Quantitative Beiträge zur Frage des Zusammenwirkens von Ionen und organischen Giften.

II. Mitteilung ¹⁾.

Von
Hans Handovsky.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 28. Februar 1922.)

In dieser Mitteilung soll die giftverstärkende Wirkung verschiedener Salze auf die Saponinhämolyse der Rz.-Bl.²⁾ besprochen werden, nachdem in der vorhergehenden einige Gesetzmäßigkeiten im bezüglichen Verhalten des Kochsalzes aufgedeckt wurden.

Zunächst seien im Hinblick auf eine Reihe inzwischen erschienener Arbeiten über das Verhalten von Bl. in vitro einige Bemerkungen zur Methodik vorausgeschickt.

Bei Untersuchungen an Bl. sind zweierlei Momente zu berücksichtigen:

I.

Aus dem strömenden Blut entfernte Bl. verändern sich ungemein leicht, wie aus eigenen Vorversuchen, besonders aber aus Untersuchungen von *Hamburger* und seinen Schülern *Brinkman*, *van Creveld*, ferner von *Ege* hervorgeht. So haben *Brinkman* und *van Dam*³⁾ darauf hingewiesen, daß schon die beginnende Gerinnung des Blutes die Bl. so verändert, daß sie Traubenzucker aufnehmen. *Hamburger*, dann *van Creveld*⁴⁾ haben auf die große Bedeutung des CO₂-Gehaltes der Suspensionsflüssigkeit für den Cl-Gehalt der Bl. hingewiesen. *van Creveld* (a. a. O.) läßt darum das Blut durch paraffinierte Kanülen in paraffinierte Zentrifugierröhrchen unter Paraffinöl einfließen und zentrifugiert sofort schnell; dies dürfte die schonendste Methode sein; für unsere Versuche waren, wie die Gleichmäßigkeit der Resultate beweist, diese Vorsichtsmaßregeln nicht nötig, zumal wir ja nicht den Elektrolytaustausch, sondern den Endzustand der Veränderung, die Hämolyse, als Indicator benutzten. *Der Behauptung von Brinkman und van Dam*⁵⁾, daß die Blutkörperchen durch Auswaschen mit Salzlösungen ihre Lecithinhülle verlieren sollen, durch Auswaschen mit Rz. nicht, bin ich nicht nachgegangen. Die einzige Vorsichtsmaßregel, auf die ich achtete, war, daß die einzelnen Prozeduren nach der Uhr vorgenommen wurden und strenge darauf gesehen wurde, daß sie in allen Versuchen gleich lang dauerten.

¹⁾ I. Mitteilung, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **190**, 173. 1921.

²⁾ Rz. bedeutet im folgenden Rohrzucker, Bl. rote Blutkörperchen.

³⁾ Arch. internat. de physiol. **15**, 105. 1919.

⁴⁾ Biochem. Zeitschr. **123**, 304. 1921.

⁵⁾ Biochem. Zeitschr. **108**, 35. 1920.

Ich ließ 10—15 ccm Blut aus der Ohrvene von Kaninchen in ein Zentrifugenglas mit Glasperlen einfließen, was stets nur 1—1½ Minuten dauerte. Das Blut wurde dann 2 Minuten geschüttelt, koliert, dann je 2,5 ccm in Zentrifugengläser pipettiert, mit Waschflüssigkeit auf ca. 50 ccm aufgefüllt und noch dreimal mit erneuter Waschflüssigkeit je 10 Minuten lang zentrifugiert; hierauf wurde die Waschflüssigkeit abermals abpipettiert, der Bl.-Brei in ein spitzes Zentrifugenglas von ca. 15 ccm Inhalt gespült und 15 Minuten scharf zentrifugiert, dann die Waschflüssigkeit mit einer Capillarpipette möglichst vollständig abgesaugt.

Nun wurde auf zweifache Weise weiter gearbeitet:

Methode I: Die gewaschenen Bl. wurden in den verschiedenen isotonischen Lösungsgemischen aufgeschwemmt, mit ihnen auf 100 ccm aufgefüllt und dann mit 1 Volumprozent verschieden konzentrierter Saponinlösungen versetzt.

Methode II: Die Bl. wurden in doppeltisotonischer Rz.- bzw. Salzlösung aufgeschwemmt, auf 100 ccm aufgefüllt, darauf durch Mischung beider und Verdünnung mit Wasser oder Saponinlösungen unter Vermeidung örtlicher Hämolyse die gewünschten Konzentrationen hergestellt.

Die Aufstellung einer Versuchsserie dauerte 25—30 Minuten, nie länger. Beide Methoden ergaben, wie aus zahlreichen Kontrollversuchen hervorgeht, stets die gleichen Resultate. Meist wurde zur Kontrolle mit beiden Methoden gearbeitet, bei größeren Serien nur mit Methode II. Daß dabei die durch das Pipettieren der Bl.-Suspensionen begangenen Fehler gering waren, erhellt aus folgender Zusammenstellung der Versuche in Tab. I. In dieser Tabelle zeigen die Zahlen der ersten Säule an, wie oft in den 53 Versuchen die in der zweiten Säule angegebene Anzahl Bl. in 0,004 cmm gezählt wurden. Die Zählung war stets in der Thoma-Zeisschen Zählkammer in der üblichen Weise vorgenommen worden.

