

Die hämolytische Wirkung von Cyclamin-Cholesterin-Mischungen.

Von

E. H. Riesenfeld und H. Lummerzheim.

Mit drei Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem physikalisch-chemischen Institut der Nobelstiftung zu Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. Aug. 1913.)

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Kenntnis der Vorgänge liefern, die sich bei der Neutralisation der Toxine durch Antitoxine abspielen. Sie enthält die Resultate einer Reihe von quantitativen Untersuchungen, die wir über die Fähigkeit des Cholesterins, die hämolytische Wirksamkeit von Saponinen herabzusetzen, angestellt haben.

Diese antihämolytische Wirkung des Cholesterins wurde zuerst 1901 von Ransom¹⁾ beobachtet. Windaus²⁾ stellte 1908 chemisch wohl charakterisierte «Molekularverbindungen» zwischen Cholesterin und verschiedenen Saponinen z. B. Digitonin her und zeigte, daß die Bildung solcher Komplexverbindungen ausreiche, die entgiftende Wirkung des Cholesterins auf Saponine zu erklären, da «das Digitonin in der Komplexverbindung tatsächlich entgiftet ist und nicht mehr das höchst energische hämolytische Vermögen besitzt, das dem freien Digitonin zukommt».

Daß es sich bei diesem Vorgange um ein Analogon der Toxin-Antitoxinbindung handelt, ist besonders von Madsen³⁾ und Arrhenius⁴⁾ betont worden. Auf die große Rolle, die Massenwirkungsgesetz und Reversibilität bei diesen Bindungen spielen, hat hauptsächlich Arrhenius (l. c.) hingewiesen. Er

¹⁾ Deutsche med. Wochenschrift, 1901, S. 194.

²⁾ Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 42, S. 238 (1909).

³⁾ Madsen und Noguchi, Oversigt Danske Vidensk. Selsk. Förh. 1904, S. 457.

⁴⁾ Immunchemie, Leipzig 1907.

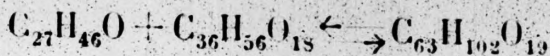
hat an vielen Beispielen gezeigt, daß bei der Entgiftung von Toxinen durch Antitoxine die Verhältnisse genau so liegen, wie man sie bei Annahme einer reversiblen Umsetzung nach den Gesetzen der physikalischen Chemie erwarten sollte.

Ein exakter Nachweis für das Vorhandensein einer dissoziierten Toxin-Antitoxinverbindung ist indessen mit großen Schwierigkeiten verbunden, weil die in Frage kommenden Stoffe nach ihrer chemischen Natur so gut wie unbekannt sind. Dagegen hat Arrhenius gezeigt, daß man umgekehrt mit Hilfe physiologischer Methoden die Konstante eines physikalisch-chemischen Dissoziationsgleichgewichtes bestimmen kann, und dies für die Neutralisation von Ammoniak durch Borsäure durchgeführt. Er fand aus der hämolytischen Wirksamkeit von Ammoniak-Borsäuregemischen den Wert $k = 1,02$, der später von Lundén auf rein physikalisch-chemischem Wege mit $k = 1,04$ bestätigt wurde.¹⁾

Da nun nach den Ergebnissen der erwähnten Windauschen Arbeit die Annahme einer Dissoziation der gelösten Saponincholesteride sehr nahe liegt, so haben wir eine Reihe von Versuchen angestellt, die Dissoziationskonstante einer solchen Komplexverbindung aus der hämolytischen Wirksamkeit verschiedener Saponin-Cholesteringemische zu bestimmen. Wir haben dazu das Cyclamincholesterid gewählt, weil Cyclamin verhältnismäßig leicht in reinem Zustande zu erhalten ist. Außerdem läßt sich Cyclamincholesterid schon durch Ätherextraktion in seine Bestandteile zerlegen, sodaß bei ihm die Annahme einer Dissoziation besonders naheliegt.

I. Bestimmung des Dissoziationsgleichgewichtes auf hämolytischem Wege.

Unter der Annahme, daß Cyclamin²⁾ und Cholesterin nach der Gleichung



¹⁾ Meddel. f. Vet.-Akads. Nobelinstitut. Bd. 1, S. 10. Zeitschrift f. physik. Chemie, Bd. 44, S. 7 (1903).

²⁾ Die Molekulargröße des Cyclamins ist bisher nicht sicher bekannt. Obige Formel hat Windaus l. c. vorgeschlagen.

1 Mol. Cholesterin + 1 Mol. Cyclamin \rightleftharpoons 1 Mol. Cyclamincholesterid
 miteinander reagieren, erhält man als Massenwirkungsgleichung

$$k = \frac{a \cdot b}{c}$$

worin a und b die Mengen freien Cyclamins und Cholesterins, c die Menge der gebildeten Komplexverbindung, sämtlich in Äquivalenten gemessen, bedeuten.

Um a, b und c aus dem Hämolysegrade zu bestimmen, wurde folgendermaßen verfahren.¹⁾

In eine Reihe von Versuchsröhren wurden eine konstante Menge isotonischer Cyclaminlösung und wechselnde Mengen einer kolloidalen Lösung von Cholesterin in Wasser eingefüllt, dazu so viel 0,9%ige Chlornatriumlösung, sodaß das Gesamtvolumen in jedem Röhrchen 5 ccm betrug. Nach einiger Zeit wurde die hämolytische Wirkung dieser Mischung gegen eine bei allen gleiche Menge Blutkörperchen bestimmt. Gleichzeitig und unter sonst ganz gleichen Bedingungen wurde eine Vergleichsreihe angesetzt, die wechselnde Mengen Cyclamin ohne Cholesterin enthielt. Bei allen Versuchen wurden auf Grund von Vorversuchen die Konzentrationen so gewählt, daß der erhaltene Hämolysegrad zwischen 5% und 95% lag. Dann wurde eine gleiche Versuchsreihe mit anderer Cyclaminkonzentration angesetzt u. s. f.

