

Der Einfluß von Cystein und Winterschlaf auf die Überlebensrate röntgenbestrahlter Siebenschläfer (*Glis glis*)

Von HANS A. KÜNKEL, GÜNTER HÖHNE und
HEINRICH MAASS

Aus der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. G. SCHUBERT)
(Z. Naturforschg. 12 b, 144—147 [1957]; eingegangen am 11. Oktober 1956)

Herrn Prof. Dr. H. Holthusen zum 70. Geburtstag gewidmet

Es wurde die Überlebensrate hibernierter Siebenschläfer nach Röntgen-Ganzbestrahlung geprüft. Hierbei zeigte sich, daß der Strahlenschaden während des Winterschlafs latent vorhanden ist, aber erst nach dem Erwachen der Tiere manifest wird. Appliziert man den Tieren zum Zeitpunkt des Aufwachens (21 Tage nach Bestrahlung) Cystein i. p., so zeigt sich hier überraschenderweise noch eine Schutzwirkung dieses SH-Körpers.

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit des lebenden Gewebes hat schon seit langem das Interesse der strahlenbiologischen Forschung in Anspruch genommen. Bereits in den 20iger Jahren konnte HOLTHUSEN¹ in seinen Untersuchungen an Askarideneiern eine deutliche Beeinflussung der biologischen Strahlenwirkung durch die Temperatur feststellen. Ganz allgemein ergibt sich aus dem bisher vorliegenden Untersuchungsmaterial², daß Temperaturänderungen in einem Bereich, in dem die Lebensfähigkeit der Zellen noch gewährleistet ist, auf die strahleninduzierte Schädigungsrate letztlich keinen entscheidenden Einfluß erkennen lassen. Allerdings zeigt sich in den meisten Fällen, daß bei Temperaturerniedrigung die Reaktion des Gewebes auf den Strahleninsult mit einer gewissen Verzögerung in Erscheinung tritt, so daß die mittlere Überlebenszeit entsprechend verlängert wird. Für das Studium des Wirkungsmechanismus der ionisierenden Strahlen wie auch der chemischen Strahlen-Schutzstoffe findet man nun in den winterschlafenden Säugetieren ein besonders geeignetes Versuchsobjekt.

Für die vorliegenden Untersuchungen verwandten wir den Siebenschläfer (*Glis glis*), eine Spezies, welche vorwiegend in Süd- und Mitteldeutschland vorkommt und sich bequem unter Laboratoriums-Bedingungen halten läßt. Allerdings gelingt eine Weiterzüchtung in der Gefangenschaft nicht, so daß man auf die Belieferung durch Tierfänger angewiesen ist. Insgesamt standen für unsere Versuche bislang 92 Siebenschläfer zur Verfügung.

Zunächst wurden in einer Serie an Tieren in wachem Zustand Ganzkörper-Bestrahlungen mit 700 r einer 200-kV-Röntgenbestrahlung (20m A; 0,5 mm Cu; Dosisleistung 85 r/Min.) durchgeführt. Die hierbei beobachtete Strahlenempfindlichkeit entsprach etwa der von uns in anderen Untersuchungen verwandten in gezüchteten Wistar-Ratten. Es starben innerhalb von 30 Tagen 83% der Tiere. In einer 2. Serie wurde den Tieren ebenfalls in wachem Zustand 10 Min. vor der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Bestrahlung intraperitoneal Cystein injiziert (500 mg/kg Körpergewicht). Alle so behandelten Tiere überlebten den Strahleninsult innerhalb von 30 Tagen. In einer 3. Serie, bei der das Cystein in der gleichen Konzentration 3 Min. nach der Bestrahlung appliziert wurde, war erwartungsgemäß kein Unterschied zu den lediglich bestrahlten Tieren zu erkennen. Es starben auch hier über 80% innerhalb von 30 Tagen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren an zahlreichen anderen Versuchssubjekten überein, die stets nur eine Schutzwirkung des Cysteins bei Applikation unmittelbar vor der Bestrahlung bestätigen, während es nach der Bestrahlung gegeben, keine signifikante Verminderung der Mortalitätsrate bewirkt.

Um nun auch Bestrahlungsversuche im Winterschlaf ausführen zu können, wurde ein Thermostat konstruiert, der die Haltung der Tiere bei einer konstanten Temperatur von +4° C erlaubt, welche sich als optimale Schlaftemperatur erwiesen hat.

Hierbei liegen die Siebenschläfer unter einer Plexiglasscheibe von 5 mm Dicke, so daß sie während des

¹ H. HOLTHUSEN, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 187, 1 [1921].

² Zusammenfassender Bericht bei H. M. PATT, Physiol. Rev. 33, 35 [1953].

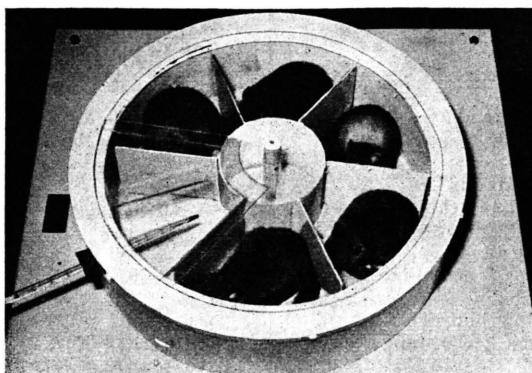


Abb. 1. Apparatur zur Bestrahlung während des Winterschlafs.

