

Aus dem Institut für Gewebeforschung (Prof. Dr. med. ELSE KNAKE)
der Deutschen Forschungshochschule Berlin-Dahlem.

Über den Nachweis von homologen und heterologen Cytotoxinen an Gewebekulturen*.

Von

BRIGITTE JAHN.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Januar 1953.)

Auf Vorschlag von Frau Prof. KNAKE untersuchte ich die Frage, ob zellgebundene ebenso wie im Serum enthaltene Immunantikörper mit Gewebekulturen als Testobjekt nachgewiesen werden können.

Neben Bakterientoxinen (LÖWENTHAL, MICSCH, MEYER 1927—1930 u. a.)^{1, 2, 3} sind auch Cytotoxine *in vitro* untersucht worden (Literatur bei R. RÖSSELE⁴). Heterocytotoxine wurden an Gewebekulturen in älteren Arbeiten mehrmals nachgewiesen.

So behandelten z. B. LAMBERT und HANES (1911)^{5, 6} Ratten und Meerschweinchen mit Maus- bzw. Rattensarkom und testeten das Immunserum an Ratten- und Meerschweinchenkulturen. Sie beobachteten Zellschädigungen. — Weitere Versuche mit Antispecieskörpern wurden von HADDA und ROSENTHAL (1913)⁷, sowie von KIMURA (1927)⁸ mit Antihuhnserum von Kaninchen an Hühnerkulturen unternommen; ebenso von NIVEN (1929)⁹ mit Antimausserum von Kaninchen an Mauskulturen. Die mit dem Immunplasma umgesetzten Gewebeexplantate waren im Wachstum gehemmt.

Isozytotoxine versuchten HADDA und ROSENTHAL (1913)⁷ im Serum nachzuweisen, indem sie eine geringe Zahl von Hühnerknorpelkulturen mit Plasma von einem Huhn umsetzten, das gegen Hühnerblut immunisiert worden war. Die Kulturen wuchsen nicht wieder aus.

Später konnte LUMSDEN (1927—1937)^{10, 11, 12} Schädigungen durch Antikörper feststellen, wenn er Jensen-Rattensarkomkulturen mit Anti-Jensen-Rattensarkomserum behandelte. Er glaubte, einen Antitumorfaktor vor sich zu haben. Nach Meinung anderer (PHLEPS 1937¹³, A. FISCHER 1930¹⁴) hat es sich um Isoantikörper gehandelt.

Man hat sich auch um den Nachweis von Immunisoantikörpern *in vivo* bemüht. Ihre Existenz ist umstritten. Es liegen Untersuchungen vor von KRUSIUS 1910¹⁵, UHLENHUTH und HAENDEL 1910¹⁶, ANDREJEW 1909¹⁷, KAPSENBERG 1912¹⁸, BRUYNOGHE 1935¹⁹, LEWIS²⁰, PICARDO, ROTTER 1937/38²¹, SCHILLER 1916²², CUMLEY und IRVIN 1943²³. LANDSTEINER behauptet, daß eventuell entstandene Antikörper von dem artgleichen Antigen im Organismus sofort abgebunden und damit unwirksam würden (LANDSTEINER 1945)²⁴.

Meine Aufgabe war, Versuchstiere gegen Tiere derselben oder einer anderen Art zu immunisieren und ihre Gewebe und Seren an Gewebekulturen auf Antikörper zu untersuchen. Dabei ließ ich die gewonnenen

* In ausführlicher Form bei der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin 1952 als Dissertation eingereicht.

Immunseren auf normales Gewebe der Antigenspender oder anderer Individuen der gleichen Art einwirken. Die Gewebe der immunisierten Tiere brachte ich mit normalem Serum des Antigenspenders oder anderer Individuen der gleichen Art zusammen.

Diese Versuchsanordnung ist in ihren Grundzügen auch von früheren Untersuchern angewandt worden. Ich bediente mich jedoch in einem Teil der Versuche neuerer Immunisierungs- und Züchtungsmethoden.

A. Methodik.

1. Herstellung und Applikation der Antigene.

Als Antigene wurden natives Serum, Alaunpräcipitat von Serum, Erythrocytenaufschwemmungen und Organhomogenisate verwendet, allein oder in verschiedener Kombination. Serumalaunpräcipitate wurden durch Zusammenbringen von Serum und 1%igem Kaliumaluminiumalaun in geringem Überschuß bei Zimmertemperatur hergestellt. Das p_{H} der Lösung war um 4,5. Wir injizierten (s. Tabelle 3, Versuchsserien 2 und 3) sehr hohe Dosen über 4—6 Wochen (HEIDELBERGER 1935)²⁵.

Die Serumpräcipitation mit 1—2%igem Kaliumaluminiumalaun oder Aluminiumhydroxyd wurde von GLENNY, POPE und WEDDINGTON (1926)²⁶ zur Steigerung der Immunwirkung empfohlen. Serumpräcipitate fanden bei der Bereitung antitoxischer Seren zu Impfzwecken Anwendung. Bei subcutaner Injektion bildet sich ein Depot, aus dem das Antigen verlangsamt in den Kreislauf gelangt. Derartige Depots erzeugen nach PRIGGE (1940)²⁷ eine um 70% gesteigerte Immunität.

Zur Herstellung unserer Erythrocytensuspension wurden Blutkörperchen 3mal in Ringerlösung in der Zentrifuge gewaschen und im Verhältnis 1:10 in Ringerlösung aufgeschwemmt.

Organhomogenisate entstanden aus grob zerkleinerter Leber, Niere und Milz entbluteter Tiere durch 20 min langes Homogenisieren bei mittlerer Tourenzahl (mikroskopischer Befund: freie Kerne und Zellteile). Zur Erhaltung der Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien wurde vor dem Homogenisieren ungefähr 1 cm³ hypertonische (30%ige) Rohrzuckerlösung hinzugefügt. Der Brei wurde im Eisschrank bei — 1° aufbewahrt.

Man weiß durch neuere Untersuchungen mit serologischer Methodik, daß die Gewebsspezifität vorwiegend an die Mitochondrien gebunden ist (MALMGREN 1951)²⁸. In isotonischem Milieu, vor allem in Elektrolyten, werden isolierte Mitochondrien stark verändert, und zwar hinsichtlich ihrer Form, ihrer Vitalfarbbarkeit mit Janusgrün und ihrer Funktionsfähigkeit als Fermentträger. Als geeignetes Suspensionsmedium hat sich stark hypertonische (0,88 Mol) Rohrzuckerlösung erwiesen (HOGEBOOM, SCHNEIDER und PALLADE 1947)^{29, 30}. Auch isotonische Rohrzuckerlösung hat gewisse günstige Eigenschaften (SCHNEIDER und HOGEBOOM 1951)³¹.

