XX.

Aus der Med. Univ.-Klinik zu Straßburg i. E.
Direktor: Prof. Dr. Moritz.

Über die Beziehungen von Lipoidsubstanzen zur Hämolyse.

Von

Dr. Wilhelm Meyerstein,
Assistenzarzt der Klinik.

Es ist bekannt, daß manche Lipoidsubstanzen eine weitgehende Bedeutung für das Zustandekommen des Hämolyse besitzen. Genauer studiert sind vor allem die Wirkungen des Cholesterins und des Lecithins. Über andere Lipide finden sich noch mehr oder weniger zusammenhängende Angaben in der Literatur, auf die später noch zurückzukommen sein wird.

Ausgehend von eigenen früheren Untersuchungen über die Hemmung der Seifenhämolyse durch eine Reihe von Lipoidsubstanzen schien es mir von Interesse, festzustellen, ob mit diesen Substanzen die gleiche Wirkung sich auch anderen hämolytischen Agentien gegenüber erzielen und so ein Einblick in das Wesen dieser Hemmung gewinnen lasse.

Als Hämolytika wurden benutzt Saponin, Natr. oleinic., Natr. taurochol. (sämtlich Mercksche Präparate) und Cobragift von Calmette. Von Lipoiden kamen zur Verwendung Cholesterin und Ovo-Lecithin (Merek), ferner Kephalin und Cerebron, die, aus Menschenhirnen dargestellt, mir ebenso wie für eine frühere Arbeit von Herrn Dr. Parnas vom hiesigen chemisch-physiologischen Institut freundlichst überlassen wurden. Während die genannten hämolytischen Agentien in physiol. Kochsalzlösung in der notwendigen Konzentration leicht löslich sind, wurden die Verdünnungen der Lipide in der Weise hergestellt, daß sie in physiol. Kochsalzlösung mit Glasperlen mehrere Stunden im Apparat geschüttelt wurden. Man erhält (beim Lecithin war noch ein kleiner Zusatz von Äther notwendig, der später bei geringer Wärme verjagt wurde) auf diese Weise Emulsionen bzw. Suspensionen, die verhältnismäßig haltbar

sind und, vor der Verwendung aufgeschüttelt, sich als hinreichend gleichmäßig erwiesen.

Außerdem wurden noch die Lipoide, die in den Erythrocyten selbst enthalten sind, untersucht, und zu diesem Zwecke der mehrfach gewaschene Blutkörperchenbrei von a cem Hammelblut mit der 4- bis 5fachen Menge 96 proz. Alkohol unter öfterem Umschütteln mehrere Tage bei 36° digeriert. Dann wurde filtriert, das Filtrat bei mäßiger Wärme im Vacuum vorsichtig abgedampft und der Rückstand mit a cem physiol. Kochsalzlösung aufgenommen und mit Glasperlen geschüttelt. Der so gewonnene Extrakt stellt eine gleichmäßige gelblich-braune Emulsion dar.

Durch Vorversuche wurde zunächst die Wirkungsweise der verschiedenen Lipoide und die für die Beobachtung geeignetste Anordnung ermittelt. In den folgenden Tabellen sind die Resultate der Kombinationen angegeben, die die festgestellten Wirkungen am deutlichsten zum Ausdruck bringen.

Die Versuche erfolgten bei Brutschranktemperatur mit je 1 cem einer 5 proz. Hammelblutemulsion (bzw. in Reihe IV, Menschenblutemulsion). Die mit den Agentien beschickten Röhrchen wurden vor der Einführung des Blutes eine Stunde im Brutschrank gehalten und schließlich sämtlich auf 3 cem mit physiol. Kochsalzlösung aufgefüllt.

Tabelle I.

Saponin.

0.1% Saponin.	a) 1 % Cholesterin cem.			
cem	0.	0.1	0.2	0.5
0.2	kompl. Häm. 30 Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
b) 0.02 % Lecithin cem.				
0.2	kompl. Häm. 25 Min.	kompl. Häm. 2 St.	kompl. Häm. 3 St.	inkompl. Häm. 3 St.
c) 1 % Kephalin cem.				
0.2	kompl. Häm. 25 Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
d) 1 % Cerebron cem.				
0.2	kompl. Häm. 30 Min.	inkompl. Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
e) Erythrocyten-Extrakt cem.				
0.2	kompl. Häm. 30. Min.	kompl. Häm. 2 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.