Schlafes innerhalb der Kühlapparatur bestrahlt werden können. Eine Störung der im Schlaf befindlichen Tiere durch Temperaturschwankungen, Geräusche oder besondere Manipulationen während der Bestrahlung konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden. Die Siebenschläfer fallen innerhalb weniger Tage, nachdem sie in die Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ gebracht worden sind, ohne jede medikamentöse Beeinflussung in einen relativ festen Winterschlaf. Die Tiere wurden nun während des Schlafes ebenfalls mit einer Dosis von 700 r bestrahlt und für weitere 21 Tage im Winterschlaf belassen. In dieser Zeit starb keines der Versuchstiere. Nach 21 Tagen wurden sie dann aus dem Thermostaten entnommen und in einen $+20^{\circ}\text{C}$ warmen Raum gebracht, wo sie innerhalb von etwa einer Stunde wach wurden. Erst einige Tage nach dem Aufwachen setzte dann die Strahlenkrankheit mit allen Symptomen ein, die wir von normalen Ganzkörper-Bestrahlungen her kennen. In dem Diagramm der Abb. 2 ist die Überlebensrate in Abhängigkeit von der Zeit nach der Bestrahlung aufgetragen. Die gestrichelte Linie zeigt die Schlafperiode an. Während dieser Zeit ist der

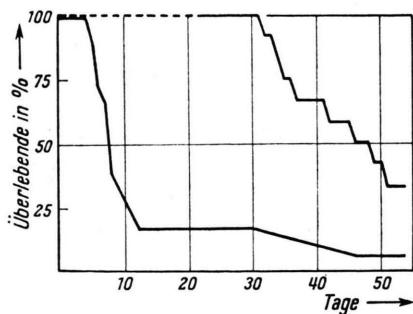


Abb. 2. Überlebensrate wach und schlafend bestrahlter Siebenschläfer.

Strahlenschaden also offensichtlich latent. Die Folgen des Strahleninsults zeigen sich erst nach dem Aufwachen, und die Absterbekurve verläuft dann analog dem Absterben der im wachen Zustand bestrahlten Tiere, als ob die Bestrahlung erst zum Zeitpunkt des Aufwachens stattgefunden hätte. Innerhalb von 51 (= 21 + 30) Tagen starben 67% der Tiere. Der Unterschied zwischen der Mortalität der im wachen Zustand und der im Winterschlaf bestrahlten Tiere liegt noch innerhalb der Streubreite des Versuchs. Eine etwaige Strahlen-Schutzwirkung des Winterschlafs ist statistisch nicht zu sichern.

Verabfolgte man den Siebenschläfern während des Winterschlafs 15 Min. vor der Bestrahlung Cystein (500 mg/kg Körpergewicht i. p.), so war ebenfalls eine 100-proz. Schutzwirkung zu beobachten. In einer letzten Serie wurde nun den im Winterschlaf bestrahlten Tieren nach 21 Tagen, und zwar unmittelbar, nachdem sie wieder auf Zimmertemperatur gebracht wurden, Cystein injiziert. Überraschenderweise zeigte sich hier, daß auch von diesen Tieren keines innerhalb von 30 Tagen starb.

Tab. 1 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse der 6 Versuchsreihen. Obwohl die Zahl der Versuchstiere in den einzelnen Reihen wegen der Schwierigkeit, genügende Mengen an Siebenschläfern zu bekommen, noch relativ klein ist, so reicht sie doch bereits aus, um die auffällige Schutzwirkung des 21 Tage nach Bestrahlung applizierten Cysteins gegenüber der reinen Winterschlaf-Bestrahlung statistisch zu sichern. Die Wahrscheinlichkeit, daß der Unterschied zwischen der Serie 4 mit einer 67-proz. Mortalität und der Serie 6 mit einer Absterberate von 0% durch eine zufällige Streuung der Ergebnisse bedingt ist, ist kleiner als 0,27 Prozent.

Das Ergebnis unserer Bestrahlungen im Winterschlaf entspricht den Befunden anderer Autoren an verschiedenen poikilothermen Versuchstieren, welche ebenfalls während der Schlafperiode eine Latenz des Strahlenschadens feststellen konnten, der erst nach dem Erwachen der Tiere manifest wurde. So konnten PATT u. Mitarbb.³ zeigen, daß mit letalen Dosen (bis zu 9000 r) bestrahlte Frösche ohne äußerlich erkennbare Schädigung bis zu 130 Tagen überleben, wenn sie bei einer Temperatur von 5 bis 6°C gehalten werden. Sobald die Tiere dann auf Zimmertemperatur gebracht werden, kommt das typische

³ H. M. PATT, M. N. SWIFT u. E. B. TYREE, Fed. Proc. 7, 90 [1948]; H. M. PATT u. M. N. SWIFT, Amer. J. Physiol. 155, 388 [1948].

Versuchsreihe	Zahl der Tiere	Behandlung	Mortalität [%]
1	18	Bestrahlung mit 700 r im Wachzustand ($T \sim + 20^\circ C$)	83 in 30 Tagen
2	10	Bestrahlung mit 700 r im Wachzustand ($T \sim + 20^\circ C$) 500 mg/kg Cystein i. p. 10 min vor Bestrahlung	0 in 30 Tagen
3	12	Bestrahlung mit 700 r im Wachzustand ($T \sim + 20^\circ C$). 500 mg/kg Cystein i. p. 3 min nach Bestrahlung	83 in 30 Tagen
4	21	Bestrahlung mit 700 r im Winterschlaf ($T \sim + 4^\circ C$). Nach 21 Tagen Aufwachen durch Erwärmung ($T \sim + 20^\circ C$).	67 in 51 (= 21 + 30) Tagen
5	5	Bestrahlung mit 700 r im Winterschlaf ($T \sim + 4^\circ C$). 500 mg/kg Cystein i. p. im Schlaf 15 min vor Bestrahlg. Nach 21 Tagen Aufwachen durch Erwärmung ($T \sim + 20^\circ C$)	0 in 51 (= 21 + 30) Tagen
6	15	Bestrahlung mit 700 r im Winterschlaf ($T \sim + 4^\circ C$). Nach 21 Tagen Aufwachen durch Erwärmung ($T \sim + 20^\circ C$). 500 mg/kg Cystein i. p. unmittelbar nach dem Einbringen in Zimmertemperatur.	0 in 51 (= 21 + 30) Tagen

Tab. 1. Abtötungsrate von Siebenschläfern nach Ganzkörper-Bestrahlung mit 200-kV-Röntgenstrahlen.