Den Reiz auf das subcutane Gewebe haben wir dadurch abgeschwächt, daß wir den konzentrierten Brei unmittelbar vor der Injektion im Verhältnis 1:1 mit isotonischer Rohrzuckerlösung (0,29 Mol) verdünnten.

Um eine Depotimmunisierung zu erreichen, kam Paraffinum liquidum im Verhältnis 1:1 hinzu.

Als Antigene dienten 1. natives Serum allein, 2. Alaunpräcipitat von Serum kombiniert mit Erythrocytenaufschwemmung und schließlich Alaunpräcipitat von Serum in Verbindung mit Organhomogenisat. Wir immunisierten Ratten intraperitoneal oder subcutan, Kaninchen intravenös oder subcutan und Meerschweinchen subcutan.

Die Gewinnung der Immunsera durch Entbluten der Tiere erfolgte je nach der Kombination der Antigene 5 Tage bis 6 Wochen nach der letzten Injektion (s. Tabellen 2—5).

2. Austestung der Immunseren an Gewebekulturen.

Die Untersuchung auf Cytotoxine im Immunserum geschah an Kulturen von Geweben unbehandelter Tiere. Diese wurden zunächst in Carrel-Flaschen oder Roller Tubes mit normalem Serum vorgezüchtet (Tabelle 1). Im Teststadium wurde das den Kulturen homologe Normalserum bei den Versuchskulturen durch das zu untersuchende Immunserum ersetzt. Bei den Kontrollkulturen wurde das entsprechende Normalserum beibehalten. Eine Spülung von 2mal $\frac{1}{2}$ Std mit Ringerlösung vor der Behandlung mit Immunserum hatte die Versuchskulturen von den Resten des normalen Serums befreit (Tabellen 2 und 3).

Tabelle 1. *Vorzüchtung der Testkulturen in Carrel-Flaschen oder Roller Tubes.*

HPl = Hühnerplasma; RaSe = Rattenserum; KaSe = Kaninchenserum; Ty = Tyrodelösung; HEE = Hühnerembryonalextrakt; I bzw. II = Zentrifugat I bzw. II.

Gewebe	Feste Phase (nur bei Carrel-Flaschen)*	Flüssige Phase	Erneuerung der flüssigen Phase
Ratte:			
Jensen-Sarkom (12tägig) . . .	2 ** HPl + 3 Ty + 1 HEE I	7 RaSe + 7 Ty + 2 HEE II	jeden 2.—3. Tag
Ratte (10tägig):			
Niere	5 HPl + 2 RaSe + 10 Ty + 3 HEE I	7 RaSe + 7 Ty + 6 HEE II	jeden 2.—3. Tag
Milz	3 HPl + 2 RaSe + 10 Ty + 3 HEE I	7 RaSe + 7 Ty + 2 HEE II	jeden 2.—3. Tag
Rippe	5 HPl + 2 RaSe + 5 Ty + 3 HEE I	7 RaSe + 7 Ty + 6 HEE II	jeden 2.—3. Tag
Kaninchen (ausgewachsen):			
Niere	5 HPl + 1 KaSe + 10 Ty + 3 HEE I	8 KaSe + 8 Ty + 4 HEE II	jeden 2.—3. Tag
Milz	5 HPl + 1 KaSe + 5—10 Ty + 3 HEE I	8 KaSe + 8 Ty + 4 HEE II	jeden 2.—3. Tag

* In roller tubes werden die Kulturen nur mit einem dünnen Plasmafilm angeheftet.

** Menge in Tropfen (1 Tropfen ungefähr 0,03 cm³).

5*

Tabelle 2. *Behandlung von Gewebekulturen mit heterologem*

Versuchsserie	Immunisierungsverfahren			Zeitraum zwischen Immunisierung und Serumgewinnung	Herkunft der Testkulturen		
	Als Antikörperfildner dienende Tierart	Als Antigen-spender dienende Tierart	Dosis, Dauer und Art der Immunisierung		Herkunft der Testkulturen		
					Tierart	Gewebe	
1	Kaninchen (1 Tier, ausgewachsen)	Ratte (ausgewachsen)	$1/2$ —1 cm ³ Serum je Woche, intravenös, 6 Monate	5 Tage	Ratte (ausgewachsen)	Jenser Sarko	
2	Ratten (2 Tiere, ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)	1 cm ³ Serum je Woche, subcutan, 4 Wochen	5 Tage	Kaninchen (ausgewachsen)	Milz, Niere	
3	Ratten (2 Tiere, ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)	1 cm ³ Serum je Woche, subcutan, 6 Wochen	16 Tage	Kaninchen (ausgewachsen)	Milz, Niere	
4	Meerschweinchen (5 Tiere, ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)	1 mal 1 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 1,5 cm ³ Organhomogenisat (1:1 in isotonischer Rohrzuckerlösung) in 1,5 cm ³ Paraffinum liquidum, subcutan	3 bis 9 Wochen	Kaninchen (ausgewachsen)	Milz, Niere	

* Bei der Vorzüchtung angewandte Methode s. Tabelle 1.

Einige frühere Untersucher haben das Einwirken von Antikörperseren auf Kulturen dadurch erreicht, daß sie entweder bereits ausgewachsene Kulturen mit dem toxischen Serum zusammenbrachten, oder sie mit dem Immunplasma umsetzten. Im ersten Falle konnten sie eine Schädigung der gesunden Zellen, im zweiten eine Wachstumshemmung beobachteten.

Wir zogen die erste Versuchsanordnung vor, weil sie tiefere Eingriffe während der Immuneinwirkung vermeidet.

Zur Untersuchung auf zellgebundene Antikörper wurden Gewebe der immunisierten, entbluteten Tiere in normalem Serum der Antigen-spenderspecies ausgepflanzt und eine gewisse Zeit fortgezüchtet (Tabellen 4 und 5). Als Kontrollen dienten Kulturen aus den entsprechenden Organen unbehandelter Tiere derselben Art. Die Züchtungsmedien waren für Versuchs- und Kontrollkulturen gleich.

B. Versuchsergebnisse.

I. Nachweis von Cytotoxinen im Serum.

Zur Darstellung unserer Versuchsergebnisse (Tabellen 2—5) bezeichnen wir die beobachteten Wirkungen wie folgt:

Bei dem geringsten Grad der Schädigung degenerieren die Zellen. Zunächst entstehen feine, dann grobe Fettropfen im Zelleib. Sie können ihn bis auf den Kernraum ausfüllen und sogar den Kern deformieren

Immunserum zum Nachweis von *Antispecies-Cytotoxinen*.

