V.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg.

Studien zur unspezifischen Reiztherapie.

IV. Mitteilung: Nachweis der atropinähnlichen Wirkung des Menschenblutes.

Von

Dr. H. Struck.

Die Untersuchungen Kirstes¹⁾ und Zondeks²⁾ haben erwiesen, daß Serum an isolierten Froschherzen, die durch Muskarin stillgestellt sind, atropinähnlich wirkt. Die Stärke dieser, dem Muskarin entgegengerichteten Wirkung, ist bei den einzelnen Seris verschieden. Oft hebt das Serum allein schon den Stillstand auf, oft — nach Kirste in der Hälfte der untersuchten Fälle von Kaninchen- und Menschenserum — bedarf es zur Aufhebung des Muskarinstillstandes eines an sich unterschwelligen Zusatzes von Atropin.

Da im folgenden gezeigt wird, daß die Fähigkeit des Serums, den Muskarinstillstand aufzuheben, auf den Alkoholextrakt völlig übergehen kann, so muß sie auf der Gegenwart alkohollöslicher, extrahierbarer Stoffe beruhen. Die Verstärkung der Herzkontraktionen durch die alkohollöslichen Stoffe der Herzsubstanz und des Serums, haben schon Clark³⁾ und Loewi⁴⁾ gezeigt.

1) Kirste, Arch f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 89, S. 106.

2) Zondek, Ebenda Bd. 87, S. 342.

3) Clark, Journ. of Physiol. 1913, Bd. 47, S. 66.

4) Loewi, Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 593. Pflügers Arch. 1918, Bd. 170, S. 677.

Die Aufgabe der folgenden Untersuchungen war zunächst, festzustellen, ob die atropinähnlichen Wirkungen des Serums und des frischen menschlichen Blutes in dessen filtrierten Alkoholauszügen vorhanden sind und inwieweit sie auf diese übergehen. Des weiteren soll geprüft werden, von welchen Umständen das Auftreten dieser Wirksamkeit des Blutes (bzw. seines alkoholischen Extraktes) abhängt, d. h. wann diese atropinähnlichen Eigenschaften im frischen menschlichen Blut vorhanden sind. Die Ergebnisse hat Freund¹⁾ bereits kurz im Zusammenhang mit den übrigen Wirkungen der Serumextrakte teilweise mitgeteilt.

Zur Prüfung der Sera wurde die von Kirste angegebene Methodik angewandt. Es wurden wegen der Jahreszeit statt der Eskulenten *Rana temporaria* benutzt, deren an der Straubschen Kanüle arbeitende Herzen nach anfänglicher Durchströmung mit Ringerlösung durch 1 ccm einer Verdünnung von 1 : 40 000 Muskarin in Ringer zum Stillstand gebracht wurden. Nur bei den in den Monaten März bis Juni unternommenen Versuchen mußten stärkere Konzentrationen (1 : 20 000) Muskarin verwandt werden, weil die Empfindlichkeit der Herzen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, wie wir dies ja auch von der Digitaliswirkung kennen. Bei den Entgiftungsversuchen wurde stets $\frac{1}{2}$ ccm der Muskarinlösung gegen $\frac{1}{2}$ ccm der entgiftenden Lösung vertauscht, nachdem die Erfahrungen Kirstes sich bestätigt hatten, daß ein im Muskarinstillstand befindliches Herz auch nach Ersatz der Hälfte der wirksamen Lösung durch Ringerlösung dauernd im Stillstand verharrte. Auch konnte durch wiederholtes Spülen des Herzens mit Ringerlösung die Giftwirkung völlig beseitigt werden, so daß an demselben Präparat verschiedene Versuche ausgeführt werden konnten.

Der alkoholische Serumextrakt wurde nach der Angabe Freunds in der Weise hergestellt, daß frisches Kaninchenblut zunächst zentrifugiert und 10 ccm des dadurch erhaltenen Serums mit 100 ccm 96 % igem Alkohol geschüttelt, filtriert, mit 15 ccm heißem Alkohol nachgespült wurde. Nach Abdunsten dieser Flüssigkeit und Lösung des Trockenrückstandes in 10 ccm absolutem Alkohol, Filtration, und nochmaliger Eindunstung zur Trockenheit, wurde die dann verbleibende Trockensubstanz mit der dem Serum entsprechenden Ringermenge gelöst und nach Filtration zum Versuche verwandt.

Die ersten Versuche galten der Frage, ob die alkoholischen Serumextrakte (S. E.) den gleichen Synergismus mit Atropin zeigen, wie das Ausgangsserum; ferner ob sie auch quantitativ dieselbe Wirksamkeit haben.

1) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1921, Bd. 91, S. 272.

Nr.	Datum	Zustand des Herzens vor der Vergiftung		Muskarin- stillstand	Konzentration der entgiftenden Lösung	Erfolg
		Pulszahl	Pulshöhe in mm			
1	27. IX. 1920	42	14	erster	1:40 Mill. Atropin	+
		39	13	zweiter	1:80 Mill. Atropin	—
		39	11	dritter	Serum 1:4	—
		37	11	vierter	1:80 Mill. Atropin in Serum 1:4	+
2	29. IX. 1920	24	10	erster	1:80 Mill. Atropin	+
		18	8	zweiter	1:100 Mill. Atropin	—
		15	11	dritter	Serum 1:4	—
		15	10	vierter	1:400 Mill. Atropin in Serumextrakt 1:4	+
		12	10	fünfter	1:400 Mill. Atropin in Serum 1:4	+

Der Muskarinstillstand wird also beim ersten Versuch noch nicht aufgehoben durch eine Atropinkonzentration von 1:80 Millionen (0,5 ccm Muskarin-Ringer + 0,5 ccm 1:40 Mill. Atropin), wohl aber durch eine Atropinkonzentration von 1:40 Millionen. Wurde der zu ersetzende $\frac{1}{2}$ ccm Muskarin-Ringer durch 0,25 ccm S.E. + 0,25 ccm Ringer abgelöst, so wurde der Muskarinstillstand nicht aufgehoben. 1:400 Millionen (= 0,25 ccm 1:20 Millionen) Atropin in S.E. 1:4 ergab prompte Aufhebung.

Beim zweiten Versuch bleibt 1:100 Mill. ccm Atropin unwirksam, ebenso $\frac{1}{2}$ Teil (= 0,25 ccm) S.E., während 1 Teil (= 0,5 ccm) S.E. sowie unterschwellige Mengen $\frac{1}{2}$ Teil S.E. in Verbindung mit der gleichfalls unterschwelligen Menge 1:400 Mill. Atropin wirksam ist. Die gleiche Wirksamkeit wie das S.E. zeigt auch das Ausgangsserum.

Ebenso wie Kirste es für das Serum fand, ergaben also auch unterschwellige Dosen Serumextrakt und Atropin eine volle Wirkung.

Die folgenden Untersuchungen sollen zeigen, daß die Wirkung des S.E. auch quantitativ mit der des Ausgangsserums übereinstimmt. Dabei ergab sich dadurch eine Schwierigkeit, daß die atropinähnliche Wirkung des Serums — ähnlich wie auch seine vasokonstriktorische — nicht konstant bleibt, sondern beim Stehen zunimmt.

Zu den folgenden Versuchen wurde benutzt:

Bei Versuch 3 ein 2 Stunden altes Serum (1a).

Bei Versuch 4 dasselbe Serum im Alter von 10 Stunden (1b).

Bei Versuch 5 $1\frac{1}{2}$ Stunden altes Serum (2a).

Bei Versuch 6 dasselbe Serum, 24 Stunden alt (2b).

Nr.	Datum	Zustand des Herzens vor der Vergiftung		Muskarin- stillstand	Konzentration der entgiftenden Lösung	Erfolg
		Pulszahl	Pulshöhe in mm			
3	3. XII. 1920	36	8	erster	1:40 Mill. Atropin	+
		39	7	zweiter	1:80 Mill. Atropin	—
		35	10	dritter	Serum (1a) 1:4	—
4	4. XII. 1920	36	7	erster	1:80 Mill. Atropin	+
		30	13	zweiter	1:100 Mill. Atropin	—
		27	8	dritter	Serum (1b) 1:4	+
		26	8	vierter	Serum (1b) 1:10	+
		25	7	fünfter	Serum (1b) 1:20	—
5	8. XII. 1920	36	9	erster	1:40 Mill. Atropin	+
		36	10	zweiter	1:50 Mill. Atropin	—
		28	8	dritter	Serum (2a) 1:2	—
6	9. XII. 1920	33	20	erster	1:80 Mill. Atropin	+
		30	18	zweiter	1:100 Mill. Atropin	—
		28	18	dritter	Serum (2b) 1:10	+

Sucht man in den Versuchen 3 und 4, sowie 5 und 6 die Atropinempfindlichkeit zahlenmäßig auszudrücken, so sieht man, daß das Serum seine Wirksamkeit ändert. In Versuch 3 entspricht 0,25 ccm des frischen Serums in der Wirksamkeit einer Verdünnung von 1:80 Mill. Atropin, mithin 1 ccm Serum 1:20 Mill. Atropin; in Versuch 4 entspricht 0,05 ccm des 10 Stunden alten Serums 1:100 Mill. Atropin, mithin 1 ccm Serum 1:5 Mill. Atropin, also der vierfach stärkeren Atropinmenge wie das frische Serum. Ebenso wird man bei einer Feststellung der Verstärkung des Serums in den Versuchen 5 und 6 eine um das vierfache kräftigere Wirkung berechnen können.

