

XIV.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Halle-Wittenberg.

Über die Bindungsgröße des Chloroforms und Äthylalkohols an die roten Blutkörperchen während der Hämolyse.

Von

G. Apitz und M. Kochmann

Volontärassistent

Oberassistent

am Institut.

Unseres Wissens liegen bisher keine Versuche vor über die quantitative Bindung der hämolytischen Substanzen an eine bestimmte Menge roter Blutkörperchen bei verschiedener Konzentration in der umgebenden Lösung. Wir nahmen daher an zwei Narkotika der aliphatischen Reihe, nämlich an Chloroform und Äthylalkohol, derartige Untersuchungen vor. Wir wählten gerade diese beiden Substanzen, weil ihre Analyse verhältnismäßig leicht ausführbar ist und hinreichend genaue Zahlen liefert.

Versuchsanordnung.

Die Versuche sind durchweg an Rindererythrocyten angestellt, die viermal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen waren. Die Blutkörperchen wurden in soviel 0,9 % iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt, daß zunächst das ursprüngliche Blutvolumen wieder erreicht wurde. Darauf wurde eine Zählung in der Bürkerschen Zählkammer vorgenommen. Nach ihrem Ausfall wurde dann noch so viel Kochsalzlösung zugesetzt, daß die Anzahl der roten Blutkörperchen etwa 2—2,5 Millionen im Kubikmillimeter betrug. In einigen Fällen verdünnten wir die Blutkörperchenaufschwemmung noch weiter um das Fünffache. Das Ergebnis wurde durch Zählung nachgeprüft. Von dieser Blutlösung wurden, nach Durchschütteln zur gleichmäßigen Verteilung, 30 oder 40 ccm mit der Pipette abgemessen und mit 60 oder 80 ccm Kochsalzlösung versetzt, die das Narkotikum in bestimmten Mengen enthielt. Zum Vergleich wurden Versuche angestellt, bei denen die gleichen Mengen Chloroform oder Alkohol in destilliertem Wasser gelöst waren. Auf diese Weise erhielten wir Lösungen des Hämolytikums, in denen die roten Blutkörperchen von An-

fang an schon hämolytisch waren. Da die Hämolyse bei Zimmertemperatur eher einsetzt als bei 0° — wenigstens ist das beim Chloroform deutlich —, wurden die Versuche immer bei 0° vorgenommen, um bei gleicher Temperatur mit hämolytischen Konzentrationen arbeiten zu können, ohne Hämolyse hervorzurufen. Die Ansätze wurden 15–60 Minuten bei 0° stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit, die, wie wir gleich bemerken möchten, für die Fixation des Hämolytikums in den angegebenen Grenzen ohne Bedeutung ist, wurden die Ansätze zentrifugiert und die quantitative Bestimmung des Hämolytikums sowohl in der hämolytierten Lösung wie in der farblosen Flüssigkeit vorgenommen, die über den abzentrifugierten Erythrocyten stand. Aus dem Unterschied dieser beiden Analysen wurde rechnerisch die auf die roten Blutkörperchen fixierte Substanzmenge gefunden. Bei der Berechnung ist zu berücksichtigen, daß die roten Blutkörperchen ein bestimmtes Volumen einnehmen und infolgedessen die überstehende Flüssigkeit bei einem Volumen der Blutkörperchen von beispielsweise 3 ccm nicht 90 ccm, sondern nur 87 ccm betrug. Das Volumen der roten Blutkörperchen wurde unmittelbar gemessen, wobei wir sehr gut übereinstimmende Werte mit den Zahlen fanden, die wir mit Hilfe der Vierordtschen Tabellen rechnerisch gefunden hatten.

Beispiel: 30 ccm einer Blutkörperchenaufschwemmung, die in 1 ccm 2.5 Millionen rote Blutkörperchen enthielt, mußte rechnerisch 3,1 ccm rote Blutkörperchen enthalten; gemessen wurden 3 ccm.

