

TRANSACTIONS OF THE SIXTH CONGRESS OF THE
**EUROPEAN SOCIETY OF
HAEMATOLOGY**

COMPTES RENDUS DU 6^E CONGRÈS DE LA SOCIÉTÉ
EUROPÉENNE D'HÉMATOLOGIE

VERHANDLUNGEN DES 6. KONGRESSES
DER EUROPÄISCHEN
GESELLSCHAFT FÜR HAEMATOLOGIE

COPENHAGEN 1957

Editor-in-Chief:

Aa. **VIDEBAEK**

Copenhagen

Editors:

J. BERNARD

Paris

E. NEUMARK

London

H. SCHUBOTHE

Freiburg i. Br.

Assistant Editor:

H. LÜDIN

Basel

Part I

PRINCIPAL PAPERS — RAPPORTS PRINCIPAUX — HAUPTREFERATE

Published simultaneously as / Parait simultanément comme / Erscheint gleichzeitig als

ACTA HAEMATOLOGICA Vol. 20, No. 1-4 (1958)

Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es auch nicht gestattet, diesen Band oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.



Copyright 1958 by S. Karger AG, Basel

Printed in Switzerland by Buchdruckerei National-Zeitung AG, Basel
Clichés: Abereg-Steiner & Cie., AG, Bern, und Steiner & Cie., AG, Basel

Index

The numbers in parentheses correspond with the consecutive numbering of papers in the "Book of Abstracts".
All *Short Papers* have been published in a Supplementary Volume.

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux numéros continus des rapports se trouvant dans le «Book of Abstracts». Toutes les *communications* paraissent dans un volume supplémentaire.

Die Zahlen in Klammern entsprechen den fortlaufenden Nummern der Vorträge im «Book of Abstracts». Sämtliche *Kurzreferate* sind in einem Supplementband zusammengefaßt.

PRINCIPAL PAPERS · RAPPORTS PRINCIPAUX · HAUPTREFERATE

(1)	FAGRAEUS, A. (Stockholm)	Cellular Reaction in Antibody Formation . . .	1
(2)	WUNDERLY, CH. (Zürich)	Zur klinischen Chemie der Proteide im normalen und krankhaft veränderten Blutserum . . .	9
(3)	HARBOE, N. M. G. (Copenhagen)	On Myelomatosis	27
(4)	WALDENSTRÖM, J. (Malmö)	Macroglobulinaemia	33
(51)	GALTON, D. A. G. (London)	The Present Status of Chemotherapy in Leukaemia	40
(52)	COURT-BROWN, W. M. (Edinburgh)	Radiation Leukaemogenesis in Man . . .	44
(53)	GRAFFI, A. (Berlin-Buch)	Zur Virusätiologie verschiedener Mäuseleukämien	49
(55)	ROHR, K. (Zürich)	Der Formenkreis des Myelofibrose-Syndroms . . .	63
(123)	CLIFFTON, E. E. (New York, N. Y.)	Physiological Mechanisms of Fibrinolysis. . .	76
(124)	STEFANINI, M. (Boston, Mass.)	Fibrinolysis as Mechanism of Hemorrhagic Tendency	85
(147)	DEUTSCH, E. und FUCHS, H. (Wien)	Natürlich vorkommende Koagulationsinhibitoren	97
(159)	QUICK, A. J. (Milwaukee, Wisc.)	Fundamental Aspects of Hemophilia . . .	115
(160)	BIGGS, R. and MACFARLANE, R. G. (Oxford)	Diagnosis of the Haemophiloid States . . .	118
(161)	BRINKHOUTS, K. M. (Chapel Hill, N. C.)	Physiopathology of Hemophilia	125
(184)	DACIE, J. V. (London)	Auto-Immune Haemolytic Anaemias . . .	131
(186)	DAUSSET, J. et COLOMBANI, J. (Paris)	Etude statistique et pronostique de 100 cas d'anémie hémolytique immunologique . .	137