Es scheint — nach weiteren, hier nicht angegebenen Versuchsreihen — ein Maximum der Serumwirkung nach etwa 6 Stunden erreicht zu sein, das dann konstant bleibt.

Eine ähnliche Berechnung der wirksamen Serum- bzw. S.E.-Mengen in den folgenden Versuchen 7 und 8 zeigt, daß die Wirksamkeit des S.E. der des Ausgangsserums auch quantitativ fast völlig entspricht. Die Prüfung an demselben Herzen ist nicht möglich, da die Herstellung des S.E. etwa 12 Stunden dauert, und das Ausgangsserum zu dem Zeitpunkt untersucht werden muß, in dem das S.E. — das seine Wirksamkeit nicht mehr ändert — aus ihm gewonnen wird.

Nr.	Datum	Zustand des Herzens vor der Vergiftung		Muskarin- stillstand	Konzentration der entgiftenden Lösung	Erfolg
		Pulszahl	Pulshöhe in mm			
7	15. II. 1921	36	7	erster	1:200 Mill. Atropin	+
		33	8	zweiter	1:300 Mill. Atropin	—
		30	11	dritter	Serum 1:4	+
		24	7	vierter	Serum 1:10	+
		21	6	fünfter	Serum 1:20	—
8	16. II. 1921	39	12	erster	1:80 Mill. Atropin	+
		36	13	zweiter	1:100 Mill. Atropin	—
		42	8	dritter	Serumextrakt 1:4	+
		36	13	vierter	Serumextrakt 1:10	—

Es ist in Versuch 7:

0,1 ccm Serum entsprechend 1:200000 mg Atropin.

1 ccm Serum entsprechend 1:20000 mg Atropin.

In Versuch 8:

0,25 ccm S.E. entsprechend 1:80000 mg Atropin.

1 ccm S.E. entsprechend 1:20000 mg Atropin.

Die auf Atropin berechnete Wirksamkeit des Extraktes ist der seines Ausgangsserums völlig gleich, was sich auch noch in anderen Versuchsreihen bestätigte.

Damit ist die anfangs gestellte Frage dahin entschieden, daß die Muskarinentgiftung des Herzens durch extrahierbare, in Alkohol lösliche Stoffe bedingt ist.

Weiterhin ist zu untersuchen, ob die atropinähnliche Wirkung — gleich den anderen von H. Freund¹⁾ untersuchten pharmakologischen Wirkungen des Serums — erst bei der Gerinnung durch den Zerfall von Blutplättchen entsteht, oder ob sie schon in dem im Körper strömenden Blut präformiert ist.

Da es keine gerinnungshemmenden Mittel gibt, die nicht das Plasma verändern und das isolierte Froschherz schwer schädigen, so war der einzig gangbare Weg zur Beantwortung dieser Frage die Methode des Alkoholauszuges auch des frischen Blutes. Diese Methode konnte verwandt werden, nachdem wir den Beweis erbracht hatten, daß alle wirksamen Bestandteile auf den alkoholischen Extrakt übergehen. Der Frischblutextrakt wurde in folgender Weise hergestellt:

1) H. Freund, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 87, S. 266.

Man läßt Blut aus dem Blutgefäß (Carotis beim Kaninchen, Cubitalvene durch weite Kanüle beim Menschen) direkt in Alkohol fließen. Dadurch werden die Zellen zerstört, das Eiweiß gefällt und gleichzeitig etwaige Fermente, wie sie beim Blutplättchen- und Leukoeytenzerfall entstehen, gehemmt. Filtriert man dann und dampft bei 50° zur Trockenheit ein, so kann man den Rückstand durch nochmaliges Lösen in absolutem Alkohol oder Chloroform von den nur wasserlöslichen Bestandteilen trennen; nach abermaligem Eindampfen bei 50° und Aufnahme mit soviel Ringer, wie der verwandten Blutmenge entspricht, hat man dann die Gesamtmenge der wirksamen Substanzen (abgesehen von den geringen Verlusten beim Filtrieren) in Lösung.