Der Wert von k wurde nun für jeden einzelnen Versuch folgendermaßen bestimmt. Der Hämolysegrad gab die Menge des freien Cyclamins a an (aus der Vergleichsreihe zu entnehmen). Die Menge des gebundenen Cyclamins ergibt sich als Differenz der zugesetzten Cyclaminmenge A und der freien Cyclaminmenge a, also A—a. Damit äquivalent sind die Menge des gebundenen Cholesterins B—b und die der gebildeten Komplexverbindung c. Die Menge des freien Cholesterins ist die Differenz aus derjenigen des insgesamt zugesetzten, B, und der des gebundenen Cholesterins. Solange wir also alles in Äquivalenten messen, können wir schreiben

¹⁾ Die technischen Einzelheiten sind unten ausführlicher beschrieben (Kap. 3).

$$k = \frac{ab}{c} = \frac{a(B - (A - a))}{A - a}$$

Zwei Voraussetzungen, die dieser Ableitung zugrunde liegen, seien hier schon kurz besprochen.

Es wurde angenommen, daß das zugesetzte Cholesterin sich in der physiologischen Kochsalzlösung löst. Diese Annahme liegt nahe wegen der großen Verdünnung, in der wir arbeiteten. Die größte Menge, die von uns verwandt wurde, war 0,5 ccm der 0,01% igen Cholesterinlösung = 0,0005 g in 5 ccm Kochsalzlösung (Versuchsreihe 17). Das entspricht einer Konzentration von 10 mg im Liter, wobei noch nicht berücksichtigt ist, daß ja nur ein Teil des Cholesterins als solches bestehen blieb, während ca. $\frac{1}{3}$ von Cyclamin gebunden wird. Außerdem wurde niemals eine Ausfällung des Cholesterins nach Zusatz der Kochsalzlösung beobachtet, wie sie bei einer kolloidalen Lösung zu erwarten wäre. Sollte anderseits unsere Annahme falsch sein und nur ein Bruchteil des Cholesterins sich lösen, so hätten wir es stets mit einer an Cholesterin gesättigten Lösung zu tun: die Menge des gelösten freien Cholesterins wäre konstant, damit auch der Wert

$$\frac{a}{A - a}$$

Dagegen müßte der Wert von

$$k = \frac{a(B - (A - a))}{A - a}$$

mit zunehmendem B ebenfalls zunehmen. Aus den Resultaten der Versuchsreihe 17, bei der die Cholesterinkonzentration am größten war, geht hervor, daß diese Annahme falsch ist. Wir finden dort eine Serie von Versuchen, für die $B = 5$, und eine zweite, für die $B = 10$ ist. Die unter k verzeichneten Werte sind unabhängig von B innerhalb der Versuchfehler konstant. Für $\frac{a}{A - a}$ dagegen finden wir, daß bei $B = 5$ Schwankungen von 3,1—4,2 (Mittel: 3,9), bei $B = 10$ Schwankungen von 1,3—2,1 (Mittel: 1,8) vorhanden sind. Also: deutliche Abhängigkeit von B.

Wir dürfen also annehmen, daß sich das zugesetzte Cholesterin in der Tat löst.

Ferner wurde angenommen, daß zwei Versuchsröhrchen, die die gleiche Menge freies Cyclamin enthalten, auf Zusatz einer gleichen Blutkörperchenmenge auch denselben Hämolysegrad ergeben, ohne Rücksicht darauf, ob und wieviel Cyclamincholesterid zugegen ist. Zunächst also soll das Cyclamincholesterid selbst nicht merklich hämolytisch wirken. Wäre diese Annahme falsch, so würden wir aus dem zu hohen Hämolysegrade einen zu großen Wert für a erhalten, und der Wert für k müßte mit zunehmender Konzentration der Komplexverbindung deutlich wachsen, wovon in unseren Versuchsreihen nichts zu merken ist. Außerdem muß man annehmen, daß durch den Vorgang der Hämolyse kein Cyclamin «verbraucht» wird: diese Annahme ist durchaus nötig, wenn man mit der Zugrundelegung des Massenwirkungsgesetzes nicht in Widerspruch zu der Tatsache einer Entgiftung selbst geraten will. Würde durch die Hämolyse freies Cyclamin verbraucht, so müßte dafür aus der Komplexverbindung neues abdissoziieren, damit das Dissoziationsgleichgewicht gewahrt bleibe, und dieser Vorgang würde sich so lange wiederholen, bis entweder völlige Hämolyse eingetreten, oder alles vorhandene Cyclamin verbraucht ist. Das Cholesterin könnte dann höchstens die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzen. Damit steht aber die Erfahrung in Widerspruch. Wenn man Blutkörperchen zu einem Cyclamin-Cholesteringemisch hinzusetzt, so kommt die Hämolyse nach 2—3-stündigem Stehen bei 37° zum Stillstand, obwohl die Gesamtmenge des vorhandenen Cyclamins zur Hervorbringung eines viel höheren Hämolysegrades ausreichen würde.

II. Herstellung der Blutlösungen.

Für unsere Versuche dienten Suspensionen von Ochsenbluterythrocyten in 0,9%iger Kochsalzlösung, bei denen die Konzentration der Blutkörperchen den zehnten (= 10%ige Blutlösung) oder den zwanzigsten (= 5%ige Blutlösung) Teil derjenigen des normalen defibrinierten Blutes betrug. Wo das Serum entfernt wurde, geschah dies in der üblichen Weise durch Zentrifugieren. Das Blut wurde mit dem doppelten Volumen physiologischer Kochsalzlösung gemischt und zentrifugiert, und die darüber stehende Kochsalzlösung abgesogen und gemessen.

Sie betrug über 15 mal soviel als die zurückbleibende Flüssigkeitsmenge, sodaß also schon nach einmaliger Wiederholung dieser Prozedur über 99,2% des vorhandenen Serums entfernt waren. Die zurückbleibende Blutkörperchenemulsion wurde dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 10- bzw. 20fache Volumen der ursprünglichen Blutmenge verdünnt.