Tabelle I.

In 0,004 cmm sind enthalten:

Zahl der Versuche	Erythrocyten
1	424
2	425
4	426
1	427
1	428
8	432
16	436
3	438
8	440
1	441
1	442
3	443
3	445
1	446
<hr/> 53	<hr/> Mittel 436

Die Versuchsserien wurden dann in den Brutschrank von 37° gebracht, darin 2 Stunden belassen, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Hämolyse 2 mal nach 4 Stunden und 2 mal nach 6 Stunden nicht weiter zugenommen hat. Hierauf wurden die Serien mindestens 10 Stunden im Brutschrank belassen und dann der Hämolysegrad mittels Zählung der Bl. bestimmt, nachdem sich aus früheren Untersuchungen ergeben hatte, daß es eine partielle Hämolyse einzelner Bl. in vitro nicht gibt, daß also die Bestimmung der Hämolyse durch Zählung der nicht hämolytierten Bl. und durch colorimetrische Bestimmung des ausgetretenen Hämoglobins

vollkommen übereinstimmt. Stets wurden die Empfindlichkeiten der in den verschiedenen Suspensionsflüssigkeiten aufgeschwemmten Bl. mit der von Rz.-Bl. derselben Entnahme verglichen; wenn Bl. in Rz. eine abweichende Empfindlichkeit zeigten, was in 61 Versuchen nur 8 mal der Fall war, wurden diese Reihen verworfen. Die gute Übereinstimmung der Hämolysegrade von Bl. verschiedener Entnahme in der gleichen Suspensionsflüssigkeit zeigen die folgenden Tab. II und III.

Tabelle II.
Hämolyse in 7,8 proz. Rohrzucker.

Saponingehalt	Hämolysegrad %												Mittel
0,006 ⁰ / ₁₀₀	14,	15,	15,	15,	16,	16,	16,	16,	17,	17,	20,	24	16%
0,008 ⁰ / ₁₀₀	19,	20,	20,	21,	23,	23							21%
0,010 ⁰ / ₁₀₀	22,	24,	24,	25,	26,	28,	28,	28,	30				26%
0,016 ⁰ / ₁₀₀	39,	40,	41,	41,	44								41%
0,025 ⁰ / ₁₀₀	61,	62,	62,	62									62%

Tabelle III.
Hämolyse in 0,9 proz. NaCl.

Saponingehalt	Hämolysegrad %						Mittel
0,003 ⁰ / ₁₀₀	6,	8,	8,	9			8%
0,004 ⁰ / ₁₀₀	55,	56,	59,	59,	62,	63	59%
0,006 ⁰ / ₁₀₀	90,	90,	90,				90%

Auf diese Weise war es möglich, methodische Unzukömmlichkeiten, die beim Arbeiten mit Bl. zu so vielen Fehlschlüssen Anlaß gegeben haben, — wenigstens für unsere Zwecke — zu vermeiden.

II.

Beim Forschen nach Gesetzmäßigkeiten im Verhalten von Bl. stehen wir aber noch einer zweiten Schwierigkeit gegenüber; wir haben es nämlich nicht etwa wie bei chemischen Reaktionen mit vollkommen gleichwertigen Reaktionseinheiten (Molekülen) zu tun, sondern mit notwendigerweise verschieden alten und darum verschieden reaktionsfähigen¹⁾. Wir wollen diesen Zustand *Heterovitalität* nennen; die Bl.-Suspension ist ein *heterovitales System*, und zwar sind die *jungen Bl. in NaCl-Lösung gegenüber dem Saponin, gegenüber NaOH und gegenüber den Serumhämolytinen resistenter als die alten*.

Die ersten hierher gehörenden Versuche aus dem Jahre 1912²⁾ hatten

¹⁾ Vgl. Anm. 2.

²⁾ Handovsky, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 412. 1912. Dort wurden zum ersten Male die Unterschiede der Giftresistenz von Rz.- und NaCl-Bl. systematisch untersucht; danach hat sich Ph. Eisenberg (Zentralbl. f. Bakteriologie usw. Abt. II, **69**, 187. 1913) prinzipiell mit der Frage der Beeinflussung der durch verschiedene Stoffe hervorgerufenen Hämolyse durch Salze vom Standpunkt der Desinfektionslehre beschäftigt und prinzipiell das gleiche qualitative Verhalten beobachtet, daß die Resistenz der Bl. in NaCl kleiner ist als in Rz. Schließlich hat Herr H. Rhode in unserem Institut gelegentlich einer Untersuchung über die hämolysierenden Eigenschaften verschiedener Salze von Alkaloiden auch die

