

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, R. Ege-Kopenhagen, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, E. Hammarsten-Stockholm, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Henri-Zürich, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heuhner-Düsseldorf, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, B. Kisch-Köln, G. Klein-Wien, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Mannheim, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, A. McKenzie-Dundee, J. Meisenheimer-Göttingen, Kurt H. Meyer-Ludwigshafen, O. Meyerhof-Heidelberg, L. Michaelis-Baltimore, H. Mollisch-Wien, H. Murschhäuser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. N., W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, W. H. Peterson-Madison, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sharsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, J. Stokloss-Prag, W. Straub-München, H. Steenhock-Madison, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Berlin, F. Verzar-Debreczen, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von
C. Neuberg-Berlin

Hugo Theorell:
Studien über die Plasmalipoide des Blutes



Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH

1930

STUDIEN ÜBER DIE PLASMALIPOIDE DES BLUTES

AKADEMISCHE ABHANDLUNG

WELCHE ZUR ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
MIT BESONDERER GENEHMIGUNG SEINER KÖNIGLICHEN MAJESTÄT

AN DEM KAROLINISCHEN INSTITUTE ZU STOCKHOLM

IM PATHOLOGISCH-ANATOMISCHEN HÖRSAAL

AM 15. MAI 1930 UM 11 UHR VORMITTAGS

ÖFFENTLICH VERTEIDIGT WIRD

VON

HUGO THEORELL

MED. KAND.



SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH 1930

ISBN 978-3-662-28213-7
DOI 10.1007/978-3-662-29727-8

ISBN 978-3-662-29727-8 (eBook)

Studien über die Plasmalipoide des Blutes.

Von

Hugo Theorell.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts zu Stockholm.)

(Eingegangen am 14. April 1930.)

Mit 16 Abbildungen im Text.

Kapitel I.

Einleitung.

Das Blutplasma besteht aus einem komplizierten, kolloidalen System, in welchem als Komponenten sowohl Kristalloide als auch Kolloide enthalten sind. Letztere können in zwei Hauptgruppen geteilt werden, Eiweißstoffe und Lipoiden in weiterem Sinne, von welchen die Eiweißstoffe spontane hydrophile Kolloide sind, während die Lipoiden, die eine aus chemischen Gesichtspunkten besonders heterogene Gruppe bilden, in Übereinstimmung damit variierende kolloidchemische Verhältnisse aufweisen. Das Cholesterin und seine Ester, Neutralfette und Fettsäuren, zeigen also in reinem Zustande kaum eine Spur von Hydrophilie, während die Phosphatide eine Zwischenstellung zwischen Emulsoiden und Suspensoiden einnehmen, da sie in Wasser aufschwellen, ohne bei gewöhnlicher Temperatur in echte Lösung zu gehen.

In welcher Form die mehr oder weniger suspensoiden Lipoiden in dem beinahe optisch leeren Plasma enthalten sind, ist noch lange nicht aufgeklärt; hier bewegt man sich mit Termini wie „Adsorption“, „Schutzkolloidwirkung“, „lockere chemische Bindung“ usw. Will man den Effekt der experimentell hervorgerufenen Variationen in der Konzentration der Lipoiden im Plasma beurteilen, muß man, um einigermaßen sicher zu sein, daß mit den nativen vergleichbare Verhältnisse vorliegen, die Forderung aufstellen, daß sich die Lipoiden in *klarer Lösung* befinden müssen, da ja dies der für die nativen Plasmalipoide kennzeichnende Zug ist.

Bei dem Studium der Literatur in dieser Frage fand der Verfasser diesen Gesichtspunkt eigentlich nirgends beobachtet, ebenso wie auch kaum die Tatsache berücksichtigt ist, daß die Suspensionskolloide gegen kleine Variationen in der Darstellungsweise der Sole äußerst empfindlich sind. Die in bezug auf das suspensoide Cholesterin einander widersprechenden Angaben der Literatur über den Effekt eines experimentellen Lipoidzusatzes zum Plasma schienen hiernach leichter begreiflich.

Verfasser machte es sich daher zur Aufgabe, zu versuchen, die Konzentration der verschiedenen Lipide des Plasmas unter möglichst nativen Verhältnissen zu variieren.

Bezüglich der Phosphatide war dies recht einfach zu erreichen durch Zusatz eines Lecithinhydrosols oder eines Sols von aus Serum extrahierten Lipoiden mit nachfolgendem Zentrifugieren, das ein klares Plasma gab, in welchem der Lipoidphosphorgehalt gesteigert war, während der Cholesteringehalt wider Erwarten gesunken war. Auf diese Weise war es also streng genommen unmöglich, nur die Phosphatidkonzentration zu variieren, weil sich damit auch die Cholesterinkonzentration änderte.

Das Cholesterin bereitete anfangs unerwartete Schwierigkeiten, da es trotz der Angaben in der Literatur hierüber in absolut reinem Zustande in kolloidaler Wasserlösung von einigermaßen hoher Konzentration nicht zu gewinnen war. Nach Zusatz einer sehr geringen Menge Seife wurden jedoch gut reproduzierbare und haltbare, ziemlich konzentrierte Sole erhalten. Aus einer Mischung von Plasma und einem solchen Cholesterinsol schied, in Kälte rascher als bei Zimmertemperatur, ein Teil Cholesterin aus und konnte wegcentrifugiert werden. Mit einer genügend kräftigen Zentrifuge konnte übrigens, schon bevor der Überschuß an Cholesterin ausgefällt war, ein Teil Cholesterin abcentrifugiert werden; in beiden Fällen konnte man wieder völlig klare Lösungen bekommen. In diesen erwies sich der Cholesteringehalt mehr oder weniger gesteigert, während der Phosphatidgehalt in den meisten Fällen unverändert blieb. Bei angestellten Analysen an verschiedenen Eiweißkörpern zeigte es sich, daß diese in ihrer Quantität von der Lipoidbehandlung völlig unbeeinflusst blieben.

Die empfindlichste Art und Weise, Veränderungen in dem kolloidalen Zustand des Plasmas nachzuweisen, besteht zweifelsohne darin, deren Effekt an der Senkungsgeschwindigkeit aufgeschlemmter Blutkörperchen zu bestimmen, die wohl wenigstens in der Hauptsache aus der Größe ihrer elektrischen Ladung mit der sie begleitenden, mehr oder weniger starken Aggregation bestimmt wird. Wie schon ältere Autoren hervorgehoben haben, ist es möglich, durch Variationen in

der Senkungsgeschwindigkeit so unbedeutende Veränderungen im Blutplasma nachzuweisen, wie sie auf keine andere Weise festgestellt werden können.

Wenn Blutkörperchen in Plasma aufgeschlemmt wurden, in welchem Cholesterin experimentell gelöst worden war, zeigte es sich, daß die Senkungsgeschwindigkeit hier im Vergleich mit dem nicht behandelten Plasma stark reduziert war. Für die Senkungsgeschwindigkeit war es jedoch, wie es sich herausstellte, gleichgültig, ob der Überschuß an Cholesterin weggeschafft wurde oder nicht; es war also unwirksam, eine Beobachtung, die die negativen Resultate mancher Autoren bei ähnlichen Experimenten dürfte erklären können.

In bezug auf das Lecithin wurde prinzipiell dieselbe Erfahrung gemacht, wenn auch hier die Verhältnisse komplizierter waren: ein direkter Zusatz von Lecithin hatte eine stark senkungshemmende Wirkung. Wurde der Überschuß an Lecithin dagegen wegzentrifugiert, wurde bald ein schwach senkungshemmender, bald ein schwach beschleunigender Effekt erzielt, der dahin gedeutet wurde, daß der Wirkung der zurückgebliebenen Steigerung im Lecithingehalt seitens des in diesen Fällen verminderten Cholesteringehalts entgegengearbeitet wurde.

Die Bestimmung der Oberflächenspannung ergab, daß das Cholesterin dieselbe stark herabsetzte, das Lecithin aber weniger stark. Blutkörperchen wurden nach Aufenthalt in mit Cholesterin versetztem Plasma erst in vielfach höherer Konzentration von Lanthannitrat entladen als nach Aufenthalt in unbehandeltem Plasma; dieser Effekt konnte unvermutet in bezug auf das Lecithin nicht konstatiert werden. Durch quantitative Analysen an mit Lipoiden versetztem Plasma, bevor und nachdem Blutkörperchen darin aufgeschlemmt und später wieder wegzentrifugiert worden waren, konnte eine teilweise Adsorption der neu hinzugekommenen Lipoiden an die Blutkörperchen konstatiert werden.

Somit war also der Mechanismus von theoretischen Gesichtspunkten aus leicht zu erklären. Kolloidal gelöstes Cholesterin hat wie ein neutraler Körper mit niedrigerer Dielektrizitätskonstante als Wasser im allgemeinen eine negative Ladung. Lecithin hat bei gewöhnlichem p_H des Plasmas als amphoterer Elektrolyt mit seinem isoelektrischen Punkte weit auf der sauren Seite eine negative Ladung. Da nun für beide eine die Oberflächenspannung senkende Wirkung nachgewiesen werden konnte, hatte man nach der Theorie von *Gibbs-Thomson* Anlaß, in den Phasengrenzflächen eine positive Adsorption zu erwarten, unter anderem in der Grenzschicht zwischen Plasma und Blutkörperchen, d. h. gerade die Adsorption an Blutkörperchen, die experimentell nachgewiesen wurde. Die Bestimmungen der Entladung der Blutkörperchen

mit Lanthannitrat zeigten schließlich eine Zunahme der negativen Ladung infolge des zugesetzten Cholesterins.

Auf Grund der erwähnten Resultate sollte man eine mehr oder weniger strenge Proportionalität zwischen Lipoidgehalt und Suspensionsstabilität erwarten. Eine solche ist jedoch, wie mehrere Untersuchungen bewiesen haben, nicht vorhanden. Meine nächste Aufgabe war daher, zu versuchen, diese eigentümliche Inkongruenz zu erforschen. Zu diesem Zwecke wurden zuerst die Verhältnisse bei den durch Aussalzung oder Elektrodialyse entstandenen Niederschlägen von Eiweiß und Lipoiden studiert. Dabei wurde bestätigt gefunden, daß mit der Globulinfraktion verhältnismäßig mehr Cholesterin ausgefällt wurde als mit der Albuminfraktion. Die zugesetzten, klar gelösten Lipoiden wurden sowohl mit Fibrinogen wie mit Globulin ausgeschieden. Aussalzungsversuche bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration zeigten, daß wenigstens ein Teil des Cholesterins und Lecithins im Plasma in freier, von Eiweiß ungebundener Form vorhanden ist, da bei 50 % Sättigung mit Ammoniumsulfat bei $p_H = 4,8$ ein eiweißfreies, lipoidhaltiges Filtrat erhalten wurde.

Da es infolge der starken Salzlösungen, welche bei oben beschriebenen Versuchen verwendet werden müssen, und die nicht nur auf Eiweiß, sondern auch auf Lipoiden in kolloidaler Lösung stark fällend einwirken, unmöglich wird zu entscheiden, ob Lipoiden und Eiweiß gleichzeitig gefällt werden, weil sie chemisch aneinander gebunden sind, oder, wenn sie voneinander unabhängig sind, weil sie mit derselben Salzkonzentration ausgeschieden werden, schien es aussichtsreicher, zu einer anderen Methode überzugehen.

In der Literatur (s. Kapitel II) findet man mehrere experimentell mehr oder weniger wohlbegründete Angaben, daß sowohl Cholesterin als auch Phosphatide an die Globuline, besonders an das Euglobulin, gebunden seien. Gäbe es eine solche Verbindung, wäre es ja nicht unwahrscheinlich, daß sie bei dem isoelektrischen Punkte der Globuline dissoziiert würde, wo ja ihr Minimum an elektrischer Ladung und Hydratation zu finden ist. *Handovsky* hat schon früher nachgewiesen, daß beim normalen c_H des Serums nur ein Teil des Gesamtcholesterins mit Äther ausschüttelbar ist; dieser Teil sollte dann außerdem im großen und ganzen umgekehrt proportional zum Euglobulingehalt, oder proportional dem Albumingehalt — was realiter dasselbe ist — im Serum sein. Nun wurden Ausschüttelversuche des Plasmas mit Äther bei verschiedenem c_H gemacht. Dabei wurde obige Annahme bekräftigt gefunden: am isoelektrischen Punkt der Globuline war das Cholesterin quantitativ mit Äther ausschüttelbar, zu beiden Seiten desselben jedoch nur teilweise. Nachdem verschiedene Eiweißfraktionen dargestellt

worden waren, gaben die an diesen vorgenommenen Ausschüttelungsproben mit Äther in allem das erwartete Resultat, d. h. Fibrinogen hielt Cholesterin kräftig gebunden in einer Bindung, aus welcher Cholesterin in mit Äther ausschüttelbarer Form bei $p_H =$ etwa 6 dissoziiert wurde, während Euglobulin ähnliche Verhältnisse mit einem Optimum der Cholesterinextraktion zwischen $p_H = 6$ und 5,5 aufwies. Für Pseudoglobulin und Albumin waren die Verhältnisse ganz andere: hier war das Cholesterin bei der Wasserstoffionenkonzentration des nativen Plasmas ebenso leicht ausschüttelbar, wie bei $p_H = 5,5$ bis 6. Die Verbindung Cholesterin—Fibrinogen bzw. Euglobulin erwies sich auf der alkalischen Seite von $p_H = 6$ als reversibel, so daß experimentell zugesetztes Cholesterin hier in einer mit Äther schwer ausschüttelbaren Form gebunden wurde.

Jetzt wurden eine Serie Extraktionsversuche an Menschenplasmen, von verschiedenen rasch sedimentierenden Blutproben herkommend, ausgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß die normalen, suspensionsstabilen, fibrinogen- und globulinarmen Blutproben Cholesterin in einer mit Äther leichter extrahierbaren Form enthielten als die pathologischen, stark sedimentierenden, fibrinogen- und globulinreichen.

Später wurde durch Ausschüttelversuche mit Äther nachgewiesen, daß das zugesetzte Cholesterin wenigstens teilweise in freier Form vorhanden ist, und daß Lecithin aus dem Plasma ausschließlich freies Cholesterin adsorbiert. Dies, zusammen mit den Resultaten aus den Senkungsversuchen, führt zu der schon an und für sich wahrscheinlichen Auffassung, daß nur von Eiweiß ungebundenes, freies Cholesterin und Lecithin die Senkungsgeschwindigkeit in negativer Richtung beeinflußt. Damit ist auch eine Möglichkeit gegeben, zu verstehen, daß der Gesamtlipoidgehalt in rasch oder weniger rasch sedimentierenden Blutproben derselbe sein kann: je rascher die Sedimentation, desto mehr Globulin; aber je mehr Globulin, desto mehr gebundene, unwirksame Lipide, und desto weniger freie, wirksame, senkungshemmende Lipide.

Man dürfte im großen und ganzen annehmen können, daß die Eiweißstoffe sicher für die Senkungsgeschwindigkeit eine sehr wichtige, aber nicht die ausschlaggebende Rolle spielen. Die Ladung der Blutkörperchen, die wahrscheinlich für deren Suspensionsstabilität die entscheidende Rolle spielt, wird hinsichtlich ihrer Größe durch ein Zusammenwirken aller elektrisch geladenen Partikelchen des Plasmas bestimmt: positiv geladene sind direkt entladend, schwach negativ geladene wirken relativ entladend, sowie stark negativ geladene wirken ladend auf die Blutkörperchen. Unter diesen letzteren spielen sicher die Lipide eine bedeutende Rolle.

Kapitel II.

Literaturübersicht.

Die außerordentlich ausgiebige Literatur über die von dieser Arbeit berührten Gebiete wird zwecks Raumersparnis nur in beschränktem Maße berücksichtigt.

Physikalische Chemie kolloidaler Lipoidlösungen.

Koch (44) beschäftigte sich als erster mit kolloidalen Lecithinlösungen, in welchen er die negative Ladung der Partikel durch Salzausfällungsversuche bewies. *Iscovesco* (37) zeigte, daß reines Cholesterin in wässriger Suspension die Oberflächenspannung bedeutend herabsetzte, ein Effekt, der nach *Berczeller* (2) nur in geringem Grade vorhanden ist; *Berczeller* teilt ferner mit, daß in einem seiner Merck-Cholesterinpräparate ein wasserlöslicher, oberflächenspannungsherabsetzender Stoff zu finden war (vgl. S. 16). *Porges* und *Neubauer* (73) haben die Salzstabilität der Lecithin- und Cholesterinsuspensionen (die Herstellung derselben vgl. S. 16) ausführlich bearbeitet; sie wiesen auch die sensibilisierende Wirkung des Eiweißes nach. Aus *Neuschlosz'* (67) Untersuchungen über ionenantagonistische Effekte auf die Oberflächenspannung von Lecithinsuspensionen scheint hervorzugehen, daß Lecithin in einer Salzmischung von der Zusammensetzung des Blutplasmas die Oberflächenspannung bedeutend erniedrigen dürfte. *Fujii* (21) zeigte, daß Lecithin nur unter gewissen dehydratisierenden Einflüssen aus wässriger Lösung mit Äther ausschüttelbar ist; der isoelektrische Punkt des Lecithins wird als $p_H = 2,7$ angegeben. *Rona* und *Deutsch* (77) und *Stern* (83), (84) studierten den koagulierenden Einfluß der H-Ionen auf Cholesterinsolen (Herstellung vgl. S. 16). Lecithin und Cholesterin wirkten aufeinander gegenseitig schützend (*Rona* und *Deutsch*), Tauro- und Glykochohlsäure, sowie Cholesterinester wirkten auf Cholesterin schützend, verschiedene Eiweißstoffe hingegen sensibilisierten. *Remesow* (75) teilt neuerdings die Resultate umfangreicher, physikalisch-chemischer Untersuchungen über Cholesterin-, Cholesterinester- und Lecithinsole mit. Alle diese Sole erwiesen sich bei Salzausfällungs- und Kataphoreseversuchen als in den weit überwiegenden Fällen negativ geladen. Nicht nur Eiweiß, sondern auch Glucose sensibilisierte die Cholesterinsole. Lecithin zeigte ein Ausflockungsoptimum bei p_H 2,0 bis 2,8 (vgl. *Fujii*, l. c.). Die Dielektrizitätskonstante der Cholesterin- und Lecithinsole sank mit steigender Konzentration; ein geringer Zusatz von Glucose wirkte auf die Dielektrizitätskonstante der Cholesterinsole herabsetzend.

In der älteren Literatur findet man nur äußerst spärliche Angaben über den kolloidalen Zustand der Blutlipide und deren Verhalten Eiweißstoffen gegenüber. *Hardy* (31), *Haslam* (32) und *Chick* (13) weisen auf den immer vorhandenen Gehalt an Phosphor in Globulin hin; *Chick* behauptet, daß der Unterschied zwischen Euglobulin und Pseudoglobulin von dem Phosphatidgehalt des ersteren bedingt sei. *Mayer* und *Terroine* (62) erzeugten bei saurer Reaktion aus einer Mischung der Komponenten den Niederschlag eines positiv geladenen Albumin-Lecithinkomplexes; diese Vereinigung kommt näher am Neutralpunkt nach *Handovsky* und *Wagner* (29) nicht zustande. Diese Verfasser brachten auch in Wasser suspendierte Serumlipide mit Serum zusammen, doch ohne zu bestimmen, ob dabei etwas von den Lipiden in Lösung ging. *Handovsky*, *Lohmann* und *Bosse* (30)

fanden in der ausgesalzten Globulinfraktion 25% des Totalcholesterins wieder, dagegen keine Phosphatide, was im Vergleich mit den übrigen zitierten Autoren und auch dem Verfasser (90) eigentümlich erscheint. Die Ätherausschüttelungsversuche mit Serum von *Handovsky* und seinen Mitarbeitern sind für die vorliegende Arbeit von dem größten Interesse. Sie fanden zwischen dem mit Äther ausschüttelbaren Anteil des Cholesterins und dem Euglobulingehalt des Serums eine, wenn auch lange nicht strenge, umgekehrte Proportionalität, aus welchem Verhalten sie auf das Vorhandensein zweier verschiedener Cholesterinformen in Serum schließen: eines „freien“, biologisch aktiven und eines „gebundenen“, biologisch unwirksamen. Unter Einhaltung möglichst konstanter Bedingungen bestimmten sie den Einfluß verschiedener Faktoren, wie Salzzusatz, Eintrocknen, Altern des Serums, auf die in einer gewissen Zeit ausschüttelbare Cholesterinmenge. Der Einfluß verschiedener H-Konzentrationen und verschiedener Ausschüttelzeiten wurde doch nicht studiert. Die von hier gefundenen Tatsachen stützen unzweifelhaft die Theorie von zwei Serumcholesterinformen. *Marie* (60) konnte aus gewissen Seren den größten Anteil des Cholesterins durch Chamberlandfilter wegschaffen. — *Frankenthal* (19) und *Troensegaard* und *Koudahl* (92) kamen bei Lipoidanalysen der aus Serum ausgesalzten Eiweißfraktionen zu verschiedenen Ergebnissen: *Frankenthal* fand bisweilen sämtliche Serumlipide in der Globulinfraktion, während *Troensegaard* und *Koudahl* in derselben Fraktion etwas Cholesterin erst nach Acetylieren nachweisen konnten. Infolge der Verschiedenheit der angewandten Sera sind doch wahrscheinlich die Resultate miteinander nicht ganz vergleichbar. *Neuschlosz* (68) (69) nimmt auf Grund einiger Modellversuche an (Ätherausschütteln sowie Tierkohleadsorption von Albumin-, Cholesterin- und Lecithingemischen), daß physikalische Verbindungen von Cholesterin mit den beiden übrigen aufkommen könnten. Da *Neuschlosz* indessen nur 5 Minuten mit Äther schüttelte, stehen seine Resultate zu den meinigen (Versuch 24) in keinem Gegensatz. Aus einer Reihe von Cholesterinanalysen an ausgesalzten Eiweißfraktionen zieht er den Schlußsatz, daß Cholesterin in Globulin kolloidal gelöst sei. Neuerdings ist es *Macheboeuf* (58) gelungen, durch mehrfaches Auflösen und Umfällen der Serumalbuminfraktion bei verschiedenen p_H einen stark lipoidhaltigen, in Wasser klar löslichen Albumin-Lecithin-Cholesterinesterkomplex herzustellen, den *Macheboeuf* als eine chemische Verbindung zwischen den Komponenten auffaßt. Über die Verhältnisse zwischen Seifen und Serum berichten z. B. *Matsumura* (61) und *Jarisch* (39). Die Bedeutung der Lipide für die Hämolyse darf nunmehr als ziemlich klar angesehen werden [siehe u. a. *Hattori* (33), *Brinkmann* und *Wastl* (9) und die kurze Übersicht bei *Leathes* und *Raper* (49, S. 214 ff.)]. Von Versuchen, Lipide in Serum klar zu lösen, ist mir ein einziger bekannt: es gelang *Lapponi* (47), das Auflösen aus Mehl extrahierter Lipide im Serum sowohl mikro- als makroskopisch festzustellen.

Einige Berührungspunkte der Senkungsfrage mit dieser Arbeit.

Katz und *Leffkowitz* (42) schreiben in ihrer Monographie auf S. 295: „Nicht nur in den rein klinischen Arbeiten, sondern auch in den theoretischen finden wir so viel dilettantische Angaben, wie kaum auf einem anderen Gebiet der Medizin.“ Sie weisen da mit Recht auf das auffallende Mißverhältnis zwischen Qualität und Quantität der in Rede stehenden Literatur hin.

