

Aus dem Pathologisch-Bakteriologisch-Serologischen Institut der Städtischen  
Krankenanstalten Karlsruhe (Vorstand: Prof. Dr. BÖHMIG).

## Über den Einfluß des Blutserums auf die Gewebsatmung.

Von

GERHARD VOGEL.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Mai 1954.)

Die zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre, die dem Studium des Infarkts und der Vorgänge am Transplantat gewidmet waren, lassen erkennen, daß das Gewebe unter verschiedenen Milieubedingungen ganz differente Grade und Formen der Schädigung erleidet. Alle Autoren sind sich darin einig, daß die morphologisch faßbaren nekrobiotischen Veränderungen am Infarkt bzw. Transplantat weitgehend von der Einwirkung der umgebenden Blutflüssigkeit abhängen. In der Deutung der gewonnenen Ergebnisse stehen jedoch bei den einzelnen Untersuchern sich zwei pathogenetische Prinzipien einander gegenüber, das der Dyshorie und das der Anoxämie. So bezogen LETTERER, TERBRÜGGEN u. a. die erstmals bei Homoioimplantaten beobachteten regressiven Vorgänge auf den krankhaften Durchtritt von Blutflüssigkeit durch die Blutgewebsschranke und eine hierdurch verursachte Schädigung des lebenden Gewebes. TERBRÜGGEN beispielsweise ließ Kaninchenserum auf homologe Organe einwirken und stellte ein sehr unterschiedliches Verhalten zwischen den in frischem und den in inaktiviertem Serum suspendierten Gewebsstücken fest. Die Tatsache, daß durch natives Serum an verschiedenen Organen eine schnelle Coagulationsnekrose zu erzeugen war, die in inaktiviertem Serum im wesentlichen unterblieb, außerdem Parenchym und Gefäßbindegewebe verschieden reagierten, deutete seiner Meinung nach darauf hin, daß durch die Blutflüssigkeit nicht nur die intracellulären Fermente aktiviert werden, sondern daß dem nativen Serum bzw. einem thermolabilen Serumbestandteil auch eine „giftige“ Wirkung zukommt. GUILLERY hingegen glaubt, daß alle katabiotischen Vorgänge am Transplantat anoxämischer Natur sind und spricht den Blutbestandteilen die Fähigkeit ab, lebende Zellen zu schädigen. Wie LÖBBERT und HEIM vermutet er, daß die Heterolyse an nicht mehr intaktem oder gar schon totem Gewebe abläuft. Die Interpretation der vielen Untersuchungsergebnisse ist insofern erschwert, als der Begriff Nekrose in letzter Zeit sehr wandelbar geworden ist und die alte Terminologie nur noch bedingt anwendbar erscheint. Die Kardinalfrage, ob normales Blutplasma jenseits des

Blutgefäßes in der Lage ist, vollgesunde Zellen zu schädigen, blieb auch darum noch offen, weil bei den bisherigen Modellversuchen unter Verzicht auf die natürlichen Korrelationen mit einer unbiologischen Materie operiert wurde. Ein Überblick über die Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Stoffwechsellpathologie zeigt mit großer Deutlichkeit, daß der Morphologie in der Erkennung des dynamischen Geschehens Grenzen gesetzt sind und daß es unmöglich ist, mit einer auf das Gestaltliche ausgerichteten Betrachtungsweise das Problem der Katabiose der Klärung näherzubringen.

Wir haben uns zur Aufgabe gemacht, an Stoffwechseluntersuchungen aufzuzeigen, welchen Einfluß das Blutserum auf die Lebensäußerungen des Gewebes hat. Es sollte zunächst festgestellt werden, ob und inwieweit die Atmung eines bestimmten Organs, gemessen an seinem Sauerstoffverbrauch, sich unter der Einwirkung homologen, jedoch unterschiedlich beschaffenen Serums ändert. Insbesondere galt es nachzuprüfen, ob dem nativen Serum wirklich eine primär schädigende Wirkung auf lebendes Gewebe zuzuschreiben ist.

### Methodik.

1. *Messung der Gewebsatmung.* Der  $O_2$ -Verbrauch wurde nach der direkten Methode von WARBURG bestimmt. Es wurden folgende Standardbedingungen eingehalten: Versuchsdauer 4 Std; Temperatur  $37,6^\circ C$ ; Temperatursgleichungsperiode 20 min; Gasphase  $O_2$ ; Gesamtflüssigkeitsvolumen der benutzten Gefäße 20 bzw. 40 ml;  $KO_2 \sim 1,6$  bzw.  $\sim 3,1$ ; der Hauptraum war mit 1,8 bzw. 3,6 ml Suspensionsflüssigkeit und den Gewebsschnitten, der Ansatz mit 0,2 bzw. 0,4 ml 10% Kalilauge beschickt. Ablesen alle 15 min; Schüttelgeschwindigkeit 105/min. Je Gefäß wurde die Atmung von 3—4 Schnitten gemessen, entsprechend 50 bis 90 mg Frischgewebe bzw. 10—15 mg Trockengewicht. Das am Versuchsende ermittelte Trockengewicht wurde der Berechnung des  $Q_{O_2}$  zugrunde gelegt.