folgende Gesetzmäßigkeit ergeben¹⁾: Die Verstärkung der hämolytischen Saponinwirkung durch NaCl (gegenüber Rz.) ist innerhalb gewisser Konzentrationsintervalle der NaCl- und der „Wirkungskonzentration“ des Saponins proportional. Es ließ sich für die damaligen Versuche, die mit Saponinum purissimum Merck ausgeführt wurden, folgende Formel aufstellen: $H = H_0 + 2500 c \cdot c_{\text{Sap}}$, wobei die Schwellenkonzentration $0,0048^0/_{00}$ Saponin betrug. H bedeutet hierbei den Hämolysegrad (%) in Salzlösung, H_0 den in Rz.-Lösung, c die Millimole Salz in 100 ccm, c_{Sap} die Wirkungskonzentration des Saponins.

Als die Versuche jetzt wieder aufgenommen wurden (1921), ergaben sich für die Verstärkung der Saponin-Rz.-Bl.-Hämolyse andere Konstanten in der Formel, und zwar: $H = H_0 + 495 c \cdot c_{\text{Sap}}$, wobei die Schwellenkonzentration $0,0014^0/_{00}$ Saponin entspricht (vgl. Tab. IV).

Das zu diesen Versuchen verwendete Saponinpräparat, das ich im Institut vorfand, Saponinum purissimum albissimum Merck, wirkte also auf NaCl- und Rz.-Bl. stärker giftig ein; dementsprechend war die Giftverstärkung, da ja die Auflösung der Zellen der Giftwirkung ein Ende setzte, geringer. Die weiteren Versuche wurden alle mit demselben giftigeren Saponinpräparat gemacht.

1. Versuche mit NaCl.

Tabelle IV.

$H = H_0 + 495 c \cdot c_{\text{Sap}}$ (Schwellenwertkonzentration $0,0014^0/_{00}$).

c	0,006 ⁰ / ₀₀ Sap $H = H_0 + 2,24 c$ $H_0 = 16$		0,008 ⁰ / ₀₀ Sap $H = H_0 + 3,24 c$ $H_0 = 21$		0,01 ⁰ / ₀₀ Sap $H = H_0 + 4,24 c$ $H_0 = 26$		0,012 ⁰ / ₀₀ Sap $H = H_0 + 5,24 c$ $H_0 = 31$		0,016 ⁰ / ₀₀ Sap $H = H_0 + 7,24 c$ $H_0 = 40$	
	H		H		H		H		H	
	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
1,54	20	20	25	26	33	33	38	39	50	54
3,08	23	23	30	31	45	39	55	48	70	69
7,70	29	33	44	46	61	58	73	72	—	—
12,32	42	44	72	71	—	—	—	—	—	—

Diese Befunde entsprechen, wie schon erwähnt, sehr gut der Formel:
 $H = H_0 + 495 c \cdot c_{\text{Sap}}$ (Schwellenkonzentration $0,0014^0/_{00}$ Saponin).

2. Versuche mit NaJ.

Diese Versuche entsprechen der Formel $H = H_0 + 250 c \cdot c_{\text{Sap}}$, wobei die Schwellenkonzentration $0,0048^0/_{00}$ beträgt. Auffallend ist die geringe verstärkende Wirkung des NaJ gegenüber dem NaCl und Resistenz der Bl. gegenüber denselben in Rz. und NaCl untersucht und gleichfalls gefunden, daß sie in ersterem wesentlich größer ist; da ich das gleiche für die NaOH- und Serumhämolyse beobachtet habe, bilden diese Untersuchungen somit eine ergänzende Bestätigung des qualitativ scheinbar allgemein gültigen Befundes, daß Bl. in Rz. resistenter sind als in Salzlösungen.

¹⁾ Dies. Arch. **190**, 173. 1921.

die ausgezeichnete Übereinstimmung der gefundenen und berechneten H -Werte (vgl. Tab. V).

Tabelle V.
 $H = H_0 + 250 c \cdot c_{\text{Sap}}$ (Schwellenwertkonzentration 0,0048‰).

c	0,006‰ Sap $H = H_0 + 0,82 c$ $H_0 = 16$		0,008‰ Sap $H = H_0 + 0,82 c$ $H_0 = 21$		0,01‰ Sap $H = H_0 + 1,30 c$ $H_0 = 26$		0,012‰ Sap $H = H_0 + 1 \cdot 70 c$ $H_0 = 31$		0,016‰ Sap $H = H_0 + 2,60 c$ $H_0 = 40$	
	H		H		H		H		H	
	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
1,54	16	16	20	22	27	28	34	34	39	40
3,08	16	17	23	23	30	30	37	36	48	48
7,70	18	18	27	27	34	36	42	44	58	60
12,32	21	20	30	31	39	42	51	52	72	74
15,40	22	21	34	34	46	46	57	57	82	80

Viel schwieriger ist die Aufstellung einer entsprechenden Formel für die Wirkung von Na_2SO_4 .

