

Leukozytenemigrationsfördernde Wirkung durch Leukozytenschädigung

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass es mit vielen lebenden Bakterien gelingt, an Leukozyten *in vitro* Chemotaxis hervorzubringen oder in geeigneten Verdünnungen mit Suspensionen lebender Bakterien eine Leukozytenauswanderungsförderung zu erhalten^{1,2}. Bei gramnegativen Keimen lässt sich zeigen, dass diese Wirkung den aus ihnen extrahierbaren Lipopolysacchariden zukommt; Polysaccharide und andere Extrakte grampositiver Keime, sowie ihre Bouillonnährmedien sind unwirksam³. Durch Züchtung grampositiver Keime auf gewissen, tierisches Material enthaltenden Nährböden gelingt es, in der Kulturflüssigkeit hitzestabile, hochmolekulare, emigrationsfördernde Stoffe nachzuweisen^{4,5}. Die Chemotaxis, durch lebende grampositive Keime erzeugt, ist eine dichte einseitige Anhäufung von Leukozyten, während Lipopolysaccharide grammnegativer Bakterien eher eine grössere Ausdehnung der «chemotaktisch» gerichteten Auswanderungszone bewirken. Es ist somit sicher, dass grampositive und grammnegative Keime über verschiedene Mechanismen zu demselben biologischen Effekt kommen. Bei dieser Sachlage bleibt es möglich, dass die Anhäufung der Leukozyten auf der Seite der

grampositiven Bakterienkultur nicht nur durch direkte Wirkung von Bakterienstoffen entsteht, sondern dass sie zustande kommt durch leukozytäre Zellstoffe, welche bei Schädigung oder Reizung der Leukozyten durch Bakterienprodukte frei werden.

CARREL und EBELING⁶ zeigten, dass benachbarte Leukozytenkulturen nicht ineinanderwandern, sondern sich abstoßen. Lipopolysaccharide heben dieses Phänomen der Abstossung nach unseren Befunden auf⁷. Wir untersuchten daher die Frage, ob Leukozytenkulturen so behandelt werden können, dass sie eine chemotaktische Wirkung auf andere Leukozyten ausüben. Kulturfiltrate aus grampositiven Bakterien schienen in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse.

Versuchsanordnung: Grampositive Keime wurden in Bouillon und in synthetischem Nährmilieu gezüchtet. Nach 24 h wurden die bewachsenen und die mitgeführten unbeimpften Nährmedien kerzenfiltriert. 0,5 cm³ einer mit Leukozyten stark angereicherten Plasmasuspension wurde mit 2,5 cm³ Kerzenfiltrat während 3 h in silikonierten Zentrifugengläsern bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zentrifugieren wurden die derart behandelten Leukozyten neben normal explantierte Leukozytenkulturen des gleichen Tieres gebracht und weitere 18 h in einer feuchten Kammer bei 37°C bebrütet. Die aus den Kulturmiedien gewonnenen Keime und die Kerzenfiltrate wurden ebenfalls auf ihre chemotaktische Wirkung geprüft. Alle

- ¹ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953).
- ² R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 14, 366 (1958).
- ³ R. MEIER und B. SCHÄR, Hoppe-Seylers Z. 307, 103 (1957).
- ⁴ R. MEIER, Helv. chim. Acta 24, 134/E (1941).
- ⁵ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 13, 492 (1957).

⁶ A. CARREL und A. H. EBELING, J. exper. Med. 36, 365 (1922).

⁷ B. SCHÄR, F. W. KAHNT und G. HUBER, Helv. physiol. Acta 15, 116 (1957).

