

Über den Einfluß von Cholesterin auf die Hämolyse.

Von

G. Jahnson-Blohm.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Upsala.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. März 1913.)

Ransom¹⁾ wies 1901 nach, daß das Cholesterin im Serum auf die Saponinhämolyse hemmend einwirkt. Er sprach auch bei derselben Gelegenheit die Ansicht aus, daß die Wirkung des Saponins dadurch zustande kommt, daß es einen wesentlichen Bestandteil der Erythrocyten, nämlich das Cholesterin, angreift. Inzwischen hat man beobachtet, daß das Saponin nicht nur das Cholesterin, sondern auch eine andere Lipoidsubstanz der Erythrocyten, nämlich das Lecithin, angreift. Dieses geht aus Versuchen von Pascucci²⁾ hervor. Er fand auch, daß eine künstliche Lecithin-Cholesterinmembran sich widerstandskräftiger gegen das Saponin zeigte, je mehr sie Cholesterin im Verhältnis zu Lecithin enthielt. Infolgedessen war es anzunehmen, daß das Cholesterin in den Erythrocyten einen Schutz für dieselben ausmachen dürfte. Zu dieser Sache machte K. Meyer³⁾ Versuche, aus welchen hervorgeht, daß Erythrocyten von verschiedenen Tierarten verschiedene Resistenz gegen das Saponin zeigen, und daß die Erythrocyten, die die größte Quote Cholesterin:Lecithin enthalten, auch die widerstandskräftigsten sind. Zu wesentlich ähnlichen Ergebnissen sind auch andere Forscher gekommen, z. B. Rywosch,⁴⁾ Schwanzenbach, Port.⁵⁾ Aus den Untersuchungen, die

¹⁾ Deutsche med. Wochenschr., 1901, Nr. 13.

²⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, 1905, S. 552.

³⁾ Ibid., Bd. XI, 1908.

⁴⁾ Pflügers Archiv, Bd. 116, 1907, S. 229.

⁵⁾ Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 99, 1910, S. 259.

Port über Sera und ihre Hemmung auf die Saponinhämolyse gemacht hat, geht hervor, daß parallele Verhältnisse zwischen den Mengen Cholesterin in den Erythrocyten und im Serum in bezug auf ihre Fähigkeit, die Hämolsinen zu entgiften, herrschen: je größer der Gehalt des Serums an Cholesterin ist, um so größer ist auch seine hemmende Einwirkung auf das Saponin.

Außer diesen sind Versuche unter Anwendung von mehreren anderen hämolytischen Stoffen und lipoiden Substanzen ausgeführt worden. So hat W. Meyerstein¹⁾ eine systematische Untersuchung über die Verhältnisse mehrerer Stoffe bei der Hämolyse gemacht. Als Hämolytika wandte er Saponin, Natr. oleinic., Natr. taurochol. und Cobragift an. Die Lipoide waren Cholesterin, Ovo-Lecithin, Kephalin und Cerebron. Hierbei zeigte es sich, daß die hämolytischen Prozesse mit einigen Ausnahmen hemmend von obenerwähnten Substanzen beeinflußt werden. Es scheint also zwischen lipoiden Stoffen und Hämolsinen eine große Affinität zu herrschen, ein Verhältnis, das außer von Meyerstein auch von Landsteiner und Raubitsch²⁾ hervorgehoben worden ist.

Die entgiftende Einwirkung des Cholesterins auf das Saponin ist nach Hauptmann³⁾ an die OH-Gruppe gebunden, indem mit dem Ersatz dieser Gruppe durch eine andere die hemmende Einwirkung des Cholesterins auf das Saponin verschwindet. Das Saponin würde also in das Cholesterinmolekül eintreten und die OH-Gruppe ersetzen. Es ist auch Windaus⁴⁾ gelungen, eine Verbindung zwischen dem Saponin Digitonin und Cholesterin herzustellen und zu isolieren, eine Verbindung, welcher die hämolytische Fähigkeit des Digitonins abging. Infolgedessen ist die Ansicht ausgesprochen worden, daß die Entgiftung der Hämolsine durch eine chemische Reaktion zwischen den Hämolsinen und den hemmenden Substanzen bedingt ist. Daß man aber für das Zustandekommen der Ent-

¹⁾ Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 62, 1910, S. 258.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 15, 1909, S. 33.

³⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. 6, 1905, S. 567.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., 1909, Bd. 42 : 1., S. 238.

giftung auch direkt physikalische Faktoren in Betracht ziehen muß, darauf scheinen mehrere Beobachtungen und Erfahrungen hinzudeuten. Liefmann und Cohn¹⁾ vermuten, daß die Hemmung der Ölsäurehämolyse durch Cholesterin von einem Adsorptionsprozeß abhängt; die Proportionen zwischen den reagierenden Stoffen scheinen darauf hinzudeuten. v. Eisler spricht dieselbe Vermutung hinsichtlich der Hemmung der Saponinhämolyse durch Cholesterin aus. Frei²⁾ sagt: «Es existiert keine direkte Proportionalität zwischen den Wirkungen der verschiedenen Mengen von Saponin und dem hemmenden Serum». Port³⁾ äußert: «Die Entgiftung des Saponins durch das Cholesterin erfolgt nicht nach dem Gesetz der konstanten multiplen Proportionen.» Der letztgenannte Verfasser sagt bei derselben Gelegenheit: «Das Serum bzw. Cholesterin scheint im gegebenen Fall sich nicht direkt mit dem Saponin zu verbinden, sondern auf die Erythrocyten selbst einzuwirken und deren Resistenz zu erhöhen.» Einige meiner Versuche geben Anlaß zu demselben Schlußsatz und bestätigen also die von Port gemachte Beobachtung.

Die Hämolytika, die ich angewandt habe, waren Saponin und Seife. Als hemmender Stoff wurde Cholesterin angewandt. Die Saponinlösung war 0,20%ig, und die Seifenlösung war 1%ig. Das Cholesterin wurde in Form einer Wassersuspension benutzt, die durch Eingießen einer mit Aceton bereiteten Cholesterinlösung in warmes Wasser bewirkt worden war. Das Aceton wurde auf dem Wasserbad verdampft. Die Suspension war in den Versuchen mit Saponin 0,20%ig und in denen mit Seife 0,50%ig. Es wurde immer dafür gesorgt, daß alle Lösungen 5,5% Traubenzucker enthielten. Die Hämolyseversuche wurden immer so ausgeführt, daß die Proben im Wasserbad von 37° 5 Minuten lang aufbewahrt wurden. Unmittelbar darauf wurde zentrifugiert und das Resultat durch Vergleichen mit einer in folgender Weise erhaltenen Skala abgelesen. 2,5 ccm Erythrocyten, die wiederholt mittels Zentri-

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 26, 1910, S. 85.

²⁾ Zur Theorie der Hämolyse, Inaug.-Diss. Zürich 1907.

³⁾ Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 99, 1910, S. 259.

fugieren mit Traubenzuckerlösung gewaschen worden waren, wurden 97,5 ccm destilliertes Wasser zugesetzt. Von der erhaltenen Hämoglobinlösung wurden Verdünnungen mit Wasser in den Proportionen 1 : 2, 1 : 4 usw. gemacht. Die Hämolyse der unverdünnten Lösung wurde = 100% gesetzt, und die Verdünnungen entsprachen also 50, 25% usw. Das Blut war defibriertes Ochsenblut.

Versuch 1.

A. Mit einer Mischung von 1 ccm Saponinlösung bzw. Seifenlösung, 1 ccm Traubenzuckerlösung und 1 ccm Blut wurden Hämolyseversuche ausgeführt.