(204)	SPRINGER, G. F. (Philadelphia, Pa.)	Relation of Blood Group Active Plant Substances to Human Blood Groups	147
(216)	DAUSSET, J. (Paris)	Iso-leuco-anticorps	156
(217)	MOESCHLIN, S. (Solothurn)	Leukocyte-Autoantibodies	167
(218)	BRECHER, G.; CRONKITE, E. P.; BOND, V. P. and DUTCHER, T. F. (Upton, N.Y.)	Problems of Leucocyte Transfusions	179
(230)	DAUSSET, J. (Paris)	Les Thrombo-Anticorps	185
(234)	STEFANINI, M. and MELE, R. H. (Boston, Mass.)	The Significance of Platelet Antibodies	195
(235)	STEFFEN, C. (Wien)	Untersuchungen über Eigenschaften, Isolierung und pathogenetische Bedeutung von Autoantikörpern	201
(249)	DISCOMBE, G. (London)	Non-Haemolytic Transfusion Reactions	210
(250)	LEWISOHN, R. (New York, N. Y.)	The Citrate Method of Blood Transfusion in Retrospect	215
(251)	WIGAND, H. (Saarbrücken)	Klinische Untersuchungen über nichthämolytische Transfusionsstörungen, Transfusionsallergie und Serumgruppen	218
(252)	JAMES, J. D. (London)	Control of Contamination of Transfusion Blood	221
(261)	NEIMANN-SØRENSEN, A. (Copenhagen)	Blood Groups of Animals in Relation to Human Blood Groups	225
(262)	KIDDY, C. A.; STONE, W. H.; TYLER, W. J. and CASIDA, L. E. (Madison, Wisc.)	Immunological Studies on Fertility and Sterility	236
(265)	GRUBB, R. (Lund)	Interactions between Rheumatoid Arthritic Sera and Human Gamma-Globulin	246
(272)	WEDGWOOD, R. J. and PILLEMER, L. (Cleveland, Ohio)	The Nature and Interactions of the Properdin System	253
(283)	SOULIER, J. P. et MÉNACHÉ, D. (Paris)	Variations pathologiques du complément et de la properdine chez l'homme	260
(290)	NELSON, R. A., JR. (New Haven, Conn.)	An Alternative Hypothesis for the "Properdin System"	275

Subjects- and authors-index of the *Principal Papers* is to be found at the end of Part 2 of the *Transactions (Short Papers)*.

Le répertoire et la liste alphabétique des auteurs des *Rapports Principaux* se trouvent à la fin de la deuxième partie des *Comptes Rendus (Communications)*.

Sach- und Autorenregister der *Hauptreferate* befinden sich am Ende von Teil 2 der *Verhandlungen (Kurzreferate)*.

Statens bakteriologiska laboratorium, Stockholm, Sweden

Cellular Reaction in Antibody Formation

BY ASTRID FAGRAEUS

During the last two decades, the study of antibody formation, that is to say of the mechanism and site of antibody synthesis, has resulted in a very extensive literature, which I can now discuss only in part. Cytologists, immunologists and chemists have tackled the problem from different aspects, but it is to be regretted that there has not been more cooperation between the specialists. The impression is often conveyed that the approach has thus been too narrow.

In studies on the organs and cells responsible for antibody production, one or more of the following methods have been used:

1. Extraction of organs or cell suspensions.
2. Culture *in vitro* of organ fragments or cell suspensions.
3. Transfer of fragments or cells, lately in particular to irradiated or cortisone-treated animals.
4. Histochemical staining as suggested by Coons. This is no doubt the most specific and elegant method. It consists of carrying out a two stage immunological reaction on frozen sections of tissues: a) allowing reaction between antibody in the tissue and dilute antigen applied *in vitro*, and b) the detection of those areas where this antigen has been specifically absorbed by means of a precipitin reaction carried out with fluorescein-labelled antibody. Examination under the fluorescence microscope reveals the yellow-green fluorescence of fluorescein over those areas where a precipitate has formed¹.
5. Absorption studies using the ultraviolet wave-length (2500-2800 Å).

Numerous investigations have shown that it depends on the mode of administration and on the form in which antigen is administered which organ will produce antibodies. The site of antibody production is closely associated with the site of antigen uptake. It has been shown by one or more of the methods just mentioned that antibodies may be produced in the spleen, the lymph nodes and the bone marrow, and also in the subcutaneous or intracutaneous nodules, especially if the antigen is injected in an adjuvant². In addition, the results obtained by transfer of cells to recipient animals seem to indicate that after subcutaneous or intraperitoneal injection

1 Acta haemat., Vol. 20, No. 1-4 (1958)

tion thymus cells (³ and own experiments) are capable of producing small amounts of antibody. The liver, so rich in phagocytizing reticulo-endothelial cells, seems to take very little part, if any, in antibody formation.

Before discussing the question of which cells produce antibodies we must make clear the import of the term "antibody formation process". The latter results in the synthesis and occurrence of specified gamma-globulin. This is, however, the last stage in a series of processes, beginning with the phagocytosis of administered antigen. The first phase, the antigenic or assimilating phase, also includes the breakdown of the antigen. This phase is sensitive to X-ray and cortisone (it has been shown by many investigators that such treatment has a depressing effect only when given before the administration of antigen). Once antibody synthesis has commenced, the same doses of X-ray and cortisone do not influence the process. This observation may be regarded as evidence in favour of the view that two different cellular systems are involved in antibody formation.

As regards antibody globulin synthesis, various cells have been credited with a role in this process. After two decades of experimentation, interest has been focussed on three different kinds of cell: the macrophages, the lymphocytes and the plasma cells, the last-mentioned two types being mostly studied.