In den Tagen der Humoralpathologie standen die hierhergehörigen Phänomene im Brennpunkt des Interesses, was ein Studium der glänzenden Arbeit von *Nasse* (66) schlagend beweist; sie enthält in der Tat den größten Teil von dem, was wir in der betreffenden Frage noch heute wissen. Nach einer Periode verminderten Interesses begannen einzelne Autoren im Anfang des 20. Jahrhunderts sich wieder mit der Blutkörperchensenkung zu beschäftigen: *Höber* (35) und *Mangin* und *Henri* (59), welche die negative Ladung der Blutkörperchen gleichzeitig entdeckten, später *Weil* und *Claude* (96), *Sellards* (82), *Wiltshire* (99), *Berczeller* und *Stanker* (3). Nach der großen Arbeit von *Fähræus* (23), die das Interesse für das Blutkörperchensenkungsphänomen kräftig belebte, folgte eine rasch anschwellende Literatur, deren allseitige Beleuchtung außerhalb des Rahmens dieser Arbeit fällt. Es möge genügen, noch auf die Arbeiten von *Wiechmann* (98), *Linzenmeier* und *Hirsch* (56) und *Westergren* (97) zu verweisen. Entgegen anderen Erklärungsgründen, z. B. die „Stalagmon“-theorie von *Schemensky* (80), *Bechhold* und *Reiner* (1), *v. Oettingen* (71), für die Änderungen der Senkungsgeschwindigkeit scheinen nunmehr allgemein Variationen der Ladung der Blutkörperchen dafür verantwortlich gemacht werden. Eine Abnahme dieser Ladung bei gesteigerter Senkungsgeschwindigkeit wurde zuerst von *Fähræus* (l. c.), dann von *Linzenmeier* (54) (55), *Kanai* (41) u. a. gefunden. Nach *Höber* und *Mond* (37) ist die Ladung der Blutkörperchen von der Zusammensetzung ihrer adsorbierten Eiweißschicht abhängig [vgl. auch *Herzfeld* und *Klinger* (34), *Rossier* (78)]. Im schnell sedimentierenden Plasma liegt nun teils eine Vermehrung der Globuline (*Fähræus*, l. c.), teils eine des Fibrinogens vor [*Frisch* und *Starlinger* (20) u. a., vgl. auch *Nasse*, l. c.]. Nun ist es wenigstens von Globulin bekannt, daß seine isoelektrische Reaktion näher am Neutralpunkt als der des Albumins liegt, und es müßte somit im Blute schwächer als Albumin geladen sein. *Höber* (36) nimmt zwar an, daß Fibrinogen noch schwächer als Globulin geladen wäre, aber dies ist wenigstens aus den verschiedenen Angaben über die isoelektrische Reaktion des Fibrinogens schwer ersichtlich: *Resch* (76) fand zwischen $p_H = 5$ und 8 keine kataphoretische Wanderung. *Funck* (22): zwischen $p_H 4$ und 9 Ausflockung, *Stuber* und *Funck* (86): Maximum der Ausflockung bei $p_H 5,0$, *Kugelmass* (45): der isoelektrische Punkt bei $p_H = 8,0$ (!), *Wöhlisch* (102): $4,85$, *Wöhlisch* und *Schloss* (103): $4,46$, *Quagliarello* (74): $4,9$, *de Waele* (94): $6,9$, *Nordbö* (70): $5,5$. — Trotz oder vielleicht eben aus der fast exempellosen Gegenstreitigkeit dieser Angaben scheint hervorzugehen, daß das Fibrinogen im Plasma wenigstens sehr schwach geladen ist (vgl. auch Versuch 28), was also die *Höbersche* Ladungstheorie gewissermaßen bekräftigt.

Über die isoelektrischen Reaktionen des Albumins (4,7 bis 4,8) und des Globulins (5,4 bis 5,5) herrscht ziemliche Einigkeit.

Die Einwirkung experimenteller Lipoidzusätze auf die Senkungsgeschwindigkeit.

Auf diesem Gebiete herrscht ein heilloses Durcheinander. Man ist daher einigermaßen verwundert, bei *Katz* und *Leffkowitz* (l. c.) als Abschluß ihrer Anführung eine ganze Reihe einander auffällig widersprechender Resultate zu lesen: „Die Theorien von *Höber* sowie von *Brinkmann* und *Wastl* und *Linzenmeier* scheinen für das Phänomen eine hinreichende Erklärung zu liefern“. Indessen scheint mir die [nach *Lewis* (50)] zitierte Formel mit aller wünschenswerten Klarheit darzutun, daß nicht nur Lecithin, sondern auch Cholesterin die Suspensionsstabilität erhöhen muß;

denn beide sind negativ geladen und erniedrigen die Oberflächenspannung und die Dielektrizitätskonstante. Wenig beweiskräftig für die entladende Fähigkeit der „Cholesterin-Phosphatidfraktion“ scheint mir weiter *Brinkmann* und *Wastls* Versuch (S. 35): hier dürfte in der Tat eine Salzausfällung der Lipide in den engen Versuchsröhrchen eine primäre „Agglutination“ vorgetäuscht haben.

Etwas früher veröffentlichte *Kürten* (46) einige Versuche, in welchen bei Zusätzen in vitro durch Lecithin Hemmung, durch Cholesterin *Beschleunigung* der Senkung stattfand. Letzteres ist von keinem späteren Autor, mit Ausnahme von *Grossmann* (26), bestätigt worden. *Kürten* nimmt eine (nicht bewiesene) entladende Wirkung des Cholesterins an; eine solche scheint indessen unwahrscheinlich nach *Brinkmann* und *van Dam* (8), die die elektrisch isolierende Wirkung des Cholesterins auf die Blutkörperchen entdeckten. Die Ergebnisse von *Grossmanns* (l. c.) Cholesterinausfütterungsversuchen, daß Cholesterin senkungsbeschleunigend wirke, sind wenig beweiskräftig wegen des kleinen Materials (neun Fälle) und der unzuverlässigen Bestimmungen (*Rohrers* Eiweißmethodik). Ein nicht näher beschriebener in-vitro-Zusatz von Cholesterin wirkte senkungsbeschleunigend. Beschleunigte Senkung nach Cholesterinfütterung wurde ferner von *Lasch* (48) nachgewiesen; nach Saponininjektionen erhielt er indessen eine Vermehrung des Blutcholesterins und eine *Verminderung* der Senkungsgeschwindigkeit. Bei Infektionskrankheiten sah er erhöhte Senkungsgeschwindigkeit und meistens erniedrigten Cholesteringehalt. *Ley* (51) und *György* (28) fanden beide durch sowohl Lecithin- als auch Cholesterinzusatz eine etwas verminderte Senkungsgeschwindigkeit. Die Versuche dürften kaum einer Kritik standhaft sein: so z. B. zieht *György* nicht in Bedenken, den zur Herstellung der kolloidalen Cholesterinlösung verwandten Alkohol oder Aceton nicht wegzuschaffen; tat er so, blieb der senkungshemmende Einfluß aus (vermutlich weil das Cholesterin dann durch Salzwirkung ausfiel). Völlig negative Resultate bei in-vitro-Zusätzen von Lipoiden erhielt *Clemente* (14). *Gabbes* (24) Versuche können auch nicht als einwandfrei gelten: er schüttelte Serum mit Äther, worauf eine verminderte Senkungsgeschwindigkeit resultierte, die doch durch Zusatz der extrahierten Lipide wieder beschleunigt werden konnte. Indessen wirkt die Ätherbehandlung denaturierend; ferner wird nicht angegeben, wie der Zusatz des wasserunlöslichen Cholesterins geschah. *Löhrs* und *Windaus* [zitiert nach *Linzenmeier* und *Hirsch* (l. c.) und *Salomon, de Potter* und *Valtis* (79)] finden keinen Zusammenhang zwischen Cholesteringehalt und Senkungsgeschwindigkeit (vgl. Versuch 26).

Kapitel III.

Methodik.

Quantitative Lipoidanalysen.

A. Die Extraktion der Lipide wurde zu Beginn in einer Reihe von Fällen mit der Methode von *Bloor* (5) ausgeführt, besonders in solchen Fällen, wo es sich nur um Cholesterin handelte. Dies soll nach *Bloor* (l. c.), *H. J. Müller* (64) u. a. auf diese Weise quantitativ extrahiert werden. Um aber betreffs einer quantitativen Extraktion absolut sicher zu sein, zog ich im allgemeinen die sicherere Extraktion in Soxhletapparaten vor. Es wurde also folgendermaßen vorgegangen: Die Flüssigkeit, im allgemeinen Plasma oder Serum, das extrahiert werden sollte, wurde direkt in einen

großen Überschuß absoluten Alkohols hineinpipettiert, wobei das Eiweiß in feinverteiltem Zustand ausschied. Dann wurde durch eine Extraktionshülse direkt in den Soxhletapparat hineinfltriert, der danach mittels elektrischer Erwärmung auf Sandbad in Funktion gesetzt wurde. Eine Mehrzahl Proben ergab, daß eine Extraktionszeit von 2 Stunden sicher ungenügend war, weil mehrere Prozent Lipotide dann noch unextrahiert zurückgeblieben sein konnten, während eine Zeit von 4 Stunden in jedem Falle eine vollständige Extraktion sowohl des Cholesterins als auch der Phosphatide herbeiführte.

Der Alkoholextrakt wurde nach beendigter Extraktion quantitativ in einen Fraktionskolben übergeführt und im Vakuum eingedunstet. Dabei ist darauf zu achten, daß der Extrakt nach Verdunsten bis zur Trockne nicht allzu lange auf dem kochenden Wasserbade bleibt, denn die Temperatur steigt nahezu bis 100° C, und dies hat oft eine leichte bräunliche Verfärbung zur Folge, die bei den Cholesterinanalysen verdrießlich ist.

Der absolut trockene Rückstand wird durch Aufnahme in Chloroform von anhängenden Salzen und ähnlichem gereinigt. Dann wird das Chloroform zum Sieden erwärmt und sofort durch ein Faltenfiltrum in einen 50-ccm-Meßkolben fltriert (soweit hierfür keine andere Größe angegeben ist). Vakuumkolben und Filter werden nach drei- bis viermaligem Gebrauch mit Chloroform ausgespült. Der so hergestellte Chloroformextrakt eignet sich ausgezeichnet zum Abpipettieren aliquoter Teile und ist lange haltbar. In gut verschlossenen Kolben läßt sich ein solcher Extrakt mehrere Monate unverändert aufbewahren.

B. Die Cholesterinanalysen wurden zuerst spektrophotometrisch nach *H. Theorell* (90) mit den von *Lijschütz* (52) angegebenen Proportionen zwischen Chloroform, Essigsäureanhydrid und Essigsäure-Schwefelsäuremischung ausgeführt, um eine *Liebermann-Burchard*-Reaktion zu erzielen.

Später ging Verfasser dazu über, dieselben Reaktionsmischungen im „Stufenphotometer“ von *Pulfrich* abzulesen. Dieses Instrument gab eine großartige Übereinstimmung der Doppelwerte, selbst in weit verschiedenen Konzentrationen. Mit nur einer 10-mm-Küvette konnten Konzentrationen von 1 bis 0,05 mg Cholesterin in 3,25 ccm Reaktionsmischung genau und ohne Schwierigkeit bestimmt werden. Die Benutzung anderer Küvetten von verschiedener Dicke erweiterte selbstverständlich das Verwendungsgebiet.

In einem Falle (Versuch 19) wurde die Digitoninbestimmungsmethode *Windaus'* [(100), (101)] angewendet. Wo es sich um einen Cholesterinester enthaltenden Extrakt handelt, wird die Bestimmung jedoch infolge der Notwendigkeit, diesen vor dem Ausfällen mit Digitonin zu verseifen, recht mühsam, zumal wenn die Anzahl der Analysen groß ist.

Gegen eine kolorimetrische Bestimmung mit *Liebermann-Burchard*-Reaktion wurde aber der Einwand erhoben [*H. J. Müller* (64), *E. Müller* (65), *Gardner* und *Williams* (25), *Fex* (17) u. a.], daß sie infolge einer bräunlichen Verfärbung die Werte unsicher macht. Sie vernichtet die Farbenähnlichkeit zwischen der Versuchslösung und der Cholesterin-Standardlösung, weshalb ein gewöhnliches kolorimetrisches Ablesen strenggenommen unmöglich wird. Im Spektrophotometer oder „Stufenphotometer“ erzielt man dagegen eine Farbenähnlichkeit, die ein Ablesen ermöglicht. Der gefundene Wert wird indessen eine Summe der Lichtabsorption der grünen Cholesterinfarbe und der Verfärbung bei der benutzten Wellenlänge. Es war daher notwendig, die Absorption des Cholesterins und der Verfärbung innerhalb

gewisser Teile des Spektrums, je für sich, zu untersuchen. Diese Untersuchung wurde vom Verfasser zusammen mit *G. Widström* ausgeführt. Die Resultate derselben dürften von allgemeinem Interesse sein, zumal die kolorimetrische Bestimmung des Cholesterins vielfach in Verruf gekommen ist [s. *Bürger* (11), *Weidmann* und *Sundermann* (95)], und sollen in aller nächster Zeit veröffentlicht werden. Da es in einem Falle (Versuch 15) sich als notwendig erwies, der Verfärbung wegen zu korrigieren, sei hier in Kürze das Prinzip für diese Korrektur mitgeteilt.

In drei Extrakten, welche durch sehr unvorsichtiges Verdunsten stark verfärbt waren, ungefähr wie mittelstarker-starker Tee, wurden zuerst die Extinktionskoeffizienten in allen Spektralfiltern des „Stufenphotometers“ für die unbehandelten, verfärbten Chloroformlösungen bestimmt. Dann wurde eine Teil zur Trockne eingedunstet und mehrmals mit absolutem Äther extrahiert; hierbei ging das ganze Cholesterin, aber nur wenig von der Verfärbung, in Lösung. Danach wurden alle Extinktionskoeffizienten für den Ätherextrakt und die Verfärbung, je für sich, bestimmt; alle in der gewöhnlichen *Lifschütz*schen Mischung für Cholesterinanalyse nach 13 Minuten bei 35° C. Schließlich wurden die Extinktionskoeffizienten für eine *Liebermann-Burchard*-Reaktion an reinem Cholesterin mit größter Sorgfalt bestimmt, und zwar in neun Proben mit Konzentrationen von 0,05 bis 1 mg Cholesterin in 3,25 ccm in einer 10-mm-Schicht. In den Spektralfiltern, S 50 und 47, war eine gewisse Verschiedenheit in den Farbentönen zwischen beiden Hälften des Gesichtsfeldes vorhanden, weshalb die Ablesung hier unsicherer wurde. Der besonders wichtige Extinktionskoeffizient für reines Cholesterin in S 61, wo übrigens die Farbgleichheit zwischen den beiden Hälften des Gesichtsfeldes, selbst in hohen Cholesterinkonzentrationen, völlig übereinstimmt, wurde wiederholt mit verschiedenen Cholesterin-Standardlösungen in zusammen 25 Proben zu $1,592 \pm 0,0051$ bestimmt; demnach ungefähr derselbe Wert, den Verfasser 1926 spektrophotometrisch gefunden hat. Der durchschnittliche Fehler einer einzelnen Bestimmung in diesen 25 Proben war $= \pm 1,60\%$.

Nachstehend folgen die Durchschnittswerte der Extinktionskoeffizienten für 1 mg Cholesterin in den acht Spektralfiltern des „Stufenphotometers“:

S 75	S 72	S 61	S 57	S 53	S 50	S 47	S 43
0,238	0,440	1,592	0,702	0,374	0,593	1,130	1,824

Diese Werte liegen den Kurven für „reines Cholesterin“ in Abb. 1 zugrunde, doch so, daß sie für jeden Extrakt mit einem Faktor multipliziert wurden, damit der Wert in S 61 mit dem gefundenen Wert für „entfärbten Extrakt“ übereinstimmt; dies, um die Abbildung übersichtlicher zu gestalten!

Die drei Extrakte weisen außerordentlich gleichartige Verhältnisse auf. Der Extinktionskoeffizient für die Verfärbung + der Extinktionskoeffizient für den entfärbten Extrakt sind durchweg gleich mit dem Extinktionskoeffizienten für den verfärbten Extrakt. Dies zeigt, daß sich die Verfärbung während der Ätherbehandlung nicht geändert hat.

Die Verfärbung läßt für alle drei Extrakte eine gleichmäßige Steigerung der Absorption nach der violetten Seite hin mit einem rascheren Anstieg bei S 43 erkennen (S 43 hat maximale Lichtpermeabilität bei einer Wellenlänge von $430 \mu\mu$, S 61 bei $610 \mu\mu$ usw.). Trotzdem man bei dem reinen Cholesterin die größte Absorption gerade in S 43 erhält, ist dieser Filter

für Cholesterinbestimmungen im Extrakt besonders ungeeignet, da sich hier gerade auch eine leichte Verfärbung sehr stark geltend macht und das Resultat verschiebt. Günstiger stellen sich die Verhältnisse nach der

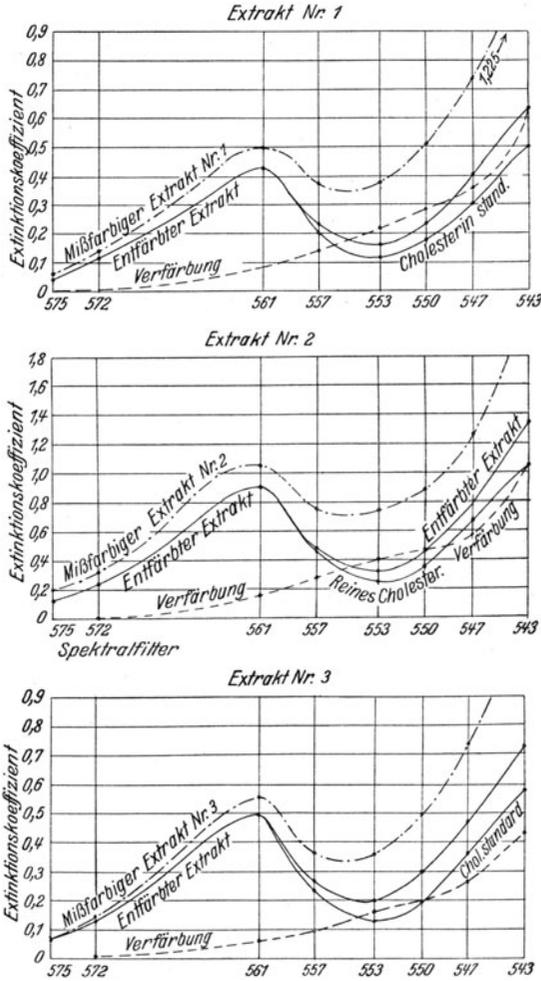


Abb. I.

- Extinktionskoeffizienten des verfärbten Extractes
- " " entfärbten
- · - · - " " der durch Ätherbehandlung entfernten Verfärbung
- " " des reinen Cholesterins.

roten Seite hin: in S 75 und S 72 gibt die Verfärbung kaum eine meßbare Absorption; trotzdem sind diese Filter ungeeignet, da auch das Cholesterin hier eine relativ unbedeutende Absorption hat. Am besten ist S 61, wo das Cholesterin eine sehr kräftige Absorption erleidet, während die der

Verfärbung noch ganz gering ist. So macht der Extinktionskoeffizient (E) in S 61 für die Verfärbung in dem sehr stark verfärbten Extrakt Nr. 1 nur 17% des verfärbten Extraktes ES 61 aus. Dies läßt sich aber im Apparat folgendermaßen direkt korrigieren, ohne daß eine Entfärbung mit Äther vorgenommen zu werden braucht:

Die Kurve für reines Cholesterin ist, wie oben erwähnt wurde, so eingelegt, daß ihr ES 61 = ES 61 des entfärbten Extraktes entspricht. Die Kurve für letzteres liegt nach der violetten Seite hin etwas über der Kurve des ersteren, was darauf hindeutet, daß die Entfärbung nicht völlig gelungen ist. Die Bezeichnungen wurden wie folgt verkürzt:

Verfärbter Extrakt = a
Entfärbter „ = b
Verfärbung = c
Reines Cholesterin = d

z. B.: Der Extinktionskoeffizient der Kurve d im Spektralfiltrum S 53 = ES 53 d; der Extinktionskoeffizient der Kurve c im Spektralfiltrum S 61 = ES 61 c usw.

Aus den Kurven findet man, daß:

$$\frac{\text{E S 53 d}}{\text{E S 61 d}} = 0,24$$

und

$$\frac{\text{E S 53 c}}{\text{E S 61 c}} = 2,5.$$

Setze x = ES 61 für das *reine* Cholesterin in Extrakt Nr. 1.

„ y = ES 61 für die *ganze* Verfärbung in Extrakt Nr. 1.

Da ES 61 a = 0,505

und ES 53 a = 0,370,

so erhält man folgende Gleichung:

$$\begin{aligned}x + y &= 0,505, \\0,24 x + 2,5 y &= 0,370,\end{aligned}$$

was ausgerechnet ergibt:

$$\begin{aligned}x &= 0,395, \\y &= 0,110.\end{aligned}$$

Gefunden ES 61 für die Kurven b und c, bzw. 0,425 und 0,080, d. h. die Entfärbung ist sonach nicht völlig gelungen; dies war auch der Fall.

Durch dieses Verfahren, die Reinheit der grünen Reaktionsfarbe durch einen Vergleich mit ES 53 und ES 61 zu kontrollieren, scheint es mir möglich, in einer einfachen Weise die mehr oder weniger mühevollen Prozeduren, wie sie in der Literatur vorgeschlagen sind: Verseifung, Entfärben mit absolutem Äther, mit Äther + Natriumsulfat usw., zu vermeiden.

Kontrollen an einer Mehrzahl farbloser Plasmaextrakte ergaben, daß für diese keine Korrektion ausgeführt zu werden brauchte. Selbst bei sichtlich verfärbten Extrakten, obgleich lange nicht so stark verfärbt wie die oben mitgeteilten, war die Korrektion konstant unter 5%. Nur in einem Falle (s. Versuch 15) war eine Korrektion notwendig.

Die vom Verfasser (90) vorgeschlagene Bestimmung von, eventuell Korrektur für, Oxycholesterin ist hier nicht ausgeführt worden, aber ihre Bedeutung wurde dadurch reduziert, daß eine Erhitzungszeit von 13 Minuten anstatt 15 in 35° Wasserbad angewandt wurde.

C. Phosphorbestimmungen.

1. In einer Reihe von Fällen wurden P-Analysen nach *Pregl* vorgenommen.

2. In einem Falle (Versuch 1) titrimetrische Bestimmung nach *Macheboeuf* (57) mit der Modifikation nach *T. Teorell* [s. *Jorpes* (40)].

3. In einem Falle (Versuch 18) nach einer noch unveröffentlichten Methode von *T. Teorell*: nach Verbrennung mit Schwefelsäure wurde das Phosphat als Ammoniumphosphormolybdat nach *Pregl* ausgefällt, filtriert, gewaschen, in Lauge gelöst, worauf das Ammoniak im Niederschlag nach *T. Teorell* bestimmt wurde.