Bei der kolorimetrischen Bestimmung des Blutfarbstoffs spielt die Verfärbung der Blutlösungen ins Violette eine sehr unangenehme Rolle: sie stammt wahrscheinlich von bakterieller Zersetzung her. Wir haben vom Zusatz von Desinfektionsmitteln abgesehen, um jede Beeinflussung der hämolytischen Resultate möglichst zu vermeiden. Dagegen haben wir bei der Herstellung der Blutlösungen auf große Sauberkeit und sorgfältige Vermeidung von Infektion Wert gelegt. Das Blut wurde, wie es beim Schlachten aus der Wunde floß, in einer mit Glassplittern beschickten, sorgfältig gereinigten Flasche aufgefangen und durch Schütteln defibriniert. Alle Gefäße, mit denen es in Berührung kam, wurden durch mehrstündiges trockenes Erhitzen auf 100°, die verwandte Kochsalzlösung durch Kochen sterilisiert. Vor dem Zentrifugieren wurde es durch sterilisiertes Filtrierpapier filtriert. Nach der Fertigstellung wurde die Blutlösung in Eiswasser gestellt und darin aufbewahrt, sodaß ihre Temperatur stets 2—4° C. betrug. So behandelt zeigt sie auch nach dreiwöchentlichem Stehen noch keine Violettfärbung, dagegen stets etwas Selbsthämolysen, die bei frischen Lösungen 3—4%, bei 8 Tage alten 7—10% betrug.

III. Das Ansetzen der Versuche.

Die verwandte physiologische Kochsalzlösung enthielt 0,9% Natr. chlorat. puriss. fusum p. anal. Merck, in destilliertem Wasser gelöst.

Cyclamin und Cholesterin wurden in Form von Lösungen verwandt. Als Molekulargewichte wurden für Cyclamin 776,6, für Cholesterin 386,5 zugrunde gelegt (Windaus l. c.). Das Verhältnis dieser Zahlen ist sehr nahe 1 : 2.

Als Cyclaminpräparat diente Cyclamin. cryst. Merck. Es wurde dreimal aus 85% igem Äthylalkohol umkrystallisiert und

im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Die verwandten Lösungen enthielten 0,001%, in einigen Fällen auch 0,01%, gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung.

Cholesterin wurde in Form von kolloidalen Lösungen verwandt. Als Präparat diente ein von Herrn Prof. Windaus freundlichst zur Verfügung gestelltes Cholesterin, das noch zweimal aus Äthylalkohol umkrystallisiert wurde. 0,5 g davon wurden in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst. 5 ccm dieser Lösung wurden in 500 ccm destilliertes Wasser unter kräftigem Umschütteln schnell eingespritzt, die entstehende Lösung sofort filtriert und in einer Stöpselflasche mehrere Stunden auf 90 bis 100° erhitzt. Sie ist dann 2—3 Wochen haltbar, ohne Ausflockung zu zeigen. Reinheit des destillierten Wassers ist dafür eine wichtige Vorbedingung. Zu einigen Versuchsreihen wurden auch 0,01%ige Cholesterinlösungen verwandt.

Der Cholesteringehalt dieser Lösungen wurde mehrmals nachgeprüft, indem 100 ccm in einem zur Gewichtskonstanz getrockneten Bechergläschen bei 95° eingedampft wurden. Der Rückstand betrug 0,0050 g (0,0048 g, 0,0050 g, 0,0051 g).

Der osmotische Druck dieser alkoholischen kolloidalen Cholesterinlösungen ist nun erheblich geringer als der des Blutes. Darum und wegen des Alkoholgehaltes sind sie selbst hämolytisch wirksam. Wir haben uns stets durch Kontrollversuche davon überzeugt, welche Mengen einer solchen Lösung ohne Cyclaminzusatz eben eine wahrnehmbare Hämolyse unserer Blutlösung hervorriefen. Die für unsere Versuche angewandten Mengen blieben stets weit unter der Hälfte dieses Wertes.

Die Versuchsreihen wurden nun folgendermaßen angesetzt. Die Versuchsröhrchen — zylindrische Röhrchen von ca. 15 cm Länge und 10,0—10,4 mm innerem Durchmesser — wurden mit den erforderlichen Cyclamin- und Cholesterinmengen und mit so viel Kochsalzlösung beschickt, daß das Gesamtvolumen überall 5 ccm betrug. Diese Mischung stand dann mindestens drei Stunden im Trockenschrank bei 37°, damit sich das zu dieser Temperatur gehörige Reaktionsgleichgewicht des Systems: Cyclamin + Cholesterin = Cyclamincholesterid vollständig einstelle. Gleiche Versuchsreihen, bei denen diese Frist einmal

2 Stunden, das andere Mal 24 Stunden betrug, zeigten gleiche Resultate. Darauf wurden in jedes Röhrchen 5 ccm der gut durchgeschüttelten und noch einmal filtrierten Blutlösung mit einer Pipette eingespritzt und die Mischung schnell geschüttelt. Sie stand dann 3 Stunden bei 37° , wieder unter häufigem Umschütteln, darauf über Nacht im Eisschrank zum Absitzen. Die in der überstehenden klaren Lösung enthaltene Hämoglobinmenge wurde kolorimetrisch bestimmt.

IV. Bestimmung des Hämolysegrades mit dem Kolorimeter von Autenrieth und Königsberger.

Das übliche Modell des Kolorimeters von Autenrieth und Königsberger¹⁾ gestattet die Bestimmung des Hämolysegrades mit einer größeren Genauigkeit, als für unsere Versuche erforderlich ist, hat aber den Nachteil, daß man die zu untersuchende Lösung in die Cavette umfüllen muß; ein schnelles Arbeiten, wie es bei hämolytischen Versuchen zu wünschen ist, wird dadurch sehr erschwert. Wir haben den Apparat daher etwas abgeändert: an die Stelle der Cavette trat ein Halter, in den unser Versuchsröhrchen selbst gesteckt wurde. Er ließ sich so verstellen, daß sich bei einem mit 10 ccm Blutlösung gefüllten Röhrchen der oberste Teil der Flüssigkeitsäule unmittelbar vor der Doppelplatte befand. Der Winkel der Doppelplatte wurde so gewählt, daß die Projektion des mittleren Röhrchens ohne Zwischenraum neben der des Keiles zu sehen war. Die Krümmung des Röhrchens und die damit verbundene Ungleichmäßigkeit der Schichtdicke ist dann so gering, daß sie vernachlässigt werden kann: das linke Gesichtsfeld erscheint ganz gleichmäßig gefärbt.²⁾

Keil und Skala des Apparates wurden folgendermaßen geeicht. Eine 10⁰/₁₀₀ige Blutlösung wurde mit dem gleichen Volumen einer 0,1⁰/₁₀₀igen Cyclaminlösung gemischt und auf

¹⁾ Münchener Med. Wochenschr., 1910, S. 998.

