

## Beispiele von Analysen:

Subst.	Ein-wage	cm <sup>3</sup> ver-bräu-chte Rhodanid lösung	mg H <sub>2</sub> O	f	Gef. % Halogen	Ber. % Halogen	Gef. % H	Ber. % H	Bestim-mi-tes Halogen
1.	5,305	0,720		0,550	7,44	7,47			Br
1.	4,097	0,565		0,550	7,59	7,47			Br
1.	4,569	0,660		0,550	7,92	7,47			Br
2.	4,939	3,960		0,244	19,61	19,75			Cl
3.	4,726	2,360	1,69	0,550	27,55	27,84	4,00	3,87	Br
2.	4,942	4,000	1,49	0,244	19,76	19,75	3,35	3,37	Cl
2.	4,538	3,730	1,30	0,244	19,72	19,75	3,18	3,37	Cl
2.	4,727	3,770	1,40	0,244	19,48	19,75	3,29	3,37	Cl
2.	5,051	3,275	1,43	0,3036	19,65	19,75	3,16	3,37	Cl
2.	5,521	3,560	1,65	0,3036	19,58	19,75	3,34	3,37	Cl
4.	4,416	3,300	1,28	0,3036	22,66	22,67	3,24	3,22	Cl
4.	5,610	4,245	1,55	0,3036	22,80	22,67	3,08	3,22	Cl
4.	5,426	4,070	1,49	0,3036	22,70	22,67	3,07	3,22	Cl
5.	5,970	2,825	2,43	0,3036	14,36	14,21	4,56	4,85	Cl

f = Faktor

1 = Gallensäurederivat

2 = Chlor-oxychinolin

3 = Brompropionyl-salicylsäuremethylester

4 = Chlorbenzoësäure

5 = Chinolinderivat

Mikroanalytisches Laboratorium der Gesellschaft  
für Chemische Industrie in Basel.

## XV. Zur Frage der Bakterienchemotaxine

von Rolf Meier.

(17. X. 41.)

So allgemein anerkannt die Tatsache ist, dass beim lokalisierten Bakterieninfekt eine Leukocytanreicherung erfolgt, so wenig einwandfrei ist die Frage entschieden, ob bei dieser leukocytären Reaktion spezifisch chemotaktisch wirkende Stoffe der Bakterien eine Rolle spielen. Die Schwierigkeit, diese Frage einwandfrei zu entscheiden, ergibt sich wesentlich aus zwei Tatsachen.

Die Prüfung chemotaktischer Wirkungen durch Einbringen der Substanz in den tierischen Organismus erlaubt nicht, mit Sicherheit zwischen der chemotaktischen Wirkung von Substanzen der Bakterien selbst und Wirkungen, die erst durch Zellschädigung, Än-

derung der Blutzirkulation und ähnliche Prozesse zustandekommen, zu entscheiden. Bereits *Marchand*<sup>1)</sup> hat auf Grund derartiger Überlegungen die älteren Versuche, die sich des Nachweises chemotaktischer Wirkung im tierischen Organismus bedienten, als nicht beweiskräftig für die Entscheidung der Frage abgelehnt, ob die eingeführte Substanz oder sekundäre Verhältnisse die Chemotaxis bedingen. Dass diese Kritik berechtigt ist, geht auch daraus hervor, dass solche Stoffe, die bei Applikation am Tier Leukocytenanlockung und sogar Eiterbildung hervorrufen, wie Terpentin und ähnliche Substanzen, nach eigenen Versuchen<sup>2)</sup> *in vitro* keine chemotaktische Wirkung besitzen. Dieser Befund zeigt deutlich, wie schwierig es ist, auf Grund des Einbringens von Stoffen in den tierischen Organismus mit Sicherheit die chemotaktische Wirkung als direkte Wirkung des eingebrachten Stoffes auf die Leukocyten zu erschliessen. Es ergibt sich aus diesen Tatsachen, dass nur die direkte Prüfung an Leukocyten *in vitro* unter Ausschluss des tierischen Organismus eine klare Antwort ergeben kann. Soll die *in vitro* eventuell eintretende Wirkung nun weiter den Beweis erbringen, dass gleiche Stoffe auch im tierischen Organismus für die chemotaktische Wirkung in Frage kommen, so genügt offenbar der Nachweis nicht, dass chemotaktisch wirkende Produkte auf künstlichen Nährböden vorhanden sind, sondern es muss der Nachweis erbracht werden, dass chemotaktisch wirkende Stoffe auf nativem, zellfreiem, körpereigenem Material *in vitro* entstehen. Weiterhin muss für den Nachweis einer spezifischen chemotaktischen Wirksamkeit gefordert werden, dass die Wirkung von allgemeinen physikalisch-chemischen Änderungen des Nährbodens, z. B.  $p_H$ -, grobe Konzentrationsänderungen etc., die auch als Ursache chemotaktischer Wirkungen angesehen werden, unabhängig ist.