In the investigations on macrophages the hypothesis has been readopted that the same cells that resorb the antigen also produce antibodies against it. In *Roberts'* experiments⁴ an amount of killed typhoid bacteria comparable to a full immunizing dose was phagocytized *in vitro*. Nonetheless these cells were unable to produce antibodies *in vitro* or if transferred to the same or a homologous animal. Intraperitoneal injection of antigen into an animal in which a macrophage exudate had been produced did not yield any extractable antibodies in the macrophages. On the basis of these and other experiments, *Roberts* called his paper "The failure of macrophages to produce antibodies". The same conclusion was drawn by *Coons et al.*¹ *Hartley*⁵ suggested that the predominating cells in subcutaneous aluminium phosphate nodules, the macrophages, were the source of the antibodies which he was able to extract from this tissue, but *Coons et al.*¹ did not detect any antibodies in the macrophages surrounding the nodule which develops at the site of injection of antigen when precipitated with aluminium phosphate or incorporated in *Freund's* adjuvant⁶. They observed nothing, either, to prove that antibodies are produced by the epitheloid cells known to appear around the nodules if acid fast bacteria are added to the *Freund* adjuvant. The antibody formation capacity observed by *Askonas* and *Humphrey*⁷ in slices of such granulomata, may be ascribed to the immature plasma cells present in these foci (⁸ and own observations).

There is thus little evidence for the participation of the macrophages in the synthesis of antibody globulin. Their role is to phagocytize the antigen and probably also to break it down, a process that may be sensitive to the influence of cortisone. It has been shown that after cortisone treatment particulate antigen remains undissolved in the macrophages for a long time.

As to the relation of the lymphocytes to antibody formation, this has been especially studied by the *Harris* group in Philadelphia and by *Dixon et al.* *Ehrlich*

and Harris⁹ were able to extract more antibodies from the lymphocytes derived from an antibody-producing lymph node than from the lymph fluid. These results were not, however confirmed by Habel et al.¹⁰. Harris and Harris¹¹ succeeded in provoking antibody formation in normal recipients of lymph node cell suspensions. Wesslén¹², like Chase¹³, was able to transfer tuberculin hypersensitivity using lymph cell suspension. He employed, however, a purer cell suspension than other workers namely the lymph cells from the thoracic duct. These cells also produced antibodies *in vitro*, although the amount was rather small in comparison with the yield obtainable with other cell suspensions. In a histochemical study of the lymph node regional to the site where antigen was injected, Harris and Harris¹⁴ observed intense and diffuse hyperplasia of the cortex and transition of the reticulum cells to young lymphocytes and finally to more mature lymphocytes. Parallel to this development a pyroninophilic substance occurred in increasing amounts, indicating an increase of ribonucleic acid in the cells. Ringertz and Adamsson³⁴ observed the same lymphocytic, as well as a pronounced plasmocytic, reaction in the lymph node after antigen stimulation and suggested that the large number of immature lymphocytes occurring under the influence of antigen are converted into antibody producing plasma cells instead of developing into mature lymphocytes. Coons et al.¹⁵ studied the primary and secondary responses in the lymph node under the same conditions, broadly speaking, as Harris and Harris. After antigen injection antibody could first be demonstrated in the cytoplasm of large immature cells in the medullary area in the lymph node. Morphologically these cells were typical haematological stem cells. When these cells multiplied and grew, the concentration of antibody increased and colonies of typical plasma cells appeared. "Occasionally antibody was found in typical blast cells at the center of the follicles in the cortex and also in small amounts in association with small cells, probably lymphocytes." Many transfer experiments have been reported which seem to suggest that one or the other type of cell produces antibodies in the recipient. This method has been employed in particular by Harris' research group^{11, 16, 17} and by Dixon et al. (¹⁸⁻²⁰). Both these groups used irradiated recipients in order to depress antibody formation by the cells of the recipient. They also both used lymph node cell suspensions, with a lymphocyte percentage varying between 85 and 99. Harris and Harris incubated the cells with soluble antigenic material, Dixon et al. established the cell-antigen contact within the recipient (table I). By this method the Dixon group observed the same antibody-forming capacity in lymphocytes and macrophages¹⁹. Harris and Harris obtained antibodies only when they used lymphocytes. The question remains, however, whether antibodies are produced only by the cells transferred. According to the results previously cited, macrophages are not likely to form antibodies. Dixon's experiment²⁰, in which cells injected into newborn animals failed to respond to antigenic stimulus, speaks in favour of the conclusion that some kind of cooperation between the injected cells and the cells of the recipient is necessary other than nutritional cooperation. It is well known, for instance from Jacobsson's work, that cells of the type used in Dixon's experiments are capable of neutralizing the irradiation effect (table II)²¹⁻²³.

Fagraeus, Cellular Reaction in Antibody Formation

Table I
Transfer Experiments

Authors	Transferred cells	Antigen	Antigen contact	Recipient irradiated	Antibodies appearing in recipient
<i>Harris et al.</i>	Lymph node cells	Soluble material Shigella paradys.	<i>in vitro</i>	+	+
<i>Harris et al.</i>	Blood leucocytes	"	<i>in vitro</i>	+	+
<i>Harris et al.</i>	Peritoneal exudate cells	"	<i>in vitro</i>	+	-
<i>Harris et al.</i>	Lymph node cells	"	<i>in vitro</i>	preimmunized with homolog. leucocytes	-
<i>Roberts and Dixon</i>	Sensitized lymph node cells	Bovine gamma globulin or bovine serum albumin	<i>in vitro</i> in recipient	+	- +
<i>Roberts and Dixon</i>	Sensitized thymus cells	"	in recipient	+	(+)
<i>Roberts and Dixon</i>	Normal lymph node cells	"	in recipient	+	-
<i>Dixon et al.</i>	Sensitized peritoneal exudate cells (macrophages)	Bovine gamma globulin or bovine serum albumin	in recipient	+	+
<i>Dixon et al.</i>	Irradiat. sensitized lymph node cells	"	in recipient	+	-
<i>Dixon et al.</i>	Irradiat. sensitized lymph node cells	"	in recipient	-	+
<i>Dixon et al.</i>	Sensitized lymph node cells	"	in recipient	neonatal recipient	-