Testverfahren					Ergebnis
Versuchskulturen	Züchtungsmedium* der Kontrollkulturen	Alter der Kulturen bei Versuchsbeginn	Beobachtungs-dauer im Versuch	Zahl der Versuchs- und Kontrollkulturen	Schädigungsgrad der Versuchskulturen
7 Ty + 2 HEE II + 7 Ka.- Immunserum	7 Ty + 2 HEE II + 7 Ka.- Normalserum	8 Tage	7 Tage	je 4 Carrel- Flaschen à 8 Kulturen	IV
8 Ty + 4 HEE II + 10 Ra.- Immunserum	8 Ty + 4 HEE II + 10 Ra.- Normalserum	30 Tage	7 Tage	je 4 Carrel- Flaschen à 8 Kulturen	I-II
8 Ty + 4 HEE II + 10 Ra.- Immunserum	8 Ty + 4 HEE II + 10 Ra.- Normalserum	10 Tage	7 Tage	je 4 Carrel- Flaschen à 8 Kulturen	I-II
8 Ty + 4 HEE II + 10 Me- Immunserum	8 Ty + 4 HEE II + 10 Me- Normalserum	8 bis 30 Tage	7 Tage	je 6 Carrel- Flaschen à 8 Kulturen	IV

(Schädigungsgrad I). Bei stärkerer Schädigung lockern sich die dichten Wachstumszonen der Kulturen durch Degeneration und Untergang von Zellen auf. Anfangs runden sich viele äußere und später auch weiter innen gelegene Zellen ab (Schädigungsgrad II) und zerfallen (Schädigungsgrad III). Bei sehr starker Giftwirkung liegen nur noch Zelltrümmer um das Mutterstück. Alle intakten Zellen sind verschwunden (Schädigungsgrad IV).

1. *Heterologe Cytotoxine*. Heterologe Cytotoxine haben wir in verschiedenen Versuchsserien im Immunserum nachgewiesen (Tabelle 2). Ein Kaninchen war gegen Rattenserum, 4 Ratten gegen Kaninchen-serum und 5 Meerschweinchen gegen Kaniuchenserum und -organe immunisiert worden. Die Immunseren schädigten die Epithel- und Bindegewebskulturen, an denen sie ausgetestet wurden, in verschiede-nem Grade. Jensen-Rattensarkomkulturen wurden von Kaninchen-Antirattenserum stark angegriffen (Tabelle 2, Versuchsserie 1, Schädigungsgrad IV), und zwar besonders die Makrophagen. Im normal gewachsenen Sarkomgewebe liegen sie in großer Zahl den breiten Fibroblasten auf (Abb. 1 a). Nach der Behandlung mit Immunserum verloren sie ihren Turgor und schwanden dahin (Abb. 1 b).

Die Wirkung des Immunrattenserums auf Kaninehennieren- und -milzkulturen war weit geringer (Tabelle 2, Versuchsserien 2 und 3). Diese Reihen zeigten nur den I. und II. Grad der Schädigung, nämlich

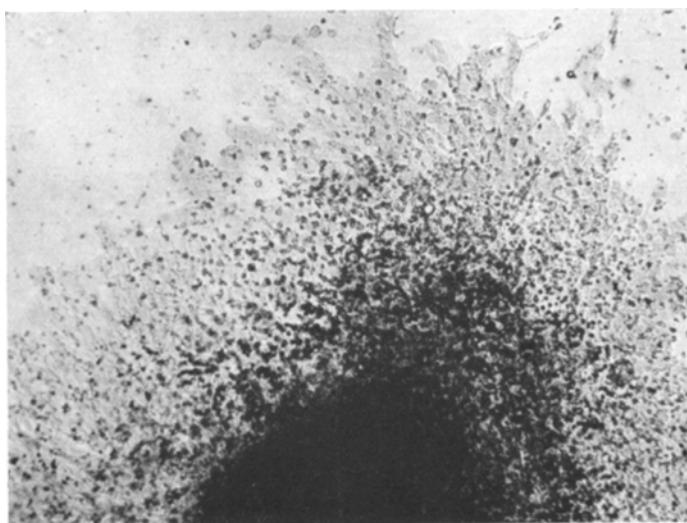


Abb. 1a. Jensen-Rattensarkomkultur mit normalem Rattenserum gezüchtet (Kontrolle zu Abb. 1b). Lebend photographiert, 40:1.

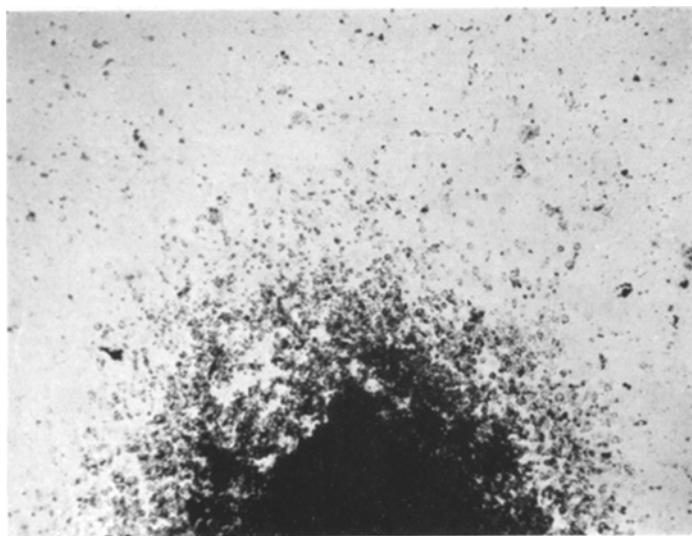


Abb. 1b. Jensen-Rattensarkomkultur mit gegen Kaninchen immunisiertem Rattenserum gezüchtet (Schädigungsgrad IV). Lebend photographiert, 40:1.

grobe Verfettung und Auflockerung der Kulturränder durch Zelldegeneration und -untergang.