3. Versuche mit Na_2SO_4 .

Tabelle VI.

c	0,002 ‰ Sap	0,004 ‰ Sap	0,006 ‰ Sap	0,008 ‰ Sap	0,010 ‰ Sap	0,012 ‰ Sap	0,016 ‰ Sap
	H gefunden						
3,08	—	15	26	32	39	45	58
7,70	—	17	30	47	55	72	88
12,32	—	25	40	55	77	88	96
15,40	18	36	51	70	83	96	100

Aus diesen Versuchen konnte ich eine einheitliche allgemeingültige Formel nicht berechnen. Bei den gegen 0,01–0,016% Saponin eben empfindlichen Bl. entspricht die Verstärkung der Giftwirkung sehr gut der Formel $H = H_0 + 710 c \cdot c_{\text{Sap}}$, wobei sich als Schwellenkonzentration 0,0048‰ ergibt. Für die älteren Bl., die bereits durch 0,004–0,008‰ Saponin vergiftet werden, stimmt diese Formel gar nicht; hingegen stimmen die H -Werte in diesen Fällen ganz gut mit den nach einer Formel $H = H_0 + 345 c \cdot c_{\text{Sap}}$ berechneten überein, wenn als Schwellenkonzentration Null gesetzt wird; das würde bedeuten, daß es Bl. gibt, die in Na_2SO_4 -haltigen Medien schon durch die geringsten Spuren Saponin gelöst werden. Daß wir bei den Na_2SO_4 -Versuchen zu keiner einheitlichen Formel kamen, wie beim NaCl oder NaJ , dürfte seinen Grund darin haben, daß Bl., die in einer NaCl -Lösung noch zu den mittelalten gehören, in Na_2SO_4 -haltigen Lösungen bereits gealtert sind; *die Alterserscheinungen können daher in verschiedenen Medien in verschiedenen Lebensaltern eintreten.*

Noch komplizierter sind die Verhältnisse beim NaSCN .

4. Versuche mit NaSCN.

Tabelle VII.

<i>c</i>	0,004 ‰ Sap	0,006 ‰ Sap	0,008 ‰ Sap	0,010 ‰ Sap	0,012 ‰ Sap	0,016 ‰ Sap
<i>H</i> gefunden						
3,08	—	19	26	32	39	52
7,70	—	19	33	45	58	78
12,32	—	34	65	81	90	98
15,40	15	48	80	96	100	—

Auch beim NaSCN ist eine giftverstärkende Wirkung vorhanden, die mit zunehmender Salz- und Saponinkonzentration zunimmt; aber diese Zunahme ist der Konzentrationszunahme nicht proportional, wie wir dies bei den bisher besprochenen Salzen gesehen haben, sondern sie ist stärker, als es der Salzkonzentration entspricht; es muß also wohl das SCN-Ion nicht nur eine giftverstärkende, sondern auch selbst eine Giftwirkung im Sinne einer Hämolyse ausüben. Eine entsprechende Sonderstellung des SCN-Ions beobachtete auch I. Runnström¹⁾ bei Untersuchung der durch Salze bewirkten Stabilisierung von Bl. gegen die Sedimentation.

Was nun die Wirkung von Salzen mit anderen Kationen anlangt, paßt sich das LiCl sehr schön dem NaCl an.

5. Versuche mit LiCl.

Tabelle VIII.

$$H = H_0 + 1260 c \cdot c_{\text{sap}} \quad (\text{Schwellenwertkonzentration } 0,008\text{‰ Sap}).$$

<i>c</i>	0,006‰ Sap $H = H_0 + 1,45 c$ $H_0 = 16$		0,008‰ Sap $H = H_0 + 4,05 c$ $H_0 = 21$		0,01‰ Sap $H = H_0 + 6,65 c$ $H_0 = 26$		0,012‰ Sap $H = H_0 + 9,25 c$ $H_0 = 31$	
	<i>H</i>		<i>H</i>		<i>H</i>		<i>H</i>	
	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
3,08	16	20	29	33	46	46	59	59
7,70	29	27	51	51	74	77	85	—
12,32	43	34	73	71	85	—	97	—
15,40	89	88	96	—	100	—	—	—

Zur Charakterisierung der Wirkung des LiCl genügt die Formel $H = H_2 + 1260 c \cdot c_{\text{sap}}$ ganz gut, wobei sich als Schwellenkonzentration 0,0048‰ errechnet; die giftverstärkende Wirkung des LiCl ist größer als die des NaCl, was sehr gut mit anderen biologischen Wirkungen des Li-Ions übereinstimmt.

Viel komplizierter gestalten sich die Beziehungen bei Salzen, die selbst hämolytisch wirken. Hierher gehören die Mg- und Ca-Salze, mit denen folgende Versuche gemacht wurden.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. **123**, 1. 1921.

6.—13. Versuche mit Mg- und Ca-Salzen.

6. MgSO_4 und Rz.-Bl.

Tabelle IX.