2. *Herstellung der Gewebsschnitte.* Versuchstiere waren jüngere, meist männliche Meerschweinchen ohne besondere Vorbehandlung. Die Leber des durch Nackenschlag getöteten und gut ausgebluteten Tieres wurde rasch herauspräpariert, mit eiskühlem destilliertem Wasser abgespült und nach Abtrocknen mit Filterpapier sofort in ein eiskühles Becherglas gebracht. Nach kurzem Abkühlen ( $\sim 5$  min) wurden aus dem rechten Leberlappen mehrere Gewebsschnitte von etwa  $1\text{ cm}^3$  Größe entnommen und zur Herstellung der Schnitte nach der Methode von DEUTSCH verwendet. Die Schnittdicke betrug 0,2—0,3 mm. Während der Vorbereitung der Gewebsschnitte wurde durch Dekapitation weiterer Tiere die für das jeweilige Experiment (Versuchsserie zu 8 Manometern) benötigte Menge Blut gewonnen und hieraus nach Zentrifugieren das Serum abpipettiert. Die weitere Verarbeitung der Gewebsschnitte und des Serums erfolgte je nach Versuchsanordnung.

3. *Medium.* In systematischen Untersuchungen haben AEBI, FRUNDER u. a. die Bedeutung der Kationenzusammensetzung für die Gewebsatmung herausgestellt und betont, daß im Experiment nicht eine möglichst naturgetreue Kopie des Ionenmilieus des Serums zu erstreben ist, sondern diejenige Elektrolytrelation, welche eine optimale und konstante Atmungsgröße gewährleistet, sowie die Quellung und die Verarmung an N-haltigen Substanzen hintanhält. Denn es hat sich gezeigt, daß schon bei kurzen Versuchszeiten eine Suspensionsflüssigkeit aus Serum

oder gleichwertigen Ersatzstoffen unphysiologisch werden kann, da sie sich nicht wie in vivo den veränderten Bedürfnissen des Gewebes anzupassen vermag. Besonders bewährten sich Medien, welche reich an Kalium waren und eine gesteigerte  $\text{PO}_4$ -Konzentration aufwiesen. Wir haben in Vorversuchen verschiedene Suspensionsflüssigkeiten geprüft und in ihrer Wirkung auf die Gewebsatmung insbesondere das Krebs-Ringer-Medium mit einer kaliumreichen Lösung verglichen. Es zeigten sich bei Verwendung dieser Suspensionsflüssigkeit höhere und gleichmäßigere Atemwerte als beim Krebs-Ringer. Daher benutzten wir, den Anregungen FRUNDERS folgend, bei allen Experimenten zur Schnittvorbereitung (Aufbewahrung des Gewebsschnittes bis zum Einbringen in das Atemgefäß) und zu Vergleichsuntersuchungen ein Medium folgender Zusammensetzung: 0,1622 m NaCl; 0,0120 m KCl; 0,0006 m  $\text{CaCl}_2$ ; 0,0005 m  $\text{MgSO}_4$ ; 0,0300 m Na-K-Phosphatpuffer von  $\text{pH}$  7,4.

Da bei Blutzuckerbestimmungen an frisch gewonnenen Meerschweinchenseren Durchschnittswerte von nur 60—70 mg-% festgestellt wurden, erhöhten wir durch Einkippen entsprechender Mengen von Glucose unmittelbar vor Versuchsbeginn die Konzentration des Serums auf 150 mg-%.

Auch beim sorgfältigsten Arbeiten lassen sich mitunter bakterielle Verunreinigungen nicht verhindern; diese machen vornehmlich bei langfristiger Schnittpvorbereitung eine Auswertung des ermittelten Quotienten illusorisch. Nachdem wir anfänglich öfters derartige Komplikationen erlebt hatten, begannen wir in solchen Fällen die Keime zu züchten und bestimmten ihre Empfindlichkeit gegenüber antibiotischen Substanzen. Da an Hand umfangreicher Vorversuche bewiesen werden konnte, daß durch einen Zusatz von 20  $\gamma$  Terramycin hydrochloride (PFIZER) je Kubikzentimeter des Mediums eine Keimvermehrung auch unter den ungünstigsten Versuchsbedingungen zu verhindern ist und daß selbst eine doppelt so hohe Konzentration des Antibiotieums (40  $\gamma/\text{cm}^3$ ) weder Atmungsgröße ( $\text{QO}_2$ ) noch Atmungskonstanz des Lebergewebes beeinträchtigt, ja sogar geringfügig erhöht (durchschnittlich um 1,67%), haben wir in den folgenden Versuchsanordnungen der Suspensionsflüssigkeit stets Terramycin zugesetzt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichten wir auf die eingehende Beschreibung der mehreren hundert Einzelversuche und beschränken uns auf eine zusammenfassende Darstellung.

### V Versuchsergebnisse.

#### *I. Die Wirkung frischen Serums auf frisches Gewebe.*

Zur Verwendung gelangte frisches Serum, welches von unmittelbar vor dem Versuch getöteten Tieren gewonnen, teils unverändert blieb, teils durch Erwärmung im Wasserbad (30 min bei 56° C) inaktiviert wurde. Wir suspendierten die ebenfalls frisch hergestellten Gewebsschnitte bis zur Beschickung der also entweder natives oder inaktivierte Serum enthaltenden Warburg-Gefäße in eisgekühltem,  $\text{O}_2$ -gesättigtem Ca-reichem Medium. Die Zeitspanne zwischen Töten der Tiere und Einfüllen von Serum bzw. Schnitten betrug etwa 30 min. In jeder Versuchsserie liefen Kontrollen mit (Gewebschnitte in Ca-reichem Medium, Serum ohne Schnitte).