Bei den ersten Versuchen, die mit dem Frischblutextrakt vom Kaninchen, unserem bisherigen Versuchstier, unternommen wurden, zeigte es sich, daß dies nicht verwendbar ist. Der Grund liegt in dem Kalireichtum der Kaninchenblutkörperchen, der durch den Ca-Gehalt der normalen Ringerlösung nicht ausgeglichen wurde. Das Kurvenbild, das die mit Frischblutextrakt gespeisten Herzen schrieben, entsprach auch völlig dem z. B. von Zondek¹⁾ angegebenen Stillstand in Ca-armer Ringerlösung. Die Giftwirkung des Frischblutextraktes vom Kaninchen ließ sich denn auch aufheben, wenn der Ca-Gehalt der Ringerlösung vermehrt wurde. Die in folgendem Versuch 9 verwandte Ca-reiche Ringerlösung enthielt 0,15% CaCl_2 statt des normalen Gehaltes von 0,025 %.

Nr.	Datum	Zustand des Herzens vor der Vergiftung		Muskarin- stillstand	Konzentration der entgiftenden Lösung	Erfolg
		Pulszahl	Pulshöhe in mm			
1	19. III. 1921	39	11	erster	Frischblutextrakt 1:4 in Ca-reicher Ringerlösung	+
		30	12	zweiter	Ca-reiche Ringerlö- sung 1:4	+
		42	9	—	Auf Zugabe von 0,5 cem Frisch- blutextrakt steht das nichtmuskari- nvergiftete Herz still	

Die Herzschiidigung durch Frischblutextrakt vom Kaninchenblut kommt also in einer Ca-reichen Ringerlösung nicht zur Geltung.

Im Gegensatz zu dem Frischblutextrakt vom Kaninchen erwies sich das von Katzenblut und menschlichem Blut als geeignet für unsere Methode der Frischblutextraktuntersuchung.

1) Zondek, a. a. O.

Die Untersuchung des menschlichen Blutes erschien um so wichtiger, als Kirste in einem Selbstversuch nachgewiesen hatte, daß die Wirksamkeit des Serums der gleichen Versuchsperson sehr schwankt. Sein eigenes Serum, bei der ersten Untersuchung unwirksam, erwies sich nach einer sportlichen Betätigung und intensiven Sonnenbestrahlung des Körpers als wirksam.

Wechselte also die Wirksamkeit des Serums, so mußte der Grund dazu im Blute selbst liegen. Dies zu untersuchen ist uns dadurch ermöglicht, daß bei unserer Methode die nachträgliche Entstehung der wirksamen Substanzen außerhalb der Blutbahn verhindert ist.

Zunächst sei ein Selbstversuch erwähnt, der zeigt, daß die Wirksamkeit der Frischblutextrakte wechseln kann, und daß sie experimentell beeinflußbar ist. Dieser Versuch ergibt, daß das bei verschiedenen Untersuchungen wirkungslose Frischblutextrakt des Verfassers stark wirksam wurde, nachdem er sich einer Behandlung mit intramuskulären Kaseosaninjektionen unterzogen hatte.

Nr.	Datum	Zustand des Herzens vor der Vergiftung		Muskarin- stillstand	Konzentration der entgiftenden Lösung	Erfolg
		Pulszahl	Pulshöhe in mm			
10	5. III. 1921	42	11	erster	1:80 Mill. Atropin	+
		39	11	zweiter	1:100 Mill. Atropin	—
		39	9	dritter	Frischblutextrakt 1:2	—
11	14. III. 1921	36	14	erster	1:40 Mill. Atropin	+
		34	11	zweiter	1:60 Mill. Atropin	—
		36	14	dritter	Frischblutextrakt 1:2 (nach der 3. Kaseo- saninjektion)	+
12	23. III. 1921	39	12	erster	1:80 Mill. Atropin	+
		36	9	zweiter	1:100 Mill. Atropin	—
		33	10	dritter	Frischblutextrakt 1:2 (nach der 4. Kaseo- saninjektion)	+

In gleichem Sinne sprechen hier unternommene Versuche, die von Freund mitgeteilt sind, der die Frage des Entstehens der verschiedenen Formen der Serumwirksamkeit nach Proteinkörpertherapie bearbeitet hat.