Auf Grund dieser Überlegungen kann der Nachweis spezifischer chemotaktisch wirkender Bakterienprodukte, die als auch im tierischen Organismus bedeutungsvoll angesehen werden können, nur dann als gelungen betrachtet werden, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. Die chemotaktische Wirkung muss auf die leukocytären Zellen *in vitro* erfolgen.
2. Die chemotaktisch wirksamen Produkte müssen bei Züchtung der Bakterien auf zellfreiem, nativem, körpereigenem Material entstehen und von den Bakterien abgetrennt wirksam sein.
3. Eigenschaften des Prüfungsmaterials, wie Abweichung des  $p_H$ , Konzentrierung von Begleitstoffen über das im Gewebe mögliche Mass, die als unspezifische Ursachen einsinniger leukocytärer Wan-

<sup>1)</sup> *Marchand*, Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 4, Entzündung.

<sup>2)</sup> *Meier, R.*, Z. ges. exptl. Med. **87**, 283—339, (1933), und unveröff. Versuche.

derung in Betracht kommen können, sind als Wirkungsursache auszuschliessen.

Da Versuche, welche diesen Anforderungen entsprechen, in der Literatur meines Wissens nicht vorliegen, wurde der Versuch gemacht, nach Züchtung von Bakterien auf tierischem Plasma Kulturfiltrate mit chemotaktischer Wirkung zu gewinnen.

### Methode.

Im einzelnen wurde folgendermassen vorgegangen:

Die Herstellung der Kulturfiltrate erfolgte in der Weise, dass Bakterien entweder auf nativem Hühnerplasma oder anderem tierischem Plasma, das nach einem besonderen Verfahren ohne Zusatz körperfremder, gerinnungshemmender oder gerinnungsfördernder Stoffe gewonnen wurde, gezüchtet wurden. Nach verschiedenen Bebrütungs-Perioden wurde das Plasmageriunsel zerstört, die Kulturflüssigkeit abfiltriert und durch Filtration mit Bakterien-dichtem Filter sterilisiert. Das Filtrat wurde mehrfach auf Sterilität geprüft und gegebenenfalls durch Zusatz von Phosphatpuffer auf  $p_H$  7—7,2 eingestellt. Dieses Filtrat wurde direkt für die Prüfung verwandt. Die Prüfung auf chemotaktische Wirksamkeit erfolgte im allgemeinen an Hühnerleukocyten. Diese werden als Schicht auf den Erythrocyten nach Zentrifugieren gewonnen. Nach Abheben des Plasmas wird die Leukocytenschicht durch geringe Mengen Embryonalextrakt zur Gerinnung gebracht, abgehoben und nach Entfernung der restlichen Erythrocyten in quadratische Stücke von ca. 1½—2 mm Kantenlänge zerschnitten. Diese werden im Zentrum einer *Carrel*-Flasche in Hühnerplasma angesetzt. Sie wandern unbeeinflusst gleichmässig nach allen Seiten aus, so dass eine kreisförmige Auswanderungszone von ca. 8—10 mm Durchmesser in etwa 18—20 Stunden zustandekommt. Für die Prüfung der chemotaktischen Wirksamkeit von Bakterienkulturfiltraten wird ein Mikrotropfen des Filtrates in bestimmter Entfernung von dem die Leukocyten enthaltenden Stückchen auf das Plasmagerinnsel aufgebracht. Bei positiver Wirkung ergibt sich eine ganz überwiegende Wanderung in der Richtung des Tropfens. Ein gewisser Anhaltspunkt über die Stärke der Wirkung lässt sich daraus erhalten, dass bei verschiedener Entfernung des Tropfens von den Leukocyten nur der am nächsten liegende oder auch die entfernter angebrachten Wirksamkeit zeigen. Für jeden einzelnen Versuch ist eine peinlichste Sterilitätskontrolle am Ende des Versuches notwendig, da ohne diese Kontrolle sekundär hereingebrachte Bakterien zu Täuschungen Anlass geben können.