Tabelle II.

Natr. oleinic.

0.1 % Natr. olein.		a) 1 % Cholesterin cem.			
cem	0.	0.1	0.2	0.5	
0.1	kompl. Häm. 20 Min.	kompl. Häm. 80 Min.	kompl. Häm. 100 Min.	inkompl. Häm. 3 St.	
b) 0.02 % Lecithin cem.					
0.1	kompl. Häm. 20 Min.	kompl. Häm. 25 Min.	kompl. Häm. 20 Min.	kompl. Häm. 18 Min.	
c) 1 % Kephalin cem.					
0.1	kompl. Häm. 25. Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	
d) 1 % Cerebron cem.					
0.1	kompl. Häm. 20 Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	
e) Blutkörperchen-Extrakt cem.					
0.1	kompl. Häm. 20 Min.	kompl. Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	

Tabelle III.

Natr. Tanrochol.

1 % Natr. taurochol.		a) 1 % Cholesterin cem.			
cem	0.	0.1	0.2	0.5	
0.1	kompl. Häm. 40 Min.	kompl. Häm. 45 Min.	kompl. Häm. 40 Min.	kompl. Häm. 50 Min.	
b) 0.5 % Lecithin. cem.					
0.1	kompl. Häm. 45 Min.	kompl. Häm. 2 St.	inkompl. Häm. 3 St.	kompl. Häm. 40 Min.	
c) 1 % Kephalin. cem					
0.1	kompl. Häm. 30 Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	
1 % Cerebron. cem					
0.1	kompl. Häm. 30 Min.	kompl. Häm. 2 St.	inkompl. Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	
e) Erythrocyten-Extrakt.					
0.1	kompl. Häm. 40 Min.	kompl. Häm. 3 St.	inkompl. Häm. 3 St.	inkompl. Häm. 3 St.	

Tabelle IV.

Cobragift.

1 ccm 5 % Menschenblut.

0.0002 %
Cobragift

a) 1 % Cholesterin. ccm

ccm	0.	0.1	0.2	0.5
0.3	kompl. Häm. 25 Min.	kompl. Häm. 35 Min.	inkompl. Häm. 3 St.	inkompl. Häm. 3 St.
b) 0.02 % Lecithin ccm.				
0.3	kompl. Häm. 25 Min.	kompl. Häm. 10 Min.	kompl. Häm. 5 Min.	kompl. Häm. 5 Min.
c) 1 % Kephalin. ccm.				
0.3	kompl. Häm. 30 Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
d) 1 % Cerebron. ccm.				
0.3	kompl. Häm. 30 Min.	inkompl. Häm. 3 St.	inkompl. Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
e) Erythrocythen-Extrakt. ccm.				
0.3	kompl. Häm. 35 Min.	inkompl. Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.

Tabelle V.

Cobragift-Lecithin.

1 ccm 5 % Hammelblut.

0.0002 %
Cobragift

0.02 %

a) 1 % Cholesterin. ccm.

ccm	Lecithin ccm	0.	0.1	0.2	0.5
0.3	—	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
0.3	0.3	kompl. Häm. 50 Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
b) 1 % Kephalin. ccm.					
0.3	—	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
0.3	0.3	kompl. Häm. 40 Min.	kompl. Häm. 2 St.	inkompl. Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
c) 1 % Cerebron. ccm					
0.3	—	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
0.3	—	kompl. Häm. 40 Min.	inkompl. Häm. 3 St.	inkompl. Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
d) Erythrocyten-Extrakt.					
0.3	—	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.
0.3	0.3	kompl. Häm. 40 Min.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.	0 Häm. 3 St.

Überblickt man vergleichend die obigen Ergebnisse, so zeigt sich im wesentlichen, daß alle untersuchten hämolytischen Prozesse mit wenigen, noch zu erörternden Ausnahmen, durch die verwendeten Lipide hemmend beeinflusst wurden.