Strahlensyndrom zur Entwicklung und die endgültige Mortalität ist die gleiche wie bei Tieren, welche ständig in warmer Umgebung geblieben sind. Hieraus geht deutlich hervor, daß der primäre Strahlenschaden durch eine Temperaturänderung und die damit verbundene Änderung der Stoffwechselaktivität nicht beeinflußt wird und daß eine Erholung auch während einer längeren Periode reduzierten Stoffwechsels nicht eintritt. Das bestätigen auch die Versuche von DOULL u. Mitarbb.⁴ an winterschlafenden Erdhörnchen (*Citellus tridecemlineatus*), ferner von SMITH u. GRENNAN⁵ sowie BRACE⁶ an Murmeltieren. So konnte bei letzteren in hämatologischen Untersuchungen gezeigt werden, daß eine signifikante Änderung der Blutzusammensetzung durch die Bestrahlung während des Winterschlafs nicht erfolgt, sondern erst nach dem Erwachen der Tiere in Erscheinung tritt. Histologische Untersuchungen an verschiedenen Drüsen und Organen zeigten, daß eine strahleninduzierte Veränderung des Gewebes im allgemeinen erst nach Beendigung des Winterschlafs erkennbar wird. Lediglich an Zellen, die auch im

hibernierten Zustand der Tiere eine Teilungsaktivität zeigen, konnten gewisse strahleninduzierte Schädigungen verzeichnet werden. Allerdings sind diese Untersuchungen bislang nur an einem sehr kleinen Tiermaterial durchgeführt worden, so daß es lohnend erscheint, diese Ergebnisse auch an Siebenschläfern noch einmal zu überprüfen.

Eine Deutung des überraschenden Ergebnisses unserer Cysteinversuche, die eine Schutzwirkung des Cysteins noch 21 Tage nach Bestrahlung ergeben, erscheint im gegenwärtigen Zeitpunkt noch recht schwierig. Eine Wechselwirkung der SH-Gruppen der Cysteinmoleküle mit primär bei der Bestrahlung auftretenden Wasserradikalen kann wegen der kurzen Lebensdauer derselben nicht stattfinden. Ob nun die primär durch die Bestrahlung gesetzte Zellschädigung in biochemischen Prozessen zu suchen ist, welche bei tieferen Temperaturen, bei verminderter Stoffwechsel- und Zellteilungsaktivität noch als reversibel und damit durch Cystein beeinflußbar anzusehen sind, oder ob das Cystein aktiv in den Ablauf jener Reaktionsketten eingreift, welche zum

⁴ J. DOULL, D. F. PETERSEN u. K. P. DUBOIS, Fed. Proc. **11**, 340 [1952]; J. DOULL u. K. P. DUBOIS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **84**, 367 [1953].

⁵ F. SMITH u. M. M. GRENNAN, Science [Washington] **113**, 686 [1951]; Fed. Proc. **10**, 128 [1951].

⁶ K. C. BRACE, Science [Washington] **116**, 570 [1952]; VII. Internat. Kongr. f. Radiologie, Kopenhagen 1953.

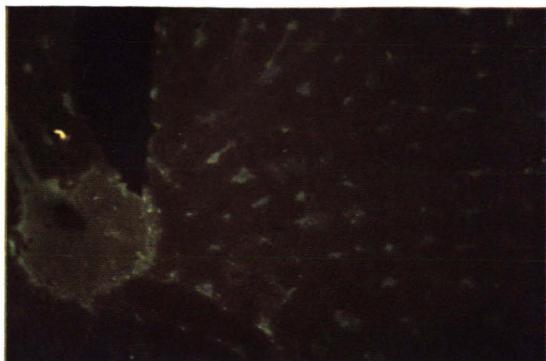


Abb. 1. Schnitt einer Rattenleber. Der Ratte wurde 30 Min. zuvor Humanalbumin intravenös injiziert. Vor der Tötung wurde das Tier mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült. Die fleckförmige Verteilung der Grün-Fluoreszenz entspricht den v. Kupfferschen Sternzellen. (Der Riß im Gewebeschnitt zeigt die Markierung des Präparates an.) Vergr. 170-fach.

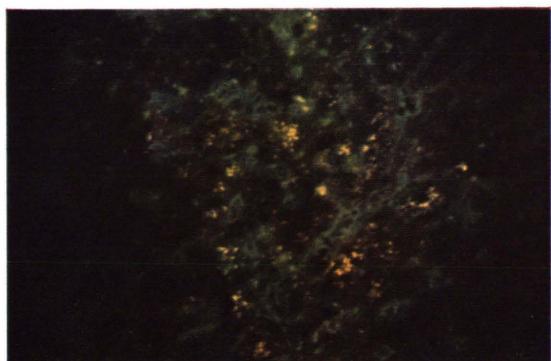


Abb. 2a. Nachweis von Humanalbumin in Schnitten von Menschenleber. Hier ebenfalls starke Grün-Fluoreszenz in den Lebersinusoiden und (in der Wiedergabe) kaum zu erkennen über den Leberzellbalken (vgl. Abb. 6a). Die gelb-rötliche Farbe stellt eine Eigenfluoreszenz des Gewebes dar (die Randpartien waren von der UV-Lampe schlecht ausgelichtet, weshalb sich hier auch keine Fluoreszenz darstellt). Vergr. 170-fach.

