Aus der Universitäts-Hautklinik (stellvertr. Direktor: Priv.-Doz. Dr. W. Frieboes) und dem Institut für Pharmakologie und Physiologische Chemie (Direktor: Geheimrat R. Kobert) in Rostock.

Ueber eine bisher unbekannte Substanz im Blutserum des Menschen und einiger Tiere.

Von Priv.-Doz. Dr. W. Frieboes.

Seit der Entdeckung der Wassermann-Neisser-Bruckschen Reaktion ist es das Bestreben gewesen, die feineren chemischen und biochemischen Vorgänge derselben aufzudecken. Eine große Zahl von Autoren hat sich diesem Arbeitsgebiet zugewandt, aber trotz der emsigen Arbeit sind die greifbaren Resultate, auf denen man hätte weiter bauen können, doch relativ gering gewesen. In neuester Zeit hat man besonders die quantitativen Verhältnisse des Cholesterins und Oxycholesterins studiert und hat sich auch mehr dem Erforschen des Phosphatidgehaltes des Blutserums zugewandt. Auch ich bin von den Cholesterinbestimmungen im Serum normaler und syphilitisch infizierter Menschen ausgegangen und habe zunächst nach der von Autenrieth und Funk¹⁾ angegebenen, neuerdings von Wacker und Hueck²⁾ als praktisch und quantitativ zuverlässig aufwärmste empfohlenen Methode gearbeitet. Auch mir hat sich diese als sehr zuverlässig bewährt, und ich kann sie daher ebenso empfehlen. Ich habe — mehr zufällig — stets nach der Chloroformmethode gearbeitet.

D. h. ich habe anfangs laut Vorschrift 2 ccm hämoglobin- und blutkörperchenfreies Menschen Serum mit 20 ccm 25 % iger Kalilauge zwei Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt, dann bis zur Erschöpfung, in der Regel 4—5 mal, mit Chloroform je 5—10 Minuten ausgeschüttelt, die Chloroformportionen vereinigt, mit 5—10 g Natr. sulf. siccum zur Klärung energisch geschüttelt, filtriert und die klare Chloroformlösung verdunstet. Es bleibt dann in der Schale ein gelblichbräunlicher bis gelblichgrüner, glasig durchsichtiger Rückstand. Aus diesem kann man mit Aether durch vier- bis fünfmaliges Extrahieren alles Cholesterin herauslösen. Läßt man den Aether verdunsten, so fällt das reine Cholesterin meist in schönen Kristallen aus. Der Rest des Rückstandes, d. h. also dessen ätherunlöslicher Teil, bildet eine bräunlichgelbliche bis leicht gelblichgrünliche Masse, die nicht kristallinisch ist und sich im Mörtel zu feinem, gelbbraunem Pulver verreiben läßt; sie ist nicht hygroskopisch. Der Gesamtrückstand, also die ätherlösliche und ätherunlösliche Portion, ist in Wasser als dickliche, beim Schütteln ziemlich stark schäumende, opaleszierende Masse löslich. Der ätherunlösliche Teil löst sich ebenfalls leicht in destilliertem Wasser und physiologischer Kochsalzlösung und weist, abgesehen von geringerer Opaleszenz, keine Differenz gegenüber der erstgenannten Lösung auf.

Während ich demnächst auch auf die ätherlösliche, also die Cholesterinportion, näher eingehen werde, soll uns hier der ätherunlösliche Teil beschäftigen. Er ist bisher anscheinend vernachlässigt worden, und doch ist er es gerade, der besonderes Interesse verdient. Die überaus stark schäumende Eigenschaft der Lösung dieses Teils legte es nahe, sie in ihrer Wirkung auf Blutkörperchen zu prüfen. Zusatz bestimmter Mengen (s. u.) zu einer Aufschwemmung von gewaschenen Blutkörperchen erzeugte momentan Hämolyse. Diese trat jedoch nicht ein, wenn man den cholesterinhaltigen Gesamtrückstand in physiologischer Kochsalzlösung löste und dann — und zwar in viel größerer Menge — einer gleichen Blutkörperchenaufschwemmung zusetzte. Mit anderen Worten: das Cholesterin hatte also die hämolytische Wirkung der cholesterinfreien Substanz aufgehoben. Danach mußte es sich bei dem neugefundenen Stoff um eine kobragift- oder saponinähnliche, wohl im menschlichen Serum normalerweise vorkommende Substanz handeln. Diese hat sich außer im normalen menschlichen

¹⁾ M. m. W. 69. 1913. S. 1243.