Table II
Antibody Restoration Experiments

Authors	Transferred cells or shielded organ	Antigen injected	Exp. animal	Treated with	Antibody formation restored
<i>Jacobson and Robson</i>	Spleen shielded	Sheep red cells	Rabbit	X-ray	+
<i>Jaroslow and Taliaferro</i>	Spleen cells	Sheep red cells	Rabbit	X-ray	+
	Spleen extracts				+
	Mouse spleen extract				+
	Hela cells: suspension or extracts				+
	Yeast autolysate				+
<i>Berglund and Fagraeus</i>	Spleen cells	Sheep red cells	Rat	Cortisone	+
	Thymus cells Disintegrated spleen cells				+ -

In contrast to the lymphocytic theory the plasmacellular theory is based on certain fundamental observations from human pathology. In a number of papers dating almost 20 years back, *Bing*²⁴, *Rohr*²⁵ and *Markoff*²⁶ pointed out that in certain diseases there is an evident correlation between a high serum globulin level and an increased amount of plasma cell in the bone marrow. The recent observation that plasma cells are lacking in agammaglobulinaemia also points at this cell as the source of gamma globulin. It is especially the observations of *Bing* that have inspired Scandinavian workers in this field, for instance *Bjørneboe* and *Gormsen*, and also myself. *Bjørneboe* and *Gormsen*²⁷ found that in hyperimmunized rabbits in which the total amount of gamma globulin sometimes consisted of antibodies alone, there was an enormous increase in plasma cells in different organs particularly in the spleen. Furthermore, from the adipose tissue of the renal sinus with cell infiltrations out of which 90 % were plasma cells they extracted proportionally more antibody globulin than from any other organ²⁸.

When using the secondary response in rabbits, I was able to follow the reaction of the spleen to one single booster injection, the antigen being *S. typhi* or horse serum²⁹. Later I have repeated the experiments using diphtheria toxoids and guinea-pig. Before the serum titre had begun to rise, a proliferation of large reticulum cells with pyronine-staining cytoplasm and an a conspicuous nuclear structure was

observable in the red pulp of the spleen, and parallel with the rise in titre, an increase in the number of these cells and a development in the direction of typical plasma cells occurred. Tissue culture experiments showed that pieces of the red pulp where these cells appeared were very much superior to the lymphocyte-containing follicles in regard of capacity to produce antibodies *in vitro*. The amount of antibody formed in the cultures correlated positively with the number of plasma cells present in the fragment cultured, especially with the number of immature plasma cells. The further differentiation of the immature plasma cell to mature plasma cell always brought about a drop in titre in the cultures. This is shown in fig. 1. The upper curve shows the additional contribution of antibodies for each

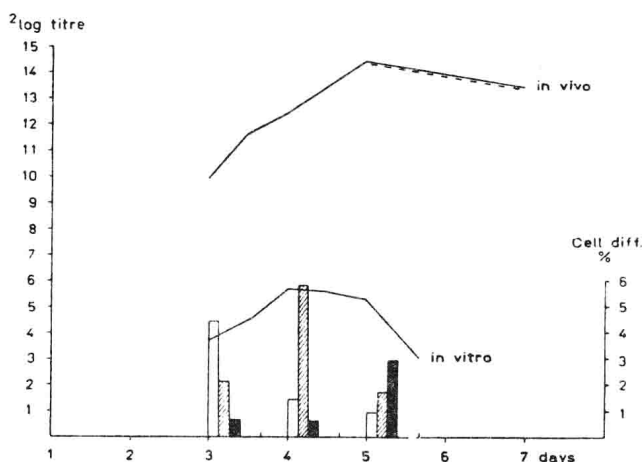


Fig. 1. Antibody production *in vitro* at 12-hour-intervals by splenic pieces (amount of tissue 0.4–0.5 mg in 0.3 ml medium). New cultures were started on 3rd, 4th and 5th day respectively. The columns indicate the amount of plasmacellular elements in the tissue when cultured.

- transitional cells
- ▨ immature plasma cells
- mature plasma cells

The *in vivo* titre curve shows the additional contribution of antibodies (for each 12-hour-period) in the serum of the rabbit, from which the spleen fragments were taken. The animal was killed on the 5th day but the titre curve continued as if an increase by 100% would have occurred on day 7, the maximal increase observed.