Wie die Atemkurve (Abb. 1) zeigt, bleibt über die ganze Versuchsperiode der  $\text{QO}_2$  (Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimeter je Milligramm Trockengewicht je Stunde) für alle Suspensionsflüssigkeiten weitgehend

konstant. Im Ca-reichen Medium (CM) beispielsweise — die Werte wurden in Vorversuchen und Kontrollmessungen ermittelt — verhält sich die Atmung auch über Stunden ganz gleichförmig;  $Q_{O_2}$  schwankt zwischen 3,59, 3,64, 3,56 und 3,88. In Serum hingegen registriert man im Verlauf des Versuchs eine geringe Reduktion des  $O_2$ -Verbrauches: sie ist im nativen Serum durchweg stärker und gleichmäßiger als bei Suspension im inaktivierten Serum. Hier hält sich die Kurve zunächst recht konstant, um erst in der 4. Std deutlicher abzufallen. Ein wesentlicher Unterschied in der Atmungsgröße macht sich nur zwischen dem CM und dem Serum bemerkbar. Der  $Q_{O_2}$  bei Serum (nativ + inaktiv) liegt mit 6,45—5,69—5,75—

5,37 wesentlich (um 59,27%) über dem  $Q_{O_2}$  bei Verwendung des „Ersatz“-mediums. Die Differenz im Sauerstoffverbrauch zwischen nativem und inaktiviertem Serum ist anfänglich ganz gering, nimmt indes, da die Atemkurven divergieren, allmählich zu. Die Atemwerte für inaktiviertes Serum sind etwas höher als die

für natives, im Mittel um 12,47%, in den ersten 2 Std um 2,68%. Wenn man sich die Variabilität der Atemgröße auch unter Standardbedingungen vergegenwärtigt (lic. AEBI), so sind Differenzen dieser Größenordnung — es handelt sich um Mittelwerte aus 30 Versuchsreihen — als äußerst geringfügig zu bezeichnen.

Frisches Lebergewebe zeigt also in frisch gewonnenem Serum eine relativ hohe und gleichbleibende Atmung. Ein stoffwechselmäßig faßbarer Wirkungsunterschied zwischen nativem und inaktiviertem Serum ist nicht festzustellen.

## II. Die Wirkung alten Serums auf frisches Gewebe.

Als Suspensionsmedien zur Messung der Gewebsatmung dienten Seren unterschiedlichen Alters, die teils nativ bleibend, teils unmittelbar nach ihrer Gewinnung inaktiviert, bis zum Versuch im Kühlschrank konserviert wurden. Die jeweils frisch hergestellten und bis zum Einfüllen in die Atemgefäße in  $O_2$ -durchströmtem CM aufbewahrten Schnitte gelangten somit erst zum Versuch mit den Seren in Berührung. Es wurden Seren geprüft, die 3—144 Std alt waren. In dieser wie in den folgenden Serien führten wir gleichartige Kontrollen wie bei I. durch.

Bei der Auswertung der zahlreichen Messungen zeigt sich insofern eine Gesetzmäßigkeit, als mit zunehmendem Alter des Serums die

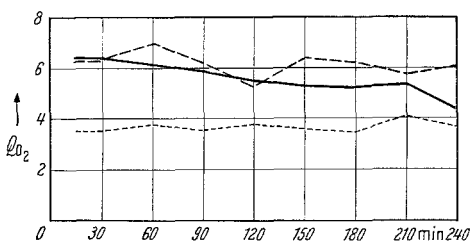


Abb. 1. Atmung frischen Gewebes in frischem Serum. Ausgezogene Linie: Nativserum; gestrichelte Linie: Inaktiviertes Serum; gepunktete Linie: Ca-reiches Ringer-Medium.

Atemgröße ( $Q_{O_2}$ ) abnimmt und die Kurve flacher verläuft. Der Kürze halber werden nur die Atemwerte für 3 Seren graphisch dargestellt (Abb. 2), nämlich die bei Benützung eines Serums mittleren Alters (24 Std) und die für beide Extreme (3 Std und 144 Std). Die Medien der anderen Altersstufen weisen keine Besonderheiten auf. Beim 3-Std-Serum entspricht die absolute Atemgröße und die Abnahme des  $Q_{O_2}$  während des Versuches weitgehend der des Frischserums, die Kurve für Nativserum verläuft wiederum gleichmäßig abfallend, ziemlich gradlinig, die bei Anwendung inaktivierten Serums nahezu horizontal. Gleichartige Beziehungen zwischen dem  $Q_{O_2}$  für natives und für

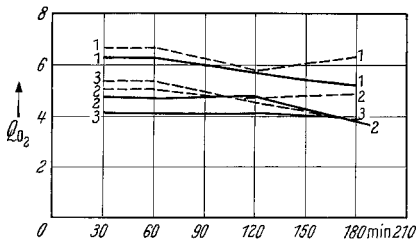


Abb. 2. Atmung frischen Gewebes in Serum unterschiedlichen Alters. 1 3 Std altes Serum; 2 24 Std altes Serum; 3 144 Std altes Serum. Weiteres s. Abb. 1.

inaktiviertes Serum bestehen auch bei der Suspension in 24 Std altem Medium; nur liegen hier die absoluten Werte des  $Q_{O_2}$  wesentlich niedriger, aber immer noch um 27% über dem des CM. Lediglich beim 144-Std-Serum findet man im Kurvenbild für aktives und inaktiviertes Serum geringe Abweichungen: im nativen Serum bleibt der  $Q_{O_2}$  ganz konstant, im inaktivierten macht sich eine erhebliche, gleichmäßige Reduktion

während des Versuches bemerkbar. Die Atemgröße (aktiv + inaktiviertes Serum) ist jedoch noch um 19,7% höher als bei Verwendung des CM. Besonders eindrucksvoll ist die Tatsache, daß bei Seren aller Altersstufen des  $Q_{O_2}$  für inaktiviertes Serum immer um 10,6–12,9% über dem für natives liegt und daß die Atmungsminderung während des Experimentes im nativen Medium stets doppelt so groß ist wie im inaktivierten.