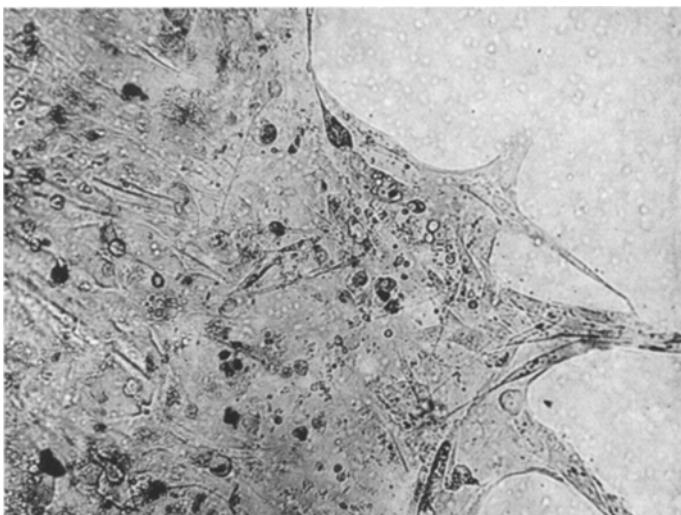


Abb. 2 a. Kaninchennierenkultur in normalem Kaninchenserum gezüchtet (Kontrolle zu Abb. 2b). Lebend photographiert, 100:1.

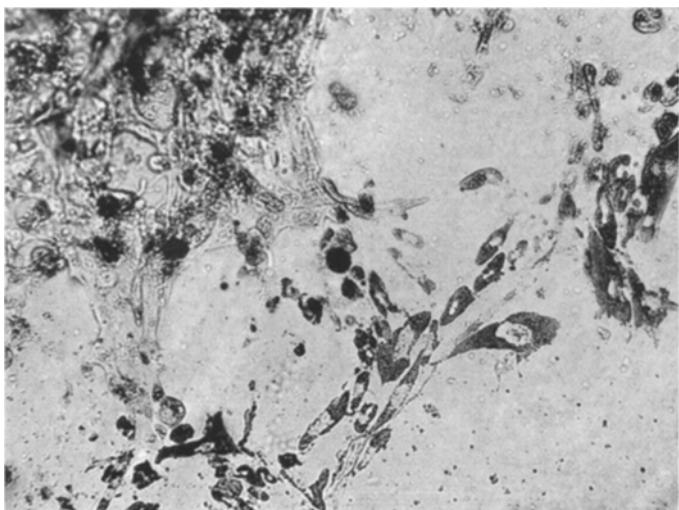


Abb. 2 b. Kaninchennierenkultur in homologem Immunserum gezüchtet (Schädigungsgrad II). Lebend photographiert, 100:1.

Das Serum der hoch immunisierten Meerschweinchen war sehr toxisch (Tabelle 2, Versuchsserie 4). Es zerstörte die Kulturen in

Tabelle 3. Behandlung von Gewebekulturen mit

Versuchsserie	Immunisierungsverfahren				Herkunft der Testkulturen	
	Als Antikörperbildner dienende Tierart	Als Antigen-spender dienende Tierart	Dosis, Dauer und Art der Immunisierung	Zeitraum zwischen Immunisierung und Serumgewinnung	Herkunft der Testkulturen	
					Tierart	Gewebeart
5	Ratten (10 Tiere, ausgewachsen)	Ratte (ausgewachsen)	1 cm ³ Serum je Woche, intraperitoneal 13 Wochen	1 Woche	Ratte (ungefähr 10 Tage)	Rippe, Niere, Milz
6	Kaninchen (2 Tiere, etwa 5 Monate)	Kaninchen (ausgewachsen)	4mal 2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 1 cm ³ Erythrocytenaufschwemmung je Woche subcutan, 4 Wochen	5 Tage	Kaninchen (ausgewachsen)	Niere, Milz
7	Kaninchen (2 Tiere, etwa 5 Monate)	Kaninchen (ausgewachsen)	4mal 2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 1 cm ³ Erythrocytenaufschwemmung je Woche subcutan, 6 Wochen	5 Tage	Kaninchen (ausgewachsen)	Niere, Milz
8	Kaninchen (4 Tiere, ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)	2mal 2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 4 cm ³ Organhomogenisat (1:1 in isotonischer Rohrzuckerlösung) in 4 cm ³ Paraffinum liquidum. 3mal 2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 2,5 cm ³ Organhomogenisat in 2,5 cm ³ Paraffinum liquidum je Woche, subcutan 5 Wochen	24 bis 26 Tage	Kaninchen (ausgewachsen)	Milz, Niere

24 Std total. Bei den Milzkulturen waren Fibroblasten und Makrophagen in gleichem Maße betroffen. Die Wachstumszonen der Nierenkulturen bestanden praktisch nur aus Epithel, so daß wir nur über die Wirkung des Immunserums auf Nierenepithelzellen urteilen können. Diese degenerierten vollkommen. Die Leiber der abgetöteten Zellen verklumpten zu Haufen (Schädigungsgrad IV).

Die in allen Versuchen gleichzeitig beobachteten Kontrollkulturen behielten ihr regeläßiges lebhaftes Wachstum auch nach dem Zusatz des heterologen (Normal-) Serums bei.

2. *Isocytotoxine*. Von den 4 Versuchsserien wurde die erste an Ratten durchgeführt (Tabelle 3, Versuchsserie 5). Eine Serie von 10 Ratten wurde 13 Wochen lang mit nativem Rattenserum intraperitoneal immunisiert und ihr Serum an Geweben unbehandelter Ratten getestet. Der Versuch verlief negativ, Versuchs- und Kontrollkulturen wuchsen gleich gut.

Danach wurden 4 Kaninchen mit Serumalaunpräcipitat und Erythrocytenaufschwemmung sowie 4 Kaninchen mit Serumalaunpräcipitat und Organbrei (Tabelle 3, Versuchsserien 6, 7 und 8) behandelt. Diese Isoimmunseren waren viel geringer toxisch als die in Tabelle 2 schon

homologem Immunserum zum Nachweis von Isocytotoxinen.

Testverfahren				Ergebnis	
Züchtungsmedium der		Alter der Kulturen bei Versuchsbeginn	Beobachtungs-dauer im Versuch	Zahl der Versuchs- und Kontrollkulturen	Schädigungsgrad der Versuchskulturen
Versuchskulturen	Kontrollkulturen				
7 Ty + 6 HEE II + 7 Ra.- Immunserum	7 Ty + 6 HEE II + 7 Ra.- Normalserum	15 Tage	7 Tage	je 9 Carrel-Flaschen à 8 Kulturen	keine Schädigung
8 Ty + 4 HEE II + 10 Ka.- Immunserum	8 Ty + 4 HEE II + 10 Ka.- Normalserum	30 Tage	7 Tage	je 8 Carrel-Flaschen à 8 Kulturen	Niere I-II, Milz keine Schädigung
8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Immunserum	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	10 Tage	7 Tage	je 10 Carrel-Flaschen à 8 Kulturen	Niere I-II, Milz keine Schädigung
8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Immunserum	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	8 bis 30 Tage	7 Tage	je 18 Carrel-Flaschen à 8 Kulturen	keine Schädigung

beschriebenen heterologen Seren. Das Serum der Tiere, bei denen Kaninchenserumalaunpräcipitat und Erythrocytensuspension als Antigen gedient hatten, schädigte die Testkulturen leicht (Tabelle 3, Versuchsserien 6 und 7, Schädigungsgrad I und II). Die Epithelzellen aller Nierenkulturen waren grob verfettet, die Fibroblasten an den Rändern der Wachstumszone weniger dicht und regelmäßig gelagert, ein Teil der Zellen abgerundet oder zerfallen. In Abb. 2a und b wird der Unterschied der geschädigten Wachstumszonen zu den gesunden, weit ausgespannten Epithelmembranen der Kontrollkulturen deutlich. — Milzfibroblasten und -makrophagen wurden nicht angegriffen.