4. In Versuch 17/18 nach *Kleinmann* (43) nephelometrisch durch Ausfällen mit Strychninmolybdat. Die Verbrennung konnte nicht direkt nach *Kleinmann* ohne Zusatz im Platinatiegel gemacht werden, denn da positive Ionen nach der Verbrennung der Lipide fehlen, wird die Phosphorsäure frei und verbindet sich mit dem Platina, so daß zu niedrige Werte erhalten werden. Deshalb wurde erst nach Zusatz von 1 ccm Lösung mit 6% Soda + 1% Salpeter verbrannt. Sodann wurde genau nach *Kleinmann* weitergearbeitet, mit der Modifikation von *Pincussen-Juliusburger* (72), nach welcher die Ausflockung nach einer gewissen Zeit, hier 45 Minuten, durch Zusatz von Gummiarabikum gehemmt wurde. Die Ablesung geschah im Stufenphotometer mit dazugehörigem „Trübungsmesser“ durch das rote Filtrum LI. Diese Methode war in der Hand des Verfassers niemals ganz zuverlässig und wurde daher übergeben zugunsten

5. der kolorimetrischen Bestimmung von *Fiske-Subarow* (18). Die Ablesung der blauen Farbe wurde im Stufenphotometer mit Spektralfiltrum S 72 ausgeführt. Die Absorption ist zwar stärker in S 75, hier ist indes infolge der Lichtschwäche das Ablesen erschwert.

„*Lecithin*“ ist durchgehends berechnet durch Multiplikation des Phosphorgehalts mit 25. Das synthetische Lecithin enthält zwar nur 3,93% Phosphor, aber das native Lecithin enthält auch immer ungesättigte Fettsäuren und infolgedessen einen etwas höheren Prozentgehalt Phosphor. Ferner ist im Blute Cephalin mit einem Phosphorgehalt von 4,18% vorhanden. Da die Proportionen zwischen diesen Phosphatiden untereinander unbekannt sind, wurde der Einfachheit halber mit 4% gerechnet.

Stickstoffanalysen wurden entweder nach *Kjeldahl* oder in den meisten Fällen nach *T. Teorell* (89) mit Natriumhypobromit gemacht. Zur Verbrennung des Serums oder Plasmas war bedeutend längere Zeit notwendig, als in der Beschreibung der Methode angegeben wird. Es zeigte sich, daß 24 bis 48 Stunden zur Überführung des gebundenen Stickstoffs in Ammoniak nötig waren. Gravimetrische Eiweißanalysen wurden mitunter benutzt (z. B. in Versuch 6).

Die Bestimmung der Eiweißfraktionen im Plasma bzw. im Serum wurde entweder durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat oder nach einer noch unveröffentlichten Mikromethode von *H. Theorell* und *Widström* gemacht. Diese wird folgendermaßen ausgeführt: der Gesamtstickstoff wird nach *T. Teorell* bestimmt; 0,1 ccm Plasma in jeder Probe. 1 ccm Oxalat-

plasma wird mit 3 cem physiologischer Kochsalzlösung versetzt, die Calciumchlorid in einer Normalität von $n/50$ enthält. Koagulation tritt nach einer Weile ein. Nach ein paar Stunden werden die Koagulate mit einem Glasrohr, das an seinem einen Ende geschlossen und zu einer in das Probierrohrlumen passenden Kugel aufgeblasen ist, ausgepreßt. Die Koagulate werden dann dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in eine Verbrennungsröhre übergeführt; danach Stickstoffanalyse nach *T. Teorell*. — Die aus den Koagulaten ausgepreßte Flüssigkeit, welche Globuline und Albumine enthält, wird mit reinem, kristallisiertem Magnesiumsulfat in Überschuß versetzt und mit dem Salz gesättigt, indem sie wenigstens zwei Stunden in einem Saturator unter sanft wiegenden Bewegungen zubringen darf. Hierbei scheiden die Globuline in einer hochdispersen Form aus, so daß die Flüssigkeit homogen und milchig aussieht. Darauf werden Stickstoffanalysen teils an der milchigen Flüssigkeit, teils nach Zentrifugieren in der Winkelzentrifuge an der klaren Mutterlauge gemacht. Dieses Zentrifugieren nimmt im allgemeinen mehrere Stunden in Anspruch. Die Globuline steigen an die Oberfläche und liegen dort wie eine Membran, die auf die Seite geschoben werden kann, wonach man die klare Flüssigkeit mit einer Pasteurpipette aufsaugt. — Auf diese Weise erhält man den Quotienten zwischen Globulin und Albumin. Die Summe aus beiden wird deutlich Gesamtstickstoff minus Fibrinstickstoff. Der Reststickstoff kann, falls es notwendig ist, bestimmt und dann von dem Gesamt- und Albuminstickstoff in Abzug gebracht werden.

Diese Methode ist in ein paar hundert Fällen verwendet worden und hat sich als außerordentlich zuverlässig erwiesen.

p_H-Bestimmungen wurden im Stufenphotometer mit Nitrophenolindikator nach einer Methode, die später von *A. Janke* und *St. Kropacsy* (38) publiziert wurde, ausgeführt.

Die *Oberflächenspannung* wurde nach *R. Brinkman* und *van Dam* (7) und *T. Tominaga* (91) mittels der Ringmethode gemessen. Eine kleine Menge Flüssigkeit wurde auf ein Uhrglas gegossen, das dann 30 Minuten in Ruhe stehen durfte, bevor die definitive Bestimmung vorgenommen wurde. Während dieser 30 Minuten sank die Oberflächenspannung — worauf *Tominaga* hinweist — anfangs rascher, dann immer langsamer. Nach 30 Minuten war der definitive Wert wenigstens nahezu erreicht.

Der *Viskositätskoeffizient* wurde mit Viskosimeter im Wasserbad von 18° C in üblicher Weise gemessen.

Die *Senkungsreaktion* wurde mit der Apparatur nach *Westergren* (97) geprüft. Für gewöhnliches Pferdeblut sind diese Senkungsröhren jedoch für die großen Aggregate zu schmal. In diesen Versuchen aber war in den meisten Fällen $1\frac{1}{2}$ mal verdünntes Plasma verwendet worden, das die Aggregation so vermindert, daß das Diameter der Röhren gut ausreicht. Kontrollversuche mit größeren Röhren gaben dieselben Werte.

Kataphoreseversuche an Blutkörperchen wurden nach *Michaelis* [(63), S. 118] angestellt.

Cholesterinsuspensionen.

Nach der Literatur zu urteilen, schien es eine leichte Sache, sowohl haltbare als auch reproduzierbare Suspensionen von Cholesterin in Wasser

herzustellen. Die meisten Verfasser, *Kürten* (46), *Grossman* (26) u. a. begnügen sich damit, festzustellen, daß Cholesterinsuspensionen von dem oder jenem Gehalt, z. B. 1%, für gewisse Versuche verwendet wurden, ohne jedoch die Darstellungsweise näher anzugeben. *Porges* und *Neubauer* (73) erhielten hochkonzentrierte, stabile Cholesterinhydrosole, indem sie eine Acetonlösung des Cholesterins in Wasser gossen und danach das Aceton auf dem Wasserbad verdunsteten. *Rona* und *Deutsch* (77) benutzten dieselbe Methode, erhielten aber nur sehr niedrig konzentrierte Sole. *R. Stern* (85) behauptet, daß die Darstellung ohne weiteres gelingt, wenn eine kochende Alkohollösung des Cholesterins langsam in kochendes Wasser gegossen wird; dies unter der Voraussetzung, daß ein ganz reines Präparat verwendet wird. In einer kürzlich erschienenen Arbeit gibt *Remesow* (75) an, daß es ihm gelungen, ein festes Präparat kolloidales Cholesterin darzustellen, das sich in Wasser in ein milchiges Sol auflöse. Die Darstellung, welche in der Hauptsache derjenigen von *Porges* und *Neubauer* ähnelt, ist sehr summarisch beschrieben, und da *Remesow* nicht angibt, ob er sein Cholesterin (*Merck*) durch Umkristallisation gereinigt hat, lassen sich seine Angaben nur schwer beurteilen. *Cashin* und *Moravek* (12) benutzten eine von der vorhergehenden gänzlich abweichende Methode (Dispersionsmethode), bei welcher sie Lecithin und Gelatine sehr freigiebig als Schutzkolloide verwendeten. Meine eigenen Versuche mit der Methode von *Stern* waren anfänglich vielversprechend, zumal sogar mit einem Cholesterinpräparat von ziemlich zweifelhafter Reinheit 1%ige hochdisperse, gut haltbare Suspensionen ohne Schwierigkeit erhalten wurden. Bei Versuchen, womöglich noch bessere Resultate mit reinerem, mehrmals aus Alkohol umkristallisiertem Cholesterin zu erzielen, traten unerwartete Schwierigkeiten zutage. Je mehr das Präparat (*Mercks* reinstes Cholesterin) umkristallisiert wurde, desto schlechter wurden die Resultate, so daß schließlich nur sehr schwache Lösungen erhalten werden konnten. Dies konnte nur so gedeutet werden, daß ein Schutzkolloid, wenn auch nur in verschwindender Menge, nötig sei, um die Suspension stabil zu machen. (Auf meine briefliche Anfrage an *Stern*, ob seine Darstellung der Suspensionen ausnahmslos gelungen sei, antwortete er, daß dies nicht der Fall gewesen sei, bisweilen seien sie ihm aus einem unbekanntem Anlaß mißlungen.) Nun hieß es also, ein geeignetes Schutzkolloid zu suchen, und zwar ein für die Zwecke des Verfassers passendes, das normalerweise im Blute vorhanden ist. Unter diesen kamen zunächst Fettsäuren, Seifen und gallensaure Salze in Frage.

Zu den Versuchen wurden verwendet: *Stearinsäure*, gereinigt durch Verseifen, Filtrieren, Ausfällen mit HCl, Ausschütteln mit Äther im Scheidetrichter, Waschen der Ätherlösung mit Wasser bis zu neutraler Reaktion im Waschwasser sowie durch mehrmalige Umkristallisation aus Alkohol.

Ölsäure: *Mercks* Ac. olein. puriss., frei von Linolsäure.

Tauro- und Glykocholsäure: Analysenreine Präparate, dargestellt von *B. Josephson*, aufgelöst in Wasser durch Zusatz äquivalenter Mengen Alkali. Für die Seifenlösungen wurde p_H bestimmt, um eine Beurteilung zu ermöglichen, in welchem Maße c_H als solches für die Resultate eine Rolle spielte. Die Bestimmung, welche ja in diesem Falle keine größere Genauigkeit erforderte, wurde kolorimetrisch mit m-Nitrophenol und Phenolphthalein unter Benutzung von *Walpoles* Prinzip ausgeführt.

A. Stearinsäure.

Versuche mit *Seifenlösungen* von verschiedener Konzentration.
Ber. äquival. Volumen NaOH = 4,11 ccm.

Tabelle I.

2%ige Stearinsäure, Alkohollösung ccm	Na OH ccm	H ₂ O ccm	p _H	Aussehen	p _H nach Schütteln mit Äther bis Klärung
2,0	2,0	23,0	7,3	Beim Erkalten Niederschlag	9,4
2,0	3,0	22,0	8,7		—
2,0	3,5	21,5	8,7		—
2,0	3,75	21,25	8,7		—
2,0	3,90	21,10	8,7		—
2,0	4,00	21,0	8,7		—
2,0	4,10	20,90	8,9		—
2,0	4,30	20,70	9,1		9,4

Die Lösungen waren vor dem Ausschütteln mit Äther in bezug auf Stearinsäure 1,48⁰/₁₀₀.

Versuche, *Cholesterinsuspension* herzustellen: Lösungen von 0,2 g Cholesterin in 4 ccm Alkohol wurden in verschieden konzentrierte Stearinsäureseifenlösungen hineingegossen (Stearinsäure + äquival. Menge NaOH).

Tabelle II.

Konzentration in bezug auf Stearinsäure ‰	p _H	Resultat
1	8,7	Erst Suspension, aber Niederschlag nach einem Tage
1/2	8,1	
1/4	7,6	
1/8	7,3	
1/16	7,0	
1/32	7,0	Niederschlag nach einer Weile

B. Versuche mit Ölsäure und Ölsäureseife.

5 ccm warmer Alkohol, enthaltend 4% Cholesterin und verschiedene Mengen Ölsäure, wurden in 20 ccm warmes destilliertes Wasser hineingegossen. Dieses wurde konsequent benutzt, nachdem mehrere Versuche gezeigt hatten, daß gegenüber dem von *Stern* vorgeschriebenen „Leitfähigkeitswasser“, das auch Verfasser anfänglich verwendete, kein Unterschied vorhanden war.

Tabelle III.

H ₂ O ccm	Konzentration der Cholesterin-alkohollösung in bezug auf Ölsäure ‰	Resultat
20	1	Niederschlag
20	1/2	
20	1/4	
20	1/8	
20	1/16	
20	1/32	

Etwas bessere Resultate wurden auf folgende Weise erhalten:

20 ccm H₂O wurden mit 1 ccm 0,8%iger Ölsäure in Alkohol versetzt. Nach Erhitzen wurden 5 ccm warmer, 4%iger Cholesterinalkohollösung zugesetzt. Die entstandene Suspension wurde augenblicklich durch fettfreie Baumwolle filtriert. Das Filtrat erwies sich als Suspension etwa 2 Wochen haltbar, wonach das Cholesterin ausschied.

Die besten Resultate waren a priori mit Ölsäureseife zu erwarten, da die Ölsäure als ungesättigte Säure eine höhere Dissoziationskonstante hat als die Stearinsäure und demnach auch eine geringere Neigung zur Hydrolyse. Wie folgende Versuche zeigen, war diese Hoffnung auch voll berechtigt.

Versuch. Ölsäure-Na-Seifen. NaOH in zur Ölsäure äquivalenter Menge.

Tabelle IV.

Nr.	Konzentration der Ölsäure ‰	pH	Aussehen nach ein paar Stunden	Aussehen nach mehreren Tagen
1	0,8	8,4	stark getrübt	stark getrübt
2	0,4	8,0	klar	schwächer getrübt
3	0,2	7,6	nahezu klar	noch schwächer getrübt
4	0,1	7,2	opak	" " "
5	0,05	7,0	stärkere Trübung	" " "
6	0,025	6,9	schwächere Trübung als vorher	" " "

In 20 ccm von jeder der vorhergehenden, neu zubereiteten Lösungen wurde unter Sieden 0,2 g Cholesterin, gelöst in 5 ccm Alkohol, zugegeben. Es entstand eine kolloidale Lösung, Nr. 6 zeigte jedoch Tendenz, Cholesterin auszufällen. Nun wurde ein gleichgroßes Volumen destillierten Wassers hinzugefügt und die Becher auf das Wasserbad gestellt, um den Alkohol zu verdunsten. Nachdem die Volumina unter 20 ccm gesunken waren, wurden die Lösungen durch Baumwolle filtriert, danach die Filtra mit etwas Wasser gespült und das Volumen auf 20 ccm ergänzt.

Tabelle V.

Spektrophotometrische Cholesterinbestimmungen.

Nr.	Cholesterin berechnet = 1 ‰ Cholesterin gefunden ‰
2	0,56
3	0,55
4	0,52
5	0,38
6	0,24

Es war also eine bedeutende Menge des Cholesterins ausgefällt worden, was offensichtlich darauf beruht, daß sich beim Verdunsten auf dem Wasserbad ein Teil des Cholesterins an den Wänden der Becher abgesetzt hatte. Man kann überhaupt nicht erwarten, mit der vorbeschriebenen, groben Methode streng reproduzierbare Suspensionen zu erhalten, im einen Falle

scheidet wenig aus, im anderen viel. Auch der Dispersitätsgrad der Suspension ist natürlich in hohem Maße abhängig vom Zusatz der Alkohollösung, den Umrührungs- und Temperaturverhältnissen sowie von den auf diese Weise unvermeidlichen Volumenänderungen beim Verdunsten des Alkohols. Dies wird deutlich aus einem Vergleich zwischen dem folgenden und den vorhergehenden Versuchen ersichtlich; die Technik war, soweit möglich, dieselbe wie in den vorhergehenden, aber die Resultate wurden, wie man sieht, recht variierend.

Tabelle VI.

Nr.	‰ Na-Oleat	1 ‰ Cholesterin zugesetzt ‰ Cholesterin gefunden	Bemerkungen
1	0,1	0,64	Ein anderes Cholesterinpräparat als die vorhergehenden, in derselben Weise und gleich rein dargestellt
2	0,04	0,64	
3	0,01	0,44	
4	0,01	0,17	

Nr. 2 mit 0,64 ‰ in diesem Versuch entspricht am ehesten Nr. 5 im vorhergehenden mit 0,38 ‰. Auch Nr. 3 und 4 im obigen Versuch zeigen deutlich, wie unmöglich es ist, auf diese Weise reproduzierbare Suspensionen herzustellen.

Um die oben berührten Schwierigkeiten möglichst zu vermeiden, wurde ein Apparat angefertigt, dessen Bau aus Abb. 2 hervorgeht.

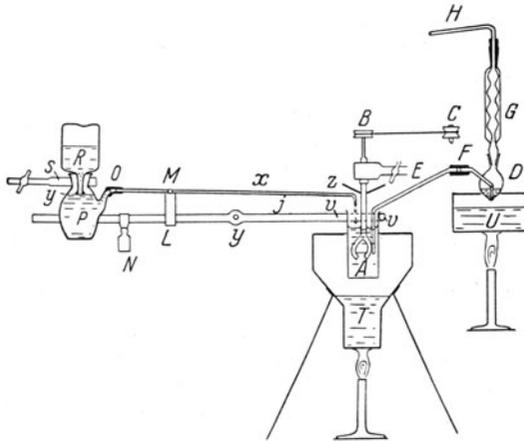


Abb. 2.

A = Becher im Wasserbad, enthält Seifenlösung, später Cholesterinsuspension. B = Umrührer. C = Motor. D = Kolben, enthaltend Cholesterin in 5 ‰iger Alkohollösung, siedend auf dem Wasserbad U. E = Ablaufrohr für die Alkohollösung. F = Gummiverbindung. G = Rücklaufkühler. H = Rohr nach dem Gasometer. I = Hebel mit der Schlinge V, in welcher A ruht. Drehbar um den festen Punkt J. L = kleiner Metallstab, an I verlötet. N = längs I verschiebbares Gewicht. O = Gummiverbindung. P = Flasche mit Ablaufrohr nach O, im Stativ S ruhend. R = nach unten gewendete Vorratsflasche mit aqua dest., hält das Niveau Y in konstanter Höhe. X = Rohr, leitet Wasser von P nach A. M = bewegliche Verbindung zwischen L und X. Z = Schutzdach gegen Staub.

Die Darstellung der Suspensionen geschieht in folgender Weise. *A* wird mit 100 ccm Ölsäureseifenlösung von gewünschter Konzentration gefüllt. Durch Verschieben des Gewichts *N* wird zwischen *A* und *N* das Gleichgewicht hergestellt. *T* wird bis zum Sieden erhitzt, *B* wird in Bewegung gesetzt. Dabei verdunstet Wasser aus *A*, der dadurch leichter und gehoben wird. *L*, *M* und die Spitze von *X* senken sich damit und stehen tiefer als *Y*; Wasser tropft aus *X* in *A* hinein, bis das Gleichgewicht wieder hergestellt ist — die Flüssigkeit in *A* wird damit bei konstantem Gewicht erhalten; In *D* werden 1 g Cholesterin und 20 ccm absoluter Alkohol eingefüllt. *E* in seine Lage gebracht wie in der Abbildung. *U* wird erhitzt, wodurch der Alkohol dank *G* bei konstantem Volumen kocht. Wenn sich das Cholesterin gelöst hat, wird *H* mit einem Gasometer mit einem gewissen konstanten Überdruck verbunden. Dadurch strömt die Cholesterinlösung mit einer gewissen Geschwindigkeit, in etwa 20 Sekunden, in *A* hinüber und gerät dabei in starkes Sieden, das durch Vermindern der Flamme unter *T* moderiert wird. Etwas Schaumbildung ist indessen unvermeidlich. Der Schaum trocknet an *B* und den Wänden von *A* ein, wodurch kleinere Verluste entstehen. Weiterhin kommen solche dadurch zustande, daß etwas Cholesterinlösung in *D* und *E* klebenbleibt. Diese Verluste werden durch die kleine untere Ausbuchtung in *D* verringert und sind sehr konstant, weshalb Verfasser es unnötig fand, die Prozedur durch Nachspülen mit Alkohol zu komplizieren. *E* wird aus *A* entfernt. Nun wird der Apparat wenigstens 4 bis 5 Stunden sich selbst überlassen, wonach der ganze Alkohol verschwunden ist. Die entstandene Suspension wird zur Kontrolle des Volumens in eine Mensur gegossen. Funktioniert der Apparat richtig, dann variiert es nicht mehr als ein oder ein paar Prozent.

Für die Zwecke des Verfassers erwies sich eine Seifekonzentration von 0,04% (mit Rücksicht auf die Ölsäure) als die günstigste und wurde auch in den meisten Fällen verwendet. Die Cholesterinkonzentration beträgt dann nach den unvermeidlichen Verlusten 0,70 bis 0,85%.

Die so hergestellten Suspensionen lassen sich demnach völlig zufriedenstellend reproduzieren und sind lange haltbar. Eine vollständige Ausfällung des Cholesterins nach noch so langer Zeit (mehrere Monate) ist niemals eingetreten, wohl aber setzt sich allmählich eine Cholesterinschicht am Boden ab, wahrscheinlich unter anderem infolge bakteriellen Zerfalls der Seife. Schon in frischen Suspensionen kann ein Teil Cholesterin durch scharfes Zentrifugieren zum Sedimentieren gebracht werden; dies deutet auf eine gewisse Ungleichheit in der Partikelgröße hin.

Es hätte selbstverständlich ein gewisses Interesse, den Zusammenhang zwischen Schutzkolloidkonzentration und Cholesterinkonzentration, Salzstabilität usw. zu untersuchen, vorläufig aber wurden die Suspensionen als Mittel, nicht als Ziel, angesehen und deshalb davon Abstand genommen.

Um eine Vorstellung von der Salzstabilität der benutzten Sole zu geben, ebenso um der Vollständigkeit halber den nahezu unnötigen Beweis zu erbringen, daß die kolloiden Cholesterinpartikelchen auch in den vom Verfasser hergestellten Solen negativ geladen sind, kann es vielleicht dennoch angebracht sein, einen solchen Ausflockungsversuch wiederzugeben.

In jedem Probierröhrchen waren 5 ccm Salzlösung. In jedes Röhrchen wurden 0,2 ccm einer 0,72% igen Cholesterinlösung mit 0,04% Ölsäureseife hinzugefügt.

	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512
NaCl . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—
Na ₂ SO ₄ .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
CaCl ₂ . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
AlCl ₃ . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

	m/1024	m/2048	m/4100	m/8200	m/16400	m/32800	m/65600	m/131200
NaCl . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Na ₂ SO ₄ .	—	—	—	—	—	—	—	—
CaCl ₂ . .	—	—	—	—	—	—	—	—
AlCl ₃ . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

Das Resultat ist typisch für ein negatives Suspensionskolloid von geringer Salzstabilität. Es verdient vielleicht angeführt zu werden, daß der beschriebene Apparat selbstverständlich ohne weiteres zur Darstellung anderer kolloidaler Lösungen unter möglichst konstanten Verhältnissen angewendet werden kann. Vergleiche z. B. Versuch 11, wo eine Mastixsuspension in oben angegebener Weise hergestellt wurde.