²⁾ Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 74. 1913. S. 416.

Blutserum und Nabelschnurblut in dem Serum von Syphilitikern, von Pferd, Hund, Kaninchen, Rind und Fisch nachweisen lassen. Die hämolytische Kraft derselben scheint, soweit wir das bis jetzt feststellen konnten, bei allen Gattungen annähernd gleich zu sein. Zur Orientierung mögen die folgenden Versuchsreihen dienen; der cholesterinfreie Rückstand wurde in ebensoviel Kubikzentimeter physiologischer Kochsalzlösung gelöst, als der Anzahl Kubikzentimeter Serum entsprach, also der Rückstand aus 20 ccm Serum wurde in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst, sodaß 1 ccm der Lösung die in 1 ccm Serum enthaltene Menge hämolytische Substanz enthielt.

1) Wassermann negatives Menschenserum:				Hämolyse
1 ccm 5% Hammelblutkörper. Aufschwmmg.	+ 1,0 ccm.	Lösung:	..	sofort total
1 do.	+ 0,5 do.	..	..	in 1 Min.
1 do.	+ 0,4 do.	..	..	in 9 "
1 do.	+ 0,3 do.	..	..	in 20 "
1 do.	+ 0,2 do.	..	..	in 45 "
1 do.	+ 0,1 do.	..	..	in 95 "
1 do.	+ 0,05 do.	..	..	Nach 10 Std.
				noch fast total gehemmt.
2) Wassermann positives Menschenserum:				Hämolyse
1 ccm 5% Hammelblutkörper. Aufschwmmg.	+ 1,0 ccm.	Lösung:	..	sofort total
1 do.	+ 0,5 do.	..	..	in 1 Min.
1 do.	+ 0,3 do.	..	..	in 15 "
1 do.	+ 0,2 do.	..	..	in 42 "
1 do.	+ 0,1 do.	..	..	nach 1 1/2 Std.
				noch nicht gelöst.
3) Pferdeserum:				Hämolyse
5 ccm 2% Hammelblutkörper. Aufschwmmg.	+ 1,0 ccm	Lösung:	In 2-3 Min.	total
(d. h. = 2 ccm. 5% Bltkörper. Aufschwmmg.)				
5 ccm 2% Hammelblutkörper. Aufschwmmg.	+ 0,1 do.		Nach 12 Std.	nur geringe Mengen gelöst.
5 do.	+ 0,05 do.			keine Hämolyse.

Versuche mit anderen Blutkörperchen (Mensch, Hund, Kaninchen) ergaben ziemlich die gleichen Resultate, sodaß ich von der Wiedergabe von Tabellen absehe.

Bei Menschenserum wurde nun festgestellt, wieviel Cholesterin zugesetzt werden muß, um die hämolytische Wirkung aufzuheben. Das Cholesterin war 1 %ig in Alkohol gelöst.

Wassermann negatives Serum:				Hämolyse
0,4 Lösung + 0,2 mg Cholesterin + 1 ccm 5% Hammelblutkörper. Aufschwmmg.	..	..	..	in 9 Min.
0,4 do. + 0,5 do. + 1 do.	..	..	..	in 24 "
0,4 do. + 1,0 do. + 1 do.	..	..	..	in 85 "
0,4 do. + 1,5 do. + 1 do.	..	..	..	nach vielen Std.
0,4 do. + 2,0 do. + 1 do.	..	..	..	nur spurweise Hämolyse
				keine Hämolyse

D. h., es ist ein Zusatz von etwa 2,5—3,0 mg Cholesterin pro 1 ccm der hämolytischen Lösung erforderlich, um die Hämolyse zu verhindern. Die Zahlen stimmen annähernd mit den später angeführten überein.