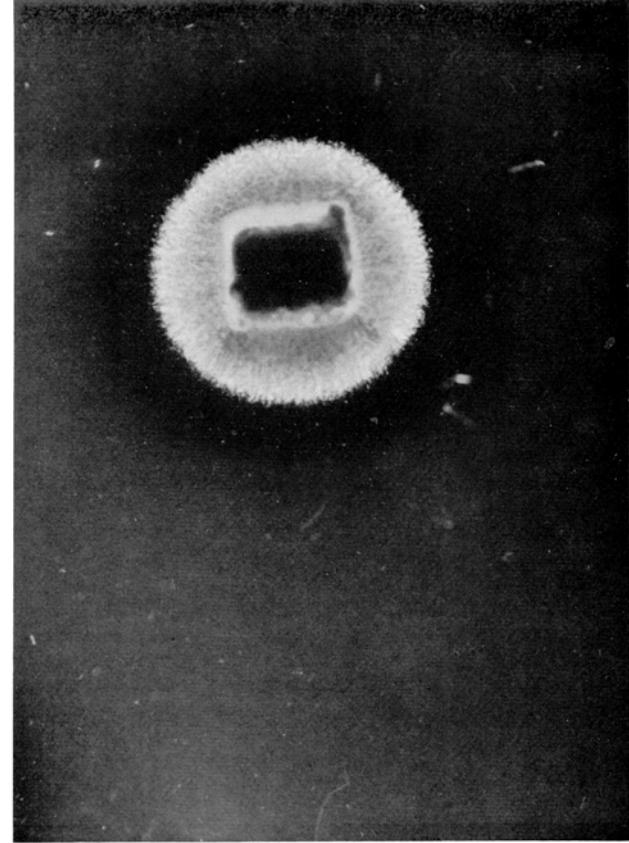
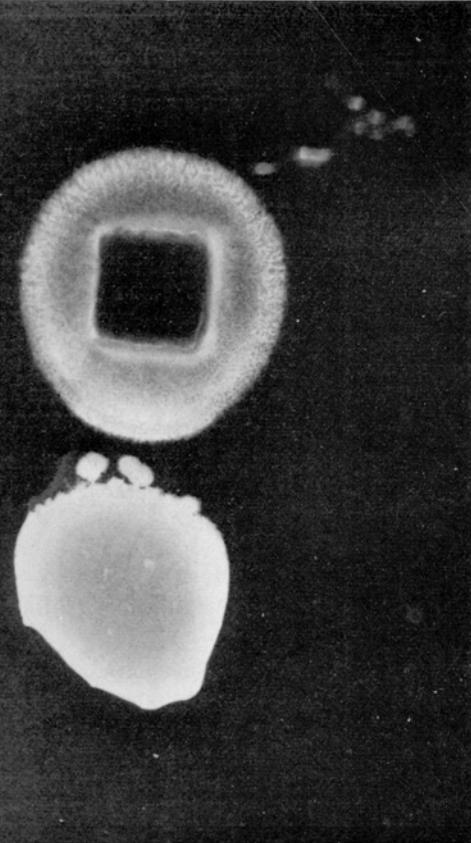


Abb. 2. Unveränderte zirkuläre Auswanderung der Leukozyten entsprechend der Kontrolle bei Anwesenheit des Filtrates der Staphylokokkenkulturflüssigkeit

Abb. 1. Anhäufung von Leukozyten auf der Seite der Staphylokokkenkultur



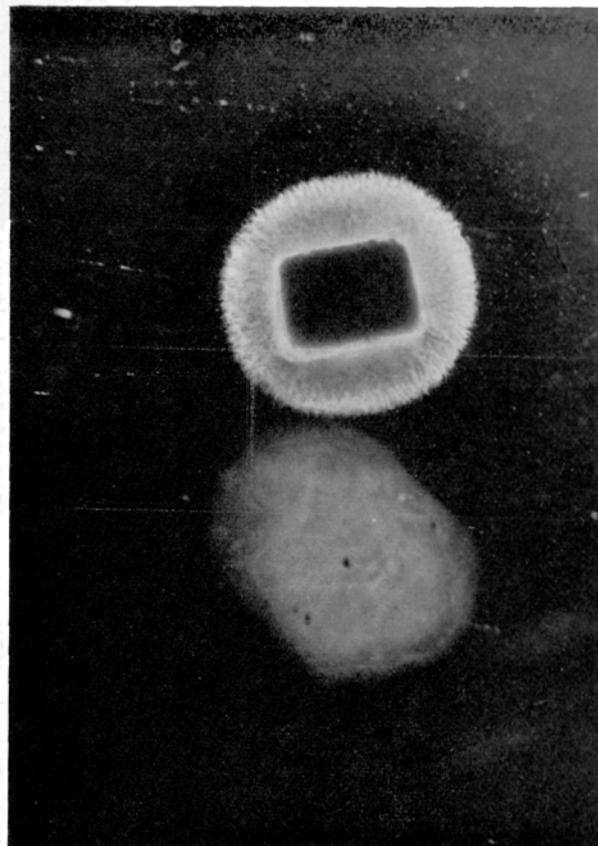


Abb. 3. Unbeeinflusste zirkuläre Auswanderung bei Anwesenheit von toten Leukozyten