12-hour-period in the serum of the rabbit from which the spleen was taken and cultured. The animal was killed on the 5th day, but the curve is continued as if an increase by 100% would have occurred on the 7th day, representing the maximal increase that could be expected to occur. The two curves, one representing antibody formation *in vivo* – the other the antibody-producing capacity of the spleen tissue *in vitro*, coincide, broadly speaking.

These observations have been confirmed by Keuning et al.³⁰, who cultured at least 10 times more tissue material, and thus obtained higher titres. They also

observed some antibody production in the white pulp fragments, but in their experiments, too, the red pulp which contained plasma cells was much more active. In hyperimmunized animals *Coons* et al.¹ detected antibody in plasma cells in the red pulp of the spleen. Small amounts of antibody were occasionally observed in cells in the lymphoid follicles.

These experiments seem to indicate that antibody formation commences in undifferentiated cells. The reticulum cells are activated under the direct or indirect influence of the antigen and thus the production of antibody is started. In *Coons'* experiments antibody globulin was first demonstrable in large immature cells resembling haematological stem cells – the cell type I have called transitional cell. Others call it plasmoblast. In my experiments most but not all of these cells developed into immature plasma cells, and as far as could be judged from the titres in the tissue cultures this cell type was the most active. *Coons* observed a high content of antibody globulin immature plasma cells. It is also possible to extract antibodies from tissues containing these cells, but fragments with predominantly mature cells release relatively small amounts of antibody in tissue culture. The assumption that the immature plasma cell is the most active antibody producer has found support in studies using ultraviolet spectrography^{31, 32}. Like other intensely protein-forming cells, the members of the plasma cell family showed a high content of nucleic acids, the immature plasma cell containing the largest amount.

Much evidence has thus accumulated suggesting that elements belonging to the plasma cell family are actively involved in antibody production. It is perhaps, confusing that results have also been obtained which speak in favour of the lymphocyte as the cellular source of antibodies. This confusion may, however, partly be due to nomenclature. The lymphoblast of *Harris*, the acute splenic tumor cell of *Rich*³³, the plasmoblast of *Coons* and the transitional cell are most probably all one and the same thing.

Another possible explanation is the existence of a family relationship between the two types of cell. I think especially of *Ringertz'* suggestion that the immature lymphoblast in the stimulated lymph node could be the precursor of an antibody-producing cell and develop into a plasma cell³⁴. The immature plasma cell stage is to me the morphological manifestation of a cell at the point of maximal antibody formation. The mature plasma cell is the end product in a chain development, a cell which has already passed the stage of its highest functional intensity. The possibility cannot be excluded that the mature lymphocyte may represent the final stage in a less intense antibody formation process. But to me it seems unlikely that such an active globulin synthesis as is reflected in the occurrence of antibodies could be going on in the mature, small lymphocytes. They do not have the general appearance of protein forming cells.

Finally I once more want to stress the probability that antibody production commences in young or undifferentiated cells, not in plasma cells or mature lymphocytes present in the body before the injection of antigen.

References

1. Coons, A.H.; Leduc, E.H. and Connolly, J.M.: J. exp. Med. 102: 49 (1955).
2. For review of literature see: Fagraeus, A.: Acta med. scand. suppl. 204 (1948).
3. Hale, W.M. and Stoner, R.D.: Yale J. Biol. Med. 26: 46 (1953).
4. Roberts, K.B.: Brit. J. exp. Path. 36: 199 (1955).
5. Hartley, G.: J. infect. Dis. 66: 44 (1940).
6. White, R.; Coons, A.H. and Connolly, J.M.: J. exp. Med. 102: 73, 83 (1955).
7. Askonas, B.A. and Humphrey, J.H.: Proc. biochem. Soc. in: Biochem. J. 60: X (1955).
8. Cavanagh, J.B.: Guy's Hosp. Rep. 105: 39 (1956).
9. Ehrlich, W.E. and Harris, T.N.: J. exp. Med. 76: 335 (1942).
10. Habel, K.; Endicott, K.M.; Bell, J.F. and Spear, F.: J. Immunol. 61: 131 (1949).
11. Harris, S.; Harris, T.N. and Farber, M.B.: J. Immunol. 72: 148 (1954).
12. Wesslén, T.: Acta derm. venereol. 32: 265-273 (1952).
13. Chase, M.W.: Fed. Proc. 10: 404 (1951).
14. Harris, T.N. and Harris, S.: Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 69: 18 (1948).
15. Leduc, E.H.; Coons, A.H. and Connolly, J.M.: J. exp. Med. 102: 61 (1955).
16. Harris, S.; Harris, T.N.; Ogburn, C.A. and Farber, M.B.: J. exp. Med. 104: 645 (1956).
17. Harris, T.N.; Harris, S. and Farber, M.B.: Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 95: 26 (1957).
18. Roberts, J.C. and Dixon, Fr.J.: J. exp. Med. 102: 379 (1955).
19. Dixon, Fr.J.; Weigle, W.O. and Roberts, J.C.: J. exp. Med. 105: 417 (1957).
20. Id.: J. exp. Med. 105: 75 (1957).
21. Jacobson, L.O.; Robson, M.J. and Marks, E.K.: Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 75: 145 (1950).
22. Jacobsen, B.N. and Taliaferro, W.H.: J. infect. Dis. 98: 75 (1956).
23. Berglund, K. and Fagraeus, A.: Nature, Lond. 177: 233 (1956).
24. Bing, J.: Acta med. scand. 103: 547 (1940).
25. Rohr, K.: Das menschliche Knochenmark (Thieme, Leipzig 1940).
26. Markoff, N.: Dtsch. Arch. klin. Med. 180: 530 (1937).
27. Bjørneboe, M. and Gormsen, H.: Acta path. microbiol. scand. 20: 649 (1943).
28. Bjørneboe, M.; Gormsen, H. and Lundquist, Fr.: J. Immunol. 55: 121 (1947).
29. Fagraeus, A.: J. Immunol. 58: 1-13 (1948).
30. Keuning, F.J. and van der Slikke, L.B.: J. Lab. clin. Med. 36: 167 (1950).
31. Bing, J.; Fagraeus, A. and Thorell, B.: Acta. physiol. scand. 10: 282 (1945).
32. Fagraeus, A. and Thorell, B.: cit. Behringwerk-Mitteilungen Heft 30 (1955).
33. Rich, A.R.; Lewis, M.R. and Wintrobe, M.M.: Bull. Johns Hopk. Hosp. 65: 311 (1939).
34. Ringertz, N. and Adamsson, C.A.: Acta path. microbiol. scand. suppl. 86 (1950).