In einer weiteren Versuchsanordnung prüften wir die Atemgröße frischen Lebergewebes in einem nativen Milieu, welches frisches und 144 Std altes Serum in verschiedenem Mischungsverhältnis enthielt.

Wie erwartet, ist hier die Atemgröße des Gewebes direkt proportional dem prozentualen Anteil des Suspensionsmediums an frischem Serum. Die Quotienten für nur frisches bzw. nur altes Serum erreichten die gleiche Höhe wie bei den früheren Versuchen, der gemessene Sauerstoffverbrauch in den Gemischen entspricht fast genau dem jeweils auf Grund der Milieuzusammensetzung erwarteten Wert. Die Abflachung der Kurve geht wiederum parallel mit der Reduktion der Atemgröße.

Der  $O_2$ -Verbrauch frischen Lebergewebes läßt folglich insofern eine Abhängigkeit vom Alter des als Suspensionsflüssigkeit verwendeten Serums erkennen, als die Atemgröße mit dem höheren Alter des Mediums

abnimmt, wobei natives und inaktiviertes Serum sich gleichsinnig verhalten und auch hier zwischen beiden nur eine ganz geringfügige Differenz nachzuweisen ist.

### *III. Die Folgen der Milieuänderung unter dem Versuch.*

Es wurde bei dieser Versuchsanordnung der  $O_2$ -Verbrauch frisch hergestellter Schnitte in Atemgefäßen gemessen, deren Hauptraum kurz zuvor gewonnenes Nativserum und das Gewebe enthielt und in deren seitlichem Anhang sich 0,2—0,4 cm<sup>3</sup> eines Serums unterschiedlichen Alters befand; dieses hatte teils nativ, teils sofort nach seiner Entnahme inaktiviert, bis zu Beginn des Experiments im Kühlschrank gelagert. Die Seren waren 24—336 Std (1—14 Tage) alt und wurden stets 45 min nach dem ersten Ablesen eingekippt.

Während die Atemkurve durch den interkurrenten Zusatz von frischem inaktiviertem Serum im Vergleich mit nativem nicht beeinflusst wird — der  $Q_{O_2}$  nimmt langsam und gleichförmig bis zum Versuchsende um 15% ab —, verursacht die Beimischung der anderen Flüssigkeiten trotz ihrer relativ geringen Menge (10% des Gesamtflüssigkeitsvolumens  $V_F$ ) eine teilweise erhebliche Irritation der Gewebsatmung. Aus der Einwirkung des aktiven Serums resultiert ein etwas anderer Kurvenverlauf als aus der des inaktivierten. Wird natives Serum zugekippt, so steigt der Sauerstoffverbrauch zunächst stark an, erreicht Werte, die weit über dem Durchschnittsverbrauch für Frischgewebe liegen, um dann rasch linear abzusinken. Je älter das Serum ist, desto kräftiger die initiale Atemsteigerung (bis 23% über dem  $Q_{O_2}$  des Versuchsbeginns) und desto beträchtlicher die nachfolgende Minderung (Endwerte bis 63% unter dem Anfangsquotient). Nach Beifügung inaktivierten Serums nimmt die zuvor ziemlich konstante Gewebsatmung im weiteren Verlauf des Versuches kontinuierlich ab, wobei die Größe des Neigungswinkels der Atemkurve dem Alter des Serums proportional ist.

### *IV. Die Abhängigkeit der Gewebsatmung von der Schnittvorbehandlung.*

Nachdem in den bisherigen Untersuchungen stets Stoffwechselvorgänge an frischem Gewebe in verschiedenen beschaffenen Seren geprüft worden waren, modifizierten wir in den nunmehr zu beschreibenden Experimenten auch die Bedingungen, unter denen das Gewebe bis zum Versuchsbeginn gehalten wurde.

A. Wir legten die jeweils frisch bereiteten Gewebsschnitte zunächst für 15, 24 oder 42 Std in Serum ein, welches zugleich mit den Schnitten gewonnen, wiederum teils nativ blieb, teils vor dem Einlegen der Leberstückchen inaktiviert wurde. Für die Dauer der Vorbehandlung lagerten Serum plus Gewebe in luftdicht verschlossenen Zentrifugengläsern bei 0° C im Kühlschrank. Bei einer Versuchsreihe

benützten wir als Suspensionsmilieu für eine 24stündige Vorbehandlung ein bereits 12 Std altes Serum; in diesem Fall war somit das Serum bei Beginn des eigentlichen Versuchs 36 Std alt. Zur Atmungsmessung wurden die derart vorbereiteten Schnitte in verschiedene Medien verbracht. Die zuvor in inaktiviertem Serum suspendierten nunmehr in frisches Nativserum, in frisches, sofort inaktiviertes Serum, in inaktiviertes Serum gleichen Alters (15, 24, 36 oder 42 Std) wie das Vorbehandlungsmedium; einige Schnitte übertrugen wir mit ihrer bisherigen Suspensionsflüssigkeit in das Atmungsgefäß. Die in Nativserum präparierten Schnitte gelangten nun entsprechend in frisches Nativserum, in frisches, sofort

inaktiviertes Serum, in gleichaltriges Nativserum oder wurden mit dem Vorbehandlungsmedium umgefüllt.