Da die hämolytische Konzentration von Chloroform nicht bekannt war, wurde sie zunächst in Vorversuchen bestimmt. Sie betrug 0,2–0,25 Gew. %. Bei 0,2% ist teilweise, bei 0,25% völlige Hämolyse bei Zimmertemperatur aufgetreten. Zum Vergleich bestimmten wir auch die hämolytische Konzentration des Äthers, die wir mit 4% fanden. Die hämolytische Konzentration des Alkohols ist von Fühner und Neubauer¹⁾ festgestellt worden, die vollkommene Hämolyse bei etwa 15 Gew. % Alkohol fanden. Wir konnten die Zahl bestätigen, indem wir Anfänge der Hämolyse der Rindererythrocyten in der von uns gewählten Menge bei 10%, vollkommene Hämolyse bei 15% auftreten sahen.

In der Tabelle 1 sind die in Betracht kommenden Zahlen für die genannten drei Narkotika zusammengestellt.

Tabelle 1.

Narkotikum	Gew. %	Hämolytische Konzentration		Verhältnis Chloroform = 1
		In Normallösung	Millimol im Liter	
Chloroform .	0,25	1/47,8	20,9	1
Äther	4,00	1/1,85	54,1	26
Äthylalkohol	15,00	3,3/1	3260,9	155

1) Fühner, H. und Neubauer, E., Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1907, Bd. 56, S. 333.

Die Bestimmung des Chloroforms geschah nach den Angaben Gepperts¹⁾ und Nicloux²⁾ (Abdestillieren des Chloroforms bei saurer Reaktion [Weinsäure]. Auffangen des Chloroforms in alkoholischer Kalilauge, wodurch das Auffangen des abdestillierten Chloroforms in Alkohol und der nachfolgende Zusatz von Kalilauge in eine Operation zusammengezogen werden. Zerstörung am Rückflußkühler und Titration der Chloride mit $n/10$ AgNO_3 nach Mohr). Zur Analyse wurden möglichst große Mengen der zu untersuchenden Flüssigkeit verwendet. Für die Bestimmung des Alkohols wurde der Alkohol abdestilliert und in einer Vorlage aufgefangen, als die ein Meßkölbchen von 150 ccm Inhalt diente. Nach Auffüllen des Destillats auf 150 ccm wurde der Prozentgehalt pyknometrisch bestimmt.

Die angegebenen analytischen Methoden sind für unsere Zwecke ausreichend. Nur bei sehr niedrigen Konzentrationen des Chloroforms und Alkohols und gleichzeitiger sehr geringer Zahl der Erythrocyten waren die Fehlergrenzen größer als die gefundenen Unterschiede im hämolysierten und nicht hämolysierten Ansatz.

Die Versuchsergebnisse lassen sich kurz in den folgenden Tabellen zusammenfassen (siehe Tabelle 2 und 3).

Es ergeben sich aus diesen Tabellen die Mengen des Chloroforms und Alkohols, die im ganzen an die Erythrocyten gebunden sind. Da die Anzahl der roten Blutkörperchen bekannt ist, so konnte auch festgestellt werden, wieviel von der hämolytischen Substanz auf eine bestimmte Anzahl, z. B. eine Milliarde Erythrocyten fixiert ist, entweder wenn Hämolyse eintritt oder geringere Konzentrationen als die hämolytischen zugesetzt waren.

Wenn man die Mengen des in 100 ccm roter Blutkörperchen fixierten Hämolytikums mit denen vergleicht, die in 100 ccm der umgebenden Lösung vorhanden sind, so erhält man einen Quotienten, der beim Chloroform im Mittel 6,8 : 1, beim Alkohol 1,7 : 1 beträgt. Es muß jedoch betont werden, daß dieser von uns berechnete Quotient weder der Teilungskoeffizient zwischen Erythrocyten und Kochsalzlösung ist, noch mit dem von Overton³⁾ bestimmten Teilungskoeffizienten zwischen Öl und Wasser verglichen werden kann. Allerdings wird er sich dem Teilungskoeffizienten zwischen Erythrocyten und Salzlösung nähern, da nach Nicloux⁴⁾ die Verteilung zwischen roten Blutkörperchen und Plasma mit 7—8 : 1 angenommen werden muß und Pohl⁵⁾ den Wert mit 2,5—4 : 1 bestimmt hat.

1) Gepperts Schüler Schneider, Hölscher Günter usw. Inaug.-Diss., Gießen, 1904—1912.

2) Nicloux, M., *Les anesthésiques généraux*. Paris 1908.

3) Overton, E., *Studien über die Narkose*. Jena 1901.

4) Nicloux, M., a. a. O.

5) Pohl, J., *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 1901, Bd. 28, S. 239.