Zur klinischen Chemie der Proteide im normalen und krankhaft veränderten Blutserum

VON CH. WUNDERLY

Die Aussalzungsverfahren, welche auf die Schule von *Sørensen* zurückgehen, sowie die Elektrophorese in der Ausführungsform von *Tiselius* haben der klinischen Eiweißchemie die Basis gegeben. Frühere empirische Tests, mit welchen man zumeist die Labilität der kolloiden Bestandteile des Blutserums prüfte, wurden durch Messungen mit quantitativen Angaben der Proteinfractionen ersetzt. Für Reihenuntersuchungen der täglichen klinischen Routine war der Arbeitsaufwand freilich noch groß. Deshalb wurden frühzeitig Bluteiweißreaktionen entwickelt, deren Ergebnisse eine gewisse Gesetzmäßigkeit mit der Zusammensetzung der Serumproteine zeigten. Da die letztere ein Mehrkomponentensystem darstellt, so zeigte die Erfahrung, daß eine einzelne Reaktion keine ausreichende Differenzierung gestattete. In der Folge wurde begonnen, entsprechende Reaktionsgruppen auszuwerten. Diese wurden so zusammengestellt, daß ihre Reaktionsbereitschaft für gewisse Proteinzusammensetzungen möglichst verschieden ist. Um eine breite Anwendung zu erzielen, war es wichtig, eine begrenzte Auswahl unter den vielen Reaktionen zu treffen und diese dem Verwendungszweck anzupassen. In dieser Absicht vereinigte *Linke*¹ das Weltmann-Band² (Hitzekoagulation, W. Bd.), die Eiweiß-Zentrifugier-Reaktion³, S. 39, und die Formol-Gel-Reaktion³, S. 59. Um auch das humorale Blutbild in den Kreis der Betrachtungen zu ziehen, wird bei dieser Reaktionsgruppe, wie auch den folgenden, jeweils die Blutsenkungsreaktion (BSR) herangezogen. 1949 zeigten wir⁴, wie die Kombination von zwei Labilitätsreaktionen, der Cadmium-Reaktion⁵ und dem Weltmann-Band, Beziehungen ergibt zur Zusammensetzung des Serumproteins (Tab. I). In dieser einfachen Reaktionskombination ist somit das ganze Spektrum der Serumeiweiß-Fractionen mitenthalten. Die Aufschlüsselung in 6 Labilitätstypen betrachtete man damals als die ausschließliche Folge von Verschiebungen im Proteingefüge des Patientenserums. Noch war das Wissen von den Proteiden zu unbestimmt, um ihren Einfluß

Tabelle I

Reaktionenkombination nach *Wuhrmann-Wunderly*⁵

Weltmann-Band		Cadmium-Reaktion	
Röhrchen mit Flockulation	Bandlänge	positiv	negativ
0-4	verkürzt	α -Globuline vermehrt	β_1 -Globuline vermehrt
5-7	normal od. stumm	β_2 - oder α - und γ -Globuline vermehrt	normale Serumproteinzusammensetzung od. β_1 - und γ -Globuline vermehrt
7 $\frac{1}{2}$ -10	verlängert	γ -Globuline vermehrt	in einzelnen Fällen γ -Globuline vermehrt

auf die Labilitätsreaktionen abzuschätzen. Die entscheidende Erweiterung auf die Proteide brachte die Papierelektrophorese. Wiederum waren es nordische Forscher, welche die Färbetechnik erstmals beschrieben haben; *Svahn*⁶ gab sie für die Lipoproteide (Sudanschwarz) und *Köiv* und *Grönwall*⁷ für die Glukoproteide (Schiffisches Reagens nach *Hotchkiss*). Obwohl die Ergebnisse in ihrem Genauigkeitsanspruch nicht mit mikroanalytischen Verfahren vergleichbar sind, haben sie auf Grund ihrer breiten Anwendung dennoch wertvolle Fortschritte ermöglicht.