Abb. 3. Abhängigkeit der Gewebsatmung von Art und Dauer der Schnittvorbehandlung. Ordinate:  $Q_{O_2}$  in Prozentsätzen, bezogen auf den  $O_2$ -Verbrauch im Ca-reichen Ringer-Medium ( $= \pm 0$ ). Abszisse: Vorbehandlungsdauer in Stunden. Ausgezogene Linie: Nativserum; gestrichelte Linie: Inaktiviertes Serum. 1 Atmung frischen Gewebes in frischem Serum aus Abb. 1 zum Vergleich. 2 Vorbehandlung bei  $0^\circ C$ . 3 Vorbehandlung bei  $37^\circ C$  in  $O_2$ -Atmosphäre. 4 Vorbehandlung bei  $37^\circ C$  unter Luftabschluß.

Generell gilt auch für diese Versuchsreihe, daß je länger die Vorbehandlungsperiode, desto geringer der  $O_2$ -Verbrauch und desto flacher die Atemkurve ist. Bei 15- und bei 24stündiger Vorbehandlung streuen die Atemkurven erheblich; eine Differenz zwischen dem  $Q_{O_2}$  bei Anwendung nativen und dem inaktivierten Serums in der präparativen Phase ist nicht wahrzunehmen. Bei 24stündiger (in 36 Std-Medium) und 42stündiger Vorbehandlung zeigen sich nur geringe Unterschiede in der Atmungsgröße, hier liegen die Werte für inaktiviertes Serum als Vorbereitungsmilieu nur etwas über denen für Nativserum.

Berechnet für die Vorbehandlungszeit beträgt der  $Q_{O_2}$  bei 15 Std durchschnittlich um 3,0, bei 24 Std um 2,4, bei 36 Std um 1,6 und bei 42 Std um 1,0. Für die Atmungsgröße und für den Kurvenverlauf hat die Beschaffenheit des als Suspensionsflüssigkeit im Atmungsgefäß verwendeten Milieus anscheinend keine Bedeutung. Es ist jedenfalls kein nennbarer Unterschied im  $O_2$ -Verbrauch in den einzelnen Medien festzustellen; trotz mehrfacher Wiederholung gleicher Versuchsanordnungen läßt sich aus den gemessenen kleinsten Differenzen eine Gesetzmäßigkeit nicht ableiten. Ausschlaggebend ist lediglich die Dauer der Vorbehandlung. Nur die Gewebsschnitte, die zur Stoffwechselmessung mit ihrem bisherigen Suspensionsmilieu in das Atemgefäß übertragen wur-

den, weisen in der ersten Stunde noch einen relativ hohen  $O_2$ -Verbrauch auf ( $Q^{O_2}$  um 5,4).

B. Vorbehandelt wurden frisch hergestellte Gewebsschnitte in frischgewonnenem, nativ bleibendem oder inaktiviertem Serum 1. unter Luftabschluß bei  $0^\circ C$  im Kühlschrank; 2. im Wasserbad bei  $37^\circ C$  in reiner  $O_2$ -Atmosphäre (kontinuierliche Sauerstoffdurchströmung des Serums) und 3. im Wasserbad bei  $37^\circ C$  unter Luftabschluß. Die Vorbehandlung dauerte  $1\frac{1}{2}$ , 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Std. Anschließend wurden die Gewebsschnitte sofort mit ihrem Suspensionsmedium in die Atmungsgefäße übertragen. Außerdem transferierten wir Schnitte, die bei  $0^\circ C$  präpariert worden waren, zum Versuch in Serum, welches leer die gleiche Zeitspanne bei  $37^\circ C$  unter Luftabschluß gelagert hatte, sowie Gewebe aus einem Vorbereitungsmilieu von  $37^\circ C$  anaerob in Serum, das bis zum Versuch bei  $0^\circ C$  konserviert worden war.

Da hier alle Atemkurven eine weitgehende Konstanz des  $O_2$ -Verbrauches über die ganze Meßperiode erkennen lassen, nur die Atmungsgröße unterschiedliche Werte zeigt und der Stoffwechselablauf bei der Suspension in den verschiedenen Seren dem des Gewebes in CM parallel geht, haben wir, um die Versuchsergebnisse anschaulicher darzustellen, das Mittel des  $Q_{O_2}$  aus jeder einzelnen Versuchsanordnung nicht in  $mm^3 O_2/mg/h$  ausgedrückt, sondern auf den  $Q_{O_2}$  des Gewebes in CM bezogen und in Prozentwerten notiert. Die in Abb. 3 eingezeichneten Kurven stellen also lediglich die Verbindungslinien der ermittelten Atmungsquotienten dar.