²⁾ Ein derartig abgeändertes Kolorimeter eignet sich vorzüglich zur Bestimmung des Hämolysegrades. Es kann von der Firma Hellige & Co. Freiburg i. Br., Albertstr., unter dem Namen Hämolyse-Kolorimeter bezogen werden.

37° erwärmt. Nach wenigen Minuten ist vollständige Hämolyse eingetreten. Von der erhaltenen Lösung wurde ein Teil in den Keil gefüllt; ferner wurden je 0,5, 1, 2, 3 usw. ccm davon in die Versuchsröhrchen gefüllt und mit so viel Wasser versetzt, daß das gesamte Volumen überall 10 ccm betrug. Die erhaltenen Hämoglobinkonzentrationen wurden als 5, 10, 20, 30 usw. prozentige Hämolyse bezeichnet und im Kolorimeter die dazu gehörigen Skalenwerte ermittelt. Man erhält aus diesen Werten durch einfache Rechnung oder auf graphischem Wege eine Formel, nach der sich der Hämolysegrad als lineare Funktion des abgelesenen Skalenwertes darstellt, von der Form

$$H = a S + b,$$

worin H und S Hämolysegrad und Skalenwert, a und b Konstanten bedeuten, die bei Verwendung von Röhrchen gleichen Durchmessers und desselben Kolorimeters für den Keil charakteristisch sind. Zeichnet man die Funktion als gerade Linie in Koordinatenpapier ein, so kann man den zu jedem Skalenwert gehörigen Hämolysegrad ohne weiteres ablesen.

Die als «100%ige Hämolyse» in den Keil gefüllte Vergleichslösung wurde stets mit der Versuchsreihe, für deren Bestimmung sie dienen sollte, frisch angesetzt. Hämolysiert wurde sie mit einem großen Überschuß von Cyclamin.²⁾ Zur Bestimmung von Hämolysegraden unter 20% wurde sie mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnt.

Ein besonderer Vorzug des Kolorimeters besteht darin, daß man die Hämoglobinkonzentration nur im obersten Zentimeter des Versuchsröhrchens mißt, der nach verhältnismäßig kurzer Zeit frei von schwebenden Blutkörperchen ist. Nötig ist nur, die Röhrchen kurz vor dem Einsetzen in den Eisschrank noch einmal umzuschütteln, damit sich das freie Hämoglobin im ganzen Röhrchen gleichmäßig verteilt.

²⁾ Nimmt man statt dessen destilliertes Wasser, das ein paar Tage über pulverisiertem Thymol gestanden hat, so erhält man eine ziemlich haltbare Keillösung. Wir haben sicherheitshalber davon keinen Gebrauch gemacht, zumal uns Blutlösung stets in genügenden Mengen zur Verfügung stand.

V. Die Versuchsergebnisse.

A und B bedeuten die angewandten Cyclamin- und Cholesterinmengen. Die dabei angegebenen Zahlen sind als Kubikzentimeter einer 0,001%igen Cyclaminlösung bzw. einer damit äquivalenten 0,0005%igen Cholesterinlösung zu verstehen. Wo Lösungen anderer Konzentration verwandt wurden, wurden sie stets entsprechend umgerechnet.

H bedeutet den Hämolysegrad in Prozenten.

a bedeutet «freies Cyclamin» und wurde aus dem Hämolysegrade und der Vergleichsreihe (durch graphische Interpolation) bestimmt.

Unter einer 5%igen Blutlösung ist eine solche zu verstehen, bei der die Konzentration der Erythrocyten den zwanzigsten Teil von derjenigen des normalen defibrinierten Blutes betrug.

a) Hämolyse durch Cyclamin ohne Cholesterinzusatz.

Den typischen Verlauf der Abhängigkeit des Hämolysegrades von der zugesetzten Cyclaminmenge stellt folgende Versuchsreihe dar:

A	0	5	6	7	8	8,5	9	9,5	10	10,5
H	6	6	6	7	7,5	8	11	13,5	16	19
A	11	11,5	12	12,5	13	13,5	14,5	15	16	18
H	29	39	44	51	62	79	86	90	93	99

Die Blutlösung war 10%ig, 6 Tage alt; Serum nicht entfernt (Abb. 1).

Bei Verwendung von serumfreien Blutlösungen bleibt der Vorgang im Prinzip derselbe, es genügen aber geringere Cyclaminmengen. Ich habe mehrmals aus ein und derselben Blutprobe zwei Lösungen hergestellt, von denen die eine von Serum befreit war, die andere nicht, um die antihämolytische Kraft des Serums zu messen. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. A gibt an, welche Cyclaminmenge erforderlich war, um 50%ige Hämolyse hervorzurufen. T bedeutet das Alter der Blutlösung in Tagen. Die durch eine Klammer zusammengefaßten Lösungen waren gleichzeitig aus der gleichen Blutmenge ein und desselben Tieres hergestellt. (S. a. Abb. 2.)