Die erwähnte Ausdehnung der klinisch-chemischen Analytik auf neue chemische Stoffgruppen war um so bedeutungsvoller, als man mittlerweile erkannt hatte, daß die Eiweißzusammensetzung allein (so wie sie etwa die Papierelektrophorese liefert) die Labilitätsteste nicht zu ersetzen vermag. Dieser Standpunkt wurde erstmals von *Jayle* u. Mitarb.^{8, 9, 14} ausgesprochen. Sie empfehlen als «Méthodes d'écran»: die BSR; Gesamtprotein (Biuretmethode); γ -Globulin-Bestimmung (Reaktionen von *Popper* und *Huerga*³, S. 21 und von *Kunkel*³, S. 45); Serum-mukoid im α_2 -Globulin (Haptoglobinbestimmung³, S. 137); Lipoproteide im β_1 -Globulin (Phenoltest nach *Kunkel*³, S. 138). Man bemerkt darin das Interesse für die Gehalte der Proteide. In der Tat ist oft bei gestörter Leberfunktion, bei Malignom, aktiver Tuberkulose, Silikosen sowie gewissen rheumatischen Erkrankungen das elektrophoretische Eiweißprofil nicht in charakteristischer Weise verändert. Damit erklärt sich für weite Gebiete der klinischen Medizin die Forderung nach einfachen Laboratoriumstesten, welche insbesondere Veränderungen im Gehalte von Proteiden erkennen lassen. Auf diese Weise werden Verlaufsquerschnitte möglich, welche für die Entwicklung einer Erkrankung, der Differenzierung von Grundkrankheit und nebenher ablaufender Erkrankung sowie dem Erfolg einer Therapie oft die zuverlässigere Deutung gestatten. Dabei vermag der Kundige, wenn die Resultate der Triage-Reaktionen (screening methods) vorliegen, diese noch durch Tests zu ergänzen, welche weiteren Einblick in der gewünschten Richtung gewähren. Es ist der Zweck vorliegender Ausführungen, auf einige spezielle Fragestellungen

einzugehen und zu zeigen, wie die moderne Serodiagnostik entsprechend dem Krankheitsgebiet eine Auswahl von Reaktionsgruppen trifft, welche die Serumproteide stark berücksichtigt.

1. Arteriosklerose

Da die Arteriosklerose diagnostisch große Schwierigkeiten bietet, begegnen Verfahren zur Verbesserung ihrer Serodiagnostik besonderem Interesse. Dies um so mehr, solange man für den ungleich wichtigeren Gefäßfaktor keinen zuverlässigen Meßwert besitzt. Es handelt sich hier um den Zustand der Gefäßwand, von welchem der Gefäßinnendruck, der Gefäßwanddruck sowie Änderungen der Filtrationskapazität abhängen. Ebenso schwierig zu verfolgen sind die Reaktionen der Intimagewebe auf die eingefilterten Substanzen, da diese Vorgänge von der chemischen Zusammensetzung der Grundsubstanz des Gewebes abhängig sind.

Die Serumanalyse normaler Individuen verschiedener Lebensalter ergibt mit fortschreitendem Alter eine Zunahme der Lipoproteide B, welche bei der Papierelektrophorese etwa an die Stelle des β -Globulins wandern. Die elektrophoretische Wanderung ist klein, weil etwa 40 % aus Neutralfett besteht, das an der Stromleitung nicht teilnimmt. Es liegt in Komplexverbindungen vor, mit Cholesterin und mit Phospholipoiden, welche etwa im Verhältnis 2:1 vorhanden sind. Gegenüber Papier als Trägersubstanz für die Elektrophorese, besitzt Stärke für die Lipoproteidkomplexe keine nennenswerte Adsorption; dadurch gelang es, im *Stärkeblock*²⁷ das Lipoproteid in mehrere Gipfel aufzutrennen. Im Agargel wandert diese Lipoproteidkomponente bis in den Bereich des α_2 -Globulins und beweist damit ihre chemische Unabhängigkeit vom β -Globulin (vgl. Uriel, Grabar und Wunderly²⁸).