Diese Versuche wurden 1927 angestellt. 1928 teilen *Blix* und *Löwenhielm* (4) mit, daß sie (ganz unabhängig von meinen Versuchen) zu dem Resultat gekommen sind, daß absolut reines Cholesterin in Wasser in kolloidale Lösung geht mit einer Konzentration von höchstens 0,05 bis 0,08%; es waren aber nur minimale Spuren von Seifen erforderlich, um die Löslichkeit des Cholesterins in kolloidale Form zu vervielfachen. Diese Erfahrungen stimmen mit denen des Verfassers überein.

Infolge des Zeitpunktes der Versuche konnte die Beobachtung von *Blix* und *Löwenhielm*, daß Cholesterin in kolloidaler Lösung durch Seife von der Säure der Luft oxydiert wird, auch nicht in Betracht gezogen werden. Später wurden jedoch in zwei Fällen Analysen auf Oxycholesterin gemacht.

1. Ein Sol, das 0,71% Cholesterin und 0,04⁰/₀₀ Ölsäureseife enthielt, war nach der Darstellung 2 Monate der Einwirkung der Luft ausgesetzt gewesen. Der Oxycholesteringehalt, bestimmt durch Vergleich mit einem vom Verfasser hergestellten analysereinen Präparat Oxycholesterin im Stufenphotometer, betrug 0,12%, d. h. es waren 17% des Cholesterins als Oxycholesterin vorhanden.

2. Ein frisches Sol mit 0,72% Cholesterin und 0,04⁰/₀₀ Seife enthielt 0,04% Oxycholesterin; also bedeutend weniger. Da nach *Lifschütz* (53) das Oxycholesterin bisweilen im Blute etwa 15% des Gesamtcholesterins erreicht und außerdem kein Grund zur Annahme vorhanden ist, daß das Oxycholesterin eine andere Einwirkung auf die Senkungsgeschwindigkeit habe als das nah verwandte Cholesterin, so dürften oben berührte Verhältnisse kaum größere Bedeutung für die nachstehend mitgeteilten Resultate haben.

Versuch mit glyko- und taurocholsaurem Na. In 0,0005 n Lösung hatten diese keinerlei schützenden Effekt auf das Cholesterin, es erfolgte vielmehr eine nahezu gänzliche Ausfällung.

Lecithinsuspensionen.

In bezug auf das „Lecithin“ im Blutplasma sind unsere Kenntnisse hinsichtlich der qualitativen Chemie bedeutend geringer, als dies betreffs des Cholesterins der Fall ist. Nach einer Reihe Versuche mit aus Pferdeplasma dargestellten Lipoiden (s. Versuch 1) hielt Verfasser es für geraten, mit dem von *Grün* und *Limpächer* (27) synthetisierten Distearinsäurelecithin zu arbeiten. Da kein chemisch reines Präparat zugänglich war, sondern nur „Rohlecithin“, reinigte ich dieses nach den Anweisungen seitens der Hersteller. Der P.-Gehalt war, wie es sich herausstellte, der theoretische 3,93%. In Wasser quillt das Präparat langsam, beim Erhitzen rascher. Beim Sieden ist es in 1%iger Lösung beinahe klar; beim Erkalten wird es jedoch immer trüber. Schüttelt man eine 1%ige Lösung bei Zimmertemperatur, erscheint die Flüssigkeit makroskopisch nicht homogen und ähnelt ungefähr einem beginnenden BaSO₄-Niederschlag. Das Lecithin macht demnach beim Erkalten anscheinend eine „Entmischung“ oder „Koazervation“ durch.

Kapitel IV.

Protokoll über ausgeführte Versuche.

Einleitend seien einige kleinere Versuche mitgeteilt, die mit Totallipoiden aus Pferdeserum gemacht wurden. Da dieses mehrere verschiedene, teilweise unvollständig bekannte Stoffe enthält, sind ja die Resultate schwerer deutbar und werden mehr variabel als bei Verwendung reiner, chemischer Körper. Verfasser fand es daher bald angebracht, zu letzteren überzugehen.

Die Darstellung der Lipoide geschah folgendermaßen: 800 ccm Pferdeserum wurden in einer Flasche mit dem dreifachen Volumen Alkohol versetzt, und diese nahezu bis zum Kork gefüllt, damit Luftzutritt so gut wie möglich ausgeschlossen war. Die Flasche wurde über Nacht im Thermostat bei 37 bis 40° aufbewahrt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit einer neuen Menge Alkohol 2 Tage hindurch extrahiert. Alsdann wurde neuerdings filtriert. Die beiden vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingedunstet und der Rückstand von Salzen und anderen Verunreinigungen befreit, indem er in absolutem Alkohol gelöst wurde, danach wurde diese Lösung filtriert und eingedunstet. Der Rückstand war eine braungelbe, schmierige Masse, die 14,5% Cholesterin und 25,5% Lecithin enthielt. Das Präparat wird im folgenden Lipoide genannt. Es quoll in Wasser langsam und ging spontan in eine kolloidale Lösung über; rascher bei Schütteln und Erwärmung. Im Ultramikroskop konnten hierbei hübsche Myelinfiguren beobachtet werden. In physiologischer NaCl-Lösung vollzog sich die Quellung nur mit Schwierigkeit.

Zuerst wurden eine Reihe Modellversuche mit Lipoiden, suspendiert in Wasser + einer 6,4%igen Lösung kristallisierten Ovalbumins, nach *Sörensen* (88), angestellt. Da in keinem Falle, weder nach Zusatz von Ölsäureseife noch nach mehrstündiger Aufbewahrung im Thermostat bei 37°, eine Aufhellung wahrgenommen werden konnte, welche darauf hindeutete, daß die Lipoide durch Einwirkung des Eiweißes in eine mehr hochdisperse Lösung übergegangen, kann es als überflüssig angesehen werden, ein ausführlicheres Versuchsprotokoll wiederzugeben.

Versuch I. Pferdeserum wurde mit Lipoiden ausgerührt und Analysen gemacht, um zu ermitteln, ob einige Lipide in Lösung gegangen.

Das Pferdeserum wurde mit wechselnden Mengen Lipoiden sowie 1,0 % Cholesterinsuspension versetzt. Dieses Cholesterinpräparat, das in den Versuchen 1 bis 6 benutzt wurde, ging spontan in Suspension und muß also (s. Kapitel III, Cholesterinsuspensionen) eine schützende Verunreinigung enthalten haben. Für einen solchen Verdacht war a priori kaum eine Stütze vorhanden, zumal der Schmelzpunkt 145° C war. Erst als dieses Präparat zu Ende war, wurde die Notwendigkeit eines Schutzkolloides für absolut reines Cholesterin entdeckt.

Tabelle VII.

Nr.	Serum cem	Zusatz	Cholesterin im Serum ‰	Lecithin im Serum ‰	Cholesterin		Lecithin	
					Zusatz mg	gelöst mg	Zusatz mg	gelöst mg
1	5	0	0,89	1,62	0	0	0	0
2	5	2,5 ccm Chol.-susp.	1,87	1,62	25	4,9	0	0
3	5	4,3 mg Lip.	0,82	1,71	0,6	- 0,35	1,1	0,45
4	5	23,5 " "	0,81	2,25	3,4	- 0,4	6,0	3,2
5	5	85,9 " "	0,82	3,00	12,3	- 0,35	21,9	6,9

Die Lipoidklumpen wurden mit Serum verrührt, wonach die Röhren 4 Stunden im Thermostat bei 37° C stehen durften.

In Nr. 2 entstand ein flockiger Niederschlag des Cholesterins. Nr. 3 bis 5 erwiesen sich als trübe. Es konnte keine sichtbare Aufhellung wahrgenommen werden. Deshalb wurde kräftig zentrifugiert, bis alle Röhren klar waren, mit Ausnahme von Nr. 2, welche eine hartnäckig verbleibende, leichte Trübung zeigte, die mit der zur Zeit des Versuches zur Verfügung stehenden Zentrifuge nicht weggeschafft werden konnte. Die Analysen wurden durch Extraktion nach *Bloor*, spektrophotometrische Cholesterinanalysen, und titrimetrische P-Analysen nach *Macheboeuf* gemacht. Aus den Resultaten (s. die Tabelle VII) geht hervor, daß das in Suspension zugesetzte Cholesterin wahrscheinlich teilweise vom Serum gelöst wird. Bei Zusatz von Totallipoiden wurde keine Zunahme des Cholesteringehaltes vermerkt, im Gegenteil eine geringe Abnahme; dies steht in guter Übereinstimmung mit den Resultaten nach Zusatz von reinem Lecithin (vgl. die Versuche 16 bis 18 und 25). Lecithin wird vom Serum größtenteils, doch nicht quantitativ, aus den Totallipoiden gelöst.

Da es möglich war, durch Zentrifugieren das mit Cholesterinsuspension versetzte Serum völlig zu klären, ließ sich annehmen, daß das ganze zugesetzte Cholesterin in einer grobdispersen Form vorlag, die

in keiner Weise mit dem vorher vorhandenen, im Serum klar gelösten Cholesterin gleichwertig wäre. Der folgende Versuch zeigt indessen, daß ein Teil des Cholesterins tatsächlich in eine klare Lösung übergeht.

Versuch 2. Behandlung von Pferdeserum mit Cholesterin in Suspension, um nachzuweisen, ob etwas Cholesterin sich löst.

Steriles Pferdeserum wurde unter aseptischen Vorsichtsmaßnahmen mit Cholesterinsuspension von 0,8% in wechselnden Mengen versetzt und mit Blutkörperchen durch Zusatz von sterilem n/1 NaCl isoton gemacht.

Tabelle VIII.

Nr.	Serum cem	Cholesterin- suspension cem	H ₂ O cem	Na Cl cem
1	10	0	4,23	0,77
2	10	0	4,23	0,77
3	10	4,23	0	0,77
4	10	2,12	2,11	0,77

In Nr. 3 und 4 schied das Cholesterin als ein leichter, flockiger Niederschlag aus, der in Ruhe zwar langsam und unvollständig sedimentierte, aber nicht wegzentrifugiert werden konnte, deutlich infolge der Erschütterungen in der Zentrifuge. (Diese Schwierigkeit konnte erst später mit Hilfe der *Lundgrenschen* Winkelzentrifuge überwunden werden.) Von den verschiedenen untersuchten Filtern können nur, wie es sich herausstellte, die Berkefeldfilter den Niederschlag zurückhalten. Nach Filtrieren von Nr. 2, 3 und 4 waren sie alle gleich, d. h. vollkommen klar. Diese Methode hatte jedoch, wie es sich zeigte, bedenkliche Nachteile.

1. Es erwies sich als schwierig, die Berkefeldfilter nach Sterilisation im Autoklaven vollständig trocken zu machen.

2. Eiweiß und auch klar gelöstes Cholesterin bleiben teilweise in dem feinporigen Filter haften.

Diese beiden Faktoren bringen eine wirkliche (dadurch, daß Wasser hinzukommt) und eine scheinbare Verdünnung (dadurch, daß Eiweiß wegfiltriert wird) des Serums zustande. Diese Ungelegenheit wird durch langsames Filtrieren mit Unterdruck teilweise neutralisiert, wodurch eine gewisse Verdunstung unvermeidlich wird. Deshalb wurden für Nr. 1 sowie 2 bis 4 nach dem Filtrieren Stickstoffanalysen nach *Kjeldahl* gemacht. Der Eiweißgehalt wurde dann durch Multiplikation des Stickstoffgehaltes mit 6,25 berechnet. Ferner wurden spektrophotometrische Cholesterinanalysen auf Bloorextrakte angestellt.

Tabelle IX.

Nr.	Eiweiß %	‰ Cholesterin direkt	‰ Cholesterin reduziert auf Eiweißgehalt 5,40
1	5,40	0,47	0,47
2	4,13	0,23	0,30
3	3,60	0,59	0,89
4	4,53	0,57	0,66

Infolge der oben beanstandeten Unzulänglichkeiten in der Filtrier-technik für diesen Zweck muß man selbstverständlich mit den Schlußfolgerungen aus obenstehenden Resultaten recht vorsichtig sein. Der Cholesteringehalt in Nr. 3 und 4 liegt schon direkt nach der Berkefeldfiltrierung so deutlich oberhalb des entsprechenden in der unfiltrierten Nr. 1, daß es nicht zu umgehen ist, anzunehmen, daß ein Teil des zugesetzten Cholesterins in klare Lösung gegangen ist. Eine Reduktion auf denselben Eiweißgehalt, Kolumne 4, ist offenbar nur berechtigt, in dem Maße die Verdünnung durch Feuchtigkeit in den Filtern zustande gekommen ist. Dagegen ist die Berechtigung einer solchen Manipulation mehr zweifelhaft, wenn die Abnahme des Eiweißgehaltes durch Hängenbleiben von Eiweiß im Filter verursacht ist. Hierbei kommen natürlich vor allem die hochmolekularen Globuline in Frage; an diese ist Cholesterin gebunden (vgl. die Versuche Nr. 21 bis 24 und 26): Auf diese Weise würde sich die Abnahme des Cholesterin- und Eiweißgehaltes aus Nr. 1 und 2 erklären lassen; die starke Cholesterinzunahme in Nr. 3 und 4 deutet in diesem Falle darauf hin, daß sich das neu zugesetzte Cholesterin wenigstens zum Teil in freier und von Globulinen ungebundener Form vorfindet — eine Vermutung, die sich später als richtig erwiesen hat. Aus einem Vergleich zwischen den Cholesterinwerten in den Nr. 2, 3 und 4 in Kolumne 4 geht hervor, daß die Zunahme in diesem Falle einigermaßen der zugesetzten Cholesterinmenge proportional war — immer unter der Voraussetzung, daß die Ausrechnung in Kolumne 4 Berechtigung besitzt.

Bei weiteren Versuchen mit Menschenserum wurde die Eigentümlichkeit beobachtet, daß ein Teil des zugesetzten Cholesterins, das nicht in Lösung geht oder ausfällt, ein Berkefeldfilter so verstopfen kann, daß es praktisch überhaupt kein Cholesterin, nicht einmal das von Anfang an in Serum gelöste, durchläßt. Man kann demnach in der Tat durch ein Cholesterinfilter das Cholesterin wegfiltrieren [vgl. *Marie* (60)].

Versuch 3. Senkungsgeschwindigkeit der gewaschenen Blutkörperchen in mit Cholesterin behandeltem Menschenharn.

Zum Menschenserum wurden unter sterilen Vorsichtsmaßnahmen 0,423 Volumen 1%ige Cholesterinsuspension (K), in einer zweiten

0,423 Volumen Wasser (O) zugesetzt. Zu beiden wurde zur Erreichung von Isotonie 0,77 Volumen n/1 NaCl hinzugefügt. Beide Mischungen durften gut verschlossen 12 Stunden im Thermostat bei 37° stehen, wonach in K ein Cholesterinniederschlag entstanden war. Nach Verlauf einer Woche war bei gewöhnlicher Temperatur der Niederschlag so weit gesunken, daß das oberste im Röhrchen abpipettiert werden konnte. Dies war nahezu, jedoch nicht völlig klar.

Extraktion nach Bloor, spektrophotometrische Cholesterinbestimmungen.

$$\left. \begin{array}{l} K = 2,86\%_{00} \\ O = 2,12\%_{00} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Cholesterin, berechnet auf} \\ \text{das unverdünnte Serum.} \end{array}$$

Zur Kontrolle, daß der Cholesterinniederschlag beim Ausscheiden kein Eiweiß oder eventuell eine andere N-haltige Verbindung adsorbiert hat, wurden N-Analysen nach *Kjeldahl* gemacht.

$$\left. \begin{array}{l} \text{In K} = 8,58\% \\ \text{In O} = 8,57\% \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Eiweiß, berechnet aus dem} \\ \text{ursprünglichen Volumen.} \end{array}$$

Der Unterschied liegt, wie man sieht, innerhalb der Fehlergrenze für diese Methode.

Frische Blutkörperchen von derselben Person wurden dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurde eine Senkungsprobe mit 6 Volumen Serum + 5 Volumen Blutkörperchen ausgeführt.

Tabelle X.

Stunden nach Beginn des Versuchs	K mm	O mm
12	1	2
36	4	8
60	7	16

Die äußerst langsame Senkung beruht in diesem Falle deutlich darauf, daß verdünntes Serum und gewaschene Blutkörperchen verwendet wurden. Die folgenden Versuche zeigen, daß die Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit durch Cholesterinzusatz bedeutend größer wird, wenn man statt dessen Plasma oder ungewaschene Blutkörperchen benutzt. Damit erhält man eine absolut viel größere Senkungsgeschwindigkeit.

Versuch 4. Senkungsgeschwindigkeit ungewaschener Blutkörperchen in mit Cholesterin versetztem Plasma.

Menschenblut, in welchem die Koagulation durch konzentriertes Na-Citrat in einer Konzentration von 1⁰/₀₀ verhindert worden ist, wurde kräftig zentrifugiert. Das Plasma wurde wie vorher behandelt,

1 Volumen Plasma + 0,423 Cholesterinsuspension (K) bzw. 0,423 Volumen H₂O (O). Beide Mischungen wurden mit 0,077 Volumen n/1 NaCl versetzt. Die Senkungsprobe wurde direkt gemacht, also bevor das Cholesterin ausgeschieden und der Überschuß weggeschafft war. 1,1 Volumen Plasma + 1 Volumen ungewaschene, hartzentrifugierte Blutkörperchen.

Tabelle XI.

Stunden nach Beginn	K mm	O mm
4	1,5	26
20	5,5	95

Nachdem das Cholesterin nach einem Tage ausgeschieden war und zu sinken begonnen hatte, wurde ein Teil der obersten, klaren Schicht abpipettiert. Bloorextraktion und spektrophotometrische Cholesterinbestimmungen.

Resultat:

K = 1,56⁰/₀₀ } Cholesterin, reduziert auf das
 O = 1,24⁰/₀₀ } ursprüngliche Volumen.

N-Bestimmung nach *Kjeldahl*; Eiweiß = 6,25 · N.

K = 8,22% } Eiweiß, reduziert auf das
 O = 8,28% } ursprüngliche Volumen.

Versuch 5. Die Senkung ungewaschener Pferdeblutkörperchen in mit Cholesterin versetztem Plasma. Hypotonieresistenz der Blutkörperchen.

Pferdeblut, in welchem die Koagulation durch 1⁰/₀₀ Am₂C₂O₄ verhindert wurde, wurde zentrifugiert. Das Plasma wurde wie im vorhergehenden Versuch behandelt. Senkungsprobe mit 1,2 ccm Plasma + 1,0 ccm ungewaschenen Blutkörperchen.

Senkung, bevor der Überschuß an Cholesterin ausgeschieden und sedimentiert war.

A.

Tabelle XII.

Minuten nach Beginn	15	30	38	42	50	60	100
mm Senkung K	1	2,5	4	5	7,5	11	27
„ „ O	4,5	25	42	50	70	82	93

Senkung am Tage darauf, nachdem der Überschuß an Cholesterin ausgeschieden und sedimentiert und die klare obere Schicht abpipettiert war. Senkungsprobe in diesem klaren Plasma mit denselben Verhältnissen zwischen Blutkörperchen- und Plasmavolumen.

B.

Tabelle XIII.

Minuten nach Beginn	15	30	40	60	100
mm Senkung K	0,8	2,5	3,5	9,5	25
" " O	13	45	65	88	95

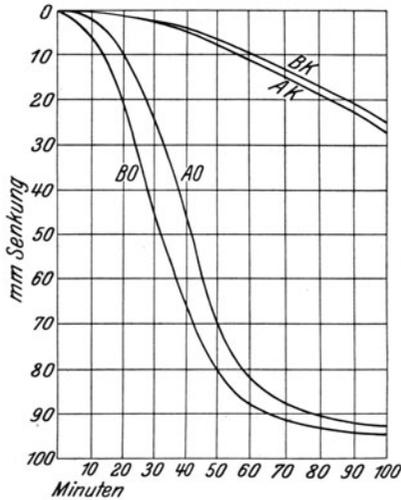


Abb. 3.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, stimmen AK und BK nahezu überein. Es ist möglicherweise der Unterschied vorhanden, daß BK noch eine etwas langsamere Senkung hat als AK, aber dieser Unterschied ist zu gering, um irgendwelche bestimmte Schlüsse zuzulassen. Sicher ist indessen, daß der ausscheidende Überschuß, man wagt wohl anzunehmen, daß dies der mehr grobdisperse, schwächer elektrisch geladene Teil des zugesetzten Cholesterins ist, keinerlei Einwirkung auf die Senkungsgeschwindigkeit besitzt. Es liegt auch die Annahme nahe, daß diejenigen Verfasser, welche seitens des Cholesterins keine Einwirkung auf die Senkungsgeschwindigkeit gefunden haben, sich eines Cholesterinzusatzes in solcher grobdispenser, unwirksamer Form bedient haben.

Der Unterschied zwischen AO und BO ist nur ein scheinbarer. Wie allgemein bekannt, vergeht immer eine gewisse Zeit, bis sich die Aggregation zwischen den Blutkörperchen entwickelt. Diese Zeit ist bei derartigen, rasch sedimentierenden Blutkörperchen wie in AO und BO in hohem Maße davon abhängig, wie die Blutkörperchen und das Plasma vermischt werden, d. h. wie vollständig die frühere Aggregation

aufgehoben ist. Diese Zeit ist für AO und BO etwas verschieden, der Unterschied beträgt ungefähr 10 Minuten, nachdem aber die Aggregation zustande gekommen ist, gehen AO und BO, wie man sieht, vollkommen parallel.

Sowohl makro- als auch mikroskopisch ist zwischen K und O hinsichtlich der Geldrollenbildung ein unerhörter Unterschied vorhanden: in K ist sie kaum mikroskopisch nachweisbar, in O sehr stark, wie überhaupt im Pferdeblut.

Bestimmung der Hypotonieresistenz bei den scharf zentrifugierten Blutkörperchen in BK und BO.

Beginnende Hämolyse in K = 0,45% NaCl,
 „ „ „ O = 0,54% „

Durch Cholesterinzusatz wurde also die Resistenz bedeutend vermehrt, was ja zu erwarten war, vgl. z. B. *Brinkmann* und *van Dam* (8). Cholesterinbestimmung: Bloorextraktion, spektrophotometrisch. K ist, nachdem das Cholesterin ausgefallen und sedimentiert hat, vollständig klar.

K = 1,13⁰/₀₀ } reduziert auf das ursprüngliche
 O = 0,67⁰/₀₀ } Volumen.

Versuch 6. Senkungsprobe in mit Cholesterin versetztem Menschenplasma. Ist die Fällungsgrenze Globulin—Albumin durch den Cholesterinzusatz verschoben worden?

Menschenblut. Koagulation durch gesättigte Na-Citratlösung zu 1⁰/₀₀ verhindert. Plasma lipämisch. Zusatz von Cholesterin in gewöhnlicher Weise. Senkungsreaktion wie im vorhergehenden Versuch.

A.

Tabelle XIV.

Minuten nach Beginn	20	40	60	18 × 60
mm Senkung K	0	1	1	29
„ „ O	5	12	20	97

In diesem Falle entstand kein flockiger Cholesterinniederschlag; das Plasma blieb diffus trübe.

Zur Ermittlung, ob sich die Fällungsgrenzen Globulin—Albumin durch den Cholesterinzusatz verschoben hatten, wurden gravimetrische Eiweißbestimmungen teils an K und O, teils an der klaren Flüssigkeit von K und O nach Zusatz gleicher Volumina Am₂SO₄ und Zentrifugieren (GK und GO) gemacht.

