

## II. Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

(Direktor: Prof. Hans Meyer.)

### Saponin und sein Gegengift.<sup>1)</sup>

Von Dr. F. Ransom.

Zu der folgenden Arbeit habe ich das Saponin pur. alb. von Merck angewandt. Dasselbe stellt ein weisses amorphisches Pulver dar, welches sich sehr leicht in Wasser löst und die für die Saponingruppe charakteristischen Eigenschaften besitzt. Insbesondere wollte ich die hämolytische Wirkung des Saponin näher studiren und habe mich zu diesem Zwecke hauptsächlich des Hundesblutes bedient. Andere Blutarten zeigten sich nur quantitativ verschieden in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Saponin.

Die Versuche sind bei Zimmertemperatur mit verdünntem Blute gemacht und die Reaktion ist in 10 ccm Flüssigkeit vorgenommen. Unter diesen Bedingungen lösen

2 mg Saponin	0,3 ccm Hundesblut	in 3 Minuten
2 " "	0,5 " "	" 10—15 Minuten
2 " "	0,7 " "	" 12—24 Stunden
2 " "	0,9 " "	nur zum Theil
2 " "	1,5 " "	nur wenig
2 " "	2,0 " "	gar nicht.

Unter lösen verstehe ich, dass die Blutverdünnung vollständig klar durchsichtig wird und nach 24 Stunden stehen keinen Bodensatz zeigt.

Wenn wir die rothen Blutkörperchen als kleine lebende Protoplasmanmassen betrachten, welche zu der Untersuchung in verdünntem Serum schwimmen, so ersehen wir aus dieser Tafel, dass 2 mg Saponin ungefähr die tödtliche Minimaldosis ist für die Zahl der kleinen Lebewesen, welche in 0,7 ccm Hundesblut enthalten sind; dieselbe Menge Saponin ist aber für ca. 0,9 ccm bis 1,5 ccm nur eine krankmachende Dosis, und in 2 ccm Blut ist die Zahl der Körperchen so gross, dass die auf jedes derselben kommende Saponinmenge nicht ausreicht, um es krank zu machen.

Bei gleichmässiger Verstärkung der Blutverdünnung und der Saponinlösung vollzieht sich die Lösung schneller. Sehr verdünnte Saponinlösungen greifen das Blut überhaupt nicht mehr an.

Wird das Blut der Saponinlösung in Raten zugesetzt, so löst sich weniger Blut auf, als wenn man die Blutmenge mit einem Mal zugiebt. Setzt man z. B. das Blut in Raten von 0,1 ccm in Zwischenräumen von einer Viertelstunde der Saponinlösung zu, so werden nicht wie sonst 0,7 ccm, sondern nur 0,5 ccm aufgelöst. Diese Thatsache scheint darauf hinzudeuten, dass das Saponin bei der Ausübung seiner hämolytischen Kraft verbraucht oder gebunden wird. Es lässt sich dies auch direkt beweisen: Nimmt man nämlich eine Mischung von Saponin und Blut, welche je nach der Blutart mehr Saponin enthält, als nöthig wäre, um das Blut aufzulösen, und setzt, nachdem die Auflösung fertig ist, noch etwas Blut dazu, so wird zwar noch Blut aufgelöst, aber nicht so viel,

<sup>1)</sup> Nach einem, vor der Gesellschaft zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften zu Marburg am 13. Februar 1901 gehaltenen Vortrage.

wie man aus dem berechneten Ueberschuss von Saponin hätte erwarten müssen. Ferner wenn zu einer Mischung von Blut und Saponin, welche eben genügend Saponin enthält, um das Blut aufzulösen, nach der Auflösung noch ein wenig Blut zugesetzt wird, so bleibt die zweite Blutportion unangegriffen. Es ergibt sich hieraus, dass das Saponin bei der Blutauflösung verbraucht, bezw. gebunden wird, und es fragt sich nun, von welchem Theil des Blutes wird es fixirt.

Trennt man durch Centrifugiren die rothen Zellen vom Serum ab und füllt dann Kochsalzlösung auf die Blutmenge auf, so zeigt sich dieses serumlose Blut weitaus empfindlicher für die schädigende Wirkung des Saponins als das Vollblut. Das Blut ist eben in gewissem Sinne überempfindlich geworden. Ich fand z. B. bei Hundeblood, dass das Saponin in einer Verdünnung von 1:200 000 noch auf die vom Serum getrennten rothen Körperchen wirkte, das Vollblut dagegen wurde bei einer Verdünnung des Saponins auf 1:40 000 nicht mehr angegriffen.

Wir haben also hier einen Zustand, wie ihn auch Camus und Gley und H. Kossel für das Ichthyotoxin des Aalserums gegenüber dem Blute immuner Thiere beschrieben haben. Die rothen Blutkörperchen schwimmen in einem Medium, welches ihnen einigermaßen Schutz gegen den Angriff des Saponins ertheilt, indem es selbst das Gift fixirt.