Die Immunseren, bei denen Kaninchenserumalaunpräcipitat und Organbrei als Antigen gedient hatten (Tabelle 3, Versuchsserie 8) schädigten die Kulturen nicht.

II. Nachweis zellgebundener Immunkörper.

Bei dieser Versuchsgruppe bezeichnen wir die Veränderungen an Kulturen aus Organen immunisierter Tiere nach Behandlung mit Normalserum folgendermaßen: Schädigungsgrad I besteht in einer Verlängerung der bis zum Wachstumsbeginn verstreichenden Latenzzeit. Von da an

Tabelle 4. Behandlung von Kulturen aus den Geweben immunisierter Tiere mit

Versuchsserie	Immunisierungsverfahren				Testkulturen	
	Als Antikörperbildner dienende Tierart	Als Antigen-spender dienende Tierart	Dosis, Dauer und Art der Immunisierung	Zeitraum zwischen Immunisierung und Organentnahme		
	Tierart	Gewebeart				
9	Ratten (2 Tiere, ausgewachsen)	Kaninchen	1 cm ³ Serum je Woche, subcutan, 6 Wochen	16 Tage	Kaninchen	Milz, Niere
10	1 Meerschweinchen	Kaninchen		3 Wochen	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere
11	1 Meerschweinchen	Kaninchen		3 Wochen	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere
12	1 Meerschweinchen	Kaninchen	1mal 1 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 1,5 cm ³ Organhomogenisat (1:1 in isotonischer Rohrzuckerlösung) in 1,5 cm ³ Paraffinum liquidum	4 Wochen	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere
13	1 Meerschweinchen	Kaninchen		4 Wochen	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere
14	1 Meerschweinchen (5 Tiere, ausgewachsen)	Kaninchen		9 Wochen	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere

Tabelle 5. Behandlung von Kulturen aus den Geweben immunisierter Tiere mit

Versuchsserie	Immunisierungsverfahren				Testkulturen	
	Als Antikörperbildner dienende Tierart	Als Antigen-spender dienende Tierart	Dosis, Dauer und Art der Immunisierung	Zeitraum zwischen Immunisierung und Organ-gewinnung		
	Tierart	Gewebeart				
15	Kaninchen (ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)	2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 1 cm ³ Erythrocytenaufschwemmung 4mal je Woche, subcutan, 6 Wochen	6 Tage	Kaninchen	Milz, Niere
16	1 Kaninchen (ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)	2mal 2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 4 cm ³ Organhomogenisat (1:1 in isotonischer Rohrzuckerlösung) in 4 cm ³ Paraffinum liquidum. 3mal 2,5 cm ³ Organhomogenisat in 2,5 cm ³ Paraffinum liquidum + 2 cm ³ Serumalaunpräcipitat je Woche, subcutan, 5 Wochen	24 Tage	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere
17	1 Kaninchen (ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)		25 Tage	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere
18	1 Kaninchen (ausgewachsen)	Kaninchen (ausgewachsen)		26 Tage	Kaninchen	Milz, Lunge, Niere

dem als Antigen benutzten Serum zum Nachweis zellgebundener heterologer Cytotoxine.

Testverfahren				Ergebnis
Züchtungsmedium		Beob- achtungs- dauer im Versuch	Zahl der Versuchs- und Kontrollkulturen	Schädigungsgrad der Versuchs- kulturen
Feste Phase	Flüssige Phase			
5 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	12 Tage	je 8 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz, Niere II
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	12 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz II, Niere I Lunge keine Schädigung
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	12 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz II, Niere I Lunge keine Schädigung
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	12 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz, Niere, Lunge III
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	12 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz, Niere, Lunge II
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	12 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz, Niere II Lunge III

dem als Antigen benutzten Serum zum Nachweis gebundener Isocytotoxine.

Testverfahren				Ergebnis
Züchtungsmedium		Beob- achtungs- dauer im Versuch	Zahl der Versuchs- und Kontrollkulturen	Schädigungsgrad der Versuchs- kulturen
Feste Phase	Flüssige Phase			
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	10 Tage	je 8 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	keine Schädigung
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	10 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz keine Schädigung. Niere, Lunge III
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	10 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz keine Schädigung. Niere, Lunge III
10 Ty + 5 HPI + 4 HEE I	8 Ty + 4 HEE II + 8 Ka.- Normalserum	10 Tage	je 9 Carrel- Flaschen à 6 Kulturen	Milz, Niere, Lunge III'

Tabelle 6. *Gegenüberstellung des Gehaltes an Antikörpern im*

	Immunisierungsverfahren			
	Als Antikörperbildner dienende Tierart	Als Antigenspender dienende Tierart	Dosis, Dauer und Art der Immunisierung	Zeitraum zwischen Immunisierung und Serumgewinnung
A. Heterozytotoxine	Ratten	Kaninchen	1 cm ³ Kaninchenserum je Woche, subcutan, 6 Wochen	16 Tage
	Meerschweinchen	Kaninchen		3 Wochen
	Meerschweinchen	Kaninchen		3 Wochen
	Meerschweinchen	Kaninchen	1 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 1,5 cm ³ Organhomogenisat (1:1 in isotonischer Rohrzuckerlösung) in 1,5 cm ³ Paraffinum liquidum	4 Wochen
	Meerschweinchen	Kaninchen		4 Wochen
	Meerschweinchen	Kaninchen		9 Wochen
B. Isocytotoxine	Kaninchen	Kaninchen	2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 1 cm ³ Erythrocytenaufschwemmung 4mal je Woche, subcutan, 6 Wochen	6 Tage
	Kaninchen	Kaninchen		24 Tage
	Kaninchen	Kaninchen	2mal 2 cm ³ Serumalaunpräcipitat + 4 cm ³ Organhomogenisat (1:1 in isotonischer Rohrzuckerlösung) in 4 cm ³ Paraffinum liquidum. 3mal 2,5 cm ³ Organhomogenisat in 2,5 cm ³ Paraffinum liquidum je Woche, subcutan, 5 Wochen	25 Tage
	Kaninchen	Kaninchen		26 Tage