Tabelle XV.

	cem	g Eiweiß gewaschen und getrocknet	% Eiweiß reduziert auf das ursprüngliche Volumen
K	0,5	0,0294	8,82
O	0,5	0,0293	8,79
GK	3,0	0,0436	} 4,34
GK	3,0	0,0431	
GO	3,0	0,0431	
GO	3,0	0,0434	

In diesem Falle hat für Ammoniumsulfat keine Verschiebung der Fällungsgrenze des Globulins stattgefunden. (Vgl. auch die Versuche 13, 18.)

Versuch 7. Senkungsversuche mit ungewaschenen Blutkörperchen in Mischungen von mit Cholesterin behandeltem Plasma und Kontrollplasma.

1 Volumen Pferdeplasma (K) wurde mit 0,423 Volumen einer Cholesterinsuspension versetzt, die im Apparat Abb. 2 hergestellt worden war. (Die Suspension enthielt 0,01^o/₁₀₀ Ölsäureseife sowie vom Beginn an 1 g Cholesterin/100 cem. Etwas feste Substanz ging durch Eintrocknen am Umrührer und Becher aus der Lösung verloren.) Ferner wurde 0,077 Volumen n/1 NaCl zugesetzt. Ein zweiter Teil Plasma (O) wurde in derselben Weise behandelt, nur mit dem Unter-

Tabelle XVI.

Bloorextraktion und spektrophotometrische Cholesterinbestimmung.

	Cholesterin berechnet auf unverdünntes Plasma % ₁₀₀	Durchschnittswert % ₁₀₀
K	{ 0,98 0,98	} 0,98
O	{ 0,72 0,73	

Tabelle XVII.

Senkungsprobe mit hartzentrifugierten, ungewaschenen Blutkörperchen.

Nr.	cem Blut- körperchen	cem K	cem O	mm Senkung nach Minuten								
				30	45	60	75	90	105	120	150	180
1	1,2	1,8	0	0	0	0	0	0,5	1	1	1	1,5
2	1,2	1,5	0,3	0,7	1	1,5	1,7	2	2	2,5	3	3,5
3	1,2	1,2	0,6	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4	5	5,5
4	1,2	0,9	0,9	2,0	3	4,0	5	5,5	6	7	8	9
5	1,2	0,6	1,2	4,0	6	8	10	11,5	13	15	18	21
6	1,2	0,3	1,5	9,5	15	20	24	28	32	37	42	48
7	1,2	0	1,8	13,5	22	30	37	44	50	57	68	79

schied, daß anstatt der Cholesterinsuspension 0,01⁰/₀₀ige Seifenlösung benutzt wurde. Nach 18 Stunden konnte das ausgefällte Cholesterin herunterzentrifugiert werden, so daß auch K völlig klar wurde.

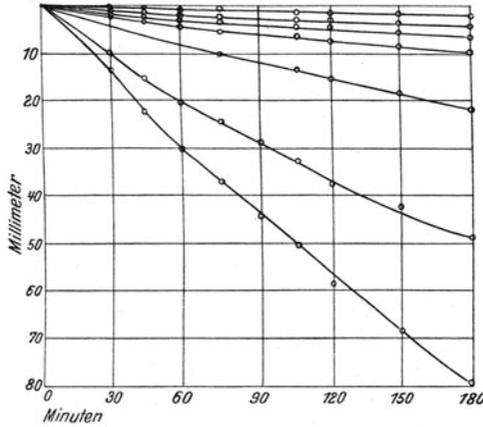


Abb. 4.

Die auf diese Weise erhaltenen Werte bilden miteinander approximativ eine geometrische Reihe mit dem Quotienten = $\frac{1}{2}$. Die einzigen, etwas abweichenden Werte zeigt Nr. 6, sonst ist die Übereinstimmung auffallend. Vergleiche untenstehende Tabelle.

Tabelle XVIII.

Gef. = gefunden. Ber. = berechnet.

Nr.	30 Min.		45 Min.		60 Min.		75 Min.		90 Min.	
	Gef.	Ber.								
7	13,5	13,5	22	22	30	30	37	37	44	44
6	9,5	7	15	11	20	15	24	19	28	22
5	4	3,5	6	6,5	8	7,5	10	9,5	11,5	11
4	2	2	3	3	4	4	5	5	5,5	5,5
3	1,5	1	2	1,5	2,5	2	3	2,5	3,5	2,75
2	0,7	0,5	1	0,75	1,5	1	1,7	1,25	2	1,4
1	0	0	0	0	0	0,5	0	0,6	0,5	0,7

Nr.	105 Min.		120 Min.		150 Min.		180 Min.	
	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.
7	50	50	57	57	68	68	79	79
6	32	25	37	29	42	34	48	40
5	13	12,5	15	14,5	18	17	21	20
4	6	6	7	7	8	8,5	9	10
3	4	3	4	3,5	5	4	5,5	5
2	2	1,5	2,5	1,8	3	2	3,5	2,5
1	1	0,8	1	1	1	1	1,5	1,3

Nachdem die Cholesteringehalte in K bzw. O 0,98 und 0,73⁰/₁₀₀, berechnet an unverdünntem Plasma, ausmachten, oder 0,65 bzw. 0,49⁰/₁₀₀ in den verdünnten Plasmen, in welchen die Senkungsproben ausgeführt wurden, begegnet man der recht überraschenden Tatsache, daß eine Steigerung des im Plasma gelösten Cholesterins mit nur 0,03⁰/₁₀₀ in diesem Falle die Senkungsgeschwindigkeit um die Hälfte verringert hat.

Daß die Zunahme in der Suspensionsstabilität durch Cholesterinzusatz nicht immer so stark ist wie in den vorhergehenden Versuchen, zeigt der folgende

Versuch 8. Senkungsprobe mit sowohl gewaschenen als auch ungewaschenen Blutkörperchen in mit Cholesterin behandeltem und unbehandeltem Plasma.

Pferdeplasma wurde in bereits angegebenen Proportionen mit n NaCl und mit Cholesterinsuspension 1,2 ‰, enthaltend 0,02⁰/₁₀₀ Seife (K), bzw. mit 0,02⁰/₁₀₀ Seife (O) versetzt. Der entstandene Niederschlag des Cholesterins durfte 2 Tage im Eisschrank bei etwa + 3° C spontan sedimentieren. Dann wurden K und O zentrifugiert, bis K klar wurde. 4,5 ccm (entsprechend 3 ccm ursprüngliches Plasma) von K und O wurden in Alkohol hineingetroppt, darauf wurde Extraktion in Soxhletapparaten vorgenommen. Spektrophotometrische Cholesterinbestimmungen:

$$\begin{array}{l} K = 0,947 \\ K = 0,953 \\ O = 0,744 \\ O = 0,748 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} K \\ K \\ O \\ O \end{array}} \right\} \begin{array}{l} 0,950^{0}/_{100}, \\ 0,746^{0}/_{100}. \end{array}$$

Senkungsprobe: 1 Volumen frische Blutkörperchen + 1,5 Volumen Plasma.

A.

Tabelle XIX.

Zeit Min.	Ungewaschene Blutkörperchen		Dreimal in physiol. NaCl gewaschene Blutkörperchen	
	K mm	O mm	K mm	O mm
30	25	34	14	13
40	40	54	23	28
50	54	76	31	42
60	68	94	38	55
70	81	103	43	67
80	—	—	52	79
90	—	—	57	87
12 × 60	121	123	109	112

Der Rest der Mischungen der gewaschenen Blutkörperchen und Plasma wurde 50 Minuten, nachdem A in Gang gesetzt war,

neuerdings wie in A gemischt, und neue Senkungsproben wurden vorgenommen. Resultat:

B.

Tabelle XX.

Min.	Gewaschene Blutkörperchen	
	K mm	O mm
30	8	17
40	15	31
50	21	44
12 × 60	106	110

Auch in diesen Versuchen ist nach Cholesterinzusatz eine augenscheinlich gesteigerte Suspensionsstabilität zu bemerken. Das Cholesterin scheint auf die gewaschenen Blutkörperchen langsamer einzuwirken. Noch 30 Minuten nach Mischung von Blutkörperchen und Plasma war der Senkungswert in K und O ungefähr derselbe. Wirken K und O unter 50 Minuten auf die gewaschenen Blutkörperchen ein, tritt der früher nachgewiesene, verzögernde Effekt des Cholesterins auf die Senkungsgeschwindigkeit schon von Anfang an zutage.

Versuch 9. Senkungsproben in Pferdeplasma, versetzt mit verschiedenen Cholesterinsuspensionen und mit nur Seifelösungen. Viskositätsbestimmung.

Pferdeplasma wurde mit 0,475 Volumen von folgenden Cholesterinsuspensionen versetzt:

- | | | |
|---|---------------------------------------|----------------------------------|
| 1. 0,64% Cholesterin, 0,1 ^{0/00} | Ölsäureseife (AK)
" (BK)
" (CK) | } + 0,025 Volumen
18%ige NaCl |
| 2. 0,64% " 0,04 ^{0/00} | | |
| 3. 0,42% " 0,01 ^{0/00} | | |

Das Cholesterin schied in gewöhnlicher Weise aus, am raschesten in BK (vgl. die Senkungsgeschwindigkeit), Zentrifugieren bis klar.

Kontrollen mittels 1 Volumen Plasma + 0,475 Volumen Seifelösungen von derselben Stärke wie in den zugesetzten Suspensionen, + 0,025 Volumen 18%ige NaCl bzw. AO, BO, CO.

Tabelle XXI.

Senkungsprobe mit 0,7 ccm ungewaschenen Blutkörperchen + 1,0 ccm Plasmamischungen.

Plasma	30 Min.	65 Min.	180 Min.
AK	1	2	9
AO	60	114	128
BK	2	4	11
BO	57	113	126
CK	1	3	8
CO	36	94	119

Diese Versuche scheinen zu zeigen, daß sowohl der Cholesterin-gehalt in den Suspensionen (vgl. AK und CK) als auch der Seifengehalt und der damit zusammenhängende Dispersitätsgrad für die Senkungshemmung von untergeordneter Bedeutung sind. Wahrscheinlicher wohl liegt jedoch die Sache so, daß in diesem Falle auch die kleinste Cholesterin- und Seifekonzentration hinreichend war, eine maximale Senkungshemmung mit einer nahezu aufgehobenen Aggregations-tendenz zwischen den Blutkörperchen hervorzurufen. Der folgende Versuch zeigt den Einfluß der Na-Ölsäureseifen an und für sich. 4 ccm Plasma (zu jeder Probe) wurden mit verschiedenen Mengen 1⁰/₁₀₀iger Ölsäureseiflösung laut Tabelle XXII und 0,1 ccm 18⁰/₁₀₀iger NaCl-Lösung versetzt, worauf das Volumen bis 6 ccm komplettiert wurde. Danach wurden 4,2 ccm ungewaschener Blutkörperchen zugesetzt und die Senkungsprobe ausgeführt. Resultat:

Tabelle XXII.

Nr.	ccm Seiflösung in 1 ⁰ / ₁₀₀ zugesetzt	Konzentration der zugesetzten Seife- lösung in Plasma- mischung, ⁰ / ₁₀₀	mm Senkung nach		
			20 Min.	45 Min.	80 Min.
1	1,9	0,32	6	19	37
2	0,6	0,10	21	69	104
3	0,2	0,03	24	81	110
4	0,02	0,003	23	81	112
5	0	0	24	82	112

Von diesen entspricht Nr. 3 ungefähr der höchsten in dieser Arbeit durch Zusatz von Cholesterinsuspension jemals erreichten Gesamtkonzentration der Na-Ölsäureseife, nämlich 0,03⁰/₁₀₀. Wie man sieht, weist diese praktisch dieselbe Senkungsgeschwindigkeit auf wie ein Zusatz von reinem Wasser. Bei höheren Konzentrationen wird das Verhältnis ein anderes; Nr. 1 mit der Seifekonzentration 0,32⁰/₁₀₀ zeigte demnach eine offensichtlich reduzierte Senkungsgeschwindigkeit. Eine so hohe Konzentration ist doch von mir niemals verwendet worden.

Die relative Viskosität wurde an AK und AO bei 18⁰ C gemessen.

$$AK = 1,482,$$

$$AO = 1,482.$$

Der Cholesterinzusatz wirkt also nicht merkbar auf die Viskosität ein; dies war auch kaum von einem hydrophoben Kolloid in niedriger Konzentration zu erwarten. Indessen zeigt das Cholesterin unter diesen Umständen auch Züge, welche auf eine gewisse Hydrophilie hindeuten: so z. B., daß es beim Zentrifugieren auf den Boden sinkt, trotzdem es im trockenen Zustande leichter ist als Wasser. Vgl. auch *Remesow* (75).

Spektrophotometrische Cholesterinbestimmungen nach Extraktion von 7,5 ccm (entsprechend ursprünglich 5 ccm) 4 Stunden mit Alkohol im Soxhlet.

$$\left. \begin{array}{l} \text{AK} = 1,36^{0/100} \\ \text{BK} = 1,02^{0/100} \\ \text{CK} = 1,00^{0/100} \\ \text{AO} = 0,69^{0/100} \end{array} \right\} \text{ (berechnet auf unverdünntes Plasma).}$$

In BK und CK hatte sich trotz des verschiedenen Schutzkolloid- und Cholesteringehalts in den zugesetzten Suspensionen ungefähr gleich viel Cholesterin gelöst. Der höhere Cholesteringehalt in AK beruht deutlich, wenigstens teilweise, auf dem grobdispersen, als eine Trübung sichtbaren Teil des Cholesterins. *Dieser hat, wie bereits nachgewiesen wurde, keine Einwirkung auf die Senkungsgeschwindigkeit.*

Versuch 10. Senkungsprobe, Hämatokritbestimmung sowie Versuch zu ermitteln, ob das zugesetzte Cholesterin ganz oder teilweise von den Blutkörperchen adsorbiert wird.

Blut von demselben Pferde wie im vorhergehenden Versuch 6 Tage später. Plasma wurde wie in BK behandelt (siehe Versuch 9) und als B, K bezeichnet. Ein anderer Teil, entsprechend B, O, wurde B, O genannt. Zentrifugieren von B, K und B, O 20 Stunden lang bei 3500 Umdrehungen pro Minute machte B, K ebenso klar wie B, O.

Tabelle XXIII.

Senkungsprobe: 0,7 Volumen ungewaschener Blutkörperchen + 1,0 Volumen Plasma.

Plasma	Millimeter nach		
	60 Min.	120 Min.	180 Min.
B, K	0	0,5	1
B, O	36	72	98

Ungewaschene, kräftig zentrifugierte Blutkörperchen wurden in zwei verschiedenen Röhrcchen gewogen und mit gleichem Gewicht B, K und B, O versetzt. Nach Mischung wurde Hämatokritbestimmung an einem Teil der Mischungen ausgeführt. Das Zentrifugieren wurde fortgesetzt, bis die Blutkörperchenpfeiler lackfarben waren.

B, K = 45% } Das Zellvolumen wurde also durch Cholesterinzusatz
 B, O = 45% } nicht verändert.

2 Stunden nachdem B, K und B, O mit den Blutkörperchen vermischt worden, wurden diese hinunterzentrifugiert und Cholesterinbestimmungen in sowohl B, K und B, O vor und nach der oben beschriebenen Behandlung mit Blutkörperchen ausgeführt. 7,5 ccm (entsprechend 5 ccm unverdünntem Plasma) wurden mit Alkohol

ausgefällt und im Soxhlet mit Alkohol mehrere Stunden extrahiert. Spektrophotometrische Cholesterinbestimmungen. Promille Cholesterin berechnet auf unverdünntes Plasma.

Tabelle XXIV.

Vor Behandlung mit Blutkörperchen		Nach Behandlung mit Blutkörperchen	
B, K	B, O	B, K	B, O
1,013	0,713	0,844	0,741
1,005	0,724	0,810	0,719
0,958	—	0,806	0,724
Mittel in ‰:			
0,992	0,719	0,820	0,728

Zwischen B, O vor und nach der Behandlung mit Blutkörperchen war also kein sicherer Unterschied vorhanden, aber in B, K war der ursprüngliche Gehalt 0,99‰ durch die Behandlung mit Blutkörperchen auf 0,82‰ heruntergegangen.

Der zugeführte Überschuß an gelöstem Cholesterin kann also teilweise entweder in die Blutkörperchen hineindiffundieren oder an deren Oberfläche adsorbiert werden; letzteres ist wohl das Wahrscheinlichere.

B, K und B, O wurden mit gesättigter Am_2SO_4 -Lösung bis 27 % Sättigung versetzt; der Niederschlag an „Fibrinogen“ wurde abzentrifugiert. Von den klaren Flüssigkeiten FK und FO wurden 12 ccm mit Alkohol im Soxhlet extrahiert. Die Reste wurden mit gesättigter Am_2SO_4 -Lösung bis 50 % Sättigung versetzt; erneutes Zentrifugieren. Von den klaren Flüssigkeiten GK und GO wurden 20 ccm im Soxhlet extrahiert. Spektrophotometrische Cholesterinanalysen.

Tabelle XXV.

Promille Cholesterin, berechnet auf unverdünntes Plasma.

FK	FO	GK	GO	B, K	B, O
0,933	0,741	0,572	0,554	—	—
0,915	0,719	0,576	0,545	—	—
Mittel:					
0,924	0,730	0,574	0,550	0,992	0,728

FO hielt demnach innerhalb der Fehlergrenzen ebensoviel Cholesterin wie B, O fest; mit der „Fibrinogen“-Fraktion wurde hier kein Cholesterin ausgefällt. FK enthielt etwas weniger Cholesterin als B, K, aber die Hauptmasse des zugesetzten und gelösten Cholesterins schied mit der „Globulin“-Fraktion aus; die Filtrate GK und GO enthielten un-

gefähr gleich viel. Dies stimmt gut mit den Erfahrungen in Versuch 24 überein. Ein geringerer Teil des zugesetzten Cholesterins wird an das in geringerer Menge vorkommende Fibrinogen gebunden, ein größerer Teil an das wenigstens im Pferdeserum reichlichere Globulin. Der in freier Form verbleibende Rest scheint ebenfalls, wenigstens zum größten Teil, bei Halbsättigung mit Am_2SO_4 ausgefällt zu werden, was ja bei dieser hohen Salzkonzentration nicht staunenswert wird.

Versuch 11. Senkung der ungewaschenen Blutkörperchen in Plasma + Cholesterinsuspensionen von verschiedener Konzentration und Dispersität. Oberflächenspannungsbestimmungen an Plasmamischungen. Bestimmung der elektrischen Ladung der Blutkörperchen nach Aufenthalt in verschiedenen Plasmamischungen.

1 Volumen Pferdeplasma wurde mit verschiedenen Suspensionen und Lösungen laut Tabelle XXVI versetzt:

Tabelle XXVI.

Nr.	Zusatz: 0,475 Vol.	Volumen NaCl 18 ‰
1	Cholesterinsuspension, 0,9 %, in 0,05 ‰ Seifelösung, nicht zentrifugiert	0,025
2	Dieselbe Cholesterinsuspension, 0,6 %, in 0,05 % Seifelösung, stark zentrifugiert	0,025
3	1 Vol. Cholesterinsuspension Nr. 2 + 9 Vol. H_2O	0,025
4	Cholesterinsuspension, 0,1 %, in 0,005 ‰ Seifelösung	0,025
5	„ „ 0,1 %, „ 0,05 ‰	0,025
6	Alkoholfreie Mastixsuspension, von anfänglich 1 %, stark ausgefällt beim Verdunsten	0,025
7	Seifelösung, 0,05 ‰	0,025
8	„ 0,005 ‰	0,025

Senkungsprobe unmittelbar nachdem 1 Volumen von jeder der obenstehenden, nicht zentrifugierten, kurz vorher zubereiteten Mischungen mit 0,7 Volumen ungewaschenen Blutkörperchen versetzt worden war.

A.

Tabelle XXVII.

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8
mm Senkung nach 70 Min.	3	4	14	4	1,5	4	16	14

Nach dieser Zeit wurde der Versuch unterbrochen. Der Inhalt in den Senkungsröhrchen wurde in die Vorratsröhrchen hineingespritzt, alles durch dreimaliges Umdrehen der Röhrchen neu gemischt und neue Senkungsproben gemacht, um zu ermitteln, ob das Cholesterin allmählich auf die Blutkörperchen einwirkte.

B.

Tabelle XXVIII.

Nr.	Millimeter Senkung nach		
	70 Min.	180 Min.	240 Min.
1	1	1	1,2
2	1	1	1,2
3	16	45	59
4	2	4	4
5	1	1,5	1,5
6	7,5	18	24
7	7,5	47	64
8	15	61	79

Vergleicht man die Werte bei 70 Minuten in A und B, findet man, daß Nr. 1 und 2 nach 70 Minuten noch mehr gehemmt sind, Nr. 3 hält sich ungefähr konstant, Nr. 4 ist noch mehr verzögert. Interessant ist der große Unterschied zwischen Nr. 3 und 4: die zugesetzten Cholesterinsuspensionen waren in bezug auf sowohl Cholesterin als auch Seife gleich konzentriert, nur die Darstellung war verschieden; Nr. 3 wurde von Anfang an in konzentrierterer Form hergestellt und später zehnmal verdünnt, Nr. 4 wurde direkt in der Konzentration hergestellt, in der sie zugesetzt wurde. Der Dispersitätsgrad muß natürlich in Nr. 3, weil die Ausflockungstendenz mit der Konzentration rasch steigt, niedriger als in Nr. 4 gewesen sein. Das Resultat gibt eine Illustration von der Bedeutung des Dispersitätsgrades für die Cholesterineinwirkung, oder mit anderen Worten dafür, wieviel Cholesterin „sich löst“. Dies wird fernerhin bestätigt durch das Verhalten von Nr. 5, wo ein zehnmal größerer Gehalt an Schutzkolloid vorhanden war als in Nr. 4 und infolgedessen sicher eine bedeutend größere Dispersität. Die Senkungsgeschwindigkeit war hier ebenfalls beträchtlich geringer. Ein Vergleich mit den Versuchen 24 und 25 zeigt, wie kompliziert der Mechanismus tatsächlich sein dürfte: das zugesetzte Cholesterin wird teilweise und allmählich an Fibrinogen und Euglobulin gebunden, wodurch das freie, nicht eiweißgebundene selbstverständlich verringert wird. Wie diese beiden, einander entgegengesetzten Prozesse, die Bindung des Cholesterins an Fibrinogen und Globulin sowie dessen Adsorption an die Blutkörperchen in diesem Falle wirken, entzieht sich einer sicheren Beurteilung.

Daß es sich hier kaum um eine Einwirkung der Seife selbst handelt, geht aus einem Vergleich mit Versuch 9 hervor. Nr. 6, die Mastixsuspension, wurde nur als ein Beispiel für ein anderes negativ geladenes Kolloid mitgenommen. Auch diese erhöhte die Suspensionsstabilität, wenn auch nicht so sehr wie das Cholesterin.