Im Papierstreifen findet sich, eng angelehnt an die sogenannte Lipoproteidkomponente B die sogenannte «Schleppe» (Abb.1). Sie enthält die Chylomi-

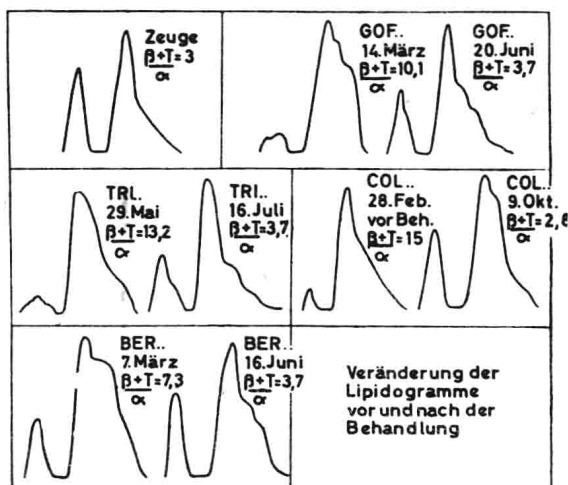


Abb.1. Veränderungen der Lipidogramme (Papierelektrophorese) vor und nach Behandlung (Gautier et al. ³⁶).

kronen und besteht aus etwa 55 % Neutralfett⁶. Bei Patienten mit Coronarsklerose und Diabetikern ist dieser Abschnitt (mit C bezeichnet) oft beträchtlich erhöht. Etwa $\frac{1}{4}$ der gesamten Lipide wandert im Bereich von Albumin und α -Globulin (A); in ihnen sind Phospholipoid und Cholesterin etwa im Verhältnis von 1:1 enthalten. Die labilen Bindungen dieser Lipoidkomplexe ändern bei Störungen des Fettstoffwechsels ihr gegenseitiges Verhältnis und dadurch ihr elektrophoretisches Verhalten. Als Beispiel für die normale Altersstufung der Lipoproteidkomponenten A, B und C geben wir in Tab. II die Mittelwerte der ausgedehnten Untersuchungen von *Tizzani*³³ sowie *Böhle et al.*³⁴. In Anbetracht der schwierigen Reproduktionsfähigkeit der Ergebnisse von Lipoidfärbungen³⁷ nach Papierelektrophorese, darf die Übereinstimmung als gut bezeichnet werden. Im Blutserum der Männer sind die Lipoproteidkomponenten B und C stärker enthalten als bei den Frauen. *Fischer*³² betrachtet die altersbedingten Verschiebungen der Lipoproteide als einen kombinierten Effekt, der sich aus dem physiologischen Vorgang der Alterung zusammensetzt, wobei Personengruppen mit primär niedrigen Lipoid- und Lipoproteidwerten begünstigt sind. Die Verschiebungen entsprechen der Alterspathomorphose der angeführten Bluteiweißkörper¹². Liegt Arteriosklerose vor, so zeigt sich zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr diese Gehaltsverschiebung der Lipoproteide des Blutserums oft in verstärktem Maß^{13, 14}. Gleichzeitig nimmt der Gehalt an Lipoproteiden A, welche die Lipoproteide hoher Dichte enthalten¹⁵, entsprechend ab. Da diese Gehaltsverschiebungen nicht nur bei Arteriosklerose auftreten, vermögen sie die Diagnose nur in bedingter Weise zu stützen¹⁶⁻¹⁹. Immerhin finden sich nach *Schettler*²⁰ bei Arteriosklerotikern jungen und mittleren Alters auffällig oft Veränderungen der Serumlipide, Lipoproteide und Glykoproteide, so daß bei klinischem Verdacht und Ausfallserscheinungen wie Angina pectoris, Durchblutungsstörungen usw. die Serumanalyse angezeigt erscheint; sie kann zur Abgrenzung entzündlicher Angiopathien dienen und kann im Einzelfall durch alimentäre Fettbelastungen im Sinne einer Funktionsdiagnostik ergänzt werden. Auch *Voigt* und *Gademmann*²¹ sowie *Voigt* und *Schrader*²² (vgl. *Thurnherr* und *Niederberger*²³ finden bei arteriographisch gesicherten Arteriosklerosen in einem größeren Prozentsatz papierelektrophoretisch normale Lipoproteidfraktionen. Um die Größenordnung der Lipoproteidverschiebung darzutun, geben wir die Ergebnisse (Papierelektrophorese, Sudanschwarzfärbung; Cholesterin und seine Ester nach modifiziertem Liebermann-Burkhardtschem Ansatz²⁴) von *Voigt* und *Gademmann*²¹ an 42 Patienten mit sicherer Arteriosklerose wieder (Tab. III). Demnach findet nur ein Überlappen der Werte statt in Kolonne c, wo die Werte ähnlich liegen wie die Normalwerte; in solchen Fällen wird die Papierelektrophorese trotz erhöhten Serum-Cholesterin-Werten mehrdeutig. In Übereinstimmung mit den Befunden von *Fischer*³², erweist sich hier das Lipoproteinspektrum als weitgehend unabhängig von der Höhe des Blutcholesterin- und Bluteiweißspiegels. Die Serumanalyse muß ergänzt werden durch die mikrochemische Bestimmung der Serumgehalte an Phospholipoiden, Totallipoiden, Neutralfett und wenn möglich dem Lipoproteidgehalt in der Flotationsklasse *Sf* 10-20 (Ultrazentrifuge^{25, 26}). Für die Zunahmen im Sektor B der Kolonnen a und b ist in erster Linie eine Zu-