ist die Wachstumsgeschwindigkeit zwischen Versuchs- und Kontrollkulturen gleich. — Bleibt die Wachstumsgeschwindigkeit nach Verstreichen der Latenzzeit bei den Versuchskulturen kleiner als bei den Kontrollkulturen, so nennen wir diesen Befund Schädigungsgrad II. — Eine völlige oder fast völlige Wachstumshemmung bedeutet den Schädigungsgrad III. — Außerdem wurden bemerkenswerterweise bei einem Teil der Kulturen, deren Epithel- und Bindegewebswachstum total gehemmt war, sehr viele amöboide Zellen (Makrophagen) mit großer Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet. In diesem Falle wirkte sich also die Hemmung von bestimmten Gewebskomponenten in der Entfesselung einer anderen aus, was schon von E. KNAKE³² für Epithelzellen und Fibroblasten beschrieben wurde. Wir bezeichnen das ganze

Serum und den Organen der gleichen immunisierten Tiere.

Versuche mit Immunserum (Testkulturen)			Versuche mit Immungewebe		
Tierart	Gewebeart	Schädigungs-grad	Tierart	Gewebeart	Schädigungs-grad
Kaninchen	Milz, Niere	II	Ratte	Milz, Niere	Milz, Niere II
Kaninchen	Milz, Niere	IV	Meer- schweinchen	Milz, Niere, Lunge	Milz II, Niere I, Lunge keine Schädigung
Kaninchen	Milz, Niere	IV	Meer- schweinchen	Milz, Niere, Lunge	Milz II, Niere I, Lunge keine Schädigung
Kaninchen	Milz, Niere	IV	Meer- schweinchen	Milz, Niere, Lunge	Milz, Niere, Lunge III
Kaninchen	Milz, Niere	IV	Meer- schweinchen	Milz, Niere, Lunge	Milz, Niere, Lunge II
Kaninchen	Milz, Niere	IV	Meer- schweinchen	Milz, Niere, Lunge	Milz, Niere II, Lunge III
Kaninchen	Milz, Niere	Niere I—II, Milz keine Schädigung	Kaninchen	Milz, Niere, Lunge	Milz, Niere, Lunge keine Schädigung
Kaninchen	Milz, Niere	keine Schädigung	Kaninchen	Milz, Niere, Lunge	Milz keine Schädigung, Niere, Lunge III
Kaninchen	Milz, Niere	keine Schädigung	Kaninchen	Milz, Niere, Lunge	Milz keine Schädigung, Niere, Lunge III
Kaninchen	Milz, Niere	keine Schädigung	Kaninchen	Milz, Niere, Lunge	Milz, Niere, Lunge III

Zusammenspiel kurz als Schädigungsgrad III', obwohl die eine Zellart, nämlich die Makrophagen, keineswegs geschädigt waren. Füttert man die Kulturen längere Zeit weiter, so bilden sich aus den Makrophagen Fibroblasten, indem sie sich langstrecken, wie es von Histiocytenkulturen allgemein bekannt ist (z. B. CARREL 1922³³, BAKER 1933³⁴, v. MÖLLENDORFF 1926—1931^{35, 36}).

Wenn überhaupt eine Wirkung vorhanden ist, so liegt um das Mutterstück geschädigter Immungewebekulturen ein Hof aus Zelldetritus. Bei einer bloßen Verzögerung der Latenzzeit (Schädigungsgrad I) wird er schließlich durchwachsen und damit unsichtbar; ist die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen außerdem verlangsamt (Schädigungsgrad II), so bleibt er noch längere Zeit deutlich. Bei der stärksten

Hemmung bleibt die Kultur von Zelldetritus umgeben. Gelegentlich vorkommende ganz vereinzelte Zellen dazwischen können an dem Gesamteindruck, daß die Kultur abgestorben ist, nicht viel ändern (Schädigungsgrad III).

1. *Zellgebundene Heterocytotoxine*. Die Gewebe zweier Ratten, die mit nativem Kaninchenserum, und von 5 Meerschweinchen, die mit Kaninchenserumalaunpräcipitat und -organhomogenisat immunisiert worden waren, wurden mit normalem Kaninchenserum gezüchtet. Die Sera der Tiere, von denen die im folgenden beschriebenen Kulturen stammen, hatten an normalen Kulturen Schädigungen hervorgerufen (Tabelle 2, Versuchsserien 3 und 4).

Bei den Nieren- und Milzkulturen der Ratten wurde eine Verlängerung der Latenzzeit und eine Verzögerung der Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet (Tabelle 4, Versuchsserie 9). Ein breiter Detritushof wurde erst nach 7 Tagen von aussprießenden Zellen zögernd durchwandert (Schädigungsgrad II), während die Kontrollkulturen schon nach 3—4 Tagen ausgedehnte Wachstumszonen gebildet hatten.

Die Wirkung von normalem Kaninchenserum auf die Gewebe von Meerschweinchen, die gegen Kaninchen immunisiert worden waren, war sehr verschieden (Tabelle 4, Versuchsserien 10—14). Milzkulturen zeigten die Schädigungsgrade II und III, auch die Nierenepithelkulturen die Grade I—III. Das Ergebnis bei Lungengeweben war ungleichmäßig: von 2 Meerschweinchen wuchsen sie lebhaft und ohne Verzögerung (Versuchsserien 10 und 11). Die Gewebe eines anderen ebenso behandelten Tieres zeigten nach einer verlängerten Latenzzeit nur sehr langsames Wachstum (Versuchsserie 13, Schädigungsgrad II). Die Lungenkulturen von 2 weiteren Tieren waren im Wachstum total gehemmt (Versuchsserien 12 und 14, Schädigungsgrad III). Die Kontrollkulturen waren etwas verfettet, aber wuchsen mit normaler Geschwindigkeit und Zelldichte. Die Verfettung röhrt wahrscheinlich von einer schlechten Verträglichkeit des Kaninchenserums für Meerschweinchengewebe her.

2. *Zellgebundene Isocytotoxine*. In gleicher Weise wie die Gewebe der heterolog immunisierten Tiere wurden auch die der homolog immunisierten gezüchtet (Tabelle 5).