Hinsichtlich des Unterschiedes zwischen Nr. 7 und 8 in den Versuchen B gilt das in Versuch 4 Gesagte, daß der Unterschied in der Hauptsache ein scheinbarer gewesen sein dürfte; nachdem der Aggregationsmechanismus anfangs das Seine getan, war die Senkungsgeschwindigkeit in beiden Proben tatsächlich ungefähr dieselbe. Zwischen 70 und 180 Minuten sinkt Nr. 7 von 7,5 auf 47 mm, d. h. 39,5 mm, Nr. 8 von 15 auf 61 mm, d. h. 46 mm; während der Periode 180 bis 240 Minuten in derselben Weise: Nr. 7 17 mm und Nr. 8 18 mm; im letzteren Falle darf man jedoch wohl mit einer beginnenden Zusammenballung der Blutkörperchen rechnen, welche den Senkungswert pro Zeiteinheit also vermindert. Nr. 8 zeigt demnach wirklich eine etwas größere Senkungsgeschwindigkeit; der Unterschied ist zwar nicht so groß, wie man, allein nach den 70 Minutenwerten zu urteilen, glauben sollte. Im übrigen stimmt die etwas niedrigere Suspensionsstabilität in Nr. 8 mit der etwas höheren Oberflächenspannung überein; siehe Tabelle XXIX.

Die *Oberflächenspannung* wurde in allen acht Plasmasuspensionsmischungen nach der Ringmethode von *Brinkman* und *van Dam* (7) und *Tominaga* (91) ausgeführt.

Tabelle XXIX.

	1	2	3	4	5	6	7	8	H ₂ O
K—G (nach <i>Tominaga</i>) g	0,113	0,113	0,126	0,113	0,107	0,130	0,125	0,130	0,144
Relative Oberflächenspannung	0,785	0,785	0,875	0,785	0,748	0,908	0,867	0,908	1,000

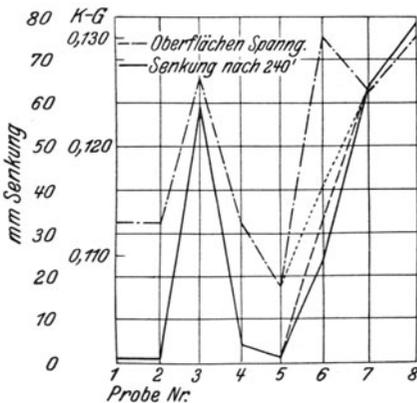


Abb. 5.

Bestimmung der elektrischen Ladung der Blutkörperchen nach Aufenthalt in verschiedenem Plasma.

- Die Blutkörperchen wandern nach der Anode.
- Die Blutkörperchen wandern überhaupt nicht.
- + Schwache Aggregation.
- ++ Mittelstarke Aggregation.
- +++ Sehr starke Aggregation.

Aus Abb. 5 geht hervor, daß Oberflächenspannung und Senkungsgeschwindigkeit einander vollständig folgen, ausgenommen Nr. 6 (mit Mastix). Das Mastix scheint die Senkungsgeschwindigkeit zu verringern,

ohne daß es die Oberflächenspannung senkt. Bezüglich des Cholesterins entspricht durchweg eine höhere Senkungsgeschwindigkeit einer größeren Oberflächenspannung, und umgekehrt.

Ein Tropfen der kräftig zentrifugierten Blutkörperchen wurde mit 5 ccm $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ in physiologischer NaCl -Lösung gemischt.

Tabelle XXX.

Molarität $\text{La}(\text{NO}_3)_3$	Blutkörperchen aus Nr. 2		Blutkörperchen aus Nr. 4		Blutkörperchen aus Nr. 6		Blutkörperchen aus Nr. 8	
	Kata- phorese	Aggre- gation	Kata- phorese	Aggre- gation	Kata- phorese	Aggre- gation	Kata- phorese	Aggre- gation
$\frac{1}{500}$	0	+++	0	+++	0	+++	0	+++
$\frac{1}{1000}$	—	0	0	+++	0	+++	0	+++
$\frac{1}{2000}$	—	0	—	0	0	++	0	+++
Reine phys. NaCl	—	0	—	0	—	0	—	0

Die Kataphoreseversuche wurden sogleich nach dem Vermischen gemacht, die Aggregation wurde nach 2 Stunden abgelesen.

Versuch 12. Senkungsprobe nach Zusatz verschieden konzentrierter Cholesterinsuspensionen zum Plasma. Oberflächenspannungsbestimmungen in den Plasmamischungen und Entladungsbestimmungen der Blutkörperchen.

Pferdeblut: Koagulation verhindert mit $1\%_{00} \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

Probe 1: 1 Volumen Plasma + 0,475 Volumen 0,87%iger Cholesterinsuspension mit 0,05%iger Seife + 0,025 Volumen 18%ige NaCl .

Probe 2: 1 Volumen Plasma + 0,475 Volumen 0,09%iger Cholesterinsuspension mit 0,05%iger Seife + 0,025 Volumen 18%iger NaCl .

Probe 3: 1 Volumen Plasma + 0,475 Volumen 0,05%iger Seife + 0,025 Volumen 18%iger NaCl .

Die Senkungsprobe wurde nach zweistündigem Zentrifugieren gemacht; Nr. 1 und 2 waren noch nicht völlig klar. 1 Volumen Plasma + 0,7 Volumen Blutkörperchen.

A.

Senkungsprobe unmittelbar nachdem die Blutkörperchen in die Plasmamischungen hineinpipettiert waren.

Tabelle XXXI.

Nr.	Millimeter Senkung nach		
	70 Min.	130 Min.	180 Min.
1	1	2	3
2	18	35	48
3	27	53	79

B.

3 Stunden später, nachdem man annehmen konnte, daß das Cholesterin adsorbiert war, wurden mit dem Rest in den Vorratsröhren neue Senkungsproben angestellt.

Tabelle XXXII.

Nr.	Millimeter Senkung nach		
	70 Min.	130 Min.	19 × 60 Min.
1	0	1	7
2	2	7	75
3	20	44	105

In Nr. 1 und besonders in Nr. 2 ist ein auffallender Unterschied zwischen A und B wahrzunehmen (vgl. Versuche 8, 11). In bezug auf den Unterschied zwischen A 3 und B 3 gilt dasselbe, was betreffend der Versuche 4 und 11 (S. 28 u. 39) gesagt wurde. Zwischen 70 und 130 Minuten sanken A 3 26 mm, B 3 24 mm, also im großen ganzen gleich viel.

Tabelle XXXIII.

Oberflächenspannung: „Ringwert“ des Wassers = 0,147 g.

Nr.	K-G (nach <i>Tominaga</i>) in g	Relative Oberflächenspannung
1	0,112	0,762
2	0,119	0,808
3	0,134	0,912

Hier tritt derselbe Zusammenhang zwischen Cholesterin, Oberflächenspannung und Senkungsgeschwindigkeit zutage wie in den vorhergehenden Versuchen.

Die Bestimmung der elektrischen Ladung der Blutkörperchen geschah in derselben Weise wie in den vorhergehenden Versuchen.

Tabelle XXXIV.

Molarität La(NO ₃) ₃	1		2		3	
	Kataphorese	Aggregation	Kataphorese	Aggregation	Kataphorese	Aggregation
1/500	0	+++	0	+++	0	+++
1/1000	schw. —	+++	0	+++	0	+++
1/2000	—	+	schw. —	+++	0	+++
1/4000	—	0	—	+	schw. —	+++
1/8000	—	0	—	0	—	++
Na Cl phys.	—	0	—	0	—	0

Die Aggregation wurde nach 3 Stunden makroskopisch abgelesen. Die Entladung scheint nach dieser Zeit, als die Kataphoreseversuche

ausgeführt wurden, etwas weiter gegangen zu sein, als unmittelbar nachdem die Mischungen in Ordnung gemacht worden waren.

Nachdem Nr. 1, 2 und 3 einige Tage kräftig zentrifugiert worden waren, erhielt man Nr. 1 und 2 (Nr. 3 war natürlich von vornherein klar) vollständig klar. Spektrophotometrische Cholesterinanalysen nach Soxhletextraktion von 4,5 ccm (entsprechend 3 ccm unverdünntem Plasma).

Tabelle XXXV.

Nr.	% ₁₀₀ Cholesterin, berechnet auf unverdünntes Plasma	
1	1,36	} 1,34
	1,35	
	1,31	
2	1,30	} 1,29
	1,29	
	1,29	
3	1,02	} 1,02
	1,02	
	1,02	

Versuch 13. Einwirkung der Cholesterin- und Lecithinsuspensionen auf die Senkungsgeschwindigkeit. Oberflächenspannungs-Bestimmungen an Cholesterin- und Lecithinsuspensionen und Seifelösungen. Viskositätsbestimmungen und Eiweißfraktionsbestimmungen.

Pferdeplasma wurde mit folgenden Lösungen versetzt:

K = 1 Volumen Plasma + 0,475 Volumen 0,9%iger Cholesterinsuspension in 0,045%iger Seife + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

L = 1 Volumen Plasma + 0,475 Volumen 0,63%iger Lecithinlösung (rein, synthetisch) + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

O = 1 Volumen Plasma + 0,475 Volumen 0,045%iger Seife + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

Tabelle XXXVI.

Senkungsprobe mit 1 Volumen K, L und O + 0,7 Volumen ungewaschener Blutkörperchen.

Plasma	mm Senkung nach	
	70 Min.	130 Min.
K	2	3
L	3	6
O	39	70

Das Lecithin hemmte demnach die Blutkörperchensenkung in nahezu ebenso hohem Grade wie das Cholesterin. Oberflächenspannungsbestimmungen an den zugesetzten Suspensionen:

Tabelle XXXVII.

	K-G (nach Tomimaga) in g	Relative Oberflächenspannung
Cholesterinsuspension, 0,9%ig, mit 0,045 % Seife	0,0980	0,685
0,045 % Seife allein	0,0905	0,633
Lecithinsuspension	0,139	0,972
Ringwert des Wassers	0,143	1,00

Lecithin setzte also die Oberflächenspannung nur unbedeutend herunter, Cholesterin mit Seife dagegen stark. Daß Seife allein diese noch stärker als in Mischung mit dem an und für sich die Oberflächenspannung senkenden Cholesterin herabsetzt, scheint zuerst paradoxal, zumal beim Vergleich mit Versuch 11. Die Erklärung hierfür muß jedoch die sein, daß die Seife in der Cholesterinsuspension in der Außenschicht der Cholesterinpartikelchen adsorbiert liegt und dadurch zu einem gewissen Grade verhindert wird, an die Oberfläche zu kommen, um dort den starken, die Oberflächenspannung senkenden Effekt auszuüben, der in der reinen Seifenlösung zum Vorschein kommt, vgl. *Iscovesco* (37). Im Plasma wird wahrscheinlich die zugesetzte kleine Seifenmenge quantitativ von den Plasmakolloiden adsorbiert, weshalb eine Senkung der Oberflächenspannung oder eine Verzögerung der Senkung (vgl. Versuch 9) bei diesen kleinen Seifenmengen nicht zustande kommen dürfte, hingegen selbstverständlich in höheren Seifenkonzentrationen.

Tabelle XXXVIII.

Viskositätsmessungen an K, L und O.

	Durchlaufzeit Sek.	Spez. Gew.	Relative Viskosität	Durchschnittswert
H ₂ O	44,0	1	1,00	1,00
K	58,2	1,018	1,34	1,35
K	58,4	1,018	1,35	
K	58,3	1,018	1,345	
L	83,2	1,018	1,92	1,93
L	83,6	1,018	1,93	
O	58,6	1,018	1,35	1,35
O	58,6	1,018	1,35	

Während also Cholesterin die Viskosität nicht beeinflußt (vgl. Versuch 9), wird diese durch Lecithin höchst bedeutend gesteigert.

Das in diesem Falle zugesetzte Lecithin entspricht einer Steigerung des Gehalts im fertig verdünnten L von $2,0\frac{0}{100}$, also eine recht anspruchslose Menge, wohl denkbar wenigstens als pathologische Variation. *Selbst wenn* dieser Versuch nicht ohne weiteres auf die nativen Verhältnisse im Plasma übertragen werden kann, *so muß* dennoch zugegeben werden, daß das Resultat, z. B. die übrigens allgemein kritisierte *Rohrer*sche Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten im Serum mittels der Viskosität, sehr fragwürdig macht.

Tabelle XXXIX.

Bestimmung der Eiweißfraktionen in K, L und O nach *Theorell* und *Widström*.

Prozentgehalt Eiweiß, berechnet an unverdünntem Plasma.

	Fibrin %	Globulin %	Albumin %	Gesamteiweiß %
K	0,348	2,70	3,76	6,81 bestimmt
L	0,434	2,64	3,83	6,90 (ber. aus F + G + A)
O	0,347	2,59	3,87	6,81 bestimmt

Die Werte innerhalb der Fehlergrenzen dieser Mikromethode sind mit einer Ausnahme, dem hohen Wert für Fibrin in L, übereinstimmend. Dieser hohe L-Wert beruht indes darauf, daß das Fibrinkoagulum in L das meiste des zugesetzten Lecithins, das ja etwas stickstoffhaltig ist, in sich aufgenommen hat. Ob dies als Erklärungsgrund hinreicht, ist aber unsicher. Der Stickstoff kommt in Lecithin als ein Alkylamin vor; Cholin und Alkylamine lassen sich bei Verbrennung mit Schwefelsäure im allgemeinen nur mit Schwierigkeit spalten. In unverteilter Form sind sie einer Oxydation durch Hypobromit unzugänglich. Die Folge ist, daß bei der Methode *T. Teorells* nur ein Teil des in Alkylaminen vorhandenen Stickstoffs mit in den Analysenwert kommt. Es ist auch möglich, daß die Auswaschung der Mutterlauge aus dem großen aufgequollenen Koagulum in L nicht vollständig gelungen ist. Jedenfalls zeigen spätere Versuche (siehe Versuch 18), daß eine Steigerung des Fibringehalts durch Lecithinzusatz nicht stattfindet. Eine solche wäre auch a priori höchst unwahrscheinlich.

Versuch 14. *Einwirkung verschieden großer Lecithinzusätze zum Plasma auf die Senkungsgeschwindigkeit. Viskositätsmessungen an Plasma.*

K = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen 0,8%iger Cholesterinsuspension auf $0,04\frac{0}{100}$ iger Seife + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

L = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen 1%iger Suspension reinen, synthetischen Lecithins + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

O = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen H_2O + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

Tabelle XL.

Senkungsprobe direkt ohne Zentrifugieren.

Minuten nach Beginn	0,7 ccm ungewaschener Blutkörperchen					
	Nr. 1 1,0 ccm L	Nr. 2 0,75 ccm L + 0,25 ccm O	Nr. 3 0,50 ccm L + 0,50 ccm O	Nr. 4 0,25 ccm L + 0,75 ccm O	Nr. 5 1,0 ccm K	Nr. 6 1,0 ccm O
60	0,5	1	1,5	3	1	16
90	0,5	1,5	3,5	5,5	1,5	23
120	1	1,5	4,5	7,5	2	28
150	1	1,5	6,0	9	2,5	33
15 × 60	26	8	15	21	9	91
20 × 60	30	23	17	24	12	96
22 × 60	31	26	18	25	12	96

Die starke Hemmung sowohl durch Cholesterin als auch Lecithin tritt hier wie früher zutage. Nach 15 Stunden zeigt Nr. 1 eigentümlicherweise eine stärkere Senkung als Nr. 2, 3 und 4. Zwischen 15 und 20 Stunden macht Nr. 2 einen Ruck und sinkt in dieser Zeit mehr als während der ganzen Zeit vorher. Der ganze Verlauf in Nr. 1 und 2 erinnert etwas an die aus den klinischen Senkungsreaktionen bekannten sogenannten „Knickungen“, wo die Senkung erst nach einer geraumen Zeit in Gang kommt, 1, 2, 3 bis 4 Stunden, und dann plötzlich.

Tabelle XLI.

Viskositätsmessung.

	Durchlaufszeit Sek.	Spez. Gew.	Relative Viskosität
K	9,3	1,018	1,39
L	12,0	1,018	1,80
O	9,3	1,018	1,39
H ₂ O	6,8	1,000	1,00

Versuch 15. Einwirkung von Lecithin auf Senkungsgeschwindigkeit, Hypotonieresistenz, elektrische Ladung der Blutkörperchen. Untersuchung, ob sich Lecithin an die Blutkörperchen adsorbiert.

L = 20 ccm Pferdeplasma + 4,75 ccm 0,6%iger Lecithinsuspension
+ 0,25 ccm 18%iger NaCl.

O = 20 ccm Pferdeplasma + 4,75 ccm H₂O + 0,25 ccm 18%iger NaCl.

Tabelle XLII.

Senkungsprobe: 1 Volumen L bzw. O + 0,7 Volumen Blutkörperchen.

Min. nach Beginn	mm Senkung in	
	L	O
37	0,8	66
46	1	80
67	1	92
107	1	97

Die Blutkörperchen in L und O wurden herunterzentrifugiert und ihre Resistenz gegen hypotone Kochsalzlösungen geprüft.

- 0 = keine Hämolyse.
- + = beginnende Hämolyse.
- ++ = stärkere Hämolyse.
- +++ = vollständige Hämolyse.

Tabelle XLIII.

5 ccm NaCl-Lösung + 1 Tropfen Blutkörperchen.

% NaCl	0,90	0,81	0,72	0,63	0,585	0,54	0,495	0,45
L - Blutk.	0	0	++	+++	+++	+++	+++	+++
O - „	0	0	0	0	+	++	+++	+++

Das Lecithin senkte also die Hypotonieresistenz bedeutend, während Cholesterin dieselbe steigerte (vgl. Versuch 5).

Tabelle XLIV.

Entladungsversuche an L- und O-Blutkörperchen mit $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ in physiologischer Kochsalzlösung.

	Molarität von $\text{La}(\text{NO}_3)_3$					
	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16 000
L	+++	+++	+++	+++	+++	0
O	+++	+++	+++	+++	+++	0

Im Gegensatz zu Cholesterin konnte demnach auf diese Weise keine Entladung durch Lecithin festgestellt werden.

Es handelte sich alsdann darum, zu untersuchen, ob zugesetztes Lecithin von den Blutkörperchen adsorbiert wurde. Hierbei war es jedoch undenkbar, ohne weiteres Blutkörperchen zu L und O zuzusetzen und nach einer gewissen Zeit herunterzentrifugieren, denn der größte Teil des zugesetzten Lecithins kann als eine voluminöse, gelatinöse Masse wegzentrifugiert werden, in welcher, wie im folgenden gezeigt werden soll (Versuche 16, 17, 18 und 25), ein Teil des vorher im Plasma

vorhandenen Cholesterins adsorbiert war, weshalb sich dabei der Cholesteringehalt des Plasmas änderte und damit die Ladung der aufgeschlemmten Blutkörperchen. Deshalb wurde der Versuch so ausgeführt, daß zu gleichen Mengen L und O gleiche Mengen Blutkörperchen hinzugefügt wurden, worauf diese spontan sedimentieren durften, was für das L-Plasma natürlich lange Zeit (2 Tage) in Anspruch nahm. Die Zeit wurde dadurch etwas verkürzt, daß das Probierrohr in 45°-Winkel zur Unterlage gestellt wurde. Von der durch das Sinken der Blutkörperchen entstehenden obersten Plasmaschicht (L₁ bzw. O₁) wurden 3 ccm von jeder abpipettiert zwecks Lipoidanalysen. 5 ccm von L und 3 ccm von L₁ und O₁ wurden danach im Soxhlet extrahiert und in gewöhnlicher Weise behandelt. Cholesterinanalysen mit Stufenphotometer, P-Bestimmungen nach *Fiske-Subarow*. Bei den Cholesterinanalysen trat in diesem Falle, wohl infolge unvorsichtiger Eindunstung, eine leichte, kaum merkbare Verfärbung ein, für welche eine Korrektur gemacht wurde (siehe Kap. III).

Tabelle XLV.

Cholesterinbestimmungen.

E = Extinktionskoeffizient in 10 mm Schicht.

	Zu jeder Chol.-Best. ccm Extrakt	<i>E</i> S 61	<i>E</i> S 53	<i>E</i> reduz.	% ₁₀₀ Chol. in unverdünntem Plasma		% ₁₀₀ Lecithin reduziert auf unverdünntes Plasma	
						Mittel		
L							2,22	} 2,22
L						0,92	2,22	
O	3	0,368	0,136	0,347	0,91	} 0,92		
O	3	0,379	0,146	0,354	0,93			
L ₁	5	0,406	0,161	0,378	0,99	} 0,99	1,78	} 1,79
L ₁	5	0,419	0,193	0,378	0,99			
O ₁	5	0,383	0,167	0,350	0,92	} 0,93	1,08	} 1,07
O ₁	5	0,401	0,186	0,361	0,94			

Hinsichtlich der Cholesterinwerte ist der etwas hohe Wert L₁ zu notieren. Der Unterschied ist so gering, daß er auf einen Analysenfehler beruhen könnte; andererseits wäre es keineswegs undenkbar, daß das zugesetzte Lecithin aus den Blutkörperchen etwas Cholesterin adsorbieren könnte, oder vielleicht richtiger, daß das Cholesterin eine neue Verteilung zwischen Blutkörperchen und Plasma + zugesetztem Lecithin eingehe.

Die Lecithinwerte zeigen für L₁ im Verhältnis zu L eine starke Senkung, d. h. die Blutkörperchen haben einen Teil des Lecithins adsorbiert in derselben Weise, wie es mit dem Cholesterin der Fall war (vgl. Versuch 10).

Versuch 16. *Senkungsprobe und Lipoidanalysen in Plasma, versetzt mit Cholesterin bzw. Lecithin, wo der Überschuß wegzentrifugiert war.*

K = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen 0,79%iger Cholesterinsuspension in 0,04%iger Seife + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

L = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen 1%iger Lecithinsuspension + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

O = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen H₂O + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

Die Mischungen wurden kräftig zentrifugiert; L wurde vollständig klar, K blieb etwas trübe.

Tabelle XLVI.

Senkungsprobe mit 2 Volumen Plasmamischungen + 0,7 Volumen ungewaschenen, stark zentrifugierten Blutkörperchen.

	mm Senkung nach		
	20 Min.	40 Min.	60 Min.
K	17	47	69
L	15	52	75
O	21	58	82

Die Unterschiede in der Senkungsgeschwindigkeit waren in diesem Falle recht gering, was sich aus den Lipoidanalysen erklärt. Cholesterinbestimmung mit Stufenphotometer, P-Bestimmungen nach *Fiske-Subarow*.

Tabelle XLVII.

	Cholesterin ‰	Cholesterin- mittel ‰	Lecithin ‰	Lecithin- mittel ‰	Cholesterin + Lecithin
K	1,369 } 1,373 }	1,371	1,195 } 1,186 } 1,190 }	1,19	2,56
L	0,781 } 0,786 }	0,784	1,57 } 1,60 } 1,54 } 1,57 } 1,56 }	1,57	2,35
O	0,862 } 0,874 }	0,868	1,36 } 1,39 } 1,34 }	1,36	2,23

In diesem Falle hatte also wie gewöhnlich der wegzentrifugierte Lecithinüberschuß einen Teil Cholesterin aus dem Plasma mitgenommen, aber eigentümlicherweise hatte ganz analog der Cholesterinüberschuß einen Teil Lecithin mit sich gerissen. Diesen Effekt beim Cholesterin habe ich ab und zu beobachtet, aber er ist immer sehr schwach und nicht konstant.

Die Summe des Cholesterins und Lecithins wies infolge der vorberührten Gründe recht geringe Variationen auf, diese gehen indes vollkommen parallel mit der Senkungsgeschwindigkeit.

Versuch 17. Einwirkung von Cholesterin und Lecithin in verschiedenen Konzentrationen und Mischungen auf Lipoidgehalt und Senkungsgeschwindigkeit.