$c_{\downarrow}$	$c_{\text{Sap}} \rightarrow$ $c_{\text{Rz}} \downarrow$	0,000	0,004 ‰	0,006 ‰ $H_0 = 16$	0,010 ‰ $H_0 = 26$	0,012 ‰ $H_0 = 31$	Volum
0,0154 n	7,02‰	10	14	51	80	90	0,0060
0,0308 n	6,24‰	16	28	56	95	95	0,0058
0,0770 n	3,90‰	21	52	63	—	96	0,0060
0,1232 n	1,56‰	93	80	86	78	96	0,0077
0,1540 n	0	100	100	100	100	100	—

7. $\text{Mg}(\text{SCN})_2$ und Rz.-Bl.

Tabelle X.

$c_{\downarrow}$	$c_{\text{Sap}} \rightarrow$ $c_{\downarrow}$	0,000	0,004 ‰	0,008 ‰	0,010 ‰	0,012 ‰	0,016 ‰	0,025 ‰
0,0308 n	28	16	37	50	65	78	96	96
0,0770 n	33	20	42	55	73	94	96	96
0,1232 n	35	28	53	65	82	—	—	—
0,1540 n	96	88	80	80	80	85	90	90

8. MgSO_4 und NaCl-BI.

Tabelle XI.

$c_{\downarrow}$	$c_{\text{Sap}} \rightarrow$ $c_{\text{NaCl}} \downarrow$	0	0,004 ‰	0,006 ‰	0,010 ‰	0,012 ‰	Volum *)
0 n	0,154 n	0	50	91	100	—	0,0072
0,0154	0,1386	25	51	64	84	96	0,0063
0,0308	0,1232	9	38	55	76	80	0,0074
0,0770	0,0770	61	64	75	78	81	0,0055
0,1232	0,0308	} 100					
0,1540	0						

9. CaBr_2 und Rz.-Bl.

Tabelle XII.

$c_{\downarrow}$	$c_{\text{Sap}} \rightarrow$ $c_{\text{Rz}} \downarrow$	0	0,004 ‰	0,006 ‰	0,008 ‰	0,010 ‰	Volum *)
0,0154 n	7,02‰	0	21	58	79	96	0,0046
0,0308 n	6,24‰	0	40	73	83	96	
0,0770 n	3,90‰	14	54	84	96	100	0,0062
0,1232 n	1,56‰	21	58	93	96	100	
0,1540 n	0‰	24	68	88	100	100	0,0062

10. $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ und Rz.-Bl.

Tabelle XIII.

$c_{\downarrow}$	$c_{\text{Sap}} \rightarrow$ $c_{\text{Rz.}} \downarrow$	0	0,004 ‰	0,006 ‰	0,008 ‰	0,010 ‰	Volum *)
0,0308	6,24‰	28	44	65	88	96	0,0056
0,0770	3,90‰	34	41	67	90	96	0,0043
0,1232	1,56‰	42	68	85	90	96	
0,1540	0‰	85	87	91	95	96	

11. CaCl_2 und Rz.-Bl.

Tabelle XIV.

$c_{\downarrow}$	$c_{\text{Sap}} \rightarrow$ $c_{\text{Rz.}} \downarrow$	0	0,004 ‰	0,006 ‰	0,008 ‰	0,010 ‰	
0,0154	7,02‰	0	61	80	92	98	
0,0308	6,24‰	0	48	70	82	95	
0,0770	3,90‰	24	25	68	78	90	
0,1232	1,56‰	60	62	86	98	100	
0,1540	0 ‰	90	98	100	—	—	

12. CaBr_2 und NaCl -Bl.

Tabelle XV.

$c_{\downarrow}$	$c_{\text{Sap}} \rightarrow$ $c_{\text{NaCl}} \downarrow$	0	0,004 ‰	0,006 ‰	0,008 ‰	0,010 ‰	Volum *)
0 n	0,154 n	0	52	91	95	100	0,0088
0,0154	0,1386	0	14	65	80	96	
0,0808	0,1232	40	73	91	96	100	0,0052
0,0770	0,0770	0	51	84	96	100	0,0088
0,1232	0,0308	0	51	78	—	100	
0,1540	0	20	54	72	100	100	0,0078

14. Kombinierte MgSO_4 und CaBr_2 -Wirkung auf Rz.-Bl.

Tabelle XVI.

MgSO_4	CaBr_2	Rz	NaCl	Sap	H	Volum
0,077 n	—	3,92‰	—	0 0,004 0,006 0,010	28 35 50 62	0,0083
0,046 n	0,031	3,92‰	—	0 0,004 0,006 0,010	27 35 48 81	—

Tabelle XVI (Fortsetzung).