Die Nieren- und Milzkulturen eines Kaninchens, das mit homologem Serumalaunpräcipitat und Erythrocytenaufschwemmung behandelt war, wuchsen ohne Hemmung lebhaft aus (Tabelle 5, Versuchsserie 15). Das Serum dieses Tieres hatte Nierenormalgewebe leicht geschädigt (Tabelle 3, Versuchsserie 7).

An den ausgepflanzten Geweben von Kaninchen, bei denen Serumalaunpräcipitat und Organhomogenisat als Antigen gedient hatten, wurden starke Beeinträchtigungen beobachtet (Tabelle 5, Versuchsserien 16 bis 18). Das Serum war, wie schon berichtet, für normale Gewebe nicht

schädlich (Tabelle 3, Versuchsserie 8). Die Milzkulturen eines Tieres und die Lungen- und Nierenkulturen aller 3 Tiere waren stark gehemmt.

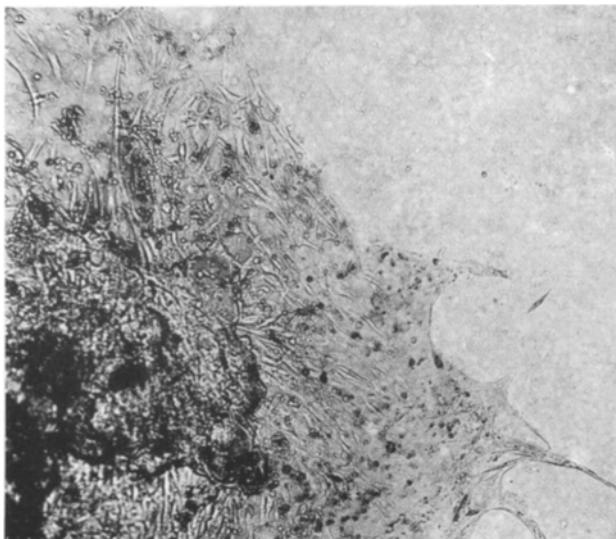


Abb. 3 a. Nierenkultur vom normalen Kaninchen mit normalem Kaninchenserum gezüchtet (Kontrolle zu Abb. 3b und c). Lebend photographiert, 60:1.

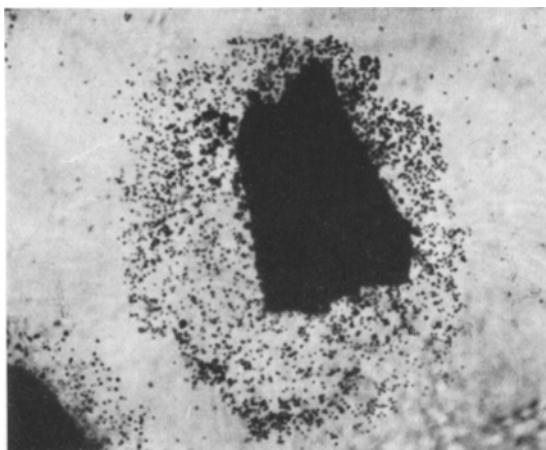


Abb. 3 b. Nierenkultur von homolog immunisierten Kaninchen mit normalem Kaninchenserum gezüchtet (Schädigungsgrad III). Lebend photographiert, 20:1.

Entweder proliferierten nur vereinzelte Makrophagen, Epithelzellen und Fibroblasten (Abb. 3 b, Schädigungsgrad III), oder es wanderten bei

Abwesenheit von Epithelzellen und Fibroblasten dichte Makrophagenhaufen aus, legten sich an das Mutterstück und streckten sich nach längerer Zeit (Abb. 3c, Schädigungsgrad III'). Die Kontrollkulturen zeigten dichte Epithel- oder Bindegewebszonen, die durch die Makrophagen nicht im Wachstum gehindert wurden (Abb. 3a). Diese waren nicht häufiger als gewöhnlich bei Nieren- und Milzkulturen und wanderten zum größten Teil an die Kulturränder und weiter ins freie Medium.

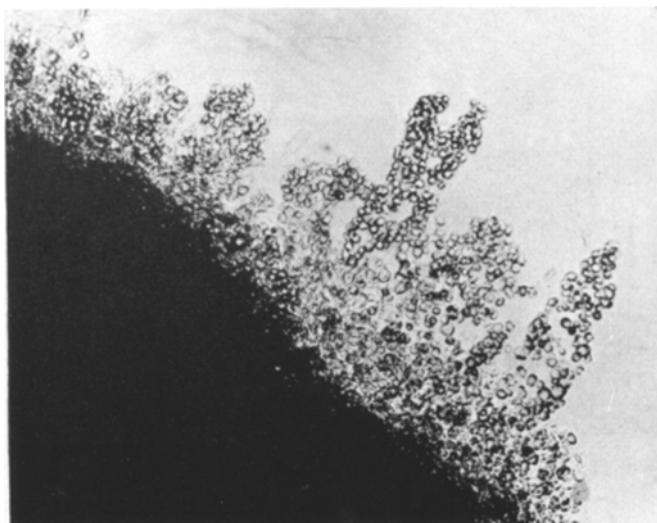


Abb. 3c. Nierenkultur von homolog immunisierten Kaninchen mit normalem Kaninchen-serum gezüchtet (Schädigungsgrad III'). Lebend photographiert, 85:1.

C. Diskussion.

Es sind schon häufig Versuche gemacht worden, mit Hilfe von Gewebekulturen zellschädigende Antikörper nachzuweisen, die im *Serum* von immunisierten Tieren enthalten sind. Dagegen sind unsere Versuche unseres Wissens die ersten, bei denen auch die *Gewebe* derselben immunisierten Tiere daraufhin untersucht wurden, ob in ihnen Antikörper fixiert sind. Besonders aufschlußreich scheint uns die Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Versuchsreihen (Tabelle 6). Es ergibt sich folgendes:

Bei heterologer Immunisierung hatte das *Serum* der immunisierten Tiere eine zellschädigende Wirkung. Von den untersuchten *Geweben* der gleichen Tiere enthielten immer Milz und Niere, oft auch Lunge Antikörper.

Anders liegen die Verhältnisse bei homologer Immunisierung. Bei 2 Versuchsreihen war offenbar noch keine nennenswerte Immunität

erzielt worden, denn das *Serum* erwies sich nur für eine Gewebeart als leicht toxisch, und die *Gewebe* der gleichen immunisierten Tiere waren frei von Antikörpern.