Trotzdem diese Methode der chemotaktischen Prüfung als einwandfrei genügend bekannt ist, sei durch einige Abbildungen belegt, dass die einsinnige Anlockung ausschliesslich auf die eingebrachten

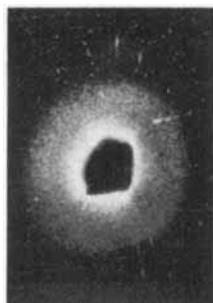


Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.

Fig. 1: Unbeeinflusste Auswanderung der Leukozyten aus den in der Mitte erkennbaren Plasmastückchen. Dunkelfeldaufnahmen.

Fig. 2: Anlockung der auswandernden Leukozyten durch eine Bakterienkultur (oben auf der Fig.). (Durch Pfeil gekennzeichnet.)

Fig. 3: Anlockung der auswandernden Leukozyten durch zwei (oben und unten auf der Fig.) an gegenüberliegenden Seiten angebrachten Bakterienkulturen. (Durch Pfeile gekennzeichnet.)

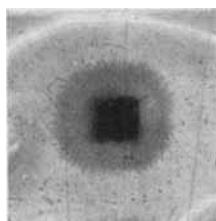


Fig. 4.

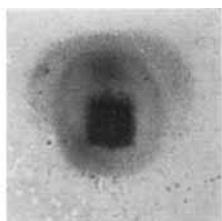


Fig. 5.

#### Figuren 4—14.

Chemotaktische Wirksamkeit steriler Filterate von Bakterienkulturen auf tierischem Plasma. Die Photographien sind teils Durchlicht-, teils Dunkelfeldaufnahmen. Bei den ersten ist der Filtrattropfen photographisch nicht dargestellt. Bei den Dunkelfeldaufnahmen wird der Filtrattropfen durch einige in ihn eingewanderte Leukozyten mehr oder weniger deutlich erkennbar.

Alle Kulturen sind so abgebildet, dass die Stelle, an der der Filtrattropfen sich befindet, der obere Rand der Figur ist.

Fig. 4: Kontrollversuch mit gleichförmiger Leukozytenauswanderung.

Fig. 5: Chemotaktische Wirkung von Kulturfiltrat von *Bact. coli*-Plasmakultur. Durchlichtaufnahmen.

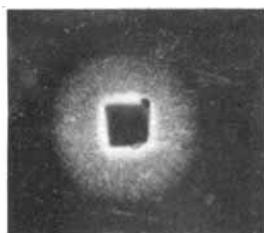


Fig. 6.

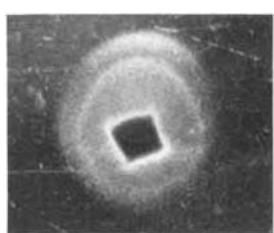


Fig. 7.

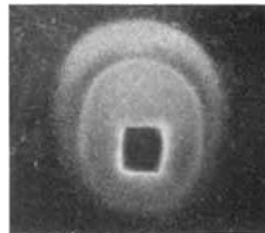


Fig. 8.

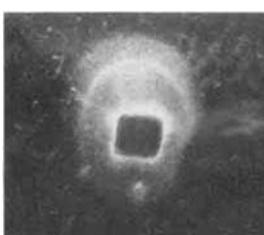


Fig. 9.

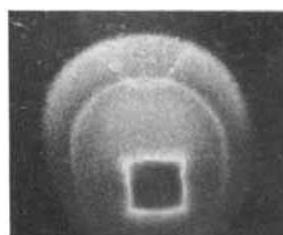


Fig. 10.

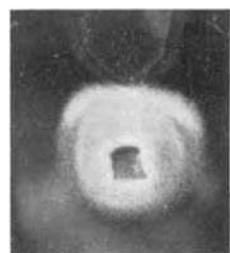


Fig. 11.