Sehr interessant waren auch die Ergebnisse, die man erhielt, wenn man der hämolytischen Lösung statt Cholesterin Meerschweinchenserum, also Komplement, oder inaktiviertes negatives Menschenserum zusetzte.

Die Versuche waren folgende:

1 ccm 5% Hammelblutkörper. Aufschwmmg. + 1 ccm Lösung + 0,1 Kompl.:				Hämolyse
1 do.	+ 0,5 do.	+ 0,1 do.	..	in 22 Min.
1 do.	+ 0,3 do.	+ 0,1 do.	..	nach 1 1/2 Std.
1 do.	+ 0,1 do.	+ 0,1 kompl.:	..	noch total gehemmt
				keine Wirkung
1 ccm 5% Hammelblutkörper. Aufschwmmg. + 1 ccm Lösung + 0,1 ccm neg. inakt. Ser.:				Hämolyse
1 do.	+ 0,5 do.	+ 0,1 do.	..	in 6 Min.
1 do.	+ 0,3 do.	+ 0,1 do.	..	nach 1 1/2 Std.
1 do.	+ 0,1 do.	+ 0,1 do.	..	noch keine Lösung
1 do.	+ 0,4 do.	+ 0,1 do.	..	ohne jede Wirkung
1 do.	+ 0,3 do.	+ 0,1 do.	..	..

Sowohl Komplement als inaktiviertes negatives Menschenserum verlangsamen die Hämolyse, und zwar das inaktive negative Menschenserum in bedeutend höherem Maße als das Meerschweinchenserum.

An experimentellen Versuchen wurden angestellt:

1. 1 Kaninchen mittlerer Größe erhielt 5 ccm der hämolytischen Lösung intravenös; nach ganz schnell vorübergehender Schwäche keinerlei Störung.

2. 1 Kaninchen mittlerer Größe erhielt 10 ccm der hämolytischen Lösung intravenös; vorübergehende Schwäche, sonst keine Störungen.

3. Annähernd 30 ccm hämolytische Lösung wurden 5 Liter Wasser zugesetzt; in die Flüssigkeit kommt ein 13 cm langer Fisch (Plette). Nach 2 Stunden ist der Fisch tief betäubt, liegt auf dem Rücken. In frisches Wasser gebracht, ist er nach weiteren 3 Stunden noch nicht wieder normal. Vergrößerte man nun das Wasservolumen auf 8 Liter, so blieb jede Wirkung auf einen gleichgroßen Fisch aus.

Diese orientierenden Vorversuche hatten mehr und mehr darauf hingewiesen, daß es sich um eine anscheinend saponinartige Substanz handelte. Es galt nun, die chemischen Eigenschaften festzustellen.

Die gelblichbraune, nicht hygroskopische Substanz ist in Chloroform und Wasser leicht, in Alkohol schwer löslich. Die wäßrige Lösung ist, der Farbe des Pulvers entsprechend, meist etwas grünlich, opaleszent, dicklich und schäumt sehr stark beim Schütteln. Recht konzentriert in Wasser gelöst, erstarrt die ganze Lösung im Eisschrank zu einer gallertigen Masse, die sich in der Wärme (Zimmertemperatur) wieder löst. Die Lösung ist vollkommen neutral.

Die wäßrige Lösung gibt keine Eiweißreaktionen (Fällung mit Säuren s. u.), ebenso keine Reaktion auf Zucker.

Mit verdünnten anorganischen wie organischen Säuren wird die Substanz quantitativ ausgefällt (das neutralisierte Filtrat hat keinerlei hämolytische Wirkung mehr). Zusatz anderer Reagentien ergab:

bei gesättigter Kochsalzlösung:	Fällung,
„ „	Ammonsulfatlösung: Fällung,
„ „	Natriumsulfatlösung: keine Fällung,
„	Chlorkalziumlösung 22,3 %: Fällung,
„	gesättigter Magnesiumsulfatlösung: Fällung,
„	Natriumphosphatlösung: keine Fällung,
„	Sublimatlösung: keine Fällung; damit erhitzt, nach dem Erkalten leichte Ausscheidung,
„	Kilianis Reagens: negativer Ausfall,
„	Nesslers Reagens (Erhitzen): schwarzer Niederschlag,
„	Goldchlorid (Erhitzen): tiefe Violettfärbung,
„	30 % H ₂ O ₂ : längeres Kochen damit macht die Substanz nicht unwirksam,
„	gesättigter Ammonsulfatlösung: Fällung,
„	Millons Reagenz: negativer Ausfall,
„	Brouardel-Boutmys Reagens: dunkelgrünblaue Färbung,
beim Kochen mit Kalomel:	Schwärzung,
Untersuchung auf Phosphorsäure:	negatives Ergebnis,
„	Schwefel: negatives Ergebnis,
„	Stickstoff: negatives Ergebnis.

Die mehrmals gereinigte Substanz ist aschefrei. Die Substanz ist nicht dialysierbar.

Die wäßrige Lösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure über eine Stunde gekocht. Der beim Kochen entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, der Filtrerrückstand mit einer Spur kohlen-saurem Natron in einigen ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst und aa mit 5% Hammelblutkörperchenaufschwemmung versetzt, wobei augenblicklich Hämolyse eintrat. Das Zerkochen hat die hämolytische Substanz also nicht verändert oder abgeschwächt. Das Filtrat gab weder mit Fehlingscher Lösung noch auf Pentosen eine Reaktion.

Halbstündiges Kochen mit Orzinsalzsäure und danach Ausschütteln mit Isobutylalkohol ergibt keine Grünfärbung, bei 5 Minuten langem Kochen mit Phloroglucinsalzsäure wird die Lösung nicht rot (Pentosenreaktionen). Ebenso fällt die Reaktion mit Azetonsalzsäure auf Methylpentosen negativ aus.

Mehrständiges Zerkochen einer konzentrierten wäßrigen und alkoholischen Lösung mit konzentrierter Salzsäure und nachheriges Kochen mit Fehlingscher Lösung ergibt keine Reduktion.

Versetzt man die konzentrierte wäßrige Lösung der hämolytischen Substanz direkt mit Fehlingscher Lösung, so entsteht ein voluminöser, flockiger Niederschlag, wie dies bei vielen Saponinen der Fall ist. Beim Kochen findet, wie schon erwähnt, keine Reduktion statt.

Zusatz von heiß gesättigtem Barytwasser zur Lösung ergibt eine quantitative Fällung der hämolytischen Substanz, d. h. das Filtrat ist unwirksam. Die aus dem Filtrerrückstand wieder in Lösung gebrachte Substanz wirkt bedeutend schwächer hämolytisch, und zwar statt momentan erst nach 1—2 Stunden.

Bromwasser fällt ebenfalls die hämolytische Substanz quantitativ aus. Das Filtrat ist unwirksam. Die Substanz selbst wird in gleicher Weise wie durch Barytwasser abgeschwächt.

Dagegen behält die mit verdünnten Säuren gefällte Substanz ihre Wirksamkeit unverändert bei.

Endlich wurde festgestellt, ob sich die Substanz durch Fällung mit Bleiazetat und Bleiessig wie manche Saponine in saure und neutrale Substanz zerlegen läßt. Mit Bleiazetat im Ueberschuß versetzt, gab sie eine dicke, fast käsig Fällung, in dem Filtrat ließ sich dagegen mit Bleiessig keine Fällung mehr erzielen. Der Bleiniederschlag wurde abfiltriert und so lange mit verdünnter Essigsäure zersetzt, bis das Filtrat mit H₂SO₄ keine Trübung mehr ergab. In mit kohlen-saurem Natron spurweis alkalisch gemachter physiologischer Kochsalzlösung löst sich der Filtrerrückstand nicht vollkommen auf; ungelöst bleibt ein Rest dicklicher klebriger Masse. Die hämolytische Kraft der in Lösung gegangenen Substanz ist anscheinend die gleiche, wie vor der Fällung mit Bleiazetat.

Zu der trocknen hämolytischen Substanz wurde ungefähr aa Rizinus-

öl zugesetzt. Beim Verreiben damit geht die hämolytische Substanz scheinbar vollständig in Lösung. Verreibt man nun diese ölige Substanz mit ungefähr der doppelten Menge Wasser, so resultiert, wie bei den Saponinen, eine prachtvolle, sich haltende Emulsion.