Pferdeplasma wurde teils mit 0,79%iger Cholesterinsuspension, mit 0,04⁰/₀₀iger Seife, teils mit 1%iger Lecithinsuspension nach folgendem Schema versetzt:

Tabelle XLVIII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Plasma, ccm	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Cholesterinsuspension, ccm	2,7	1	0,5			2,2	1	0,5	
Lecithinsuspension, ccm				2,7	1	0,5	1,7	2,2	
H ₂ O, ccm		1,7	2,2		1,7				2,7
NaCl, 9%ig, ccm	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Nach zweitägigem Zentrifugieren in der Winkelzentrifuge im Eisschrank, um Fäulnis zu verhindern, waren alle, außer Nr. 1 und 6, völlig klar. Auch diese waren jedoch nur unbedeutend getrübt.

Dann wurden 4,5 ccm von jeder in gewöhnlicher Weise im Soxhlet extrahiert. Cholesterinbestimmungen mit Stufenphotometer. Nephelometrische P-Bestimmungen nach *Kleinmann*.

Senkungsreaktionen mit 1 Volumen Plasma + 0,7 Volumen frischen, ungewaschenen Blutkörperchen.

Die sämtlichen erhaltenen Werte sind in nachstehender Tabelle wiedergegeben.

Aus dieser Tabelle geht, wie schon früher, hervor, daß auch nach einem Zentrifugieren, das eine kristallklare Flüssigkeit gibt, ein Teil des zugesetzten Lecithins in Lösung bleibt (Nr. 4, 7, 8). Ferner erwies sich der Cholesteringehalt nach Wegzentrifugieren des Überschusses an zugesetztem Lecithin niedriger als vorher; das Lecithin hatte einen Teil des Plasmacholesterins aufgelöst oder adsorbiert (Nr. 4 und 5). Infolgedessen war in diesem Falle die Senkungsgeschwindigkeit in Nr. 4 und 5 größer als in Nr. 9, d. h. der verminderte Cholesteringehalt überkompensierte hier den gesteigerten Lecithingehalt (in Nr. 4; Nr. 5 hatte wahrscheinlich fehlerhaften Lecithinwert). Der Zusammenhang zwischen Suspensionsstabilität und Lipoidgehalt im Plasma war ziemlich offenbar; eine absolute Parallelität kann man kaum begehren, da die nephelometrische P-Bestimmung an Zuverlässigkeit etwas hinter den übrigen benutzten P-Bestimmungsmethoden zurückbleibt; außerdem gilt auch hier das über den Aggregationsmechanismus früher Erwähnte, nachdem

Tabelle IXL.

Nr.	mm Senkung nach 60 Min.	‰ Cholesterin	‰ Cholesterin Mittel	‰ Lecithin	‰ Lecithin Mittel	Zusatz zu 6 ccm Plasma	
						0,79 ‰ Cholesterin	1 ‰ Lecithin
1	31	1,04	1,04	1,07	1,09	2,7	
		1,04		1,11			
2	54	0,875	0,88	1,03	1,06	1,0	
		0,885		1,09			
3	59	0,817	0,81	1,06	1,09	0,5	
		0,807		1,12			
4	82	0,653	0,66	1,37	1,39		2,7
		0,658		1,40			
5	76	0,639	0,64	1,00	0,99		1,0
		0,640		0,98			
6	31	0,856	0,85	1,11	1,07	2,2	0,5
		0,849		1,03			
7	55	0,872	0,87	1,16	1,19	1,0	1,7
		0,875		1,21			
				1,20			
8	72	0,800	0,79	1,19	1,20	0,5	2,2
		0,777		1,21			
				1,21			
9	64	0,755	0,76	1,05	1,06		
		0,765		1,07			

ein vereinzelter Einstundenwert kaum als ein vollauf gültiger Ausdruck für die Senkungsgeschwindigkeit anzusehen ist (siehe Versuch Nr. 5). Vergleicht man Nr. 1, 2, 3 und 9, wird man einsehen, daß sich mit der zugesetzten Cholesterinmenge proportionale Mengen gelöst hatten (vgl. Versuch Nr. 9). In Nr. 6, 7 und 8 liegen schwer zu überblickende Verhältnisse vor, da das Lecithin ja teils den Cholesteringehalt durch Adsorption des Cholesterins an den wegzentrifugierbaren Überschuß vermindert, teils wahrscheinlich zu einem gewissen Grade den Cholesteringehalt durch Schutzkolloidwirkung auf das zugesetzte Cholesterin bei einem Teil des Lecithins, das in Lösung bleibt, vermehrt.

Versuch 18. Vergleich zwischen der Lipoidverteilung auf die verschiedenen Eiweißfraktionen in mit Lecithin versetztem Plasma und solchem ohne Lecithin.

L = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen 1%iger Lecithin-suspension + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

O = 1 Volumen Pferdeplasma + 0,475 Volumen H₂O + 0,025 Volumen 18%iger NaCl.

Unmittelbar nach Zubereitung von L und O wurde je ein Teil der beiden mehrere Stunden zentrifugiert. Nachdem L völlig klar war (O war bereits beim Beginn klar), wurden 4,5 ccm L und O (bezeichnet

mit *TL* und *TO*) im Soxhlet in gewöhnlicher Weise extrahiert. Während dies geschah, war der andere Teil von *O* und *L*, wo also noch Überschuß an Lecithin vorhanden war, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu 27 % Sättigung versetzt und klar zentrifugiert worden. Aus der klaren Mutterlauge *FL* und *FO* wurden Mengen entsprechend *TL* und *TO* im Soxhlet extrahiert, während die Reste mit noch weiterer gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu 50 % Sättigung versetzt und zentrifugiert wurden. Von der klaren Mutterlauge wurde ein Teil im Soxhlet extrahiert und mit *GL* und *GO* bezeichnet.

Tabelle L.

Cholesterinbestimmungen mit Stufenphotometer. P-Bestimmungen sowohl nephelometrisch als auch titrimetrisch mit NaBrO.

Extrakt	‰ Lecithin nephelometrisch	‰ Lecithin titrimetrisch	‰ Lecithin Mittelwert	‰ Cholesterin	‰ Cholesterin Mittelwert
TL	1,82	1,92	1,87	0,509 0,515	0,512
TO	1,28	1,30	1,29	0,509 0,521	0,515
FL	1,33	1,37	1,35	0,424 0,416	0,420
FO	0,91	0,91	0,91	0,416 0,422	0,419
GL	mißlungen	0,76 0,80	0,78	0,316 0,320	0,318
GO	0,78 0,75	mißlungen	0,77	0,324 0,312	0,318

Aus der Tabelle geht hervor, daß in diesem Falle keine sicher nachweisbare Herabsetzung des Cholesteringehalts durch die Lecithinbehandlung eingetreten ist. Bei einer energischeren Behandlung verringert sich jedoch der Cholesteringehalt regelmäßig (siehe Versuch 25). Das Lecithin hatte sich indes klar aufgelöst, so daß der Gehalt von 1,29 auf 1,87 ‰ stieg. Bei Sättigung mit Ammoniumsulfat zu 27 % verteilte sich das Gesamtlecithin zwischen „Fibrinogen“-Fällung und -Lösung in folgender Weise:

Tabelle LI.

	In der Fällung ‰ Lecithin	In der Lösung ‰ Lecithin
FL	0,52	72,2
Gesamtlecithin L	1,87 = 27,8	
FO	0,38	70,5
Gesamtlecithin O	1,29 = 29,5	

Versuch 19. Bestimmung der Lipoidverteilung an ausgefälltem und in Lösung zurückbleibendem Eiweiß bei Elektrodialyse und Ammoniumsulfatfraktionierung von Pferdeserum.

700 ccm frisches Pferdeserum, mit etwas Toluol versetzt, wurden in *W. Paulis* Apparat elektrodialysiert, bis nach zwei Tagen die Stromstärke auf Null heruntergegangen war und das eingekoppelte Voltmeter die Netzspannung 220 Volt aufwies. Hierunter wurde aus dem Serum „Euglobulin“ ausgefällt. Der Apparat wurde quantitativ mit destilliertem Wasser ausgespült. Infolge der Volumenverminderung während der Elektrodialyse wurde das schließliche Volumen nur 773 ccm nach der Spülung. Der Niederschlag wurde abgenutscht, aber nicht gewaschen. Statt dessen wurde der Niederschlag naß gewogen, das Gewicht eines gleich großen, nassen Filters abgezogen, der Wassergehalt an einem aliquoten Teil bestimmt; daraus konnte der Gehalt an Mutterlauge und nach der Bestimmung des Eiweißgehalts der Mutterlauge das Prozent „Euglobulin“ im Serum berechnet werden.

100 ccm des ursprünglichen Serums wurden mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Der Niederschlag an „Globulin“ wurde abgenutscht, dreimal mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen und das Volumen des Filtrats gemessen. Zu den Lipoidbestimmungen wurden folgende Mengen und Bezeichnungen verwendet:

Tabelle LIII.

	Bezeichnung	Die extrahierte Menge entsprach ccm ursprünglichen Serums
Ursprüngliches Serum	I	75
Dialyse-Filtrat	II	75
Dialyse-Niederschlag	III	700
Am ₂ SO ₄ -Filtrat	IV	100
Am ₂ SO ₄ -Niederschlag	V	100

Für die Lipoidextraktion wurden I, II und IV mit drei Volumen Aceton ausgefällt und zum Sieden erhitzt. Die entstandenen Niederschläge wurden abfiltriert und wie III und V mit Alkohol im Soxhletapparat extrahiert. Der Extrakt von III und V wurde im Vakuum eingedunstet und in 100 ccm Chloroform aufgenommen. Die Extrakte I, II und IV wurden mit den Filtraten aus den Acetonfällungen vereinigt und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Trocknen wurde darum vorgenommen, die empfindlichen Phosphatide beim Eindunsten vor allzuviel Wasser mit daraus folgenden höheren Temperaturen und Gefahr einer Hydrolyse zu schützen. Das Natriumsulfat wurde abfiltriert, mehrmals mit absolutem Alkohol auf dem Filtrum gewaschen und

danach das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wurde in 100 cem Chloroform aufgenommen.

Eiweißbestimmungen in I und IV wurden durch Zusatz von gleichen Volumina n/25 Essigsäure (+ etwas Am_2SO_4 zu I) ausgeführt; Koagulation über Wasserbad, Filtrieren der Niederschläge, Waschen auf SO_4'' auf einem Filtrum mit Wasser, mehrmaliges Auswaschen mit Alkohol und Äther, Trocknen und Wiegen.

Lipoidbestimmungen an den Extrakten: *P-Bestimmungen* nach *Pregl*. Die *Cholesterinanalysen* teils spektrophotometrisch, teils mit Digitonin nach *Windaus*: zuerst wurde der unbehandelte Extrakt mit Digitonin in alkoholischer Lösung gefällt. Das als Digitonid ausgefallte, freie Cholesterin wurde dann gewaschen, getrocknet und gewogen. Der Digitoninüberschuß im Filtrat wurde durch wiederholtes Ausschütteln zwischen Äther und Wasser im Scheidetrichter weggeschafft. Das Digitonin geht in die Wasserschicht ein, die Cholesterinester in die Ätherschicht. Der Äther wurde verdunstet, der Rückstand auf gewöhnliche Weise mit Na-Alkoholat verseift. Das frei gemachte Cholesterin wurde von Na-Alkoholat und Seifen durch wiederholtes

Tabelle LIV.

Nr.	Eiweiß %	Lecithin ‰		Freies Cholesterin ‰		Als Ester gebundenes Cholesterin ‰			
			I II + III IV + V		I II + III IV + V	Mit Digitonin bestimmt	Spektrophotometrisch bestimmt	I II + III IV + V	
								Mit Digitonin berechnet	Spektro- photometrisch berechnet
I	7,25	1,85	1,85	0,23	0,23	0,71	0,71	0,71	0,71
II	6,43	1,58	} 1,82 {	0,18	} 0,22 {	0,50	0,53	} 0,65	} 0,68
III	0,82	0,24		0,04		0,15	0,15		
IV	3,52	1,29		0,13		0,37	0,40		
V	3,73	0,57	} 1,86 {	0,09	} 0,22 {	0,32	0,33	} 0,69	0,72

Nr.	Gesamtcholesterin ‰			
	Mit Digitonin berechnet	Spektrophotometrisch berechnet	I II + III IV + V	
			Mit Digitonin berechnet	Spektrophotometrisch berechnet
I	0,94	0,94	0,94	0,94
II	0,68	0,71	}	0,87
III	0,19	0,19		
IV	0,50	0,53	}	0,91
V	0,41	0,42		

Ausschütteln zwischen Äther und Wasser im Scheidetrichter getrennt. Schließlich wurde das Cholesterin mit Digitonin wie früher bestimmt.

Die angegebenen Ziffern zeigen den berechneten Gehalt des ursprünglichen Serums.

Da hier innere Kontrollen durchwegs vorhanden sind, hat man ausgezeichnete Möglichkeiten, die Zuverlässigkeit der Lipoidanalysen zu beurteilen. Die Lecithinwerte stimmen, so gut man nach so vielen Manipulationen verlangen kann, überein, ebenso die Werte für freies Cholesterin, während der Wert für die Cholesterinester besonders in II und III etwas niedrig liegt. Verwendet man die spektrophotometrisch gefundenen Werte, welche eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den mit Digitonin erhaltenen aufweisen (vgl. *Theorell*, l. c.), erhält man eine beinahe vollständige Übereinstimmung. II und III liegen jedoch in bezug auf Lecithin und Cholesterinester immer noch etwas niedrig. Dies dürfte mit Sicherheit auf eine unvollständige Extraktion von III zurückzuführen sein, dessen schmierige Konsistenz es für eine Extraktion im Soxhlet ungeeignet machte.

Das Verhältnis Cholesterin : Cholesterinester war etwa = 1 : 3, was ungefähr dem, was in der Literatur für Pferdeserum als normal angegeben wird, gleichkommt. *Wacker* und *Hueck* (93) geben 1 : 3,3 an.

Hinsichtlich der Verteilung auf die verschiedenen Fraktionen scheint dieses Verhältnis ungefähr aufrechterhalten zu werden: die Quotienten für I bis V sind 0,32, 0,34, 0,27, 0,35 und 0,27. Mit den beiden Globulinfractionen III und V sind doch verhältnismäßig etwas mehr Ester als freies Cholesterin ausgefällt worden. Der Unterschied ist jedoch unbedeutend.

Es wurden Analysen von Oxycholesterin versucht (*Theorell*, l. c.), aber sie gaben nur unzufriedenstellende Resultate. Dieser Körper scheint ziemlich labil zu sein und fordert besondere Vorsichtsmaßnahmen bei der Darstellung der Extrakte, um zuverlässige Analysenresultate zu ergeben¹.

In den folgenden Tabellen sind für die verschiedenen Fraktionen die Quotienten Gesamtcholesterin : Lecithin, Cholesterin : Eiweiß, Lecithin : Eiweiß, und wie viele Gramm Eiweiß einem Molekül Cholesterin bzw. Lecithin entsprechen, ausgerechnet. Die Cholesterinwerte wurden spektrophotometrisch gefunden.

¹ Als Testsubstanz wurde hier ein Präparat verwendet, das ganz wie dasjenige in der ersten Mitteilung des Verfassers in dieser Zeitschr. 175, 305, 1926, hergestellt wurde. Dank einer persönlichen Mitteilung von Professor *A. Windaus*, daß Oxycholesterin nach der von *Lifschütz* angegebenen Methode nicht rein dargestellt werden konnte, wurde dieses Präparat sehr sorgfältig auf Kohle und Wasserstoff analysiert. Die gefundene Zusammensetzung stimmte sehr nahe mit der theoretischen Formel $C_{27}H_{46}O_2$ überein.

Tabelle LV.

1	2	3	4	5	6	7
Nr.	Natur des Eiweißes	Cholesterin	Cholesterin	Lecithin	1 g Mol.	1 g Mol.
		Lecithin	Eiweiß	Eiweiß	Cholesterin pro g Eiweiß	Lecithin pro g Eiweiß
I	Gesamteiweiß . .	0,51	0,013	0,0255	30 000	30 000
II	Pseudoglobulin + Albumin . .	0,45	0,011	0,0246	35 000	32 000
III	Euglobulin . . .	0,79	0,023	0,0292	17 000	27 000
IV	Albumin	0,41	0,015	0,0366	26 000	21 000
V	Gesamtglobulin .	0,75	0,011	0,0153	35 000	51 000

Aus Kolumne 3 geht hervor, daß mit den Globulinfractionen III und V auch in diesem Falle verhältnismäßig mehr Cholesterin als Lecithin ausgefällt wurde, mit II und IV umgekehrt. Dies gilt besonders, wie man erwarten konnte, für die labilste Fraktion, Euglobulin. Dies weist auch, Kolumne 4, den höchsten Wert für den Quotienten Cholesterin : Eiweiß auf, während dieser Wert für Lecithin : Eiweiß weder auffallend hoch oder niedrig ist. In Kolumne 5 tritt besonders der hohe Wert für IV im Vergleich mit dem niedrigen für V zutage. Die Molekulargewichte der drei hier in Rede stehenden Eiweißkörper waren und sind, wie man vielleicht sagen kann, noch umstritten. *Sørensen* [zitiert nach *Cohn* (15)] nimmt auf Grund von osmotischen Druckmessungen 140000, 80000 und 45000 als wahrscheinliche Molekulargewichte von Euglobulin, Pseudoglobulin und Albumin an, während *Svedberg* und *Sjögren* (87) den Unterschied zwischen Eu- und Pseudoglobulin auf Grund ihrer Resultate beim Ultrazentrifugieren als Artefakt erklären. Demnach sollte Serumglobulin einheitlich sein mit einem Molekulargewicht von 103800 ± 3000 , während das Molekulargewicht von Serumalbumin 67500 ± 2000 sein sollte. Werden die von *Svedberg* und *Sjögren* angegebenen Werte als richtig angenommen, findet man, daß ein Molekül Euglobulin in diesem Falle beinahe genau sechs Moleküle Cholesterin gebunden haben sollte, während ein Molekül Gesamtglobulin drei Moleküle Cholesterin gebunden hätte. Eine entsprechende Ausrechnung für Albumin gibt einen ungleichmäßigen Wert. — Aus diesem einzigen Falle lassen sich selbstverständlich keine bestimmten Schlüsse ziehen.

Versuch 20. Die Verteilung der Lipoide auf die Eiweißfraktionen des Plasmas bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen mit Ammoniumsulfat ausgesalzt.

Pferdeplasma wurde mit steigenden Mengen 0,4 n H₂SO₄ versetzt. Eine Serie (F) wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis 27 % Sättigung, eine zweite (G) bis 50 % Sättigung versetzt. Danach

wurde klar zentrifugiert und kolorimetrische p_H -Messungen an den klaren Flüssigkeiten mit Nitrophenolindikatoren angestellt.

Tabelle LVI.

Bezeichnung	Plasma ccm	0,4 n H_2SO_4 ccm	H_2O ccm	Am_2SO_4 ccm	Indikator	p_H
F I	15	0,0	3,0	6,65	Meta-Nitrophenol	7,46
F II	15	1,0	2,0	6,65	Para-Nitrophenol	6,54
F III	15	1,5	1,5	6,65	"	5,99
F IV	15	2,0	1,0	6,65	"	5,57
F V	15	2,5	0,5	6,65	γ -Dinitrophenol	5,06
F VI	15	3,0	0,0	6,65	"	4,70
G I	15	0,0	3,0	18	Meta-Nitrophenol	7,41
G II	15	1,0	2,0	18	Para-Nitrophenol	6,42
G III	15	1,5	1,5	18	"	6,12
G IV	15	2,0	1,0	18	" und γ -Dinitrophenol	5,59
G V	15	2,5	0,5	18	"	5,07
G VI	15	3,0	0,0	18	"	4,77

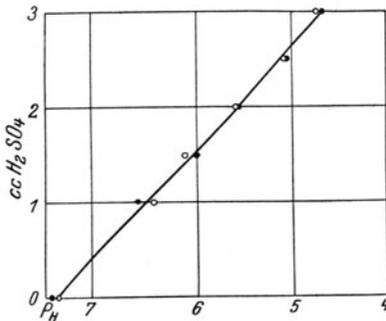


Abb. 6.

Abb. 6 zeigt den Zusammenhang zwischen der zugesetzten Schwefelsäuremenge und p_H . Die Änderung in p_H verläuft bei Erhöhung des Schwefelsäurezusatzes in diesem Falle approximativ nach einer geraden Linie. Der größere Gehalt an Ammoniumsulfat in G, verglichen mit F, und das Fehlen von Globulinen in G scheint keinen Einfluß auf p_H zu haben.

Eiweiß- und Lipoidbestimmungen wurden teils mit dem unbehandelten Plasma (T), teils mit allen Filtraten angestellt. Die Eiweißanalysen wurden folgendermaßen ausgeführt: in T direkt mit *T. Teorells* Natriumhypobromitmethode, in F und G wurde eine hinreichende, in die Verbrennungsröhre pipettierte Menge zuerst mit Überschuß an Magnesiumoxyd unter Zusatz von 50 % Alkohol behandelt. Nach

Tabelle LVII.

I	2	3	4	5	6	7	8	9
Extrakt	pH	°/o Eiweiß	°/oo Lecithin	°/oo Lecithin Mittel	°/oo Cholesterin	°/oo Cholesterin Mittel	Lecithin · 100 Eiweiß	Cholesterin · 100 Eiweiß
T ₁	7,85	6,85	1,23 1,24 1,22 1,23	1,235 1,225	0,830 0,832 0,823 0,830	0,831 0,827	1,80	1,21
T ₂								
F I	7,46	6,44	mißlungen		0,727 0,713 0,753	0,731	—	1,14
F II	6,54	6,41	1,25 1,22	1,235	0,767 0,787	0,777	1,93	1,21
F III	5,99	6,39	1,22 1,25	1,235	0,793 0,780	0,787	1,93	1,23
F IV	5,57	6,30	1,18 1,17	1,175	0,740 0,760 0,750	0,750	1,87	1,19
F V	5,06	5,35	1,025 1,025	1,025	0,607 0,607	0,607	1,91	1,13
F VI	4,70	3,63	0,62 0,63	0,625	0,513 0,490	0,502	1,74	1,38
G I	7,41	3,55	1,04 1,04	1,040	0,523 0,523	0,523	2,93	1,47
G II	6,42	3,55	1,04 1,02	1,030	0,527 0,513	0,520	2,90	1,46
G III	6,12	2,25	0,892 0,900	0,896	0,460 0,466	0,463	3,99	2,06
G IV	5,59	1,05	0,475 0,450	0,463	0,270 0,276	0,273	4,41	2,60
G V	5,07	0,26	0,21 0,25	0,23	0,153 0,180	0,167	8,85	6,42
G VI	4,77	0	0,13 0,11	0,12	0,093 0,093 0,103	0,096	∞	∞

Verdunsten auf dem Wasserbade wurden neuerdings 50 % Alkohol dazugegeben und mehrmals verdunstet, bis in den Dämpfen kein Ammoniak (aus dem Ammoniumsulfat) mehr nachgewiesen werden konnte. Darauf wurde mit Schwefelsäure verbrannt und in der Weise, wie von *Teorell* angegeben ist, fortgesetzt.

Zwecks Lipoidanalysen wurden in Soxhletapparaten mit Alkohol Mengen, entsprechend 3 ccm des ursprünglichen Plasmas, extrahiert. Von T wurden zwei gleiche Extrakte, T₁ und T₂, hergestellt. Cholesterinanalysen mit Stufenphotometer, P-Analysen nach *Fiske-Subarow* im Stufenphotometer.