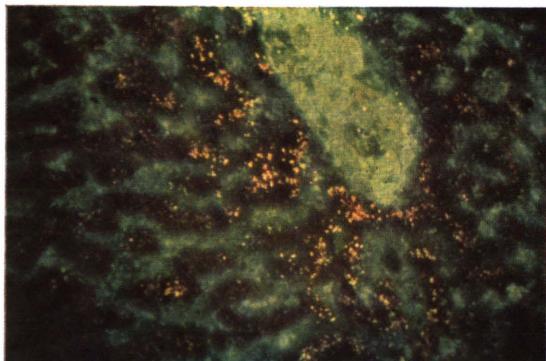


Abb. 3. Darstellung von menschlichem γ -Globulin in Schnitten von menschlicher Leber. Grün-Fluoreszenz nur in den Lebersinusoiden und in dem tangential getroffenen Gefäß. Die Leberzellbalken sind gänzlich ausgespart. Bei Vergleich mit dem H.-E. gefärbten Schnitt läßt sich nachweisen, daß die v. Kupfferschen Sternzellen ebenfalls im Bereich der Fluoreszenz liegen. Die gelb-rötliche Farbe stellt eine Eigenfluoreszenz im Bereich der Leberzellbalken dar. Vergr. 170-fach.

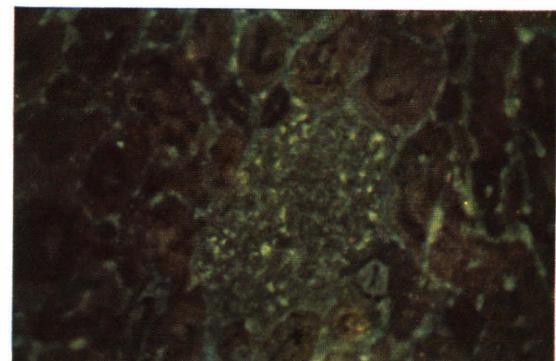


Abb. 4a. Schnitt einer Rattenniere. Nachweis von Rattenalbumin. Spezifische Grün-Fluoreszenz nur im Interstitium und über dem Glomerulum zu sehen. Bei Vergleich mit der H.-E.-Färbung desselben Schnittes (Abb. 4b) läßt sich zeigen, daß der Albumin-Nachweis nur in den vom Schnitt getroffenen Kapillaren, nicht dagegen in den Schlingen-Deckzellen möglich ist. (Besonders gut bei Projektion der farbigen Dia-positive an die Wand zu entscheiden.) Vergr. 300-fach.

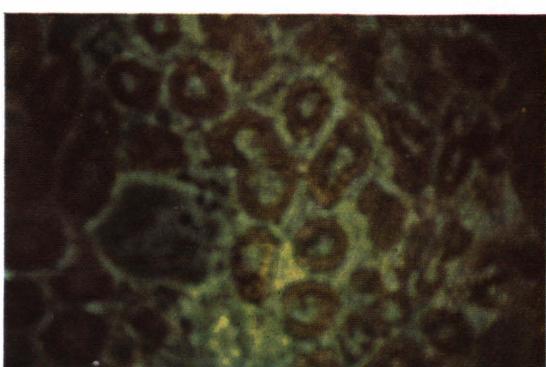


Abb. 5. Nachweis von Rattenalbumin in der Rattenniere. Die Tubuli sind quer getroffen. Die spezifische Grün-Fluoreszenz findet sich nur im Interstitium und im Tubuluslumen, nicht aber in den Epithelien der Tubuli.

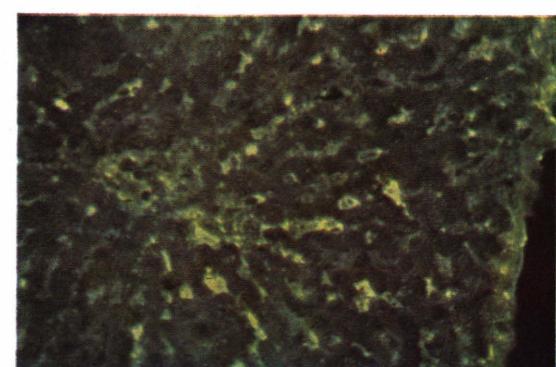


Abb. 6a. Nachweis von Rattenalbumin in Schnitten von Rattenleber. Starke Fluoreszenz in den Lebersinusoiden und Blutgefäßen, eben erkennbare über den Leberzellbalken; die Leberzellkerne sind ausgespart. Vergr. 170-fach.

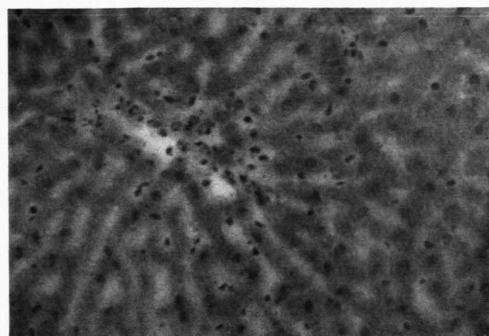


Abb. 2b. Haematoxylin-Eosin-Färbung des Schnittes der
Abb. 2a.

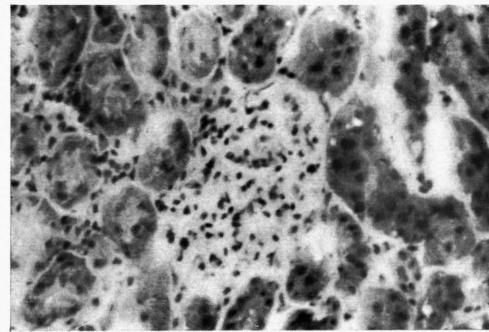


Abb. 4b. H.-E.-Färbung des Gewebeschnittes 4a.