B. Gleiche Teile Saponinlösung bzw. Seifenlösung und Cholesterinsuspension wurden gemischt und bei 37° gehalten. Nach unten angegebenen Zeiten wurden davon 2 ccm genommen, die mit 1 ccm Blut versetzt wurden, wonach auf obenerwähnte Weise die Hämolyse bestimmt wurde.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten.

	Mit Saponin	Mit Seife
Mit A (Saponin bzw. Seife-Traubenzucker)	100 %	100 %
» B (» » Seife-Cholesterin) sogleich . .	80 %	95 %
» » (» » » ») nach 10 Min.	55 %	75 %
» » (» » » ») » 20 »	40 %	60 %
» » (» » » ») » 30 »	25 %	40 %
» » (» » » ») » 45 »	10 %	25 %
» » (» » » ») » 60 »	6 %	15 %
» » (» » » ») » 75 »	4 %	10 %
» » (» » » ») » 90 »	0 %	7 %
» » (» » » ») » 120 »	0 %	0 %

Wir sehen, daß das Cholesterin die Hämolyse hinderte, wobei die Zeit der Einwirkung des Cholesterins auf das Saponin bzw. die Seife eine große Rolle spielt, indem schließlich in diesem Falle für das Saponin nach 90 Minuten, für die Seife nach 120 Minuten, alle Hämolyse vollständig ausblieb.

Versuch 2.

Gleiche Teile Saponin- bzw. Seifenlösung und Cholesterin-suspension wurden vermischt und in der einen Probe bei 37°, in der anderen bei 15° aufbewahrt. Nach folgenden Zeiten wurden 2 ccm aus jeder Probe genommen und mit 1 ccm Blut auf hämolytisches Vermögen geprüft.

Das Ergebnis war:

Für das Saponin:

	Bei 37°	Bei 15°
(Saponin-Cholesterin) nach 5 Minuten . . .	45 %	75 %
» » 10 » . . .	28 %	55 %
» » 20 » . . .	18 %	40 %
» » 30 » . . .	10 %	25 %
» » 45 » . . .	0 %	10 %
» » 60 » . . .	—	5 %
» » 75 » . . .	—	3 %
» » 90 » . . .	—	0 %

Für die Seife:

(Seife-Cholesterin) nach 5 Minuten	50 %	85 %
» » 10 »	37 %	60 %
» » 20 »	25 %	47 %
» » 30 »	18 %	35 %
» » 45 »	10 %	25 %
» » 60 »	0 %	18 %
» » 75 »	—	12 %
» » 90 »	—	8 %
» » 120 »	—	0 %

Bei der höheren Temperatur war die Einwirkung des Cholesterins bedeutend kräftiger als bei der niederen. Bei 37° war die Hämolyse schon nach 45 bzw. 60 Minuten verhindert worden, während dasselbe bei 15° erst nach der doppelten Zeit erreicht wurde.

Versuch 3.

In diesem Versuche wurde 1 ccm Saponin- bzw. Seifenlösung mit unten angegebenen verschiedenen Mengen Cholesterinsuspension und Traubenzuckerlösung versetzt. Die Mischungen wurden 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 37° gehalten, wonach das Blut zugesetzt wurde.

(Saponin + 1 ccm Cholesterin + 1 ccm Traubenzucker)	80%
(„ + 1 ¹ / ₄ „ „ + ³ / ₄ „ „	50%
(„ + 1 ¹ / ₂ „ „ + ¹ / ₂ „ „	15%
(„ + 1 ³ / ₄ „ „ + ¹ / ₄ „ „	3%
(„ + 2 „ „ kein Traubenzucker)	0%
(Seife + 2 ccm Traubenzucker)	75%
(„ + ¹ / ₂ „ Cholesterin + 1 ¹ / ₂ ccm Traubenzucker)	60%
(„ + 1 „ „ + 1 „ „)	45%
(„ + 1 ¹ / ₂ „ „ + ¹ / ₂ „ „)	25%
(„ + 2 „ „ kein Traubenzucker)	10%

Wie ersichtlich, vermindert eine größere Menge Cholesterin in höherem Grade als eine kleinere die Hämolyse. Indessen steht nicht die Verminderung der Hämolyse im Verhältnis zu der vermehrten Cholesterinmenge. Dieses stimmt gut mit oben erwähnten von anderen Forschern gemachten Beobachtungen überein.