Bei einer anderen Versuchsserie war dagegen eine Immunisierung eingetreten: zwar waren die *Seren* frei von schädigenden Faktoren, doch enthielten viele der untersuchten *Gewebe* der gleichen Tiere Antikörper, und zwar immer Niere und Lunge und manchmal auch Milz.

Vergleicht man die Ergebnisse unserer heterologen mit unseren homologen Immunisierungsversuchen, so kann man sie zusammenfassend folgendermaßen gegenüberstellen: Bei heterologer Immunisierung fanden sich immer Immunkörper im Serum und meistens auch in den Geweben der immunisierten Tiere. Bei homologer Immunisierung enthielten die Seren fast nie, die Gewebe der immunisierten Tiere meistens Antikörper.

Aus diesen Ergebnissen kann man sich von dem Vorgang der Immunkörperbildung mit artgleichem Antigen folgende Vorstellung machen:

1. Werden Cytotoxine in den Geweben gebildet, so können sie in den Zellen selbst fixiert werden, ohne ins Serum zu gelangen.
2. Erfolgt eine Abgabe ins Serum, so könnten sie durch Bindung an artgleiche Faktoren unschädlich gemacht werden.
3. Die Antikörperproduktion bei Isocytotoxinen hat nicht ausgereicht, um einen Überschuß in das Blut gelangen zu lassen.

Die vorliegenden Versuche zeigen also, daß eine homologe Immunisierung möglich ist. Es ist zu vermuten, daß Abwandlungen im Immunisierungsverfahren weitere positive Ergebnisse bringen würden.

D. Zusammenfassung.

1. Es wurde untersucht, ob sich an Gewebekulturen als Testobjekt Hetero- und Isocytotoxine nachweisen lassen.
2. Dabei wurden von immunisierten Tieren in getrennten Versuchsröhren Serum und Organe auf Antikörper ausgetestet.
3. Wir fanden im *Serum* von Tieren, die heterolog immunisiert worden waren, je nach Tierart und Immunisierungsverfahren schwache oder starke Cytotoxine. Im Serum von Tieren, die homolog immunisiert worden waren, konnten wir keine oder schwach zellschädigende Antikörper nachweisen.

Die *Organe* heterolog immunisierter Tiere zeigten bei der Auspflanzung zuweilen keine, meistens aber schwache oder sogar starke Schädigung durch Antigen-Antikörperreaktion; bei den Organen homolog immunisierter Tiere war dasselbe der Fall.

Literatur.

¹ LÖWENTHAL: Zbl. Bakter., A **104**, 52 (1927). — ² LÖWENTHAL u. MICSCH: Arch. exper. Zellforsch. **10**, 150 (1930). — ³ LÖWENTHAL u. MEYER: Z. Immunforsch. **54**, 409, 420 (1928). — ⁴ RÖSSELE: Zur Lehre von den Zytotoxinen. Sitzgsber.

preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. **1938**, VI. — ⁵ LAMBERT and HANES: J. of Exper. Med. **13**, 505 (1911). — ⁶ LAMBERT and HANES: J. of Exper. Med. **14**, 453 (1911). — ⁷ HADDA u. ROSENTHAL: Z. Immun.forsch. **16**, 524 (1913). — ⁸ KIMURA: Z. Immun.forsch. **55**, 443 (1928). — ⁹ NIVEN: J. of Path. **34**, 307 (1931). — ¹⁰ LUMSDEN: Arch. exper. Zellforsch. **6**, 206 (1928). — ¹¹ LUMSDEN: Amer. J. Canc. **29**, 517 (1937). — ¹² LUMSDEN: Amer. J. Canc. **29**, 430 (1937). — ¹³ PHLEPS: Amer. J. Canc. **31**, 441 (1937). — ¹⁴ FISCHER, A.: Gewebezüchtung, S. 428. München 1930. — ¹⁵ KRUSIUS: Z. f. Immun.forsch. **5**, 699 (1910). Zit. nach DOERR 1947. — ¹⁶ UHLENHUTH u. HAENDEL: Z. Immun.forsch. **4**, 761 (1910). Zit. nach R. DOERR, Antikörper, Bd. I. Wien 1947. — ¹⁷ ANDREJEW: Arb. ksl. Gesdh.amt **30** (1909). Zit. nach DOERR 1947. — ¹⁸ KAPSENBERG: Z. Immun.forsch. **15**, 518 (1912). — Zit. nach DOERR 1947. — ¹⁹ BRUYNOGHE: C. r. Soc. Biol. Paris **118**, 1260 (1935). Zit. nach DOERR 1947. — ²⁰ LEWIS: J. Amer. Med. Assoc. **1937**, 1336. Zit. nach DOERR 1947. — ²¹ PICARDO et ROTTER: C. r. Soc. Biol. Paris **127**, 1096 (1938). Zit. nach DOERR 1947. — ²² SCHILLER: C. r. Soc. Biol. Paris **79**, 562 (1926). Zit. nach DOERR 1947. — ²³ CUMLEY and IRVIN: J. of Immun. **46**, 63 (1943). Zit. nach DOERR 1947. — ²⁴ LANDSTEINER: Rev. Edit. Harvard Univ. Press 1945. Zit. nach DOERR 1947. — ²⁵ HEIDELBERGER and KENDALL: J. of Exper. Med. **62**, 697 (1935). — ²⁶ GLENNY, POPE and WEDDINGTON: J. of Path. **29**, 38 (1926). — ²⁷ PRIGGE: Zbl. Bakter. **145**, 241 (1940). — ²⁸ MALMGREN and BENNISON: J. Nat. Canc. Inst. **11**, 301 (1950). — ²⁹ HOGEBOOM, SCHNEIDER and PALLADE: J. of Biol. Chem. **172**, 619 (1948). — ³⁰ HOGEBOOM, SCHNEIDER and PALLADE: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **65**, 320 (1947). — ³¹ SCHNEIDER and HOGEBOOM: Cancer Res. **2**, 1 (1951). — ³² KNAKE, E.: Dtsch. Z. Chir. **242**, 655 (1934). — Virchows Arch. **306**, 88 (1940). — ³³ CARREL and EBELING: J. of Exper. Med. **36**, 365 (1922). — ³⁴ BAKER: J. of Exper. Med. **58**, 575 (1933). — ³⁵ MÖLLENDORFF, M. v.: Z. Zellforsch. **12**, 559 (1931). — ³⁶ MÖLLENDORFF, M. v.: Verh. der Anat. Ges., aus Anat. Anz. **61**, 43 (1926).

Dipl. biol. Dr. BRIGITTE JAHN, Berlin-Dahlem, Institut für Gewebeforschung der Deutschen Forschungshochschule, Garystr. 9.