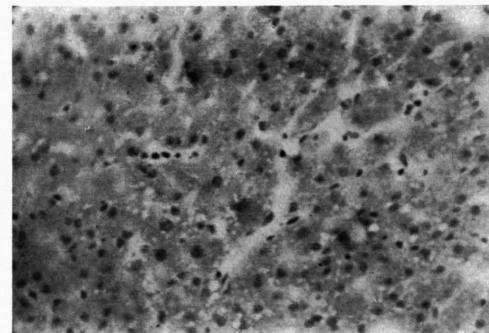


Abb. 6b. Derselbe histologische Schnitt wie in Abb. 6a nach
Haematoxylin-Eosin-Färbung. Vergr. 170-fach.

makroskopisch erkennbaren Zellschaden und schließlich zum Zelltod führen, ist bislang noch ungeklärt. Zumindest aber kann gesagt werden, daß die bisherigen Arbeitshypothesen über den Wirkungsmechanismus sulfhydrylhaltiger Schutzstoffe zur Deutung der vorliegenden Ergebnisse nicht herangezogen werden können.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Herrn Dr. LÖHRL von der Staatlichen Vogelschutzwarste Ludwigsburg sind wir für die wiederholte Beschaffung von Siebenschläfern zu besonderem Dank verpflichtet. Fräulein R. ANGER und Fräulein M. BARKOWSKY danken wir für ihre Mitarbeit bei den Versuchen.

Serum-Protein-Nachweis durch fluoreszierende Antikörper in Leber und Niere

Ein Beitrag zur vitalen Farbstoffspeicherung

Von JOSEF WOLLENSAK und GERHARD SEYBOLD

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. BENNHOLD)
(Z. Naturforschg. 12 b, 147—150 [1957]; eingegangen am 8. Juni 1956)

In vergleichenden Untersuchungen konnten in Lebern von Mensch, Ratte und Meerschweinchen in der Leberparenchymzelle nur Spuren von artspezifischem Albumin nachgewiesen werden. In den v. Kupffer'schen Sternzellen dagegen war wesentlich mehr Albumin enthalten. Niemals sahen wir Albumin in den Zellkernen.

Human- γ -Globulin war in der Menschenleber nur in den v. Kupffer'schen Sternzellen nachweisbar. Nach Verabreichung von Humanalbumin und Human- γ -Globulin an Ratten und Meerschweinchen wurden diese Proteine in der Leber im Protoplasma der v. Kupffer'schen Sternzellen gespeichert.

In den Schlingendeckzellen der Glomerula von Ratten- und Meerschweinchen-Nieren konnte keine Speicherung von homologem Albumin gefunden werden. Auch nach Verabreichung von Humanalbumin und Human- γ -Globulin konnten die heterologen Proteine als Antigene 10 bzw. 30 Min. nach i.v. Injektion in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. In den Tubuluszellen der Rattenniere findet sich trotz der physiologischen Proteinurie dieser Tiere kein Rattenalbumin.

Durch Vitalspeicherung von Trypanblau und Lithiumkarmin ändert sich bei Ratten und Meerschweinchen die Verteilung des homologen Serumalbumins der Leber nicht. Trypanblau selbst fluoresziert jedoch schon in Spuren rot-violett, während Lithiumkarmin selber nicht fluoresziert, andere Fluoreszenz aber löscht. Damit erfährt diese Aussage eine gewisse Einschränkung.

Unsere Untersuchungen über die Bildungsstätte der Myelomproteine¹ durch fluorescein-markierte Antikörper nach der Methode von Coons² veranlaßte uns zu obiger Fragestellung. Ähnliche Untersuchungen haben insbesondere GITLIN und Mitarbb.³ an Organen von Kindern durchgeführt. Körper-eigene Antigene sind mit dieser Methode bereits von mehreren Autoren^{4–10} nachgewiesen worden.

Gleichzeitig wollten wir nochmals die Frage der Kapillar- und Zellpermeabilität für Serum-Proteine im Zusammenhang mit der vitalen Farbstoffspeicherung prüfen^{11, 12, 13}. In früheren Versuchen¹¹ hatten wir gezeigt, daß ¹³¹I-signiertes Rattenserum in den Lebern von Farbstofftieren (Lithiumkarmin) vermehrt gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden konnte.

¹ J. WOLLENSAK u. G. SEYBOLD, Z. Naturforschg. 11 b, 588 [1956].

² A. H. COONS u. M. K. KAPLAN, J. exp. Medicine 91, 1 [1950].

³ D. GITLIN, B. H. LANDING u. A. WHIPPLE, J. exp. Medicine 97, 163 [1953].

^{4a} A. H. COONS, H. E. LEDUC u. M. H. KAPLAN, J. exp. Medicine 93, 173 [1951].

^{4b} A. H. COONS, H. E. LEDUC u. J. M. CONOLLY, J. exp. Medicine 102, 49, 61 [1955].

⁵ I. M. MARSHALL, J. exp. Medicine 94, 21 [1951]; J. exp. Cell. Res. 6, 240 [1954].

⁶ A. G. S. HILL u. B. CRUICKSCHANK, Brit. J. exp. Pathol. 34, 27 [1953].

⁷ R. M. CLAYTON, Nature [London] 174, 1059 [1954].

⁸ E. WEILER, Z. Naturforschg. 11 b, 31 [1956].

⁹ B. A. ASKONAS u. R. G. WHITE, Brit. J. exp. Pathol. 37, 61 [1956].

¹⁰ H. MAYERSBACH u. A. G. E. PEARSE, Brit. J. exp. Pathol. 37, 81 [1956].