Unter den rothen Körperchen von verschiedenen Thierarten habe ich in dieser Beziehung keine grossen Unterschiede gefunden. Die relative Immunität der Blutarten gegen Saponin scheint in der Hauptsache von der Menge des im Serum befindlichen Schutzkörpers abhängig zu sein.

Eine nähere Untersuchung dieser Schutzkraft des Serums ergab, dass es möglich war, das Saponin durch Serum unschädlich zu machen. Die Zahlenverhältnisse sind in der folgenden Tafel aufgestellt:

		In 10 ccm Flüssigkeit		
2 mg Saponin	+ 1 ccm Serum	+ nach 1/4 Std.	0,5 ccm Blut	keine Auflösung
2 "	" + 0,75 ccm "	" + "	" 0,5 "	" "
2 "	" + 0,5 ccm "	" + "	" 0,5 "	" etwas "
2 "	" + 0,25 ccm "	" + "	" 0,5 "	" ca. 1/2 gelöst
2 "	" + 0,125 ccm "	" + "	" 0,5 "	" fast alles gelöst

Demnach sind 0,75 ccm Hundeserum im Stande 2 mg Saponin so zu fixiren, dass nachgeschicktes Blut nicht angegriffen wird.

Diese saponinbindende Kraft des Serums wird durch halbstündliches Erwärmen auf 55° C nicht beeinträchtigt. Wurde dagegen das Serum schwach angesäuert, gekocht und filtrirt, so hatte das Filtrat keine Wirkung auf Saponin.

Ein weiterer Versuch zeigte, dass auch die rothen Körperchen selbst das Saponin fixiren. Ungefähr 0,75 ccm Hundeblood ohne Serum binden 2 mg Saponin, sodass bei weiterem Zusatz von Blut keine Auflösung stattfindet. Demnach ist sowohl in den rothen Körperchen als im Serum eine saponinfixirende Substanz vorhanden.

Vom Serum befreite rothe Körperchen wurden mit Aqua destillata lackfarben gemacht, dann wurden die Stromata gefällt und durch Centrifugiren von der Hämoglobinlösung getrennt. Die auscentrifugirten Stromata wurden mit Kochsalzlösung auf die Blutmenge aufgefüllt und ihr Verhalten gegen Saponin mit dem der Hämoglobinlösung verglichen. Es ergab sich, dass letztere keinen Einfluss auf das Saponin ausübte, denn das nachträglich zugesetzte Blut wurde aufgelöst. Die Stromata dagegen fixirten das Saponin, und das nachher zugegebene Blut wurde nicht aufgelöst.

Demzufolge ist der Angriffspunkt des Saponins in dem Stroma des rothen Körperchens zu suchen. In oder an demselben muss ein Stoff sein, welcher eine Beziehung zu Saponin besitzt.

Gut gewaschene Erythrocyten wurden mit Aqua destillata und Aether lackfarben gemacht und mehrere Tage mit Aether geschüttelt. Der dekantirte und filtrirte Aetherextrakt wurde bis auf wenig verdampft und mit etwas Alkohol in Kochsalzlösung gegossen. Es entstand hierbei eine milchige Mischung, welche sich als ein wirksamer Schutz gegen das Saponin erwies. Die nach dem Dekantiren des Aethers zurückgebliebene Hämoglobinlösung war dagegen absolut ohne saponinbindende Kraft.

Da, wie oben gesagt, das Serum einen Stoff enthält, welcher im Stande ist, eine gewisse Menge Saponin unschädlich zu machen, so schüttelte ich Hundeserum mit Aether aus, dekantirte, vertrieb den im Serum gelösten Aether und fand nun, dass das Serum seine Fähigkeit, Saponin zu fixiren, vollständig eingebüsst

hatte. Der fast völlig verdampfte Aetherextrakt des Serums, in Kochsalzlösung gegossen, gab eine milchige Emulsion, welche sich als fähig erwies, die Auflösung der rothen Körperchen durch Saponin zu verhindern.

Es ergibt sich hieraus, dass der Stoff, welcher in den rothen Körperchen sowohl wie im Serum das Saponin fixirt, in Aether löslich ist. Dass die Emulsion in der That schützend wirkt, lässt sich leicht zeigen. Man nimmt eine kleine Menge Emulsion (0,2 bis 0,4 ccm), verdünnt sie mit Kochsalzlösung und setzt Saponinlösung zu; nach etwa 1/4 Stunde wird etwas Blut in die Mischung gebracht, meistens ca. 1/5 der Blutmenge, welche das Saponin sonst im Stande wäre aufzulösen. Das Blut wird nicht lackfarben, auch nicht nach mehreren Stunden. Die Erythrocyten sinken zu Boden, und die obere Flüssigkeit wird völlig farblos. Im Controlröhrchen ohne Emulsion dagegen wird das Blut in wenigen Minuten aufgelöst. Eine nähere Untersuchung des Aetherextrakts des Serums sowohl als der Erythrocyten ergab in beiden Fällen als Hauptbestandtheil Cholesterin.