Ueber die quantitativen Verhältnisse der hämolytischen Substanz kann ich noch keine genauen Angaben machen, da sich bei der Gewinnung einige Fehlerquellen ergeben haben, die erst ausgeschaltet werden müssen. So genügt z. B. das Nichtverseiftsein von etwas Fett, den ganzen gewonnenen Rückstand aus dem Chloroform unbrauchbar zu machen, da er sich dann größtenteils in Aether löst und es dann nur unter großen Verlusten gelingt, Cholesterinportion und hämolytische Substanz zu trennen; vor allem scheint aber dabei der hämolytische Teil von vornherein nicht quantitativ gewonnen zu sein. Zur quantitativen Bestimmung wurden stets 10–20 ccm Serum benutzt, der Gesamtrückstand gewogen, dann der Rückstand mit Aether extrahiert, bis keine Liebermannsche Reaktion mehr auftrat, dann der trockne Rest des Rückstandes wieder gewogen. Dabei ergaben sich folgende Zahlen in mg pro 1 ccm Serum:

	Cholesterin post.	Hämolyt. Subst.
1) Wasserm. negat. Menschenserum:	2,0 1,82 2,8	nicht bestimmt 4,9 5,5
2) Wasserm. posit. Menschenserum:	3,4 2,8 3,4 3,6 2,8	nicht bestimmt 10,7 nicht bestimmt 7,06 5,85
3) Kaninchenserum:	2,45	5,75
4) menschl. Nabelschnurblut (Zahl aus 20 ccm gewonnen!)	2,8	6,1
5) Fischblut (10 ccm Serum)	2,1	nicht bestimmt

Daraus ergibt sich, daß bei gesunden Menschen und Kaninchen Cholesterinportion und hämolytische Substanz in annähernd gleichem Mengenverhältnis vorhanden sind. Auch das menschliche Nabelschnurblut macht darin keine Ausnahme. Die hohe Zahl für die Cholesterinportion in demselben scheint freilich im Widerspruch zu stehen mit den sonst angeführten niedrigen Cholesterinwerten für das Blut des Neugeborenen. Ob die zweimal berechneten hohen Werte für die hämolytische Substanz im Serum Syphiliskranker irgendeine praktische Bedeutung haben, bleibe dahingestellt. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung, besonders bei solchen Patienten, bei denen man Ansteigen und Abfallen der Wa.R. verfolgen kann, werden vielleicht darüber Aufschluß geben. Diese Mitteilung soll lediglich den Zweck haben, auf die eigenartige Substanz hinzuweisen.

Zusammenfassung. Im Serum des Menschen (auch im Nabelschnurblut) und einer Anzahl von Tieren (Pferd, Rind, Hund, Kaninchen, Fisch) läßt sich eine weder durch verdünnte Säuren noch durch hochprozentige Kalilauge zerstörbare, koktostabile, hämolytische Substanz regelmäßig nachweisen. Durch Anlagerung oder chemische Bindung von Cholesterin verliert sie gleich Saponin oder Kobragift ihre hämolytische Kraft.

Auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften ist sie den sauren Saponinen sehr ähnlich, denn sie ist: 1. enorm schäumend, 2. kolloid, nicht dialysierbar, 3. paraffinbenetzend, 4. fettemulgierend, 5. durch Säuren fällbar, in Alkalien wieder löslich, 6. aussalzbar, 7. Goldchlorid reduzierend, 8. mit Nessler's Reagens positiv reagierend, 9. löslich in Methylalkohol, unlöslich in Aether, 10. durch neutrales Blei fällbar, 11. wird durch Cholesterin entgiftet, 12. wird sie durch Brom und Baryt in ihrer Wirkung geschwächt, 13. wirkt sie hämolytisch, 14. wirkt sie betäubend auf Fische.

Unter diesen Umständen ist man berechtigt, diese Substanz vorläufig als „Saponoid (d. h. als saponinähnliche Substanz) des Blutserums“ zu bezeichnen. Ganz dasselbe gilt ja auch vom Schlangengift.