¹¹ G. SEYBOLD u. E. KALLEE, Z. Naturforschg. 9 b, 173 [1954].

¹² J. WOLLENSAK, E. KALLEE u. G. SEYBOLD, Z. Naturforschg. 10 b, 582 [1955].

¹³ H. BENNHOLD, G. SEYBOLD u. E. KALLEE, Z. Naturforschg. 10 b, 578 [1955].

Injiziert man Ratten oder Meerschweinchen dieselbe Menge eines sauren Vitalfarbstoffes pro kg Tier, so erfolgt bei der Ratte in der Leber eine Farbspeicherung nur in der v. Kupfferschen Sternzelle, während beim Meerschweinchen der Farbstoff auch in der Leberzelle selbst abgelagert wird. Auf Grund unserer Farbstoffbindungs-Studien an Mitochondrien¹² hatten wir Anhaltspunkte dafür gefunden, daß der verschiedene Speichertyp auf feinstrukturellen Unterschieden der Sinusoidwände der Leber beruhen könnte. Ergänzende polarisationsoptische Untersuchungen zu dieser Frage werden gegenwärtig zusammen mit MISSMAHL durchgeführt. Ob neben dem Faktor des feinstrukturellen Aufbaues der Lebersinusoiden auch die farbstoffbindenden Serum-Proteine (Vehikel)¹⁴ für die verschiedenen Speichertypen verantwortlich sind, war unter anderem ein Gegenstand dieser Arbeit. Außer der Leber haben wir als weiteres parenchymatoses Organ die Niere nach denselben Gesichtspunkten untersucht.

Methode

Als Versuchstiere wurden weiße Laborratten und Meerschweinchen verwandt. Zum Teil wurden die Tiere mit körperwarmer Ringerlösung in Chloroformnarkose durchspült¹⁵ und getötet. Damit erhielten wir weitgehend blutleere Kapillaren und gleichzeitig ließ sich die intrazelluläre Fluoreszenz besser beurteilen. Zur Farbstoffspeicherung erhielten die Tiere pro 100 g Körpergewicht 6,25 mg Lithiumkarmin bzw. 5 mg Trypanblau intravenös verabreicht. An Human- γ -Globulin bzw. Humanalbumin wurde den Tieren etwa 20 mg Protein pro 100 g Körpergewicht intravenös injiziert.

Probeexzisionen (sie wurden in anderem Zusammenhang ausgeführt) aus menschlichen Lebern standen uns von zwei Patienten zur Verfügung.

Darstellung der Antigene: Humanalbumin reinst und normales γ -Globulin bekamen wir von den Behring-Werken Marburg a. d. Lahn. Meerschweinchen-Albumin wurde nach der Ätherfraktionierung von MACKAY¹⁶ mit elektrophoretisch (Papierelektrophorese) einheitlicher Wanderung gewonnen. Rattenalbumin wurde durch Ammoniumsulfatfällung hergestellt; die Albuminfraktion erhielt 97% Albumin und 3% Globulin.

Herstellung der Antiseren: Zur Immunisierung erhielten die Kaninchen in langsam steigenden Dosen insgesamt 150 mg Protein. Dieses wurde zum größten Teil intravenös in 3–4-tägigen Abständen

den über einen Zeitraum von 3–4 Wochen gegeben. Die Antikörper gegen Humanalbumin sowie Meerschweinchen-Albumin erwiesen sich spezifisch. Der Antikörper gegen Rattenalbumin zeigte sich nach erschöpfender Absättigung spezifisch, der gegen Human- γ -Globulin zeigte keine Kreuzreaktion gegen Humanalbumin.

Die Kupplung der Antiseren sowie der histologische Nachweis der Antigene erfolgte nach der Methode von Coons und Mitarb.². Weitere Einzelheiten unseres Vorgehens haben wir früher schon beschrieben¹.

Ergebnisse

In histologischen Schnitten von Lebern zeigte sich nach Zugabe fluoreszierender Antikörper gegen homologes Albumin eine starke Grünfluoreszenz in den Lebersinusoiden. Wurden die Tiere zuvor mit körperwarmer Ringerlösung in Narkose durchspült, so war eine starke Grünfluoreszenz nur noch in den v. Kupfferschen Sternzellen zu sehen. Eine schwache, diffuse, spezifische Fluoreszenz fanden wir auch in den Leberzellen selbst, dagegen nicht in den Leberzellkernen (Abb. 6* a und b). Der erhobene Befund ist in den Lebern von Ratten und Meerschweinchen gleich. Auch die histologischen Präparate der Humanleber zeigten dasselbe Bild (Abb. 2 a und b).

Homologes γ -Globulin wird in den von uns untersuchten Humanlebern nicht in der Leberzelle gefunden. Es liegt ausschließlich im Protoplasma der v. Kupfferschen Sternzelle (Abb. 3).

Gibt man Ratten und Meerschweinchen Humanalbumin oder Human- γ -Globulin i.v., so werden diese schon nach kurzer Zeit in der Leber in den v. Kupfferschen Sternzellen als Antigen wieder gefunden (Abb. 1). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen mit einer anderen Methode auch SCHILLER und Mitarb.¹⁷ sowie andere Autoren^{5, 18}.

Wird den Tieren 24 Stdn. vor ihrer Tötung Trypanblau oder Lithiumkarmin i.v. injiziert, so finden wir in der Verteilung der Grünfluoreszenz des entsprechenden Antikörpers keine Unterschiede gegenüber Normaltieren. Doch zeigten schon Spuren von gespeichertem Trypanblau bei Einschluß des histologischen Präparates mit Glycerin im ultravioletten Licht eine rot-violette Fluoreszenz, während im durchfallenden Licht bei Hellfeld das Trypanblau des selben Präparates als blaue Farbe noch nicht sichtbar war. Die Fluoreszenz von Trypanblau kann eine

* Abb. 1–6 s. Tafel S. 146 a u. b.