Tabelle 2.
Chloroform.

a	b		c ¹⁾	d	e		f			g	
Konzentration in Gew. %	Molekulare Konzentration		Zahl der roten Blutkörperchen in 1 cmm der verwendeten Blutkörperchen- aufschwemmung (in Millionen)	In den 120 ccm der hämo- lysierten Blutlösung gefunden in g	In der überstehenden farblosen Flüssigkeit des Ansatzes gefun- den		Folglich gebunden			Quotient $f_{3a}:e_2$	
	1	2			1	2	3	1	2		3
	In Normal- lösung	In Millimol			im ganzen	in 100 ccm in g	im ganzen in mg	auf 1 Milliarde Erythrocyten in mg	α in g	β in Millimol	
0,314	1/38	26	0,56	0,3768	0,3596	0,302	17,2	0,768	1,92	161	6,4 : 1
0,2632	1/45	22	2,02	0,3160	0,2712	0,232	44,8	0,560	1,4	117	6,3 : 1
0,2594	1/46	21,8	0,56	0,3012	0,2896	0,243	21,6	0,982	2,34	196	9,7 : 1
0,2397	1/50	20	2,6	0,2876	0,2424	0,209	45,2	0,435	1,13	95	5,4 : 1
0,2343	1/51	19,7	2,075	0,2812	0,2424	0,207	38,2	0,468	1,21	101	6 : 1
0,2129	1/56	18	0,56	0,2556	0,2444	0,205	11,2	0,5	1,25	105	6 : 1
0,2135	1/56	18	0,48	0,2534	0,2419	0,203	11,7	0,609	1,52	127	7,6 : 1

1) Da die 40 ccm der verwendeten Blutkörperchenaufschwemmung noch mit der doppelten Menge Chloroform-Kochsalz-lösung versetzt wurden, beträgt die Zahl der roten Blutkörperchen in 1 cmm des Ansatzes nur $\frac{1}{3}$ der oben angegebenen.

Tabelle 3.
Alkohol.

a	b		c ¹⁾	d	e		f			g	
Konzentration in Gew. 0/0	Molekulare Konzentration		Zahl der roten Blutkörperchen in 1 cmm der verwendeten Blutkörperchen- aufschwemmung (in Millionen)	In den 90 ccm der hämo- lysierten Blutlösung gefunden in g	In der überstehenden farblosen Flüssigkeit des Ansatzes gefun- den		Folglich gebunden			Quotient $f^3 a : e_2$	
	1	2			1	2	1	2	3		
	In Normal- lösung	In Millimol			im ganzen in g	in 100 ccm in g	im ganzen in mg	auf 1 Milliarde Erythrocyten in mg	α in g	β in Millimol	
10,944	2,38/1	2380	2,5	9,8496	9,2290	10,608	620,6	8,267	20,69	4498	2 : 1
10,608	2,31/1	2310	2,35	9,5472	8,9366	10,272	610,6	8,661	21,65	4706	2,1 : 1
7,656	1,66/1	1660	2,6	6,8904	6,6567	7,656	233,7	2,996	7,50	1630	1 : 1
4,134	1/1,1	899	2,5	3,7206	3,3199	3,816	400,7	5,342	13,32	2896	3,5 : 1
2,862	1/1,16	622	2,6	2,5758	2,4899	2,862	85,9	1,101	2,75	598	1 : 1
10,608	2,31/1	2310	0,5	9,5472	9,4836	10,608	63,6	4,240	10,60	2304	1 : 1
7,656	1,66/1	1660	0,5	6,8904	6,8444	7,656	46,0	3,667	7,66	1665	1 : 1

1) Da die 30 ccm der zum Ansatz verwendeten Blutkörperchenaufschwemmung noch mit 60 ccm Alkohol-Kochsalzlösung versetzt wurden, so beträgt die Zahl der roten Blutkörperchen in 1 cmm des Ansatzes nur $\frac{1}{3}$ der angegebenen Zahl.

Die molekularen Mengen, die auf die roten Blutkörperchen bei beginnender Hämolyse fixiert worden sind, entsprechen Normallösungen von $n/9,5$ Chloroform und $4,6\ n/1$ Alkohol, oder in Millimol im Liter ausgedrückt: 105 Millimol Chloroform und 4600 Millimol Alkohol. Sie stehen also in einem molekularen Verhältnis von 1 : 44.