Die nunmehr angewandte Schnittvorbehandlung entspricht prinzipiell derjenigen, die TERBRÜGGEN bei seinen mit den Methoden der Morphologie durchgeführten Untersuchungen wählte. Das Ergebnis der Stoffwechselmessung läßt mit aller Deutlichkeit erkennen, daß ein Unterschied in der Atmungsgröße zwischen dem in nativem und dem in inaktiviertem Serum suspendierten Lebergewebe *nicht* besteht, und zwar trifft diese Feststellung für jede Form der Schnittpräparation zu. Bei einer Vorbehandlungszeit bis zu 18 Std in eisgekühltem Serum zeigt das Gewebe im Experiment einen noch 20% oberhalb des  $Q_{O_2}$  für CM liegenden  $O_2$ -Verbrauch, bei länger dauernder Vorbehandlung sinken die Atemwerte rasch ab. Schnitte, die im Wasserbad bei  $37^\circ C$  vorbehandelt wurden, weisen übereinstimmend — sowohl die in reiner  $O_2$ -Atmosphäre als auch die anaerob suspendierten — nach zunächst gleichförmiger Atemkurve bei einer Vorbehandlungszeit von 6 Std eine rapide Atmungsminderung auf. Auch nach längerer Präparationsperiode ist eine darüber hinausreichende Reduktion des Sauerstoffkonsums nicht zu erzielen. Lediglich bei Gewebe, welches unter reinem Sauerstoff und  $37^\circ C$  in inaktiviertem Serum vorbehandelt worden war, setzt die Atmungsminderung verzögert ein. Die zum Versuch in ein anderes Milieu übertragenen Schnitte gleichen in ihrem  $O_2$ -Verbrauch ganz denen, die im Vorbehandlungsmedium verbleibend der Stoffwechseluntersuchung unterworfen wurden. Auch hier ist für die Atmungsgröße nur die Art und Dauer der Präparation maßgebend.



### Diskussion.

Während anfänglich das von WARBURG modifizierte Verfahren der Gewebsstoffwechsellmessung als Methode der Wahl galt, hat es in den letzten Jahren nicht an Stimmen gefehlt, welche es für gänzlich ungeeignet hielten, auf die Gewebsschädigung bei der Schnittherstellung und beim Schütteln in der Apparatur sowie auf die Abhängigkeit der Sauerstoffzehrung von den Milieubedingungen hinwiesen, hierbei besonders die Quellungsfaktoren hervorhoben und Untersuchungsergebnisse zitierten, nach denen die  $O_2$ -Aktivität durchaus kein sicheres Maß der vitalen Aktivität (des Überlebens) eines Gewebes zu sein braucht (lic. FISCHER u. a.). Auf der anderen Seite wissen wir jedoch auf Grund systematischer Untersuchungen von DRUCKREY und AEBI, daß bei der Schnittherstellung als Schädigungsfolge lediglich eine initiale Irritation des Stoffwechsels beobachtet wird mit geringfügiger Vermehrung des  $O_2$ -Verbrauches und „Extrakohlensäure“bildung und daß nach Ermittlung des Milieuoptymums für das jeweilige Gewebe und nach Normierung der Versuchsbedingungen mit der WARBURGSchen Methode durchaus genaue und allgemein vergleichbare Stoffwechsellmessungen durchgeführt werden können, zumal wenn es wie bei unseren Experimenten nicht um die Feststellung absoluter Werte geht, sondern um vergleichende Messungen. Die Tatsache, daß wir bei Einhalten standardisierter Versuchsanordnungen immer gleiche und konstante Atemkurven erhielten und daß außerdem die Höhe des gemessenen  $O_2$ -Konsums quantitativ mit den in zahlreichen Untersuchungen anderer Autoren ermittelten Werten übereinstimmte, berechtigt uns auch ohne individuelle Nachprüfung der Vitalität zu der Annahme, daß wir stets unter biologischen Bedingungen, d. h. mit lebendem Gewebe operierten.

Wie schon eingangs betont, galt unser besonderes Interesse der Frage, ob bei der Einwirkung von Serum auf homologe Organe (Leber) ein Wirkungsunterschied zwischen nativem und inaktiviertem Serum feststellbar ist. Während TERBRÜGGEN auf Grund der in seinen Versuchen gefundenen recht differenten Strukturveränderungen im Serum einen thermolabilen, primär gewebsfeindlichen Körper vermutete, ist es uns mit den Methoden der Atmungsmessung nicht gelungen, ein unterschiedliches Verhalten lebenden Gewebes in nativem und inaktiviertem Serum nachzuweisen. In dem Bestreben, eine Erklärung für diesen Widerspruch zu finden, müssen wir auf Untersuchungen über den Infarkt und sein Wesen als Coagulationsnekrose zurückgreifen. Die von BAUER angestellten Modellversuche haben ergeben, daß nach Ausschaltung eines Gewebsteils aus der Ernährung zunächst eine Anstauung saurer Stoffwechselprodukte eintritt, daß dann aber infolge der alkalisierenden Wirkung der umspülenden Blutflüssigkeit die Autolyse gehemmt und durch heterolytische Vorgänge (Coagulationsnekrose)

abgelöst wird, wobei der weitere Gewebsabbau unter Mitwirkung von Fermenten vonstatten geht, die, teils intracellulär, durch Aktivierung beim Zelluntergang frei werden, teils aus dem eindringenden Serum stammen. Experimentelle Arbeiten GROLLS und seiner Schüler bestätigen, daß auch im sauren Milieu, also bei der postmortalen Autolyse, die regressiven Veränderungen am kadaverösen Gewebe sich ohne zusätzliche, von außen herangebrachte Fermente abspielen können, wenn nur eine optimale Wasserstoffionenkonzentration die zelleigenen Enzyme zur Wirkung kommen läßt.