Filtrate und Leukozytensuspensionen wurden auf ihre Sterilität geprüft.

Resultat. Die lebenden Keime, im abgebildeten Falle Staphylokokken, bewirken an der Leukozytenkultur die beschriebene Anhäufung von Leukozyten auf der Seite der Bakterien (Abb. 1). Die Kulturfiltrate haben keine chemotaktische Wirkung (Abb. 2). Die in der oben beschriebenen Weise mit Kerzenfiltrat behandelten Leukozyten haben verschiedene Wirkungen, je nachdem ob synthetisches Milieu oder Bouillon verwendet wurde. Die synthetischen Nährmedien, bewachsen oder nicht bewachsen, verändern die Leukozyten in der Weise, dass sie nicht mehr auswandern. In diesem Zustand haben sie weder eine anziehende noch abstossende Wirkung auf die normale, daneben liegende Leukozytenkultur (Abb. 3). Die Kerzenfiltrate aus Bouillon, bewachsen und unbewachsen, schädigen die Leukozyten nicht stark, ihre Wanderungsfähigkeit bleibt in gewissem Umfange erhalten. Von der Kultur mit derart vorbehandelten Leukozyten wird eine ausgesprochene chemotaktische Reaktion mit Ausbreitung des bewanderten Areales, wie es für Lipopolysaccharide typisch ist, hervorgerufen (Abb. 4).

Die Versuche zeigen, dass die abstossende Wirkung zweier Leukozytenkulturen nur dann auftritt, wenn die Zellen durch sorgfältiges Manipulieren keiner Schädigung ausgesetzt waren.

Wenn eine Beeinträchtigung der Zellen stattgefunden hat, wirken diese chemotaktisch auf normale Leukozytenkulturen. In stark geschädigtem oder totem Zustand haben die Leukozyten weder anziehende noch abstossende Wirkung. Es sind somit im «buffy coat» Zellen enthalten, die durch leichte unspezifische Schädigung derart ver-

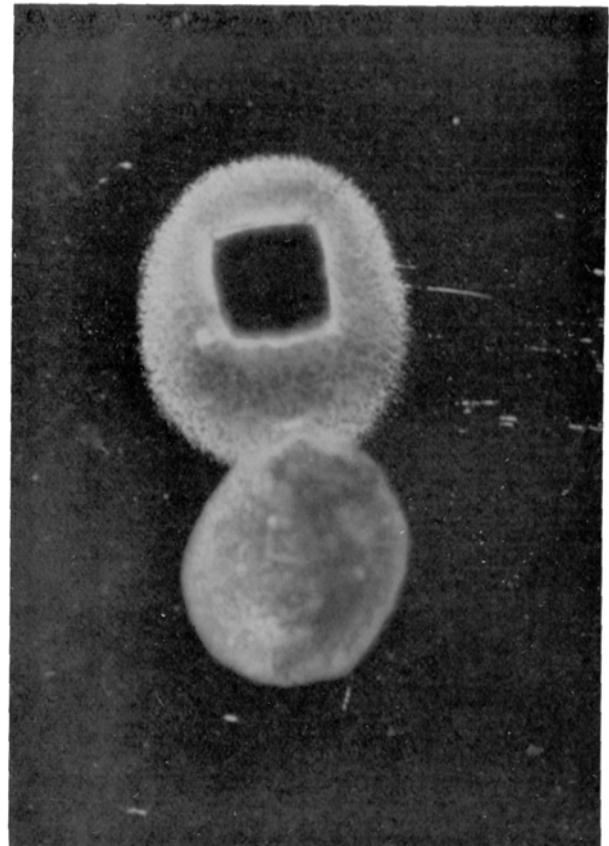


Abb. 4. Auswanderungsförderung der Leukozyten auf der Seite der ***geschädigten*** Leukozyten

ändert werden, dass sie normale Leukozyten zur Auswanderung stimulieren.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das Zustandekommen dieses Phänomens auszulegen. Wir möchten hier nur zwei diskutieren.