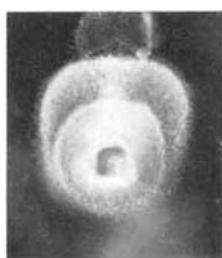


Fig. 12.

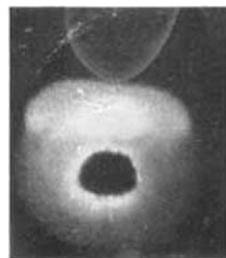


Fig. 13.

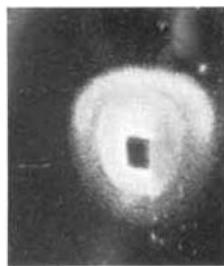


Fig. 14.

Fig. 6: Kontrollversuch mit unbeimpftem Plasma.

Fig. 7 -14: Chemotaktische Wirkung von Kulturfiltraten:

von Bakt. coli (Fig. 7).

von Pneumococci (Fig. 8).

von Streptococci (Fig. 9).

von Bac. prodigiosus (Fig. 10).

von Streptococci (Fig. 11, 12, 13),

von Pneumococci (Fig. 14).

Dunkelfeldaufnahmen.

chemotaktisch wirksamen Produkte zu beziehen ist. Figur 1 zeigt die kreisförmige unbeeinflusste Auswanderung der Leukocyten. Figur 2 zeigt die einseitige Anlockung durch Anbringen einer mit Pfeil bezeichneten Bakterienkultur. Figur 3 zeigt die Anlockung der Leukocyten durch zwei an gegenüberliegenden Seiten der Leukocyten angebrachte Bakterienkulturen. Eine derartig gelenkte Anhäufung der Leukocyten kann nur durch die chemotaktisch wirksamen Produkte der Bakterien und nicht durch zufällige andersartige Einwirkungen zustandekommen. Der gezeigte Versuch lässt sich bei entsprechender technischer Übung mit Sicherheit reproduzieren.

Es wurde für die Prüfung chemotaktischer Wirkung mit dieser Methode die Einführung der Substanz mit Hilfe von Glaskapillaren, die in den Hals der *Carrel*-Flasche gelegt werden, nicht verwandt. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass leicht Zerreissungen der oberen Plasmaschicht eintreten, in deren Gefolge Flüssigkeitsströmungen auftreten können, die die Leukocytenwanderung stören können. Auch ist bei der Kapillarmethode die Gefahr der Sekundärinfektion erheblich grösser.

#### Versuchsergebnisse.

Die Abbildungen 4—14 zeigen den Ausfall der chemotaktischen Prüfung mit einer Reihe von sterilen Plasmakulturfiltraten verschiedener Bakterien. Es handelt sich um Filtrate von *Streptococci*-, *Pneumococci*-, *Bact. coli*- und *B. prodigiosus*-Kulturen. Dieser Effekt der sterilen Kulturfiltrate entspricht der Wirkung der direkt auf das Plasma geimpften Bakterien. Gleichzeitig werden die Kontrollversuche mit Filtrat des unbeimpften, gleich lange bebrüteten Plasmas bzw. ohne Zusatz abgebildet. Diese geben keine chemotaktische Wirkung.

Das  $p_H$  der Plasmakulturfiltrate lag zwischen 6,5 und 7,8. Alle Kulturfiltrate wurden auch bei neutraler Reaktion mit gleichem Ergebnis geprüft. Um die Bedeutungslosigkeit der veränderten  $H$ -Ionen-Konzentration für die chemotaktische Wirkung weiter zu belegen, wurden verschiedene chemotaktisch positive Filtrate auf  $p_H$  5,4—8,4 gepuffert, in Intervallen von etwa 0,2  $p_H$ . In diesem  $p_H$ -Bereich wurde die chemotaktische Wirksamkeit der Filtrate nicht wesentlich beeinflusst. In allen Einzelversuchen wurde die Sterilität des aufgesetzten Tropfens durch direkte Beobachtung und durch Abimpfung kontrolliert. Für die Bewertung wurden nur solche Versuche verwandt, in denen alle Kontrollen auf Sterilität einwandfrei waren.