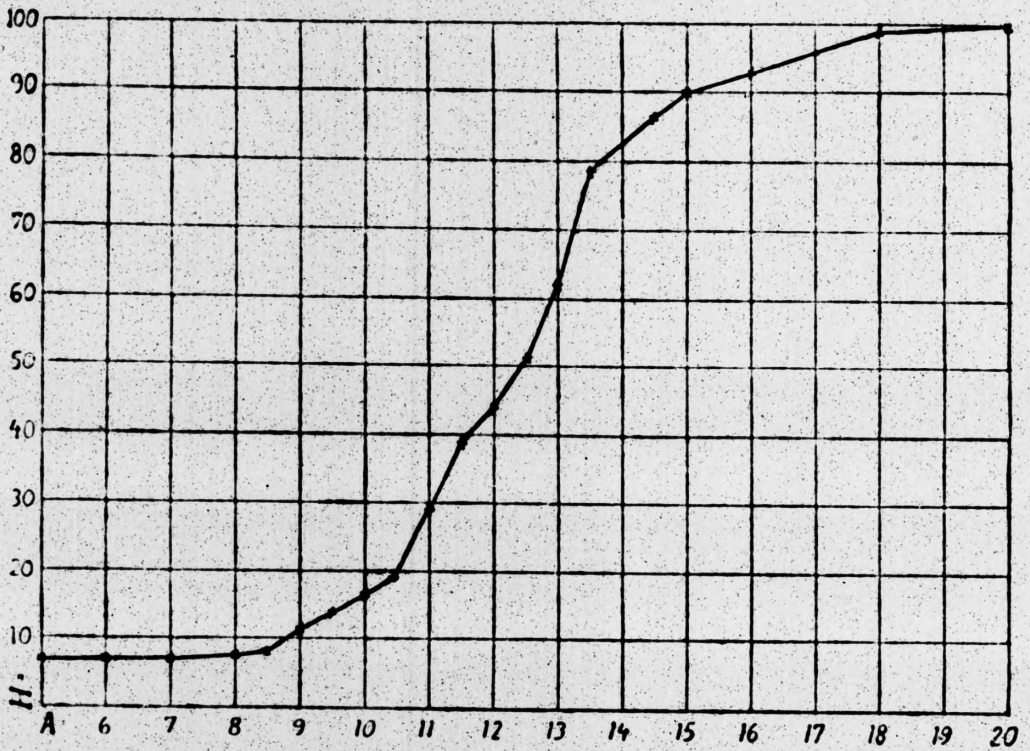


Abb. 1. Abhängigkeit des Hämolysegrades von der Cyclaminkonzentration.

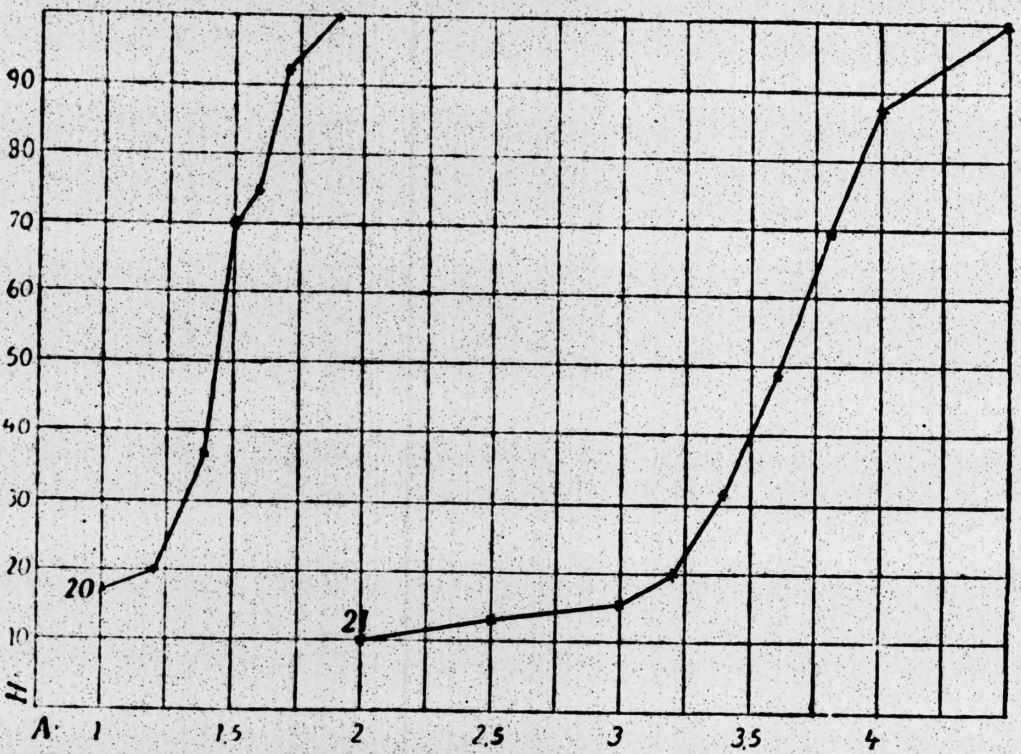


Abb. 2. Die Beeinflussung der Hämolyse durch das Serum.
 Blutlösung 20: Serum entfernt.
 Blutlösung 21: Serum nicht entfernt.

Blutlösung	A	T
{ 16 (serumhaltig)	12,5	1
{ 18 (serumfrei)	1,8	1
{ 21 (serumhaltig)	3,6	5
{ 20 (serumfrei)	1,45	5
{ 24 (serumhaltig)	4,8	1
{ 23 (serumfrei)	1,8	1

Blutlösung 16 und 18 waren 10⁰/₁₀ig; 20, 21, 23 und 24 waren 5⁰/₁₀ig.

Die Beeinflussung der Hämolyse durch das Serum ist also großen Schwankungen unterworfen.

b) Die Beeinflussung der Cyclaminhämolyse durch Cholesterinzusatz.

Die erste hier aufzuführende Versuchsreihe wurde angesetzt, um zu zeigen, daß beim Zusammengeben äquivalenter Mengen Cyclamin und Cholesterin in der Tat nur eine Abschwächung, nicht eine völlige Aufhebung der Giftwirkung des Cyclamins eintritt, und daß ein Überschuß von Cholesterin eine weitere Herabsetzung der hämolytischen Wirksamkeit zur Folge hat, ganz im Sinne der Dissoziationshypothese.

A	0	3	3	3	3,6	3,6	3,6	4	4	4
B	0	0	3	6	0	3,6	7,2	0	4	4
H	4	100	12	4	100	49	4	100	90	4

Die verwandte Blutlösung war 5⁰/₁₀ig, vom Serum befreit, 3 Tage alt.