Durch die beschriebene Beeinflussung oder Reizung können aus lebenden Leukozyten Substanzen freigesetzt werden, die einen spezifischen leukozytenemigrationsfördernden Charakter haben. Der chemische Charakter derselben wäre näher zu bestimmen.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit hängt zusammen mit der Beobachtung, dass Ionenaustauscher mit negativer Gitterladung Leukozyten abstoßen, Ionenaustauscher mit positiver Gitterladung sie anziehen⁸. Die negativen Oberflächenladungen intakter Leukozyten^{8,9} können für das Zustandekommen der Abstossung verantwortlich sein. Schädigungen der Zellen könnte zu Ladungsänderungen der Zelloberflächen führen, wie sie auch bei geschädigten Endothelien auftreten¹⁰. Abgetötete Leukozyten zeigen diese Oberflächeneigenschaften nicht. Die Beobachtung, dass lebende homologe Spermien eine starke chemotaktische Wirkung besitzen, tote aber ohne Einfluss sind¹¹, kann für diese Betrachtungsweise sprechen, schliesst jedoch die erste nicht aus.

⁸ H. A. ABRAHAMSON, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **1**, 92 (1933).

⁹ E. FRITZ, P. DOERING, H. MANKE und R. SCHÖN, Schweiz. med. Wschr. **83**, 783 (1953).

¹⁰ P. N. SARWYER und J. W. PATE, Amer. J. Physiol. **173**, 103 (1953).

¹¹ Unpublizierte Befunde.

Trotzdem noch andere Erklärungsmöglichkeiten in Betracht kommen, zeigen die vorgelegten Befunde, dass von geschädigten Zellen unter bestimmten Schädigungsverhältnissen leukozytenmigrationsfördernde Effekte ausgelöst werden können. Damit wird es möglich, das Auftreten leukozytärer Reaktionen im Gewebe bei entzündungserregenden Einwirkungen, die selbst keine leukozytenmigrationsfördernde Wirkung besitzen, einer einheitlichen Deutung zuzuführen.

B. SCHÄR und R. MEIER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft,
Pharmazeutische Abteilung, Basel, 7. Oktober 1959.

Summary

Leukocytic cells after slight damage produce stimulation of migration of other normal leucocytes; normal leukocytes inhibit to some extent migration of other normal leukocytes, killed leukocytes have no effect. The significance of this result is, that secondary accumulation of leukocytes with not primary chemotactic substances may be explained by the interaction of damaged leukocytes.

Amitosis in a New Ascites Tumor¹

In attempting to produce an ascitic form of a methylcholanthrene-induced sarcoma in the hamster (*Mesocricetus auratus*), one resulted which displayed an unusual number of polynucleated cells. The cells of the original tumor employed in these experiments normally divide by mitosis as they grow subcutaneously, yet transformation to the ascitic form resulted in a high percentage of the tumor cells containing more than one nucleus. Microscopic examination showed these occur by budding of a daughter nucleus from the parent nucleus, a type of nuclear division which according to KATER² can be classified as amitotic division.

Methods and Results. The original methylcholanthrene-induced tumor was a spindle cell sarcoma³ and had no amitotic figures present. Using sterile conditions, viable solid tumor was removed from the thigh region of the hamster. 1 g of this tumor was homogenized in 10 ml of sterile isotonic saline pH 7. Each of 20 normal adult female hamsters was injected intraperitoneally with $\frac{1}{2}$ ml of the total homogenate. Twenty-eight days later all the hamsters had greatly distended abdomens. They were sacrificed and the peritoneal fluid withdrawn using a sterile 16 gauge needle and syringe. This fluid was smeared, fixed, and then stained by the Feulgen reaction. In addition to the ascitic fluid, each animal had large masses of solid tumor nodules spread through the peritoneal cavity. This material was fixed in 10% formalin and stained with hematoxylin and eosin.