MgSO ₄	CaBr ₂	Rz	NaCl	Sap	H	Volum
0,015	0,062	3,92%	—	0 0,004 0,006 0,010	10 44 81 92	—
—	0,077 n	3,92%	—	0 0,004 0,006 0,010	10 51 81 96	0,0077

Aus der Fülle von Einzelheiten, die in diesen Versuchen beobachtet werden konnten, seien folgende hervorgehoben:

1. Alle Mg-Salze verstärken die Wirkung des Saponins gegenüber Rz.-Bl., und zwar MgSO₄ mehr als Mg(SCN)₂.

2. Es besteht eine ausgesprochene antagonistische Wirkung von Rz. und Mg auf die Saponinempfindlichkeit der Bl.; schon Spuren von Rz. hemmen die Mg-Hämolyse beträchtlich, während die Ca Hämolyse entsprechend dem Ca-Gehalt zunimmt, recht unabhängig vom Rz.-Gehalt. Diese Annahme wird auch durch folgenden instruktiven Versuch gestützt: In einer 0,154 n-MgSO₄- sowohl als auch in einer 0,154 n-CaCl₂-Lösung werden die Bl. in kurzer Zeit schon bei Zimmertemperatur komplett gelöst; werden zu beiden einmal Rz das andere Mal NaCl in Mengen, hinzugefügt, so daß alle Mischungen doppelt isotonisch sind, dann wird die MgSO₄-Hämolyse durch Rz., nicht aber durch NaCl-Überschuß gehemmt, die CaCl₂-Hämolyse weder durch Rz., noch durch NaCl. Der Antagonismus erstreckt sich insbesondere auf die mittelalten und jungen Bl., denn obwohl z. B. in einer 0,154 n-Mg(SCN)₂-Lösung 96% Bl. gelöst werden, sind in derselben Lösung + 0,01% Saponin nur 80% Bl. gelöst (Tab. X). Die Mg-Salze schützen also besonders die jungen Bl. vor der Saponinvergiftung.

3. Wird ein Teil des NaCl durch die gleiche Anzahl Mole MgSO₄ ersetzt, dann hängt die hämolytische Wirkung vom Verhältnis $\frac{\text{MgSO}_4}{\text{NaCl}}$ ab; sie hat, wenn $\frac{\text{MgSO}_4}{\text{NaCl}} = 0,11$ ein Maximum, nimmt dann bis $\frac{\text{MgSO}_4}{\text{NaCl}} = 0,25$ ab und steigt von da wieder an (Tab. XI).

4. Wird ein Teil des NaCl durch die gleiche Anzahl Mole MgSO₄ ersetzt, dann wird die Giftempfindlichkeit der jüngeren Bl. vermindert, die der älteren gesteigert; die verstärkende Wirkung nimmt mit zunehmendem Mg-Gehalt ab.

5. Die Ca-Salze üben auch stets eine verstärkende Wirkung auf die Saponinvergiftung der Rz.-Bl. aus, die von der Salzkonzentration

ziemlich unabhängig ist. Beim CaCl_2 geht sie durch ein Maximum. Von den untersuchten Konzentrationen wirkt die am stärksten lytisch wirkende Konzentration am schwächsten verstärkend (Tab. XIV).

6. Ersatz von NaCl durch kleine Mengen CaBr_2 vermindert die Giftempfindlichkeit der Bl. beträchtlich; in höheren Konzentrationen, also bei zunehmendem Verhältnis $\frac{\text{Ca}}{\text{Na}}$, wird die Giftempfindlichkeit der alten Zellen beträchtlich gesteigert, die der jungen, wenn auch in geringem Ausmaß, vermindert (Tab. XV).

7. Der bekannte biologische und allgemein kolloidchemische Antagonismus von ein- und zweiwertigen Ionen gilt also auch für die Beeinflussung der Giftempfindlichkeit von Bl. gegenüber Saponin. Ein Antagonismus von Ca und Mg konnte nicht beobachtet werden, höchstens in bezug auf die jungen Zellen, deren Giftempfindlichkeit durch Mg -Salze beträchtlich herabgesetzt wird, nicht aber durch Ca -Salze.

Wenn wir jetzt daran gehen, die obigen Versuche durch kolloidchemische Überlegungen auf eine einheitliche Basis zu stellen, müssen wir zunächst noch unsere Erfahrungen über den Zusammenhang von Giftempfindlichkeit und Volumen der Bl. sammeln.

Die Volumina der Rz.-Bl. sind bei den verschiedenen Blutproben natürlich nicht gleich, ebensowenig die der NaCl -Bl., wohl aber ist das Volumen der Bl. derselben Entnahme in 7,8proz. Rz. stets um ca. 20% geringer als in 0,154 n- NaCl -Lösung (vgl. Tab. XVII).

Tabelle XVII.

Hier und im folgenden ist unter Volumen stets das Volumen von 109 Millionen Bl., und zwar in Kubikzentimeter gemeint. 109 Millionen sind in 1 ccm einer 2,5proz.

Kaninchenblutsuspension durchschnittlich vorhanden.