Die Cholesterinlösung enthielt 0,01⁰/₁₀ Cholesterin in 2⁰/₁₀igem Alkohol.

Zur Berechnung der Dissoziationskonstante wurden nun eine größere Anzahl von Versuchen mit verschiedenen Cyclamin- und Cholesterinmengen angesetzt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Die unter k angegebenen Zahlen sind nach der Formel

$$k = \frac{a(B - A + a)}{A - a}$$

berechnet.

Versuchsreihe 25.

A	B	H	a	k
(2	0,2	44	1,75	-0,35)
(2	0,4	31	1,6	0)
(2	0,8	18	1,45	0,7)
2	1,2	7	1,3	0,9
2,5	1	56	1,85	1
2,5	1,6	21	1,5	0,9
2,5	1,8	15	1,39	0,9
2,5	2	10	1,35	1
2,5	2,2	6	1,25	0,95
3	2	43	1,75	1,05
3	2,4	28	1,6	1,1
3	2,8	19	1,47	1,2
3	3	10	1,35	1,1
3	3,2	8	1,3	1,15

Mittel: 1,02

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2	2,2
H	3,8	8	15	21	29	38	48	63	84	100

Die Blutlösung war 5⁰/₁₀₀ig, 1 Tag alt, vom Serum befreit. Die Cholesterinlösung enthielt 0,01⁰/₁₀₀ Cholesterin in 2⁰/₁₀₀igem Alkohol.

Versuchsreihe 27.

A	B	H	a	k
(2	0,1	84	1,8	-0,9)
(2	0,2	68	1,74	-0,4)
(2	0,4	39	1,6	0)
(2	0,6	37	1,58	0,7)
(2	0,8	27	1,52	1)
2	1	21	1,45	1,2
(2,2	0,4	80	1,8	0)
(2,2	0,8	47	1,64	0,7)
(2,4	0,8	92	1,88	1,0)
2,4	1,2	52	1,65	1,0
2,4	1,6	27	1,5	1,2
2,6	1,2	90	1,87	1,2

Mittel: 1,15

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2,0
H	6	14	18	30	33	60	83	93	100

Blutlösung 5^o/ig, 2 Tage alt, Serum entfernt. Cholesterinlösung: 0,01% Cholesterin in 2^o/igem Alkohol.

Versuchsreihe 7.

A	B	H	a	k
2,3	2	45	2,06	15
2,5	2	71	2,26	17
2,3	4	25	1,86	15
2,4	4	36	1,98	17
2,5	4	46	2,06	17
2,6	4	61	2,18	18,5
2,7	4	65	2,2	15
2,8	4	76	2,3	16
2,9	4	90	2,4	17
2,6	6	37	1,98	17

Mittel: 16,5

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	1,3	1,5	1,7	1,8	1,9	2	2,14	2,2	2,3	2,4
H	17	20	20	21	31	41	52	68	77	80

Blutlösung 10^o/ig, 7 Tage alt, Serum nur zum Teil (ca. 6%) entfernt.

Cholesterinlösung: 0,005% Cholesterin in 1^o/igem Alkohol.

Versuchsreihe 17.

A	B	H	a	k
9	5	21	7,2	13
9,5	5	21	7,2	8,5
10,5	5	46	8,4	12
11	5	55	8,9	12
11,5	5	66	9,3	12
12	5	74	9,5	9,5
12,5	5	83	9,9	9
13	5	92	10,3	9

Mittel: 10,6

11,5	10	11	6,4	6
12	10	22	7,2	8
12,5	10	34	7,8	8,5
13	10	48	8,6	11
13,5	10	61	9,1	12
14	10	72	9,5	12
14,5	10	75	9,6	10
15	10	87	10,1	10,5

Mittel: 9,8

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	0	5	5,5	6	6,5	7	7,5
H	4,5	5	5,5	7,5	12	18	29
A	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11
H	38	52	63	69	83	96	100

Blutlösung 10⁰/₁₀ig, 1 Tag alt, Serum nicht entfernt.
Cholesterinlösung: 0,01⁰/₁₀ Cholesterin in 2⁰/₁₀igem Alkohol.

Versuchsreihe 18.

A	B	H	a	k
8	2	12	6,9	6
8,5	2	18	7,5	7,5
9	2	21	7,7	4
9,5	2	30	8,2	4,5
10	2	42	8,9	7

Mittel: 6

8,5	4	10	6,7	8
9	4	17	7,4	11
9,5	4	24	7,9	12
10	4	28	8,1	9
10,4	4	39	8,7	10,5

Mittel: 10,5

10	6	17	7,4	10
10,5	6	21	7,7	9
11	6	25	8	8
11,5	6	41	8,9	11,5
12	6	41	8,9	8
12,5	6	56	9,7	11
13	6	63	10,2	12

Mittel: 10

11	8	19	7.6	10
11,5	8	22	7.8	9
12	8	34	8,4	10
13	8	46	9.1	9.5

Mittel: 9,5

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	0	6	6,5	7	7,5	8	8,5
H	6	7	9	13	19	22	33
A	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12
H	42	54	60	67	74	79	88

Dieselben Lösungen wie bei Reihe 17. Blutlösung 3 Tage alt.