Fühner und Neubauer¹⁾ haben nun nachgewiesen, daß die hämolytische Wirkung der Narkotika der Alkoholreihe sich mit dem Teilungskoeffizienten zwischen Öl und Wasser gleichsinnig ändert, also der H. Meyer-Overtonschen Narkosetheorie folge.

Es konnte mithin angenommen werden, daß die Hämolyse ähnlich wie die Narkose durch die Veränderungen zustande komme, die die Blutkörperchenlipide durch die Tatsache der Lösung des Hämolytikums erleiden. Dann würde man sich vorstellen müssen, daß äquimolekulare Mengen in den Zellipoiden die gleichen Wirkungen ausüben; oder man könnte annehmen, daß die in den Erythrocyten gelösten Mengen Hämolytikum wenigstens in einem bestimmten molekularen Verhältnis ständen, indem vom Alkohol etwa 2,6mal mehr Moleküle nötig seien als vom Chloroform, da das Molekulargewicht des Alkohols 2,6mal kleiner ist als das des Chloroforms.

In unseren Versuchen zeigt sich jedoch, daß ein derartiges Verhältnis sich nicht aufstellen läßt. Die Mengen des auf die roten Blutkörperchen fixierten Narkotikums sind weder äquimolekular, noch stehen sie in diesem Verhältnis von 1 : 2,6. v. Knaffl-Lenz²⁾, der einen ähnlichen Gedankengang für die Narkose entwickelt, versucht die molekulare Konzentration des Narkotikums in den Zellipoiden aus dem Teilungskoeffizienten und der gerade zur Narkose hinreichenden Konzentration zu berechnen. Er kommt dabei zu dem Ergebnis, daß die bloße Lösung des Narkotikums in den Lipoiden nicht das Wesentliche für die Narkose sein kann. Auf Grund unserer durch die Analyse gefundenen Zahlen müssen wir uns dem Urteil v. Knaffl-Lenz insofern anschließen, als die Hämolyse durch Alkohol und Chloroform durch die bloße Lösung in den Lipoiden nicht erklärt werden kann. Damit ist der Ansicht von der Bedeutung der Lipoidlöslichkeit für das Zustandekommen der Hämolyse unseres Erachtens aber keineswegs die Berechtigung entzogen. Die Löslichkeit des Narkotikums in den Zellipoiden ist zwar nicht Ursache des hämolytischen Vorgangs, nicht das Wesen der Hämolyse, wohl aber eine unumgängliche Vorbedingung für sie, vielleicht der Transport-

1) Fühner, H. und Neubauer, E., a. a. O.

2) v. Knaffl-Lenz, E., Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1918, Bd. 84, S. 66.

weg, um die hämolytische Substanz an oder in die Zelle zu schaffen, wo sie dann ihre spezifische Wirkung irgendwelcher Art entfaltet.

Die quantitative Bestimmung der in den roten Blutkörperchen gebundenen Menge hämolytischer Substanz wird vielleicht die Grundlage abgeben können, um den Vorgang der Hämolyse, und vielleicht auch der Narkose, in eine bestimmte Art physikalischer oder physikalisch-chemischer Beeinflussung und Veränderung der Erythrocyten einzuordnen.

Zusammenfassung:

1. Die Hämolyse der Rinderblutkörperchen wird durch eine 0,2—0,25 %ige Chloroform-, 4 %ige Äther- und 10—15 %ige Alkohollösung bei Temperatur von 18—20° C hervorgerufen.

2. Sowohl in dieser hämolytischen Konzentration von Chloroform und Alkohol, wie auch in schwächerer Lösung, werden meßbare Mengen des Hämolytikums an die Erythrocyten gebunden. Bei der Hämolyse sind es etwa 0,5 mg Chloroform und 8,5 mg Alkohol auf 1 Milliarde roter Blutkörperchen des Rindes.

3. Die molekularen Konzentrationen von Alkohol und Chloroform, die Hämolyse hervorrufen, stehen im Verhältnis von 1 : 115—118, die fixierten Mengen in einem ungefähren Verhältnis von 1 : 44.

4. Beziehungen zwischen der molekularen Größe der fixierten Menge und der hämolytischen Wirkung sind nicht erkennbar. Die Hämolyse läßt sich infolgedessen nicht als einfacher Lösungsvorgang in den Blutkörperchenlipoiden erklären.