Es darf somit aus diesen Versuchen geschlossen werden, dass Bakterien auf zellfreiem, körpereigenem Material Stoffe zu bilden imstande sind, die eine chemotaktische Wirkung besitzen.

Neben diesen chemotaktisch wirkenden Kulturfiltraten wurden auch eine Reihe von Filtraten erhalten, die keine chemotaktische Wirkung besaßen. Fehlende chemotaktische Wirkung kann dadurch vorgetäuscht werden, dass im Kulturfiltrat abstossend wirkende Produkte vorhanden sind. Für die übrigen negativen Ergebnisse ist wahrscheinlich eine zu kurze Wachstumszeit der Bakterien die Ursache des Fehlens chemotaktischer Wirksamkeit der Kulturfiltrate. Stellt man die Filtrate nach dem Zeitpunkt des Abtrennens von der Kultur zusammen, so ergibt sich deutlich ein Maximum an chemotaktischer Wirksamkeit, das bei den verschiedenen Bakterien variiert. Die lange Wachstumsdauer für die Erreichung des Maximums ist etwas auffallend, da bei direktem Aufimpfen von Bakterien bereits nach ca. 10—14 Stunden ein stark positiver Effekt zu erkennen ist. Worauf diese Erscheinung beruht, kann nicht gesagt werden. Möglicherweise ist nur die Konzentration im gesamten Kulturfiltrat bei kurzer Bebrütungsdauer zu klein, um nachgewiesen werden zu können.

Es wurde weiter versucht, die Natur dieser chemotaktisch wirkenden Produkte etwas näher zu charakterisieren. Zunächst wurde die Ultrafiltrierbarkeit geprüft. Nur in einem Versuch gelang es, ein Ultrafiltrat durch eine grobporeige Kollodiummembran zu erhalten, dessen Wirksamkeit angenähert derjenigen des Ausgangskulturfiltrates entsprach. In allen anderen Versuchen war das eiweißfreie Ultrafiltrat negativ, während in allen Versuchen der Ultrafilterrückstand erheblich an Wirksamkeit zunahm. Die chemotaktisch wirksame Substanz ist somit hochmolekular oder an eine grosse Molekel adsorbiert.

Diese Feststellungen über die Natur der Bakterienchemotaxine stehen in gewissem Gegensatz zu Angaben von *Menkin*<sup>1)</sup>, der aus künstlich erzeugten Pleuraergüssen eine von ihm Leukotaxin bezeichnete Substanz erhalten konnte, die nach seinen Angaben dialysabel ist und sowohl die Kapillardurchlässigkeit erhöht als die Leukocyten anlockt. Die von *Menkin* angeführten Befunde über die chemotaktische Wirksamkeit seiner Substanz scheinen wegen der angewandten Versuchsanordnung entsprechend den eingangs gemachten Erörterungen nicht voll beweiskräftig. Da *Menkin* angibt, dass seine als Leukotaxin bezeichnete Substanz dialysabel ist, ist sie mit der in den Plasmakulturfiltraten vorhandenen Substanz wahrscheinlich nicht identisch. Um ein noch etwas weitergehendes Urteil über diese Frage zu erhalten, wurden verschiedene Plasmakulturfiltrate auf die für die *Menkin*'sche Substanz charakteristische Permeabilität-erhöhende Wirkung geprüft. Dies geschieht so, dass der Eintritt von intravenös injiziertem Trypanblau in eine intrakutan

<sup>1)</sup> *Menkin, V.*, Dynamics of inflammation, New York, The Macmillan Comp., 1940.

Tabelle I.