Es sind dies jedoch alles Untersuchungen, die sich mit dem weiteren Schicksal toten oder absterbenden Gewebes beschäftigen; auch in den Experimenten TERBRÜGGENS dürfte nach der dargelegten Verfahrensweise die Wirkung des Serums auf lebendes Gewebe nicht nachprüfbar gewesen sein. Die Anwendung des WARBURGSchen Verfahrens hat es uns indes ermöglicht, sicher lebendes Gewebe mit Suspensionsflüssigkeiten unter Bedingungen zusammenzubringen, die eine fortlaufende Kontrolle seiner Lebensäußerungen erlauben und bei variabler Versuchsanordnung einen Vergleich der ermittelten Atmungsgrößen mit Standardwerten zulassen. Allerdings gelingt es auch bei dieser Form der Stoffwechsellmessung nicht, den direkten Kontakt der einzelnen Zelle mit dem Serum herzustellen und hieraus resultierende Vorgänge zu erfassen. Da auch die Verwendung von Gewebshomogenisaten wegen der damit verbundenen umfangreichen Zellschädigung und der hohen Fehlerbreite hierzu nicht geeignet ist, wird auch dieser Methodik die restlose Klärung grundlegender und bislang noch ungelöster Stoffwechselprobleme versagt bleiben.

Fassen wir das Ergebnis unserer Untersuchungen zusammen: Weder das in frischem noch das in unterschiedlich altem Serum suspendierte Lebergewebe läßt einen stoffwechselmäßig faßbaren prinzipiellen Unterschied zwischen dem nativen und dem inaktivierten Milieu erkennen. Auch die Änderung des Mediums während des Versuchs hat keine grundsätzliche Differenz der Atmungswerte zur Folge. Schnitte, die vor der Messung des  $O_2$ -Verbrauches einer vielfach modifizierten Vorbehandlung unterworfen wurden, zeigen anschließend ebenfalls keine nennenswerten, von der unterschiedlichen Beschaffung des Serums abhängigen Abweichungen. Wenn nun bei der Suspension in inaktiviertem Serum, besonders bei Verwendung älterer Medien, ein etwas höherer und gleichbleibender Stoffwechselquotient festgestellt wurde, so ist dieses Phänomen nicht auf einen Schutzeffekt dieses Milieus zurückzuführen, sondern auf die Tatsache, daß in der Blutflüssigkeit eiweißspaltende Fermente vorhanden sind, die natürlich bei der Inaktivierung zerstört werden, im nativ bleibendem Serum hingegen bei entsprechendem  $p_H$  ihre volle Wirksamkeit entfalten können. Selbst bei großer manueller

Geschicklichkeit wird bei der Schnittherstellung Gewebe geschädigt und außerdem bei längerer Vorbehandlung das Suspensionsmilieu trotz Beifügung geeigneter Substrate nicht optimal bleiben. Läßt sich trotzdem noch nach stundenlanger Einwirkung des Serums an den Gewebsschnitten ein relativ hoher und konstanter  $O_2$ -Verbrauch nachweisen, der erst unter extremen Versuchsbedingungen eine wesentliche Minderung erfährt, so ist uns dieses Verhalten ein Beweis dafür, daß frisches Serum keine primär gewebsschädigende Wirkung besitzt, daß das suspendierte Material unter den gegebenen Voraussetzungen erst interkurrent im allmählich (besonders wegen der Sauerstoffverarmung) unphysiologisch werdenden Serummilieu abstirbt und daß die sich anschließenden nekrolytischen Vorgänge wohl in 2 Phasen ablaufen. Hierbei ist den mit dem Serum herangebrachten Proteinaseen nicht die ihnen zugeschriebene überragende Bedeutung beizumessen; der weitere Abbau geschieht vorwiegend durch zelleigene, beim Gewebstod freiwerdende Fermente. Wie sollte man sich sonst die Tatsache erklären, daß bei Verwendung des bezüglich seines Fermentgehaltes vollwertigen Nativserums im Atmungsversuch praktisch die gleichen Reaktionen erfolgen wie im inaktivierten Medium. Da in einigen Versuchsreihen die Atmungsminderung bei Suspension in inaktiviertem Serum (Vorbehandlung bei  $37^{\circ}C$  in reiner  $O_2$ -Atmosphäre) verzögert einsetzt, sind möglicherweise unter besonderen Milieubedingungen (kein für das Wirkungsspektrum der intracellulären Fermente optimales  $p_H$ ) auch einmal die Fermente des Serums für die initiale Steuerung des nekrolytischen Prozesses verantwortlich. Vermuten wir doch mit LETTERER, daß die bei der Nekrolyse gemessenen  $p_H$ -Verschiebungen Ausdruck einer kontinuierlichen Änderung aller aktuellen Reaktionen in der Zelle sind und daß mit dem Wechsel des Säuregrades auch verschiedene Fermentgruppen wirksam werden. Bei den differenten Enzymspektren des Suspensionsmilieus und der Gewebsschnitte, sowie bei den vielfach variierten Versuchsbedingungen sind die geringfügigen Unterschiede zwischen den Atmungskurven für natives und für inaktiviertes Serum durchaus mit einer allmählichen Verschiebung des Potenzoptimums zwischen intra- und extracellulären Fermentsystemen zu erklären. Übereinstimmend mit MOEGEN, der in seinen Untersuchungen über Papainverdauung regelmäßig erst nach 6 Std morphologische Kennzeichen der Nekrose nachweisen konnte und BAUER, welcher die Bedeutung des Calciums für die Gerinnung nachprüfte und ebenfalls frühestens nach 6 Std einwandfreie regressive Veränderungen sah, fanden wir in eigenen, unter IV beschriebenen Versuchen nach kräftiger Atmung bis zur 3. Std eine rapide Minderung der  $O_2$ -Zehrung bei 6stündiger Vorbehandlung. Es erscheint uns dies als weiterer Beweis dafür, daß nichtlebendes Gewebe durch das Serum geschädigt, sondern daß in-

folge Anoxämie und ungenügender Abfuhr von Stoffwechselabfallprodukten lädierte Zellen fermentativ abgebaut werden.