¹⁷ A. A. SCHILLER, R. W. SCHAYER u. E. L. HESS, J. gen. Physiol. **36**, 489 [1953].

¹⁸ H. SMETENA, Amer. J. Pathol. **23**, 255 [1947].

¹⁴ H. BENNHOLD, Kolloid-Z. **43**, 328 [1927]; Erg. inn. Med. Kinderhk. **42**, 273 [1932].

¹⁵ E. KALLEE u. G. SEYBOLD, Z. Naturforsch. **9b**, 307 [1954].

¹⁶ M. E. MACKAY, Biochem. J. **475**, 60 [1955].

schwache spezifische Grünfluoreszenz des fluoreszierenden Antikörpers überdecken. Die Unterschiede in der Farbstoffspeicherung von Ratte und Meerschweinchen finden sich auch bei der so viel empfindlicheren Nachweismethode von Trypanblau im UV-Licht. Gespeichertes Lithiumkarmin dagegen zeigte keine Fluoreszenz, sondern löschte in Abhängigkeit seiner Konzentration die spezifische Grünfluoreszenz der Fluorescein-Antiserum-Globuline.

In Ratten- und Meerschweinchen-Nieren fanden wir bei der Behandlung der Schnitte mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Albumin weder in den Schlingendeckzellen der Glomerula noch an irgend einer Stelle der Tubulusepithelien homologes Albumin (Abb. 4 a und b). Im Tubuluslumen dagegen kann bei Ratten oft homologes Albumin nachgewiesen werden (Abb. 5).

Die Speicherung der intravenös verabreichten Vitalfarbstoffe war an typischer Stelle im Tubulus contortus I sichtbar. Nach Gabe von Trypanblau fluoreszierten diese Tubulusabschnitte sehr stark leuchtend rot, während bei Lithiumkarmin keine Fluoreszenz auftrat.

Im Interstitium der Nieren fanden wir sowohl bei Ratten wie auch bei Meerschweinchen, auch nach Narkose-Durchspülung der Tiere, eine reichliche spezifische Grünfluoreszenz.

Um die spezifische Fluoreszenz einwandfrei lokalisieren zu können, ist es sehr wichtig, daß immer dasselbe Blickfeld sowohl als Fluoreszenzbild als auch im Hellfeld nach entsprechender Färbung photographisch festgehalten wird. Werden diese Bilder farbig photographiert und sodann an die Wand übereinander projiziert, können die fluoreszierenden Stellen exakt im gefärbten Schnitt lokalisiert werden (Abb. 1 bis 6).

Diskussion

Bereits vor uns fanden COONS^{4a}, GITLIN³ und SCHILLER¹⁷ Albumine und Globuline in der v. Kupfferschen Sternzelle. In einer späteren Arbeit beschrieben COONS und Mitarbb.^{4b} bei immunisierten Kaninchen eine unspezifische Färbung der v. Kupfferschen Sternzellen. Wir konnten dies bei den von uns untersuchten Lebern nicht feststellen. Das Fluorescein-Antiserum-Globulin gegen Humanalbumin bzw. Human- γ -Globulin zeigte keine Grünfluoreszenz über den v. Kupfferschen Sternzellen der Ratten- bzw. Meerschweinchenleber. Lediglich bei

Ratten bzw. Meerschweinchen, die zuvor Humanalbumin i.v. injiziert bekamen und deren Lebern wir mit fluoreszierendem Antikörper gegen Humanalbumin inkubierten, wurde die beschriebene Grünfluoreszenz über den v. Kupfferschen Sternzellen gesehen. Im übrigen beschrieben COONS und Mitarbb.^{4a} in früheren Arbeiten ebenfalls eine Speicherung heterologer Proteine u. a. in den v. Kupfferschen Sternzellen der Mäuseleber.

Ferner fanden GITLIN³ und COONS^{4a} Albumin und Globuline sowohl in Leberzellkernen als auch in den Kernen der v. Kupfferschen Sternzellen. In unseren vergleichenden Untersuchungen an Human-, Meerschweinchen- und Rattenlebern konnten wir diese Befunde nicht bestätigen. SCHILLER und Mitarbb.¹⁸ kamen mit einer anderen Methodik an Tierlebern zu demselben Ergebnis wie wir.

Wir fanden die homologen Albumine wohl in sehr geringer Menge (geringe Grünfluoreszenz) im Leberzell-Protoplasma. Der Befund muß aber mit Vorsicht bewertet werden, denn auch nach Beschickung des histologischen Präparates mit nativem Antiserum und anschließender Inkubierung mit fluoreszierendem Antiserum-Globulin ließ sich die leichte Grünfluoreszenz im Leberzell-Protoplasma nicht vollständig aufheben. Dagegen war bei gleichem Vorgehen die intensive Grünfluoreszenz der v. Kupfferschen Sternzellen und die der Lebersinusoiden bis auf eine Spur nicht mehr sichtbar.

Im Gegensatz zu obigem Befund sahen wir in einzelnen Schnitten von Lebern auffällenderweise eine schwache Grünfluoreszenz vieler Leberzell-Kerne. Bei Betrachtung des mit H.-E. nachgefärbten Präparates im Hellfeld waren auch die vorher fluoreszierenden Leberzellkerne zwar anfärbbar, d. h. nur ein Teil jedes einzelnen Zellkernes. Die Zellkerne waren, wohl durch die Präparation bedingt, mechanisch zerriissen. Eine weitere Vortäuschung einer spezifischen Fluoreszenz in den Zellkernen kommt durch Überlagerung mit feinsten, abgeschwommenen, fluoreszierenden Präzipitaten zustande, worauf wir bereits an anderer Stelle hingewiesen haben¹.