Danach war das Experimentum crucis leicht auszuführen. Ich nahm etwas reines Cholesterin, löste, bezw. emulsionirte es, einem Vorschlag von Prof. Meyer folgend, in Lecithin und fand, dass diese Emulsion dieselbe Wirkung gegenüber Saponin ausübte wie der Aetherextrakt des Serums oder des rothen Körperchens. Das Lecithin allein ist vollständig ohne Einfluss auf das Saponin.

Setzt man zu 20 ccm einer 0,1%igen Lösung von Saponin in 0,85%iger Kochsalzlösung 1 ccm einer 1%igen Lösung von Cholesterin in Aether, schüttelt es gut durch und lässt es einige Stunden bei 36° C stehen, so erweist sich die Mischung, nachdem der Aether durch Luftdurchleitung entfernt ist, als vollständig unschädlich für Hundeblood. Filtrirt man, so ist das wasserhelle Filtrat auch wirkungslos. 2 ccm einer 0,1%igen Saponinlösung, unter die Haut eines Frosches injizirt, rufen schwere lokale Vergiftungserscheinungen, mitunter auch den Tod hervor. Eine gleiche oder grössere Menge der Cholesterin-Saponin-Mischung wird anstandslos vertragen. Eine in der oben angegebenen Weise hergestellte Mischung ist jedoch nicht für alle Blutarten harmlos. Meerschweinchenblut z. B., welches bedeutend empfindlicher für Saponin ist als Hundeblood, wird noch immer angegriffen. Will man das Saponin für diese Blutart unschädlich machen, so muss man mehr Cholesterin im Verhältniss zu Saponin — etwa gleiche Theile — nehmen. Eine solche Mischung nach dem Filtriren kann man sogar einem Meerschweinchen in die Blutbahn injiziren, ohne Krankheitssymptome hervorzurufen, auch wenn mehr als die tödtliche Dosis Saponin in der injizirten Menge enthalten war.

In Bezug auf die hier mitgetheilten Ergebnisse ist es interessant, dass Phisalix dem Cholesterin sowie dem Tyrosin eine immunisirende Wirkung gegen Schlangengift zuschreibt. Auch schon früher hat Fraser eine ähnliche Fähigkeit für die Galle von giftigen Schlangen beansprucht.

Man war bis jetzt ziemlich im Unklaren über die Stelle des Cholesterins im thierischen Haushalt, meine Beobachtungen weisen ihm wenigstens im Aufbau der Erythrocyten eine wichtige Stelle an, denn seine Entfernung, bezw. Veränderung hat den Austritt des Hämoglobins zur Folge.

Fassen wir die Ergebnisse meiner Versuche kurz zusammen, so habe ich gefunden, dass, was die hämolytische Wirkung des Saponins betrifft, derselbe Stoff, nämlich Cholesterin, in dem Serum als Giftableiter, in den rothen Körperchen aber als Giftzuleiter fungirt.

Es existirt eben eine Art Affinität oder ein Löslichkeitsverhältniss zwischen Saponin und Cholesterin, wodurch es dem ersteren möglich ist, auf die Gewebe, welche letzteres enthalten, als Gift zu wirken, das letztere aber unter gewissen Bedingungen zum Schutzkörper gegen das erstere macht.

Das Saponin ist für die rothen Blutkörperchen giftig, indem es einen wesentlichen Theil ihrer Struktur — das Cholesterin — angreift. Dies geschieht aber nicht mit einem Male. Es giebt eben für das Saponin eine Inkubationszeit und auch eine zweite Periode, welche vom Anfang der Symptome bis zu der Vollendung des Processes und dem vollständigen Entweichen des Hämoglobins dauert. Das Saponin greift zunächst augenscheinlich die Oberfläche des rothen Körperchens an, und, wie die Strukturverhältnisse auch liegen mögen, bis eine gewisse Menge Cholesterin angegriffen wird, kann kein Hämoglobin austreten. Dieser Zwischenraum ist für Saponin die Inkubationszeit. Man kann auch thatsächlich die rothen Körperchen in allen Stadien der Zerstörung

sehen, von solchen, welche noch viel Hämoglobin enthalten, bis zu solchen, welche fast hämoglobinfrei sind. Die grösste Menge Saponin, welche das Körperchen mit seinem Cholesteringehalt binden kann, ist eben grösser als die krankmachende, wahrscheinlich auch grösser als die tödtliche Dosis.

Soweit ich bis jetzt untersucht habe, ist das Cholesterin nur wirksam gegen das eigentliche Saponin und die Mitglieder der Saponin-Gruppe, vielleicht auch nicht gegen alle diese. Gegenüber anderen Hämolytinen pflanzlichen Ursprungs sowie gegen die hämolytische Wirkung fremder Sera ist es, soweit ich probirt habe, vollständig unfähig, einen Schutz auszuüben.

Mit der Entdeckung des Verhältnisses von Cholesterin zu der Saponinhämolyse ist es zum ersten Male gelungen, direkt aus dem von einem Toxin angegriffenen Gewebe jenen Stoff, welcher den Angriffspunkt für das Toxin bildet, rein zu isoliren und gleichzeitig zu demonstrieren, dass derselbe Stoff auch als Schutzmittel dienen kann und thatsächlich dient.