Vom Cholesterin ist eine derartige Wirkung durch die Untersuchungen von Ransom (1) für die Saponinhämolyse und durch die Arbeiten von Kyes und Sachs (2) für die Cobragifthämolyse seit längerem bekannt. Die Beeinflussung der Seifenhämolyse ist in neuerer Zeit geklärt worden; im Gegensatz zu früheren Angaben von Kurt Meyer (3) gelang es Jsovesko und Foucaud (4 u. 5) und mir (6), eine vollkommene Aufhebung der Natriumoleat-Hämolyse zu erzielen. Zu diesem Zwecke brachten Jsovesko und Foucaud die mit Cholesterin versetzte Natriumoleatlösung für längere Zeit in den Brutschrank, wogegen ich das Seifencholesteringemisch aufkochte. In den obigen Versuchen habe ich diese Technik nicht angewendet, weil ich einerseits für die labileren Substanzen wie Kephalin, Lecithin höhere Temperaturen verwenden, andererseits eine Gleichmäßigkeit der Versuchsanordnungen erzielen wollte. Übrigens geht aus einem Vergleich der oben angegebenen Resultate (Tab. II a) mit meinen früheren Untersuchungsergebnissen (6) mit großer Deutlichkeit hervor, daß der Aufkochmethode bei weitem die intensivere Wirkung zukommt, da mit ihrer Hilfe viel geringere Mengen Cholesterin zur vollkommenen Hemmung führen.

Auffallend ist die Tatsache, daß das Cholesterin auf die Gallensalz-hämolyse ohne Einfluß blieb (Tab. III a), was mit den Angaben von Bayer (7) übereinstimmt. Hier ließ sich auch durch Aufkochen kein anderes Resultat erreichen. Zur Erklärung muß man in Betracht ziehen, daß das Cholesterin offenbar auf zweierlei Weise seine Hemmungswirkung auszuüben vermag; entweder bildet es mit der hämolytischen Substanz, wie dies Windaus (8) für das Saponin zeigen konnte, eine chemische Verbindung oder es wird gelöst und wirkt als solches adsorbierend, „ablenkend“ auf das hämolytische Agens, ein Vorgang, den ich für die Seifenhämolyse darzutun versucht (6) habe. Dabei kann man beobachten, daß je weniger konzentriert die Seifenlösung ist, umsomehr Cholesterin im Verhältnis zum gelösten Natr. olein. in Lösung zu bringen ist. Auch im Natr. taurochol. ist Cholesterin bekanntlich in gewisser Menge löslich. Da aber die hämolytische Kraft des Natr. taurochol. weit schwächer ist als die des Natr. olein. und man daher zum hämolytischen Versuche höherer Konzentrationen bedarf (cf. Tab. II u. III), so wäre es denkbar, daß die Wirkung des Cholesterins bei der Taurochol-

Hämolyse deshalb ausbleibt, weil die Menge des gelösten Cholesterins relativ zu gering ist.

Lecithin zeigt deutliche Hemmungswirkung für die Saponin- und Gallensalzhämolyse (Tab. Ib u. IIIb), wie dies auch von Arrhenius(7) bzw. Bayer(9) festgestellt wurde, blieb dagegen einflußlos für die Seifenhämolyse (Tab. IIb); in einigen Versuchen war sogar eine gewisse Beschleunigung des Eintritts der Hämolyse zu beobachten. F. Sachs(10) berichtet, daß von zwei untersuchten Lecithinpräparaten das Lecithin Agfa, des selbst hämolytische Kraft besitzt, begünstigend, das Lecithol Riedel, das nur in Spuren zu hämolysieren vermag, dagegen hemmend auf die Seifenhämolyse einwirkte. Ich benutzte, wie vorher angegeben, Ovo-Lecithin (Merck), das ebenfalls eine gewisse hämolytische Wirkung entfaltet. Sachs vermutet, daß das Lecithin Agfa deshalb nicht zu einer Hemmung führte, weil in ihm selbst Seifen enthalten sein dürften. Auch für das Ovo-Lecithin glaube ich solches annehmen zu müssen. Daß dieses Lecithin gleichwohl die Saponin- und Gallensalzhämolyse zu hemmen imstande ist, scheint mit nicht dagegen zu sprechen. Vielmehr könnte hier der gleiche Fall vorliegen, wie ich ihn für verschiedene Seifen früher zeigen konnte(11), daß verschiedene Hämolytika bei ihrem Zusammentreffen sich in ihrer Wirkung unterstützen, sondern auch gegenseitig abschwächen können.