Versuch 4.

Das Blut wurde mit seinem doppelten Volumen Cholesterinsuspension gemischt und bei 37° aufbewahrt. Nach folgenden Zeiten wurden davon 2 ccm genommen, die mit 1 ccm Saponin- bzw. Seifenlösung versetzt wurden, worauf der Hämolyseversuch auf gewöhnliche Weise ausgeführt wurde.

	Mit Saponin	Mit Seife
(Blut-Cholesterin) sogleich	65 %	60 %
„ nach 10 Minuten	50 %	—
„ „ 25 „	40 %	75 %
„ „ 45 „	35 %	90 %
„ „ 60 „	10 %	100 %
„ „ 120 „	0 %	—

Aus diesem Versuch geht hervor, daß das Blut durch die Cholesterinbehandlung seine Resistenz gegen das Saponin vermehrt hat; und diese Resistenz nimmt zu, je länger die Behandlung dauert. Gegen die Seife enthielt das Blut durch die Behandlung mit dem Cholesterin anfänglich eine gewisse Resistenz, die indessen allmählich immer mehr geschwächt wurde, um schließlich ganz aufzuhören. Dieses von der Saponinhämolyse abweichende Verhältnis läßt sich gegenwärtig nicht erklären. Auch haben mehrere Forscher die Entgiftung der Seifenhämolyse durch Cholesterin geleugnet.

Versuch 5.

A. Wie im vorigen Versuche wurde eine Mischung von Blut und Cholesterinsuspension bei 37° aufbewahrt. Nach unten angegebenen Zeiten wurden davon 2 ccm genommen, die zentrifugiert wurden; das Serum wurde wegpipettiert, und die zurückgebliebenen Erythrocyten wurden mit Serum durch Umschütteln und Zentrifugieren dreimal gewaschen. Zu den Erythrocyten wurden hernach 1 ccm Traubenzuckerlösung und so viel Serum gegeben, daß das Volumen 2 ccm blieb, 0,5 ccm Saponin- bzw. Seifenlösung wurde darauf zugesetzt und der Hämolyseversuch ausgeführt.

B. Kontrollversuch mit Traubenzuckerlösung anstatt Cholesterinsuspension.

Das Ergebnis war folgendes:

	Mit Saponin	Mit Seife
Mit A (Blut-Cholesterin) sogleich	55 %	65 %
» » (») nach 30 Minuten	40 %	85 %
» » (») » 60 »	20 %	95 %
» » (») » 90 »	10 %	100 %
» B (Blut-Traubenzucker)	100 %	100 %

Dieser Versuch gibt dasselbe Ergebnis wie der vorige. Daneben zeigt er hinsichtlich der Saponinhämolyse, daß ein irreversibler Prozeß zwischen den Erythrocyten und dem Cholesterin zustande gekommen ist, wodurch die Entgiftung ge-

schah. Je länger die Zeit der Einwirkung des Cholesterins ist, um so größer bleibt auch die Hemmung.