Von klinischer Bedeutung kann die Prüfung der Frage werden, ob der Frischblutextrakt von gesunden Individuen in der Norm negativ ist, und ob und wann er positiv werden kann. Es sei hier gleich bemerkt, daß die Grenze des »Normalen« hier wie überall keine feststehende ist, daß infolge von überstandenen Krankheiten, sowie auch wie bei Kirstes Versuch intensiver Sonnenbestrahlung (s. o.) bei »Gesunden« eine positive Reaktion auftreten kann. Zunächst wurden Versuchsreihen an normalen Individuen vorgenommen. Der Frischblutextrakt des Blutes von 10 normalen Versuchspersonen erwies sich als wirkungslos.

Nun seien einige Versuchsreihen angeführt, in denen der alkoholische Extrakt des frischen Blutes auch von kranken Personen keine Aufhebung des Muskarinstillstandes herbeiführte.

Nr.	Datum	Zustand des Herzens vor der Vergiftung		Konzentration der entgiftenden Lösung	Erfolg
		Pulszahl	Pulshöhe in mm		
13	25. III. 1921	36	14	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Polycytämie	—
14	2. IV. 1921	30	18	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit einem kompensierten Vitium cordis	—
15	15. IV. 1921	25	12	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Arthritis urica	—
16	18. V. 1921	34	18	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Lebercirrhose	—
17	25. V. 1921	32	16	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Nephritis mit Hypertonie	—

Der Übersichtlichkeit halber sind in obigen Protokollen die Versuche über die Atropinempfindlichkeit der Herzen nicht erwähnt, die sich bei sämtlichen Präparaten zwischen 1:50 Mill. und 1:120 Mill. bewegte. Auch wurde in diesen Versuchen das Überschreiten der Reizschwelle einer an sich unerschwelligen Atropinmenge durch Zusatz des an sich auch unwirksamen Frischblutextraktes nur einmal, und zwar bei dem Frischblutextrakt des Vitium cordis beobachtet.

Es folgen nun die Versuche, in denen der Frischblutextrakt eine positive Wirkung entfaltete, an die ein Versuch von klinisch zweifelhafter Diagnose angeschlossen sei, der vielleicht für spätere Untersuchungen von Wichtigkeit werden kann.

Nr.	Datum	Zustand des Herzens vor der Vergiftung		Konzentration der entgiftenden Lösung	Erfolg
		Pulszahl	Pulshöhe in mm		
18	20. III. 1921	28	18	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit einer frischen Apoplexie	+
19	22. III. 1921	28	14	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Lues III	+
		26	12	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit alter (latenter) Lues	+
20	18. IV. 1921	36	12	1:2 Frischblutextrakt einer Graviden (M. VIII)	+
21	19. IV. 1921	38	18	1:2 Frischblutextrakt einer Graviden (M. IX)	+
22	19. IV. 1921	36	18	1:2 Frischblutextrakt einer Graviden (M. VI)	+
23	2. V. 1921	32	16	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit fieberhafter Bronchitis	+
24	14. V. 1921	28	14	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit akuter Infektion (Pneumonie)	+
25	24. V. 1921	26	18	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit frischer Endocarditis	+
26	28. V. 1921	36	14	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit aktiver Tbc. pulm.	+
27	18. IV. 1921	36	12	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit perniziöser Anämie	+
28	2. VI. 1921	14	12	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Ca. ventriculi	+
		18	12	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Ca. pylori	+
29	4. VI. 1921	28	10	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken mit Ca. recti	+
		28	10	1:2 Frischblutextrakt eines Kranken Differentialdiagnose zwischen Ca. hepatis und Zirrhosis hepatis. Später auch klinisch einwandfrei als Zirrhosis diagnostiziert	— (!)

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich dahin zusammenfassen, daß die atropinähnliche Wirkung des Serums den alkohol-löslichen Bestandteilen zukommt.

Auf dieser Grundlage konnte eine Methode ausgearbeitet werden, mit der es gelang, den Nachweis solcher Substanzen auch im strömenden Blut des Menschen zu führen. Das Blut 10 normaler Versuchspersonen enthielt diese Substanzen im allgemeinen nicht, war also unwirksam. Ebenso wurde das Blut von 6 untersuchten Kranken unwirksam gefunden. Bei 10 anderen Kranken, besonders in Fällen, bei denen mit erhöhtem Eiweißzerfall zu rechnen ist, und bei Gravidität wurde eine positive Wirkung beobachtet. Besonders hervorgehoben sei der positive Ausfall der Reaktion noch bei frischen Infektionskrankheiten und bei Karzinomen.

Ob diesen Reaktionen eine klinische Bedeutung zukommt, ist aus der Anzahl der bis jetzt untersuchten Fälle noch nicht erkennbar.