The new ascitic tumor was maintained by injecting 0.5 ml of fresh ascitic tumor intraperitoneally into normal adult female hamsters using sterile technique.

The volume of ascitic fluid which was obtained from each animal varied from 3 to 10 ml and was hemorrhagic.

Microscopic examination of the ascitic fluid showed that excluding red blood cells there were 95–98% tumor cells present, the remaining cells being leucocytes. Thirteen to 25% of the tumor cells were polynucleated, of these 60–75% had two nuclei present in each cell (Figure 3). The remaining cells had more than 2 nuclei (Figure 4) with 1–2% having as many as 10 nuclei (Table).

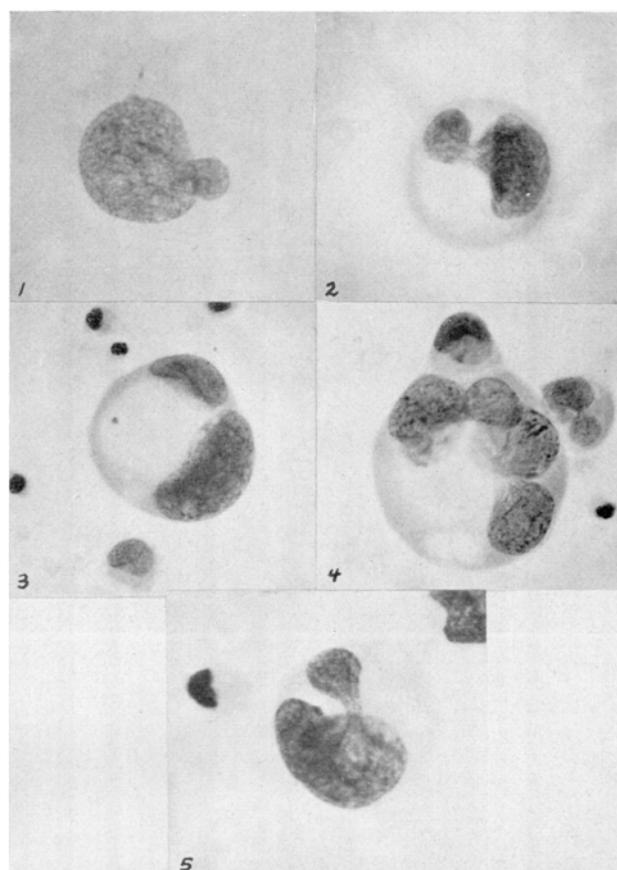


Fig. 1.—Nucleus with a well defined bud
Fig. 2.—Nucleus with the bud more discreet and demonstrating the less densely stained bridge
Fig. 3.—A binucleate ascites cell with a small granule of DNA in the cytoplasm
Fig. 4.—An ascites cell with 7 nuclei present
Fig. 5.—A binucleate ascites cell with a well defined bridge in which parallel filaments are present

The nuclei within one cell were either discreet from one another or attached by bridges which varied in thickness from single strands approximating the thickness of chromatin threads to widths slightly less than the diameter of the smaller nucleus. The nuclei within one cell were usually not equal in size and they tended to be irregular in shape; cells, however, were always oval in shape. Phase microscopy and microscopic observations on many stained cells in various degrees of nuclear budding indicated that the parent nucleus buds off equal size or smaller nuclear segments in much the same manner as an amoeba sending out pseudopods (Figure 1). A connection or bridge between the parent nucleus and the bud appears as the bud becomes more discreet (Fig. 2) and gradually stretches, narrows, and eventually parts completely or remains as a very thin strand. It was quite evident that these bridges stain less densely than the nuclei which they connect.

¹ This investigation has been aided by the U.S. Public Health Service (Grant No. C 321), and an institutional grant of the American Cancer Society.

² M. McA. KATER, Bot. Rev. 6, 164 (1940).

³ B. R. LUTZ, G. P. FULTON, D. I. PATT, A. H. HANDLER, and D. F. STEVENS, Cancer Res. 11, 64 (1951).