Volumina der Blutkörperchen in 1 ccm 2,5proz. Blut aufgeschwemmt in

7,8% Rohrzucker	0,9% NaCl
0,0045	—
0,0046	0,0060
0,0058	0,0070
0,0060	0,0072
0,0060	0,0073
0,0060	0,0074
—	0,0076
—	0,0076
—	0,0076
0,0072	0,0086
0,0072	0,0091
Mittel: 0,0059	0,0073

Eine Ursache für das verschiedene Volumen der Bl. verschiedener Kaninchen im gleichen Milieu konnte ich nicht auffinden. Nachdem ich

die Arbeit von *Ege*¹⁾ gelesen hatte, habe ich Kontrollen der Volumbestimmung von NaCl und auch Rz.-Bl. gemacht, indem ich das Volumen zu Beginn des Versuches, etwa $\frac{3}{4}$ Stunden nach dem Vermischen der Bl. mit ihrer Suspensionsflüssigkeit, nach Herausnehmen aus dem Brutschrank, also etwa $2\frac{1}{4}$ Stunden später und nach etwa 10stündigem Verweilen im Eisschrank bestimmte. Ich konnte keinerlei Unterschiede in der Größe des Bl.-Volumens zu diesen 3 verschiedenen Zeitpunkten finden, was ja schließlich den Befunden *Eges* nicht direkt widerspricht. Die Volumbestimmung geschah stets in selbst nachtarierten *Hamburger*-schen *Chronohämatokriten* mit 0,02 bzw. 0,04 ccm Capillarinhalt; ich mußte stets $1\frac{1}{2}$ – $1\frac{3}{4}$ Stunde bis zur Volumkonstanz zentrifugieren.

Eine darauf gerichtete Durchsicht der oben mitgeteilten Tabellen lehrt allenthalben, daß *ein Zusammenhang zwischen Volumen und Giftempfindlichkeit der Bl. nicht besteht*. Besonders eklatant erscheint ein Versuch, in dem Bl. derselben Entnahme unter 2 verschiedenen Bedingungen ein Volumen von 0,0072 ccm hatten, aber durch 0,008 $\frac{8}{100}$ Saponin im einen Fall zu 30%, im anderen zu 96% hämolysiert wurden. Das gleiche beweist der Einfluß der Konzentration des Rz. auf Giftempfindlichkeit und Volumen der Bl. (vgl. Tab. XVIII).

Tabelle XVIII.

c_{Rz} %	Volum		H (Versuch 43)	
	Versuch 26	Versuch 43	0,012 $\frac{12}{100}$ Sap	0,025 $\frac{25}{100}$ Sap
5,85	0,0049	0,0059	32	84
7,8	0,0047	0,0056	34	62
15,6	0,0037	0,0087	32	62

Trotz des mit zunehmender Rz.-Konzentration kontinuierlich abnehmenden Volums, eine Erscheinung, die inzwischen von *T. Takei*²⁾ im *Hamburger*-schen Institut systematisch untersucht wurde, ist die Giftempfindlichkeit in hypo- bis hypertonischen Lösungen gleich, in hypotonischen erscheint die Resistenz der jungen Bl. vermindert.

In diesem Zusammenhang muß noch ein Versuch erwähnt werden: Es ist, wie ich mich wiederholt überzeugen konnte, für Volumen und Saponinempfindlichkeit der Bl. gleichgültig, ob diese vor dem Aufschwemmen in Rz. in NaCl oder in Rz. serumfrei gewaschen wurden. Nicht gleichgültig ist dies jedoch für Bl., die in NaCl aufgeschwemmt werden sollen. Schon *Gürber*³⁾ hatte beobachtet, daß in Rz. gewaschene Bl. gegen CO₂ ungemein empfindlich sind. Ich konnte zweimal beobachten, daß in Rz. bis zur Cl-Freiheit der Waschflüssigkeit gewaschene

¹⁾ Biochem. Zeitschr. **115**, 109. 1920 und ebenda **115**, 175. 1921.

²⁾ Biochem. Zeitschr. **123**, 126. 1921.

³⁾ Habilitationsschrift. Würzburg 1904.

Bl. gegenüber 0,154 n-NaCl sehr empfindlich geworden sind; das NaCl wirkt dann so wie sonst Salze mit zweiwertigen Kationen (vgl. Tab. XIX).

Tabelle XIX.

$\frac{Rz}{Na}$ ^{a)}	c_{sap} ‰	Rohrzucker-Waschung ¹⁾		NaCl-Waschung ¹⁾	
		H ‰	Vol.	H ‰	Vol.
$\frac{5}{1}$	0 0,004 0,006 0,010	0 0 16 21	0,0058 0,0050	0 0 16 21	0,0058
$\frac{4}{1}$	0 0,008	10 26		0 25	
$\frac{2,5}{2,5}$	0 0,008	14 30	0,0072	0 32	0,0069
$\frac{1}{4}$	0 0,008	36 62		0 65	
$\frac{0}{5}$	0 0,004 0,008	96 96 100		0 56 96	0,0072

