). — ASHER u. EBNÖTHER: *Biochem. Z.* **72**, 416 (1916). — BAMANN u. MEISENHEIMER: In BAMANN-MYRBÄCK, *Methoden der Fermentforschung*, S. 1637. — BARKAN, G. u. O. SCHALES: *Hoppe-Seylers Z.* **253**, 83 (1938). — BORST u. KÖNIGSDÖRFFER: *Untersuchungen über Porphyrie*. Leipzig: S. Hirzel 1929. — CALVO-CRIADO: *Biochem. Z.* **164**, 61 (1925). — DOLJANSKI u. KOCH: *Virchows Arch.* **291** (1933), Mitt. 1, 2, 4. — DUESBERG, R.: *Klin. Wschr.* **1938**, 1353. — ENGEL, M.: *Klin. Wschr.* **1940**, 1177. — FISCHER, H., H. KÄMMERER u. A. KÜHNER: *Hoppe-Seylers Z.* **139**, 107 (1924). — GÖTZ, P.: *Inaug.-Diss.* Tübingen 1944. — GUILLERY, H.: *Virchows Arch.* **304**, 317 (1939). — *Frankf. Z. Path.* **53**, 522 (1939). — HEILMEYER, L.: *Medizinische Spektrophotometrie*. Jena: Gustav Fischer 1933. — *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (ABDERHALDEN)* Abt. II, Teil 2/2, S. 2337. — HUECK, W.: *Handbuch der allgemeinen Pathologie von KREHL-MARCHAND*, Bd. 3, 2. Abt. 1921. — JUNG, F.: *Klin. Wschr.* **1947**, Nr 29/30. — KLEIN, W.: *Z. phys. Chem.* **207**, 125 (1932). — KUBOWITZ: *Z. inn. Med.* **1947**, H. 3/4. — KUNITZ, M.: *J. gen. Physiol. (Am.)* **24**, 15 (1940). — KUNITZ, M. and U. J. H. NORTHROP: *J. gen. Physiol. (Am.)* **19**, 991 (1936). — LAUDA: *Erg. inn. Med.* **34** (1928). — LETTERER, E.: *Verh. dtsch. path. Ges.* **1934**. — *Allgemeine Pathologie des Stoffwechsels*.

FIAT-Review, Bd. 1. Dieterichsche Verlagsbuchhandlung 1948. — LEUPOLD, E.: Beitr. path. Anat. **59** (1914). — LINEWEAVER and JANSEN: Ann. rev. Biochem. **14**, 75, 83 (1947). — LUBARSCH, O.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie, von HENKE-LUBARSCH, Bd. 1, Teil 2. 1927. — MASSHOFF, W.: Beitr. path. Anat. **108**, H. 1 (1943); **109**, H. 1 (1944). — Dtsch. med. Wschr. **1946**, Nr 9—12. — RÖSSLE, R.: Verh. dtsch. path. Ges. **1923**. — S.ber. preuß. Akad. Wiss. Berl. Physik.-math. Kl. **2**, 22 (1936). — Virchows Arch. **311**, 252 (1943). — Zbl. Path. **83**, H. 1/2 (1945). — SCHREUS u. CARRIÉ: Klin. Wschr. **1934**, 1670. — SCHÜRMANN, P.: Verh. dtsch. path. Ges. **1934**. — SCHUMM, O.: Hoppe-Seylers Z. **132**, 34 (1924); **133**, 298 (1924); **149**, 1 (1925); **159**, 194 (1926). — STETTEN: Ann. rev. Biochem. **16**, 133 (1947). — STÜBEL: Pflügers Arch. **142**, 1 (1911). — TAUBER: Ann. Rev. Biochem. **10**, 47 (1947). — TERBRÜGGEN, A.: Beitr. path. Anat. **98** (1936—37). — WEHNER, G.: Inaug.-Diss. Greifswald 1935. — WILLSTÄTTER, R. u. E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Z. phys. Chem. **125**, 150 (1923). — ZOLLINGER, H. U.: Schweiz. med. Wschr. **1945**, 777.