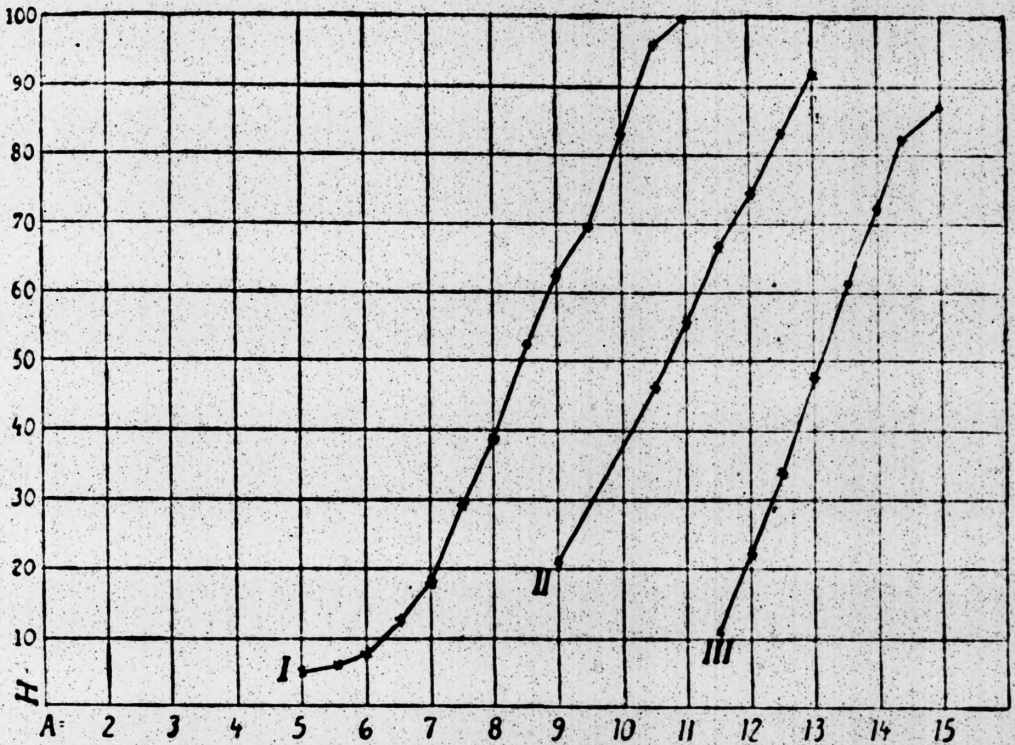


Abb. 3. Die Beeinflussung der Hämolyse durch Cholesterinzusatz in serumhaltiger Blutlösung. (Versuchsreihe 17.)

- I. Cyclaminhämolyse ohne Cholesterinzusatz (Vergleichsreihe).
- II. Cyclaminhämolyse mit Cholesterinzusatz. B = 5.
- III. Cyclaminhämolyse mit Cholesterinzusatz. B = 10.

VI. Besprechung der Resultate.

Versuchsreihe 25 liefert für k Werte, die man innerhalb unserer Versuchsfehler als konstant ansehen darf. Eine Aus-

nahme bilden diejenigen Versuche, für die B kleiner als 1 war. Bei ihnen ist k erheblich zu klein; sie verhalten sich also so, als sei für B ein zu kleiner Wert angesetzt. Da bei den übrigen Versuchen der Wert für k mit zunehmendem B nicht ansteigt, muß man wohl annehmen, daß bei Verwendung von so kleinen Cholesterinmengen unkontrollierbare Fehlerquellen aus der Blutlösung das Resultat beeinflussen. Es waren bei diesen Versuchen 0,04 ccm oder weniger der 0,01%igen Cholesterinlösungen zugesetzt. — Versuchsreihe 27 mit den gleichen Lösungen wie 25 einen Tag später angesetzt, ergab im wesentlichen das gleiche Resultat. Das geringe Ansteigen von k mit zunehmender Konzentration der Komplexverbindung in Reihe 25 berechtigt wohl kaum zu dem Schlusse, daß diese selbst hämolytisch wirkt (s. S. 274); man beachte, daß in den späteren Versuchsreihen davon nichts zu merken ist, obwohl dort viel größere Mengen der Komplexverbindung vorhanden waren.

Die Versuchsreihen 7, 17 und 18 unterscheiden sich von den beiden vorhergehenden dadurch, daß aus den verwandten Blutlösungen das Serum nicht oder nur teilweise entfernt war. Wir erhalten dort für k Zahlen, die sehr viel größer sind als die aus Reihe 25 und 27 gefundenen. In ein und derselben Versuchsreihe stimmen sie aber wieder innerhalb der Versuchsfehler untereinander überein. Der Grund dafür, daß bei Verwendung verschiedener Blutlösung verschiedene Werte für k erhalten werden, dürfte in der Beeinflussung der Hämolyse durch das Serum zu suchen sein.

Es liegt nahe, die Fähigkeit des Serums, antitoxisch gegen Cyclaminhämolyse zu wirken, seinem Gehalt an freiem Cholesterin zuzuschreiben. Damit stehen indessen unsere Resultate augenscheinlich im Widerspruch. Man müßte unter dieser Annahme in der für die Berechnung von k dienenden Formel den Wert von B um einen konstanten Betrag S vermehren, der der Menge freien Cholesterins in 5 ccm unserer Blutlösung entsprechen würde. a dürfte nicht mehr aus der Vergleichsreihe entnommen werden, da auch diese jetzt Cholesterin enthält. Indessen lassen sich die Werte für a und S

aus dem vorhandenen Material auch ohne Benützung der Vergleichsreihe bestimmen. Man hat nur nötig, aus den Ergebnissen einer Versuchsreihe 3 Wertepaare für A und B, also etwa A_1B_1 , A_2B_2 und A_3B_3 , so zu interpolieren, daß man für jedes den gleichen Hämolysegrad (also etwa 50%) erhält. Dann besteht die Beziehung

$$k = \frac{a}{A_1 - a} [B_1 + S - (A_1 - a)]$$

$$k = \frac{a}{A_2 - a} [B_2 + S - (A_2 - a)]$$

$$k = \frac{a}{A_3 - a} [B_3 + S - (A_3 - a)]$$

worin k und a stets denselben Wert haben. Durch Umrechnung erhält man daraus

$$a = \frac{A_1B_2 - A_2B_1}{A_2 - A_1} - \frac{A_1B_3 - A_3B_1}{A_3 - A_1}$$

$$S = \frac{B_2 - B_1}{A_2 - A_1} - \frac{B_3 - B_1}{A_3 - A_1}$$

$$S = \frac{B_2(A_1 - a) - B_1(A_2 - a)}{A_2 - A_1}$$

Wir haben ein solches Beispiel durchgerechnet. Aus Reihe 18 ergeben sich für $H = 50\%$ die Wertepaare:

$A_1 = 10.3$	$B_1 = 2$
$A_2 = 11.2$	$B_2 = 4$
$A_3 = 12.2$	$B_3 = 6$
$A_4 = 13$	$B_4 = 8$

Rechnet man nun S aus, so erhält man negative Werte nahe bei Null ($-2, -2.6, -2.2$), wodurch wohl die Hinfälligkeit unserer Voraussetzung genügend dargelegt ist. Im Serum vorhandenes freies Cholesterin kann also nicht als Fehlerquelle für uns in Frage kommen.¹⁾

¹⁾ Über die Mengen freien Cholesterins im normalen Serum haben wir Angaben in der Literatur nicht finden können. Nach den Arbeiten von Dorée, Fraser und Gardner (Proceedings of Royal Soc., Vol. 81, S. 110 und 230) erscheint verfüttertes Cholesterin z. T. im Blut wieder und zwar im Serum, dessen antihämolytische Kraft bedeutend erhöht wird. Damit stehen unsere Resultate nicht im Widerspruch, wir müssen

Dagegen würden unsere Resultate im Einklang mit der Annahme stehen, daß das Serum die Fähigkeit hat, von der jeweils vorhandenen Menge freien Cyclamins einen ihr proportionalen Anteil so zu binden, daß er weder an der Hervorbringung der Hämolyse noch an dem Dissoziationsgleichgewicht teilnehmen kann. a möge wieder diejenige Cyclaminmenge bedeuten, die nicht vom zugesetzten Cholesterin gebunden wird. Von a soll jetzt noch der n -te Teil «freies Cyclamin» bleiben, der Rest wird vom Serum gebunden. n wäre dann ein Maß für die Cyclamin bindende Kraft des Serums. In unserem Dissoziationsgleichgewicht ist dann: die Menge des «freien» (d. h. weder vom Cholesterin noch vom Serum gebundenen) Cyclamins $= \frac{a}{n}$, die Menge des an Cholesterin gebundenen Cyclamins nach wie vor $A - a$. Die Reaktionsgleichung nimmt also die Form an:

$$k = \frac{\frac{a}{n} [B - (A - a)]}{A - a}$$

$$n \cdot k = \frac{a}{A - a} [B - (A - a)]$$

Was wir aus der Vergleichsreihe entnehmen, ist nach wie vor a . n ist für uns nicht direkt bestimmbar. Es ist um so größer, je mehr Cyclamin das Serum zu binden imstande ist, und hat für jede Blutlösung einen anderen Wert (Kap. V a). Wir werden also für

$$\frac{a}{A - a} [B - (A - a)]$$

aber annehmen, daß der Gehalt des Serums an freiem Cholesterin in den für unsere Versuche benutzten Blutlösungen so gering ist, daß er für uns nicht in Betracht kommt, und daß die antihämolytische Fähigkeit des normalen Serums in erster Linie auf die Anwesenheit eines anderen Stoffes zurückzuführen ist.

Nachträgliche Anmerkung: Nach neueren Versuchen von Ellis und Gardner (Proceedings of Royal Soc., Vol. 85, S. 932) wird der normale Gehalt an freiem Cholesterin im Kaninchenblut sehr hoch gefunden, nämlich zu 0,06–0,08%.

einen um so größeren Wert erhalten, je größer die Cyclamin bindende Fähigkeit des in der verwandten Blutlösung befindlichen Serums ist. Für Versuche mit ein und derselben Blutlösung muß er konstant sein, weil dann n konstant ist.

Versuchsreihe 25 und 27 waren mit serumfreier Blutlösung angesetzt; man könnte sagen, daß dann $n = 1$ ist und der für k gefundene Wert die wirkliche Dissoziationskonstante des Cyclamincholesterids bei 37° darstellt (um ihn auf g-Äquivalente zu beziehen, müßte man ihn mit $1,29 \times 10^{-8}$ multiplizieren). Er ist nahezu gleich 1; die bei den übrigen Versuchsreihen in letzter Vertikalreihe aufgeführten Zahlen wären dann nicht Werte für k , sondern für n . Man wird wohl aber dem absoluten Wert der Konstanten wenig Bedeutung zumessen.¹⁾ Der Zweck dieser Arbeit war in erster Linie, zu zeigen, daß auch bei der Entgiftung der Saponine durch Cholesterin Gesetzmäßigkeiten vorhanden sind, die mit dem Gesetz von Guldberg und Waage im Einklang stehen.

Zusammenfassung.

Wenn man äquivalente Mengen Cyclamin und Cholesterin zusammengibt, so erhält man eine Mischung, in der die hämolytische Wirkung des Cyclamins nur zum Teil aufgehoben ist. Ein weiterer Zusatz von Cholesterin bewirkt eine weitere Herabsetzung der Giftigkeit. Diese Tatsachen lassen vermuten, daß die Cyclamin-Cholesterin-Komplexverbindung in Lösung dissoziiert ist. Sieht man die hämolytische Wirkung irgend einer Cyclamin-Cholesterin-Mischung als ein Maß für die vorhandene Menge freien Cyclamins an, so kann man die Dissoziationskonstante k des Cyclamincholesterids berechnen, vorausgesetzt, daß man den Gesamtcyclamingehalt und den Gesamtcholesteringehalt der Mischung kennt.

¹⁾ Offenbar ist die Cyclamin bindende Eigenschaft des Serums an die Anwesenheit eines Stoffes gebunden; denn sie läßt sich ja durch Auswaschen herabsetzen. Wir haben aber keine Gewähr dafür, wie weit uns das gelingt, und ob nicht (vielleicht infolge von Adsorption) doch ein erheblicher Anteil davon zurückbleibt.

Man erhält nach dieser Methode für k konstante Werte, solange man die Bestimmungen mit ein und derselben Blutlösung ausführt. Daß man bei Verwendung verschiedener Blutlösungen verschiedene Werte für k erhält, ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit des Serums zurückzuführen. Das Serum hat die Fähigkeit, die hämolytische Wirkung des Cyclamins herabzusetzen, und diese Fähigkeit ist von Blutlösung zu Blutlösung großen Schwankungen unterworfen.