Wenn TERBRÜGGEN an seinen relativ großen und dicken Organexplantaten nach 12—36stündigem Aufenthalt im Brutschrank morphologische Veränderungen beobachtete, die bei Suspension in Nativserum stark ausgeprägt waren, und zwar an Parenchymzellen mehr als an Bindegewebelementen und Capillarendothelien, bei Einbettung in inaktiviertem Serum indes sehr geringfügig erschienen, so berechtigt die Feststellung dieser Tatsache noch keineswegs dazu, einen prinzipiellen Wirkungsunterschied der Medien anzunehmen und daraus den Schluß zu ziehen, daß Nativserum lebendes Gewebe schädigt bzw. dem inaktivierten Serum eine erhaltende Wirkung zukommt. Der Beweis des Überlebens ist an den in inaktiviertem Milieu präparierten Organen nicht erbracht worden. Das nach der geschilderten Methode vorbehandelte, zweifellos anfänglich vitale Gewebe erlitt mit Sicherheit nach wenigen Stunden eine schwere anoxämische Schädigung und wurde in der Folgezeit durch Fermente abgebaut. Daß bei der alleinigen Einwirkung der zelleigenen Enzyme (Suspension in inaktiviertem Serum) Modus und Tempo der kadaverösen Veränderungen anders sind als bei gleichzeitiger oder zweiphasiger Reaktion extra- und intracellulärer Fermente (Suspension in Nativserum) und sich deswegen auch histologisch Abweichungen ergeben, liegt auf der Hand. Das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Zellkerne ist durch den verschiedenen Gehalt derselben an Fermenten bedingt. Es hat den Anschein, als ob bei der TERBRÜGGENschen Versuchsanordnung den Fermenten des Serums eine wesentlich größere Bedeutung zukäme als in unseren, mit den Methoden der Stoffwechsellmessung durchgeführten Untersuchungen. Da jedoch mit der einen Verfahrensweise eine im Augenblick der Fixierung gegebene Situation festgehalten, mit der anderen die Summe der aktuellen Lebensäußerungen erfaßt wird, ist es unmöglich, die Resultate beider Arbeiten in diesem Punkt miteinander zu vergleichen.

### Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung von Meerschweinchenserum auf homologes Gewebe (Leber) mit Hilfe von Stoffwechsellmessungen (Warburg-Methode) untersucht.

Wir prüften die Atmung frischen Gewebes in frischem und unterschiedlich altem Serum, ferner die Folgen der Milieuänderung während des Versuchs, außerdem die Abhängigkeit des  $O_2$ -Verbrauches von einer Vorbehandlung, bei der das Gewebe unter verschiedenen Temperatur- und Stoffwechselbedingungen gehalten wurde.

Dabei zeigte sich weder ein prinzipieller noch ein nennenswerter quantitativer Unterschied zwischen nativem Serum und Serum, welches zuvor  $\frac{1}{2}$  Std auf  $56^{\circ}$  C erhitzt (inaktiviert) worden war.

Die nach längerer Einwirkung des Serums beobachtete, in aktivem und inaktiviertem Milieu gleichsinnige Atmungsminderung ist Ausdruck der langsamen fermentativen Nekrolyse des anoxämisch geschädigten Gewebes.

Die geringen Differenzen der Atmungsgrößen für natives und inaktiviertes Serum sind Folge des Ausfalls der durch den Inaktivierungsvorgang zerstörten, im Serum vorhandenen Fermente.

### Literatur.

- AEBI, H.: Helvet. physiol. Acta 8, 525 (1950). — BAUER, J.: Frankf. Z. Path. 57, 122 (1943). — DRUCKREY, H.: Arch. exper. Zellforsch. 22, 587 (1939). — FISCHER, H.: Helvet. physiol. Acta 9, 416 (1951). — FRUNDER, H.: Hoppe-Seylers Z. 291, 182 (1952). — GROLL, H., u. G. MERKLE: Beitr. path. Anat. 92, 518 (1933/34). GUILLERY, H.: Frankf. Z. Path. 53, 522 (1939). — Virchows Arch. 304, 317, 336 (1939). — LETTERER, E.: In Naturforschung und Medizin in Deutschland, Bd. 70/I. Wiesbaden: Dieterich 1948. — LÖBBERT, O.: Virchows Arch. 304, 344 (1939). — MOEGEN, P.: Frankf. Z. Path. 54, 352 (1940). — RÖSSLE, R.: Zbl. Path. 83, 51 (1945). — TERBRÜGGEN, A.: Beitr. path. Anat. 98, 264 (1936).

Dr. GERHARD VOGEL, Städt. Krankenanstalten Karlsruhe.

---