Interessanterweise bleibt die Saponnempfindlichkeit die gleiche, ob die NaCl-Bl. in Rz. oder in NaCl gewaschen wurden. Die Ursachen der Hämolyse durch Salze und die der giftverstärkenden Wirkung der Salze sind also verschieden. Die hämolysierende Wirkung von Ionen beruht, wie *Stewart* ³⁾ und neuerdings besonders *Haffner* ⁴⁾ nachgewiesen haben, auf *Fällung* oder *Quellung* von Hämoglobin oder Stroma, die *verstärkende Wirkung* jedoch, wie ich wahrscheinlich gemacht zu haben glaube ⁵⁾, auf einer *Vergrößerung der freien Oberfläche*, als Angriffspunkt des oberflächenaktiven Giftes ⁶⁾. Wie können wir uns diese Oberflächenvergrößerung vorstellen? Da müssen wir uns zunächst der Frage zuwenden, in welchem kolloidchemischen Zustand sich die Rz.-Bl. befinden.

Die Rz.-Bl. haben stets ein ca. 20% geringeres Volumen als NaCl-Bl. Um eine Entquellung im gewöhnlichen Sinn kann es sich hier schwer handeln; denn 1. ist von einer entquellenden Wirkung von Rz.

¹⁾ Blut derselben Entnahme.

²⁾ $\frac{Rz}{Na}$ bedeutet das Verhältnis von Kubikzentimetern isotonischer Rohrzucker- zu isotonischer NaCl-Lösung.

³⁾ Americ. Journ. of physiol. **11**, 374. 1904.

⁴⁾ Verhandl. d. dtsh. pharmakol. Ges. 1921, S. XXIX.

⁵⁾ Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **190**, 173. 1921.

⁶⁾ Über die Unterschiede dieser verschiedenen Ursachen vgl. des Verf. Leitfaden der Kolloidchemie f. Biol. u. Med. Dresden 1922, S. 185.

nichts bekannt, 2. wäre eine Entquellung reversibel, während die Rz.-Bl. eine nachherige Aufschwemmung in 0,154 n-NaCl nicht vertragen. Wir stellen uns vielmehr vor, daß die Rz.-Bl. mehr gelatinisiert sind als die NaCl-Bl.; die Volumabnahme dürfte so vor sich gehen, daß beim Gelatinieren oder erst beim Zentrifugieren — das wird sich experimentell schwer entscheiden lassen — der Rz.-Bl. Wasser ausgepreßt wird. Daß die Volumabnahme der Rz.-Bl. mit zunehmender Rz.-Konzentration fortschreitend zunimmt, spricht nicht gegen die Auffassung einer Gelatinierung; dafür gibt es vielmehr in der Kolloidchemie viele Beispiele¹⁾.

Die Gelatinierung ist stets mit einer Dispersitätsgradverminderung verbunden²⁾. Die Salze wirken dieser Gelatinierung entgegen, erhöhen den Dispersitätsgrad und vergrößern die Angriffsfläche des Giftes. Für den mehr gelatinierten Zustand der Rz.-Bl. spricht auch der Antagonismus des Rz. gegenüber den Mg-Salzen (vgl. oben S. 259); denn die Mg-Salze sind als Verflüssiger des Protoplasmas bekannt³⁾. Auch der oben angeführte (Tab. X) eigentümliche Befund, daß hämolysierende $\text{Mg}(\text{SCN})_2$ -Konzentrationen durch geringe Saponinkonzentrationen in ihrer Wirkung antagonistisch beeinflußt werden, läßt sich in unserem Sinne deuten, da wir nach Untersuchungen von Knaffl-Lenz⁴⁾ annehmen können, daß oberflächenaktive Stoffe in niedrigen Konzentrationen eine Verfestigung des Protoplasmas bedingen.

Wir kommen also zu folgender Vorstellung über die Ursachen der oben beschriebenen Phänomene: Der Rz. bewirkt innerhalb der wohl ständig hin und her pendelnden Sol-Gelumwandlung des Protoplasmas einen mehr gelatinierenden Zustand, dieser ist mit einer Verminderung des Dispersitätsgrades verbunden, die die Bl. für das oberflächenaktive Gift weniger empfindlich macht. Salze beeinflussen diesen Zustand in der entgegengesetzten Richtung; sie machen daher die Rz.-Bl. wieder giftempfindlicher, und zwar, was zugleich als Wahrscheinlichkeitsbeweis für diese Annahme angeführt sei, wenn sie selbst keine hämolytischen Wirkungen ausüben, nach den für die Adsorptionsverstärkung geltenden Gesetzmäßigkeiten. Dabei ist es für diese Probleme natürlich belanglos, ob der Zustand der Rz. — oder der der NaCl — Bl. dem der Bl. im strömenden Blut näher kommt.

¹⁾ Vgl. Leitfaden, S. 173.

²⁾ Vgl. Leitfaden, S. 163 ff.

³⁾ Vgl. z. B. Hannsteen-Cranner, Jahrb. f. wiss. Botan. **53**, 536. 1914.

⁴⁾ Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **171**, 54. 1918.