Auch in einzelnen Nierenpräparaten sahen wir in zahlreichen Tubulusepithelien und im Interstitium reichlich grünfluoreszierende Zellkerne, ohne daß diese im mit H.-E. gefärbten Schnitt irgendeine Besonderheit erkennen ließen. Kontrolluntersuchungen zeigten, daß die Ursache hierfür einmal auf einem nicht genügend an Aceton-Trockenpulver adsorbierter Fluorescein-Antiserum-Globulin beruhte, zum an-

deren traten diese Kunstprodukte bei solchen fluoreszierenden Antiseren auf, die bakteriell zersetzt waren bzw. häufig aufgetaut und wieder eingefroren wurden.

Die Ratte, die eine physiologische Proteinurie aufweist¹⁹, zeigte auffallenderweise in den Nieren trotz der in den Epithelien des Tubulus contortus I häufig histologisch sichtbaren hyalinen Eiweißgranula kein nachweisbares homologes Albumin. Der Befund ist nur so zu erklären, daß die nachweisbare Proteinspeicherung kein Serumprotein ist oder daß dieses, wie wir annehmen möchten, intrazellulär bereits seine spezifische Antigenstruktur verloren hat. MAYER-BACH und Mitarbb.¹⁰ sind in ihren Untersuchungen mit heterologen Proteinen ebenfalls zu der Ansicht gelangt, daß diese rasch ihre Antigenstruktur verlieren. Außerdem muß an die von GYLIN und Mitarbb.³ geäußerte Möglichkeit gedacht werden, daß durch Komponenten des Cytoplasmas keine Fluoreszenz angeregt werden kann.

¹⁹ S. B. GILSON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **72**, 608 [1949].

Der Nachweis der Serum-Proteine in der Leber und die verschiedene Lokalisation der Farbstoffspeicherung bestätigt wieder unsere früheren, methodisch auf andere Weise erhaltenen Befunde¹², wonach die Serumproteine auf den Speichertyp in der Leber keinen Einfluß haben. Der Nachweis einer vermehrten Serum-Proteinspeicherung der Niere¹¹ nach Trypanblauinjektion konnte mit der angewandten Methode nicht erbracht werden. Der Grund hierfür kann in der oben vermuteten Aufhebung der immunologischen Spezifität des heterologen Albumins in der Tubulusepithelzelle beruhen. Weiter stört bei der Beurteilung der Grünfluoreszenz die starke rotviolette Fluoreszenz von Trypanblau bzw. die Lösung von Fluoreszenz durch Lithiumkarmen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für ihre Unterstützung zu größtem Dank verpflichtet. Herrn Prof. H. BENNHOLD gebührt unser Dank für die wohlwollende Förderung. Herr Prof. Dr. H. FRIEDRICH-FREKSA stellte uns entgegenkommenderweise Einrichtungen des Max-Planck-Institutes für Virusforschung zur Verfügung, wofür wir ihm herzlichst danken. Fräulein B. SCHÜTT assistierte vorbildlich.

Verfolgung der Bildung reduzierender Substanzen mit Hilfe der elektrochemischen H_2O_2 -Meßmethode an inkubierter *Chlorella pyrenoidosa* im Hellen und im Dunkeln

Von K. DAMASCHKE

Aus der Bundesanstalt für Materialprüfung, Berlin-Dahlem
(Z. Naturforsch. **12 b**, 150—155 [1957]; eingegangen am 27. November 1956)

Da bei der elektrochemischen H_2O_2 -Messung nicht nur H_2O_2 , sondern die Summe der reduzierenden Stoffe angezeigt wird, lag es nahe, die Bildung dieser Stoffe in Chlorellasuspensionen unter den verschiedensten Bedingungen zu untersuchen. Es wurde erst einmal grundsätzlich festgestellt, daß während der Lichteinwirkung reduzierende Stoffe gebildet werden. Die Bildung derselben wurde dann bei verschiedenen CO_2 -Gehalten und nach verschieden langer Inkubationszeit verfolgt. Es zeigte sich, daß die Menge der gebildeten reduzierenden Stoffe mit der Länge der vorangegangenen Inkubationszeit ansteigt. Die im Licht gebildeten reduzierenden Stoffe wurden ebenfalls im Licht wieder zersetzt. Ist dies geschehen, setzt die Photosynthese ein. Die dabei entstehenden O_2 -Konzentrationsänderungen werden ebenfalls elektrochemisch gemessen. Während der Dunkelzeit werden geringe Mengen eines reduzierenden Stoffes gebildet. Die Bildung der reduzierenden Stoffe während der Hellzeit ist durch *o*-Phenanthrolin hemmbar.

Methodik

Der Sauerstoff wurde elektrochemisch nach Tödt^{1, 2, 3, 4} mit der Elementkombination Goldamalgam gegen Zink gemessen. Diese Methode hat gegenüber der Mano-

metrie den Vorteil, daß man ohne Verzögerung den gelösten Anteil des Sauerstoffs in einer Lösung bestimmen und ihn registrierend verfolgen kann. Vor allem kann man genaue Aussagen darüber machen, welche O_2 -Konzentration in der Lösung besteht, was bei der

¹ K. DAMASCHKE, L. ROTHBÜHR u. F. TÖDT, Biochem. Z. **326**, 424 [1955].

² W. SCHWARZ, Werkstoffe u. Korrosion **11**, 527 [1955].

³ F. TÖDT, Angew. Chem. **67**, 266 [1955].

⁴ F. TÖDT, K. DAMASCHKE u. L. ROTHBÜHR, Biochem. Z. **325**, 210 [1954].