Weiterhin ergab sich, daß sämtliche untersuchten Arten der Hämolyse durch Kephalin gehindert werden konnten (Tab. Ic—Vc). Hervorzuheben ist hier besonders der hemmende Einfluß auf die Cobragifthämolyse (Tab. IVc u. Vc). Bekanntlich müssen wir nach den Untersuchungen von Kyes(12) zwei Arten von Erythrocyten unterscheiden, solche, die durch Cobragift allein gelöst werden und solche, bei denen dies nur bei Zusatz von Lecithin der Fall ist. Als Repräsentanten für die erste Art wählte ich Menschen-Erythrocyten (Tab. IV) und für die zweite Art Hammelerythrocyten (Tab. V). Aus den Untersuchungen von Kyes und Sachs(2) geht nun hervor, daß außer Lecithin auch Kephalin einen aktivierenden Einfluß auszuüben vermag. Ich vermochte dagegen einen solchen Einfluß nicht festzustellen; im Gegenteil ergab sich sowohl für die Cobragift- wie für die Cobragiftlecithin-Hämolyse eine vollkommene Hemmung durch das Kephalin (Tab. IVc und Vc).

Vielleicht erklärt sich diese Differenz der Ergebnisse aus einer Verschiedenheit der verwendeten Präparate. Denn Kyes und Sachs geben an, daß ihre Substanz anzusehen sei als Dioxysteoxyldi-

methyllecithin, während Parnas, dem ich mein Präparat verdanke, und der gerade über die Konstitution des Kephalins eingehend gearbeitet hat (13), dieses keineswegs mit dem genannten Körper identifiziert, sondern definiert als ein alkoholunlösliches Phosphatid, dessen Base wahrscheinlich Methyloxäthylamin und dessen Säuren Stearinsäure und Linolsäure sind.

Ebenso konstant und absolut antilytisch wie das Kephalin erwies sich auch das Cerebron, ein glykosidartiges Lipoid aus der Gruppe der Cerebroside (Tab. Id—Vd). Von einem anderen Repräsentanten dieser Gruppe, dem Cerebrin (Merck), berichtet Beyer (7) für die Gallensalzhämolysen gleichfalls eine deutlich hemmende Wirkung.

Die Lipotide Cholesterin, Lecithin, Kephalin und Cerebron, die ich in den Kreis meiner Untersuchungen zog, und von denen ich mit nur einigen, und wie ich glaube, erklärlichen Einschränkungen eine Hemmung der geprüften Hämolysarten feststellen konnte, erregen gemeinsam auch wegen ihres Vorkommens im Organismus biologisches Interesse. Sie finden sich nämlich sämtlich außer in dem Hauptdepot der Lipoidsubstanzen, dem Gehirn, nach den Arbeiten von Bang u. Forssmann (14) und Pascucci (15) in den Stromata der Erythrocyten und stellen deren hauptsächlichsten Lipoidgehalt dar.

Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob der Lipoidextrakt der roten Blutkörperchen selbst die gleiche Wirkung wie die einzelnen Komponenten zu entfalten imstande ist. Ich verwendete alkoholische Extrakte, deren Herstellung oben angegeben wurde. Zwar sind nur ein Teil der in Frage kommenden Lipotide als solche in Alkohol löslich. Aber da Gemische von Kolloiden sich in ihrem gesamten physikalischen Verhalten und besonders auch hinsichtlich ihrer Löslichkeit gegenseitig beeinflussen, so durfte man hoffen, mit solchen Extrakten ein Gesamtbild von dem Verhalten der Erythrocytenlipotide zu gewinnen. In der Tat erwiesen sich diese für sämtliche Arten der Hämolysen als antilytisch (Tab. Ie—Ve), wie dies für die Seifenhämolysen von Isovesko (19) und von mir (11) bereits früher gezeigt worden ist und wie es übrigens für andere hämolytische Prozesse (durch Serum, Tetanolyse) mit Ätherextrakten ganz analog von Landsteiner und v. Eisler (16) beobachtet wurde. Daß auch die Cobragifthämolysen in demselben Sinne beeinflußt wurde (Tab. IVe und Ve), widerspricht nicht der von Kyes (12) und Kyes und Sachs (2) berichteten Tatsache der Cobragiftaktivierung durch Erythrocyten bzw. durch ihre Lösungen und Stromataaufschwemmungen. Denn es ist zu beachten, daß ich Extrakte von Hammel-

erythrocyten verwendete, deren aktivierende Tätigkeit nach den genannten Autoren an sich schon inkonstant ist, und daß außerdem bei der Herstellung des Extraktes eine Abdampfung vorgenommen wurde, die aktivierende Tätigkeit aber bei 62 Grad verloren geht.

Aus den mitgeteilten Hemmungswirkungen scheint mir mit großer Sicherheit hervorzugehen, daß zwischen Lipoidsubstanzen und Hämolsinen starke Affinitäten bestehen, worauf auch Landsteiner und Ranbitschek (17) in einer jüngst erschienenen Arbeit hinweisen. Dabei ist es praktisch nicht von großer Bedeutung, wie dies Pick und Schwarz (18) ähnlich für Kolloidgemenge im allgemeinen anführen, ob es zwischen den beiden Faktoren zu echten chemischen Verbindungen (Saponin-Cholesterin von Windaus) oder nur zu physikalischen Anlagerungen, Adsorptionen kommt. Diese Affinitäten sind jedenfalls — wie für die geschilderte Hemmung — auch die Ursache für das Zustandekommen der Hämolyse, indem sie die Einwirkung der Hämolytika überhaupt erst möglich machen und dürften unter Weiterführung dieses Ransomschen (1) Gedankens vielleicht auch als bedeutungsvoll für den Ablauf pathologischer Vorgänge anzusehen sein. Denn sollte in der Tat der Fall gegeben sein, der z. B. von mancher Seite für die Entstehung der Anämien angenommen wird, daß innerhalb des Organismus Hämolyse wirksam sind, so müßte die Auflösung einer gewissen Menge von Erythrocyten und die dadurch erfolgende Mobilisierung ihrer Lipide einen regulatorischen Einfluß entfalten.

Literatur:

- 1) Ransom, Deutsche med. Woch. 1901, Nr. 27.
- 2) Kyes u. Sachs, Berl. klin. Woch. 1903, Nr. 2—4.
- 3) Kurt Meyer, Arch. f. Hyg. 1900, Bd. 5.
- 4) Isovesko u. Foucaud, Comptes rendus de la Soc. de Biol. 1908, Bd. 64.
- 5) Isovesko, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1909, Bd. 61.
- 6) Meyerstein, *ibid.* 1909, Bd. 60.
- 7) Bayer, Biochem. Zschr. 1907, Bd. 5.
- 8) Windaus, Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch. 1909.
- 9) Arrhenius, Biochem. Zschr. 1908, Bd. 11.
- 10) Sachs, F., *ibid.* 1908, Bd. 12.
- 11) Meyerstein, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. 62.
- 12) Kyes, Berl. klin. Woch. 1902, Nr. 38 u. 39.
- 13) Parnas, Biochem. Zschr. Bd. 22, H. 5 u. 6.
- 14) Bang u. Forssmann, Hofmeisters Beitr. 1906, Bd. 8.
- 15) Pascucci, *ibid.* 1905, Bd. 6.
- 16) Landsteiner u. v. Eisler, C. f. Bcht. I. 1905, Bd. 39.
- 17) Landsteiner u. Raubitschek, Biochem. Zschr. 1909, Bd. 15.
- 18) Pick u. Schwarz, *ibid.*
- 19) Isovesko, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, Bd. 64, S. 675.