Obenerwähnte Versuche zeigen, daß die hemmende Einwirkung des Cholesterins auf die Saponinhämolyse teils auf einer Reaktion zwischen dem Cholesterin und dem Saponin, teils auf einer solchen zwischen dem Cholesterin und den Erythrocyten beruht. Die vorige Reaktion hängt in hohem Grade von der Zeit der Einwirkung des Cholesterins und Saponins aufeinander, von der Temperatur und von der Menge des Cholesterins ab. Diese Ergebnisse zeigen große Ähnlichkeiten mit denen, die ich aus Versuchen betreffs des Einflusses einiger kolloiden Stoffe auf die Hemmung der Enzymwirkungen erhalten habe.¹⁾ Ich fand unter anderem, daß das Saponin der Hemmung der Labwirkung durch Kohle und Normalserum entgegenwirkt und in einigen Fällen sie ganz aufhebt, und daß es sogar eine Mischung von Enzym und Hemmungskörper zum Teil aktiviert. Bei diesen Prozessen spielen mehrere Faktoren eine wesentliche Rolle. So hat das Saponin bei einer höheren Temperatur eine größere Wirkung als bei einer niederen. Sein Einfluß steigt mit der Zeit, wie auch eine größere Menge Saponin sich kräftiger als eine kleinere zeigt. Auf dieselbe Weise wie das Saponin bei der Hemmung der Enzymwirkung sich mit der Kohle und dem Serum verbindet, wodurch diese verhindert werden, auf das Enzym einzuwirken, verbindet sich bei der Saponinhämolyse wahrscheinlich auch das Cholesterin mit dem Saponin, und die Hämolyse kann dadurch nicht zustande kommen. Der Prozeß, durch welchen das Saponin sich mit der Kohle und dem Serum in den oben erwähnten Enzymversuchen verbindet, muß wahrscheinlich als eine Adsorption betrachtet werden, wobei, wie erwähnt, Zeit, Temperatur und Mengenverhältnisse eine große Rolle spielen. Wenn man dieses ins Auge faßt, so liegt die Annahme nahe, daß die Hemmung der Saponinhämolyse durch das Cholesterin in einem Adsorptionsprozesse ihren Grund hat. Daß eine chemische Verbindung zwischen den beiden Substanzen zustande kommen kann, dürfte nicht ausgeschlossen sein. Andererseits aber mag auf die verhältnismäßig

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, 1912, S. 178.

ungünstigen Umstände hingewiesen werden, unter welchen die Verbindung bei den Hämolyseversuchen entstehen würde, indem das Cholesterin sich in Form einer Wassersuspension befindet und das Saponin in kolloider Lösung. Windaus hatte bei der Herstellung seiner Verbindung die Substanzen in alkoholischer Lösung. Aus den Versuchen 4 und 5 geht hervor, daß die Erythrocyten das Cholesterin aufgenommen hatten, und daß das Cholesterin trotz wiederholtem Waschen zurückgehalten wurde. Was dabei stattgefunden hat, ist nicht leicht zu sagen; möglicherweise ist das Cholesterin in die Erythrocyten eingedrungen, wo es also die Menge des vorher befindlichen Cholesterins vermehrt. Dadurch würde die Resistenz der Erythrocyten nach den oben erwähnten von Pascucci gemachten Schlußsätzen vermehrt werden. Wir haben hier wahrscheinlich im Grunde denselben Hergang wie bei der direkten Einwirkung von Cholesterin auf das Saponin. Das Cholesterin lenkt das Saponin von den Blutkörperchen ab, sowohl, wenn es in der die Blutkörperchen umspülenden Flüssigkeit vorhanden ist, als auch wenn es von denselben aufgenommen ist.

Was die Hemmung der Seifenhämolyse durch das Cholesterin betrifft, so sehen wir, daß auch diese in hohem Grade auf der Zeit, während welcher das Cholesterin auf das Saponin einwirken darf, auf der Temperatur, sowie auch auf der Menge des Cholesterins beruht. Hier ist es auch vielleicht schwieriger als bei der Saponinhämolyse, sich die Entstehung einer chemischen Verbindung als die Ursache der Entgiftung zu denken; deshalb muß die Annahme eines Adsorptionsprozesses näher liegen, zumal die Seife, sowie auch das Cholesterin in kolloider Form vorhanden sind.