Filtrat Nr.	Bakterien	Nährboden	Chemotaxis*)			Menkin**) Trypanblau-Reakt.			pH
			1. Prüf.	2. Prüf.	3. Prüf.	1. Prüf.	2. Prüf.	3. Prüf.	
F 145	Streptoc.	Hühnerplasma	+++			●	●	●	7,5
F 119	"	"	+++			●	●	●	7,5
F 243	"	"	+++			○	○	○	7,0
F 146	"	"	+++			●	●	●	7,0
F 273/8	Pneumoc.	"	+++	+++		○	○	○	6,5
F 273/10	B. Coli	"	+++	+++		○	○	○	6,8
F 273/12	B. Prodig.	"	+++	+++		○	○	○	6,5
F 177	Streptoc.	Rinderplasma	++	+++	+++	○	○	○	8,0
F 178	"	"	+++	+++	+++	○	○	○	7,2
F 179	Pneumoc.	"	+++	+++		○	○	○	8,0
F 180	Streptoc.	"	+++	+++		●	●	●	8,2
F 181	B. Coli	"	+++	+++	+++	●	●	●	8,5
F 241/4	Streptoc.	"	+++	+++		○	○	○	8,5
F 78	"	"	++	++		○	○	○	7,0
F 82/6	"	"	++	++		○	○	○	7,5
F 142/6	"	"	++	++		○	○	○	6,8
F 143	"	"	++			○	○	○	6,8
F 273/1	unbeimpft bebrütet	Hühnerplasma	—	—	—	●	●	●	7,2
F 273/2	unbeimpft bebrütet	"	—	—	—	●	●	●	6,5
—	unbeimpft unbebrütet	"	—	—	—	●	●	●	7,5
—	unbeimpft unbebrütet	Thyrode	—	—	—	●	●	●	7,0-7,5

\*) Drei Kreuze bedeuten maximale chemotaktische Anlockung.

\*\*) Ausgefüllter schwarzer Kreis bedeutet voll positive Trypanblau-Reaktion; bei Ausfüllung von Sektorten entsprechend geringere Reaktionsstärke; leerer Kreis negative Trypanblau-Reaktion.

gesetzte Quaddel des zu prüfenden Präparates festgestellt wird. Es zeigte sich nun bei der Prüfung einer grossen Zahl von chemotaktisch positiven und negativen Kulturfiltraten keine Parallelität zwischen der chemotaktischen Wirksamkeit *in vitro* und der Permeabilität-beeinflussenden Wirkung. Es liess sich die von *Menkin* beschriebene Kapillarpermeabilität-steigernde Wirkung auch an Kulturfiltraten finden, doch zeigt die Tabelle I, dass in chemotaktisch positiven Filtraten der Permeabilität-steigernde Faktor meist nicht nachweisbar ist. Aus den bisherigen Befunden gewinnt man sogar den Eindruck, dass ein Permeabilität-steigernder Faktor in höherem Prozentsatz in chemotaktisch negativen oder sogar in abstossend auf die Leukozyten wirkenden Filtraten vorhanden ist.

### Zusammenfassung.

Der Nachweis spezifischer Chemotaxine der Bakterien lässt sich auf Grund von Tierversuchen nicht klären, da keine sichere Trennung zwischen chemotaktisch wirksamen Produkten der Bakterien und solchen aus dem geschädigten Gewebe entstehenden Stoffen, dem Einfluss der  $p_H$ -Änderung, allgemeiner Änderung der physikalisch-chemischen Struktur des Gewebes und dem Einfluss der geänderten Blutzirkulation möglich ist. Die Prüfung auf spezifische chemotaktische Wirksamkeit muss aus diesem Grunde *in vitro* unter Ausschluss der störenden Faktoren erfolgen.

Durch den Nachweis chemotaktischer Wirksamkeit an Bakterienprodukten, die durch Züchtung von Bakterien auf künstlichem Nährboden gewonnen werden, kann auch dann, wenn die Prüfung auf chemotaktische Wirksamkeit *in vitro* erfolgt, nicht der Beweis erbracht werden, dass diese Produkte unter den Bedingungen des tierischen Organismus entstehen und eine Rolle spielen.

Es wurde nun der Nachweis erbracht, dass nach Züchtung von Bakterien auf tierischem Plasma von den Bakterien durch sterile Filtration abtrennbare Stoffe entstehen, die *in vitro* bei physiologischem  $p_H$  starke chemotaktische Wirkung zeigen.

Die Stoffe, welche Träger dieser Wirkung sind, sind entweder hochmolekular oder an einen hochmolekularen Träger adsorbiert. Sie sind bis zu einem gewissen Grade thermostabil.

Die aus solchen Plasmakulturen erhaltenen chemotaktisch wirksamen Stoffe erweisen sich als nicht gleichartig mit dem von *Menkin* beschriebenen, die Kapillarpermeabilität-steigernden Stoffen („Leukotaxin“), der von diesem Autor aus künstlichen Exsudaten erhalten wurde.