Das Filtrat G VI war praktisch biuretfrei. Sein N-Gehalt betrug 0,24⁰/₁₀₀, entsprechend 0,15 % Eiweiß, also ungefähr der normale Reststickstoffgehalt im Plasma. Alle Eiweißwerte wurden daher um 0,15 verringert.

Die Resultate der Tabelle LVII sind in Abb. 7 zusammengestellt.

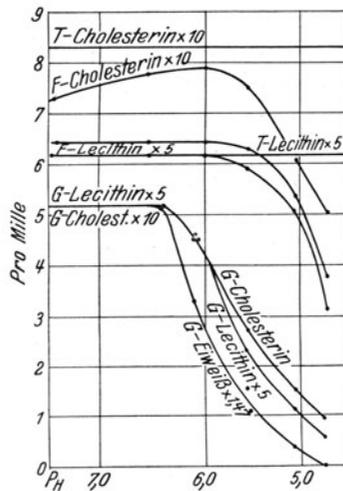


Abb. 7.

Betrachtet man zuerst die Eiweißwerte, so findet man, daß bei 27 % Sättigung zwischen p_H 6,0 und 5,6 auch anderes Eiweiß als Fibrinogen auszufallen beginnt, höchstwahrscheinlich Globuline. Bei 50 % Sättigung beginnt diese gesteigerte Fällung, in diesem Falle von Albumin, sich zwischen p_H 6,4 bis 6,1 geltend zu machen. An dem isoelektrischen Punkt der Albumine, $p_H = 4,7$, scheint die 27 %ige Sättigung in gewissen Beziehungen dieselben Resultate zu geben wie die 50 %ige bei $p_H = 7,4$, indem sowohl Eiweiß- als auch Cholesteringehalt in F VI und G I gleich hoch sind, während dies für Lecithin nicht der Fall ist.

Der Niederschlag von Lipoiden bei 27 % Sättigung und verschiedenen p_H scheint mit den Niederschlägen von Eiweiß einigermaßen gleichen Schritt zu halten. Doch ist schon bei F VI, Kolumne 9, beim Cholesterin eine Tendenz wahrzunehmen, daß es verhältnismäßig leichter als Eiweiß in Lösung bleibt.

Der etwas höhere Cholesteringehalt in F II, III und IV als in F I ist eigentümlich. Selbst wenn in diesem Falle die weniger guten Doppelwerte in den Cholesterinbestimmungen dazu beitragen, daß ein solches Verhalten mit diesem Versuche nicht als bewiesen angesehen werden kann, ist dies jedoch schon ein Anlaß, Verdacht zu schöpfen, daß hier ein Freiwerden von Cholesterin aus dem Fibrinogen in Analogie mit dem Verhalten in späteren Versuchen (siehe Versuch 24) vorliegen könne. Die Unterschiede in den F-Werten in Kolumne 8 und 9 sind nicht größer, als daß es wohl am richtigsten sein dürfte, die Durchschnittswerte mit 1,90 und 1,21 anzugeben.

Aus der G-Serie scheint deutlich hervorzugehen, daß auf der saueren Seite verhältnismäßig mehr Eiweiß als Lipide ausgeschieden werden, siehe G I bis VI, Kolumne 8 und 9, sowie die Abb. 7. Besonders interessant ist G VI, das, trotzdem es eiweißfrei ist, nicht unbedeutende Mengen Lipide enthält; dieser Umstand zeigt, daß für das in Lösung verbleibende Cholesterin im Plasma noch andere Schutzkolloide als Eiweiß eine gewisse Rolle spielen (Phosphatide, Seifen, Gallensäuren?).

Zum Vergleich mit den Versuchen 18 und 19 folgen nachstehend die ausgerechneten Cholesterin : Lecithinquotienten für die verschiedenen ausgefallten Fraktionen.

Tabelle LVIII.

1 Nr.	2 p_H	3 Cholesterin für Lecithin		
		„Fibrinogen“	„Globulin“	„Albumin“
		I	7,46—7,41	∞
II	6,54—6,42	∞	1,05	0,50
III	5,99—6,12	∞	1,20	0,52
IV	5,57—5,59	1,44	0,71	0,59
V	5,06—5,02	1,00	0,66	0,73
VI	4,70—4,77	0,54	0,66	0,80

Nr. I, II und III weisen dieselben Verhältnisse auf wie vorher (vgl. Versuch 19) mit hohem Cholesterin : Lecithinquotienten für Fibrinogen und Globulin, niedrigem für Albumin. Nr. IV bis VI haben mehr unregelmäßige Werte; dies ist jedoch kaum staunenswert, zumal ja hier die Fällungsgrenzen stark verschoben sind, d. h. es scheiden in IV bis

VI teilweise andere Eiweißkörper aus als in I bis III. Da aber die lockeren Bindungen Eiweiß—Cholesterin in hohem Maße von c_H abhängig sind und man annehmen muß, daß auch die Lipoide an und für sich betreffs ihrer Löslichkeit von Salzkonzentration und c_H Einfluß nehmen, muß man einsehen, daß in bezug auf Schlußfolgerungen hier große Vorsicht geboten ist. Kolumne 4 zeigt indes für IV bis VI einen sinkenden Cholesterin : Lecithinquotienten, was deutlich darauf beruht, daß auch hier Albumin ausgefällt wird. Kolumne 5 weist hingegen eine entsprechende, gleichmäßige Steigerung desselben Quotienten auf und zeigt damit, daß von den drei untersuchten Stoffen Cholesterin unter diesen Umständen die größte Neigung hat, in Lösung zu bleiben.

Versuch 21. Ausschütteln von Plasma mit Äther bei verschiedenen p_H .

Tabelle LIX.

Pferdeplasma wurde mit n/1 HCl in steigenden Mengen versetzt. p_H wurde mit Nitrophenolindikatoren im Stufenphotometer bestimmt.

Nr.	Plasma ccm	n/1 HCl ccm	H ₂ O ccm	Indikator	p_H	Bemerkungen
1	12,5	0	1,0	Meta-Nitrophenol	7,86	
2	12,5	0,2	0,8	Para-Nitrophenol	6,92	
3	12,5	0,4	0,6	"	6,26	
4	12,5	0,6	0,4	"	5,75	} Etwas trübe, wurde zwecks p_H -Bestimmung zentrifugiert
5	12,5	0,8	0,2	γ -Dinitrophenol	5,32	
6	12,5	1,0	0	"	4,96	

Die p_H -Werte liegen längs einer schwach gebogenen Kurve, siehe Abb. 8.

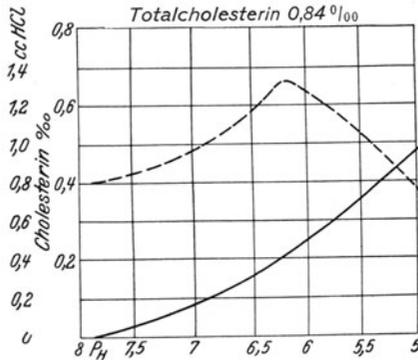


Abb. 8.

Die Reste aus 1 bis 6 nach den p_H -Bestimmungen, 10,35 ccm (entsprechend 9,58 ccm des ursprünglichen Plasmas), wurden mit gleichen

Volumina Äther in Probieröhrchen von ganz den gleichen Dimensionen versetzt und diese mit gewöhnlichen Korken verschlossen. Die Röhren wurden mittels Gummibändchen an einem Arm befestigt, der durch einen Motor und exzentrische Kopplung in gleichmäßig wiegende Bewegung versetzt wurde, etwa drei ganze Schwingungen in zwei Sekunden. Durch diese relativ langsame Bewegung wurde vermieden, daß der Äther und das Plasma ein allzu hochdisperses kolloidales System miteinander bildeten. Andererseits wurde dennoch eine effektive Extraktion erzielt. Nach zwölfstündigem Schwingen wurde der Versuch unterbrochen. In den Nr. 1 bis 3 waren nur kleine, unbedeutende Niederschläge vorhanden, in Nr. 4 eine recht kräftige Fällung von Eiweiß, in den Nr. 5 bis 6 sehr starke Eiweißniederschläge. Zur Trennung von Äther und Plasma wurde in einer Winkelzentrifuge zentrifugiert. Dabei wurde die Ätherschicht vollkommen klar. Die Eiweißniederschläge waren nach oben geflossen und hatten sich zu einem festen Kuchen dicht an der Ätherschicht zusammengepackt. Nun wurde die Ätherschicht abpipettiert, und danach wurde dreimal rasch mit Äther ohne Umschütteln der Röhren gewaschen. Die vereinigten Ätherlösungen wurden verdunstet, die Rückstände in Chloroform aufgenommen und schließlich Cholesterinanalysen im Stufenphotometer ausgeführt.

Tabelle LX.

Nr.	Cholesterin in ‰, berechnet auf unverdünnt. Plasma	Durchschnittswert	p_H
1	0,411	0,410	7,86
	0,409		
2	0,484	0,487	6,92
	0,490		
3	0,660	0,656	6,26
	0,652		
4	0,596	0,595	5,75
	0,594		
5	0,470	0,470	5,32
	0,470		
6	0,357	0,361	4,96
	0,364		
T	0,840	0,842	—
	0,844		

Die Cholesterinbestimmung wurde an dem ursprünglichen Plasma wie gewöhnlich ausgeführt, d. h. durch Extraktion mit Alkohol in Soxhletapparaten, Verdunsten und Überführen in Chloroform; die Cholesterinanalysen hieraus mit dem Stufenphotometer werden als T bezeichnet. — Das Resultat ergibt, daß ein Ausschüttelungsmaximum beim Cholesterin ungefähr bei $p_H = 6$ vorhanden ist. Dieses Maximum

liegt hier jedoch wahrscheinlich etwas zu weit nach der alkalischen Seite hin, denn die Werte 4 bis 6 sind sicher eine Ahnung zu niedrig, was darauf zurückzuführen sein dürfte, daß ein Teil des Äthers nach dem Zentrifugieren, in dem dicken Kuchen des Niederschlags eingeschlossen, beim Auswaschen unerreichbar gelegen hat. Diese Ungelegenheit läßt sich entweder dadurch verbessern, daß ein größeres Volumen Äther verwendet wird, wobei sich genannter Fehler verringert, oder durch wiederholtes Ausschütteln, womit er ganz eliminiert werden kann. Beides wurde in den folgenden Versuchen benutzt. Ferner wurde der P-Gehalt im Extrakt nach *Fiske-Subarow* mit Stufenphotometer bestimmt.

Tabelle LXI.

Nr.	$\frac{0}{100}$ P ausgeschüttelt, berechnet auf unverdünntes Plasma	Berechnet als Lecithin $\frac{0}{100}$
1	0,000 24	0,006
2	0,001 46	0,037
3	0,000 47	0,012
4	0,000 24	0,006
5	0,000 12	0,003
6	Spuren	Spuren

Im Ätherextrakt wurden also, wie zu erwarten war, keine nennenswerten Mengen Phosphor wiedergefunden, vgl. *Fujii* (21).

Versuch 22. Ausschütteln des Plasmas mit Äther bei verschiedenen p_H .

Pferdeplasma wurde mit n/1 HCl versetzt und die p_H -Bestimmungen wie in den vorhergehenden Versuchen ausgeführt.

Tabelle LXII.

Nr.	Plasma ccm	n/1 HCl ccm	H ₂ O ccm	Indikator	p_H	Bemerkungen
1	18,8	0	1,2	Meta-Nitrophenol	8,00	} Etwas trübe, wurde vor der p_H -Bestimmung zentrifugiert
2	18,8	0,3	0,9	Para-Nitrophenol	7,29	
3	18,8	0,6	0,6	"	6,60	
4	18,8	0,9	0,3	γ -Dinitrophenol	6,01	
5a	18,8	1,2	0	"	5,36	
5b	18,8	1,2	0	"	5,36	

In 5b wurde die Trübung vor dem Schütteln mit Äther wegzentrifugiert. Dann wurden alle Proben mit drei Volumen Äther versetzt und zwölf Stunden wie im vorhergehenden Versuche gewiegt. Nach dieser Zeit hatte sich in 4, 5a und 5b ein kräftiger Niederschlag abgesetzt; darauf Zentrifugieren, Abpipettieren der Ätherschicht und Waschen mit

Äther wie im vorhergehenden Versuch. Verdunsten des Äthers, Überführen in Chloroform und Cholesterinbestimmung im Stufenphotometer. Die Resultate werden aus nachstehender Tabelle sowie Abb. 9 ersichtlich.

Tabelle LXIII.

Nr.	p_H	Cholesterin ‰, berechnet auf unverdünntes Plasma	Durchschnittswert	P
1	8,00	0,548 0,551	0,550	Spuren
2	7,29	0,526 0,539	0,533	"
3	6,60	0,755 0,755	0,755	"
4	6,01	0,725 0,729	0,727	0
5a	5,36	0,602 0,595	0,599	0
5b	5,36	0,625 0,625	0,625	0

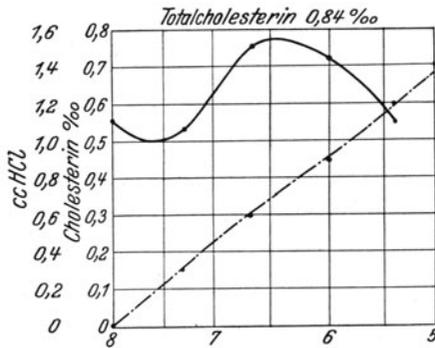


Abb. 9.

Bestimmung des Gesamtcholesteringehalts im ursprünglichen Plasma in derselben Weise wie im vorhergehenden Versuch ergab 0,84 ‰.

Das Resultat der Ätherausschüttelungen war in diesem Falle demjenigen im vorhergehenden auffallend ähnlich. 5b gab innerhalb der Fehlergrenzen ebensoviel Cholesterin wie 5a, weshalb es keine Rolle zu spielen scheint, ob der Niederschlag nach Zusatz von HCl wegcentrifugiert wird oder nicht. Das Maximum lag hier jedoch bei p_H 6,3 bis 6,4. Außerdem gibt die Kurve eine Stütze für den Verdacht, daß ein Minimum bei $p_H = 7,6$ bis 7,7 angenommen werden könnte; demnach recht nahe dem normalen, vitalen p_H des Plasmas (daß in Nr. 1 p_H so hoch liegt wie 8,0, beruht natürlich darauf, daß aus demselben CO_2 abgegeben wurde). Im folgenden Versuch sind daher gerade auf diesem Gebiet mehrere

Proben eingefügt worden. Außerdem wurde wiederholt ausgeschüttelt, um zu erforschen, ob in irgendeinem Gebiete das Cholesterin quantitativ ausgeschüttelt werden konnte.

Versuch 23. Wiederholtes Ausschütteln des Plasmas bei verschiedenen p_H .

Pferdeplasma wurde mit n/l HCl versetzt, und p_H -Bestimmungen wurden wie früher ausgeführt.

Tabelle LXIV.

Nr.	Plasma ccm	n/l HCl ccm	H ₂ O ccm	Indikator	p_H	Bemerkungen
1	12,5	0	1	Meta-Nitrophenol	7,79	
2	12,5	0,1	0,9	"	7,68	
3	12,5	0,2	0,8	"	7,50	
4	12,5	0,3	0,7	Para-Nitrophenol	7,21	} Etwas trübe, für p_H -Bestimmung zentrifugiert
5	12,5	0,4	0,6	"	6,73	
6	12,5	0,5	0,5	"	6,20	} Stärkere Trübung, für p_H -Bestimmung zentrifugiert
7	12,5	0,6	0,4	"	5,68	} Starke Trübung, für p_H -Bestimmung zentrifugiert
8	12,5	0,7	0,3	"	5,26	
9	12,5	0,8	0,2	γ -Dinitrophenol	5,08	
10	12,5	0,9	0,1	"	4,87	

Nachdem 3,5 ccm der Mischungen zu p_H -Bestimmungen verwendet worden waren, blieben 10 ccm zurück, entsprechend 9,25 ccm des unverdünnten Plasmas. In so weit wie möglich gleichartigen Proberröhren wurden diese 10 ccm mit 10 ccm Äther zwölf Stunden gewiegt. Die Ätherschicht wurde vom Plasma wie im vorhergehenden Versuche getrennt und der Ätherextrakt wie früher behandelt; diese Serie Extrakt wird als I bezeichnet. Danach wurde dieselbe Behandlung dreimal in derselben Weise wiederholt und lieferte die Extraktserien II, III und IV. Cholesterinbestimmungen im Stufenphotometer. Das Gesamtcholesterin im ursprünglichen Plasma wurde nach Alkoholextraktion im Soxhlet zu 1,150⁰/₁₀₀ bestimmt.

Tabelle LXV.

Nr.	p_H	Kurve A I	II	Kurve B I + II	III	Kurve C I + II + III	IV	Kurve D I + II + III + IV
1	7,79	0,212	0,164	0,376	0,192	0,568	0,101	0,669
2	7,68	0,185	0,031	0,216	0,206	0,422	0,108	0,530
3	7,50	0,168	0,306	0,474	0,121	0,595	0,039	0,634
4	7,21	0,346	0,245	0,591	0,070	0,661	0,013	0,674
5	6,73	0,569	0,212	0,781	0,045	0,826	0,014	0,840
6	6,20	0,767	0,355	1,122	0,012	1,134	0,000	1,134
7	5,68	0,754	0,400	1,154	0,000	1,154	0,000	1,154
8	5,26	0,563	0,520	1,087	0,008	1,095	0,000	1,095
9	5,08	0,444	0,418	0,862	—	—	—	—
10	4,87	0,306	0,340	0,646	0,067	0,713	0,016	0,729

Die Resultate sind graphisch in Abb. 10 dargestellt.

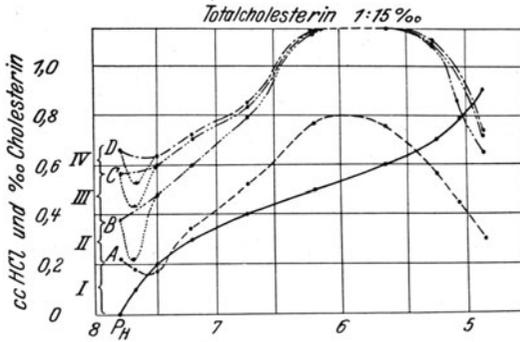


Abb. 10.

Aus der Abb. 10 geht hervor, daß die Erwartungen bezüglich eines Minimums in der Nähe des normalen p_H 7,7 des Plasmas fast allzu sehr erfüllt wurden. Die durchweg niedrigen Werte in Nr. 2 beruhen indessen nur auf einem einzigen Wert, nämlich 2 II. Dies kontrastiert so stark gegenüber 2 III und 2 IV, daß es wahrscheinlich angebracht ist, die gestrichelten Teile von B, C und D zu verwerfen und direkt 1 und 3 zusammenzubinden.

Das Resultat der wiederholten Ausschüttelungen gibt im übrigen zu folgenden Reflexionen Anlaß: Für jede neue Ätherbehandlung werden neue Mengen Cholesterin extrahiert. Dies kann deutlich darauf beruhen, 1. daß Cholesterin allmählich in Äther ausschüttelbarer Form freigemacht wird, 2. daß das Cholesterin so langsam in den Äther hinüberdiffundiert, daß erst nach sehr langer Zeit das Lösungsgleichgewicht des Cholesterins zwischen Äther und Plasma erreicht wird.

Von diesen beiden Möglichkeiten ist erstere die weitaus wahrscheinlichere, denn a) eine so niedrige Diffusionsgeschwindigkeit, wie das Cholesterin im Falle 2 haben muß, ist nahezu undenkbar, da ja die Schüttelung so kräftig ist, daß Plasma und Äther intim vermischt werden (so daß Zentrifugieren notwendig wird, um sie zu trennen); b) wäre alles Cholesterin frei, so ist es schwer verständlich, weshalb es bei p_H 5,5 bis 6 leichter extrahiert werden sollte als bei anderen Wasserstoffionenkonzentrationen. Es dürfte daher kaum eine andere Möglichkeit übrigbleiben als die Annahme, daß eine mehr oder weniger lockere chemische oder physikalische Bindung des Cholesterins mit einem anderen Stoff im Plasma, *wahrscheinlich den Globulinen*, deren isoelektrischer Punkt, $p_H = 5,5$, ja nahe mit dem Maximum der Ausschüttelungsmöglichkeit des Cholesterins zusammenfällt (in diesem Falle $p_H = 5,68$), vorhanden ist. Auch in der Literatur findet man

vereinzelte Angaben über eine solche Bindung Cholesterin—Globulin (vgl. Kapitel II), welche jedoch wenigstens in bezug auf das Blutplasma eher vermutet als direkt bewiesen waren.

Hinsichtlich des Fibrinogens habe ich nirgends in der Literatur nähere Angaben über sein Verhalten zu Lipoiden angetroffen.

Das Albumin wiederum konnte schwerlich in den Verdacht kommen, ein Bild wie Abb. 10 zu geben, denn sein isoelektrischer Punkt liegt ja bei $p_H = 4,7$ bis $4,8$, wo die Ausschüttelungsmöglichkeit für Cholesterin bei weitem nicht mehr maximal ist.

Versuch 24. Darstellung verschiedener Eiweißfraktionen und Untersuchung ihres Verhaltens zu Cholesterin bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

650 ccm klares, hämolysefreies Pferdeplasma wurden mit zwei Volumen Wasser verdünnt, um das Volumen der später ausgesalzenen Niederschläge im Verhältnis zum Gesamtvolumen zu vermindern; dann wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis 27 % Sättigung versetzt, worauf der entstandene Fibrinogenniederschlag abfiltriert und einmal mit 27 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen wurde. Sodann wurde der Niederschlag vom Filtrat entfernt, in Wasser gelöst und noch zweimal bei 27 %iger Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt und in eine Kollodiumdialysehülse gebracht.

Trotzdem *Svedberg* und *Sjögren* (87) erklären, daß zwischen Eu- und Pseudoglobulin von vornherein kein Unterschied vorhanden sei, sondern erst während der Behandlung der Fraktionen entstehe, wurde dennoch ein Versuch gemacht, diese beiden Eiweißkörper nach dem üblichen Verfahren zu trennen, da dieses, nach der Meinung des Verfassers, wahrscheinlich wenigstens nicht denaturierend auf die erste Fraktion, das Euglobulin, einwirken kann.

Die Mutterlauge des ersten Niederschlags wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis 36 % Sättigung versetzt, wonach das ausgefällte Euglobulin gewaschen und wiederum bei 36 %iger Sättigung mit Ammoniumsulfat analog dem Fibrinogen gefällt wurde.

Um das Pseudoglobulin auszufällen, wurde bis 50 % gesättigt. Die Mutterlauge dieses Niederschlags wurde mit Ammoniumsulfat in Substanz gesättigt, wobei also Albumin ausgeschieden wurde. Pseudoglobulin und Albumin wurden dann in ähnlicher Weise gereinigt wie die vorhergehenden Fraktionen. Die so hergestellten Eiweißkörper wurden mit etwas Toluol versetzt zur Verhinderung von Fäulnis, und wurden bei einer Temperatur von 2 bis 4° C unter Überdruck gegen eine jeden zweiten Tag erneute physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Nach drei Wochen konnten in der Außenflüssigkeit keine SO_4'' -Ionen nachgewiesen werden. Das Fibrinogen hatte sich in einen gelatinösen Klumpen verwandelt, der jedoch nach Zusatz von physiologischer

NaCl-Lösung leicht peptisiert wurde und in eine viskose Lösung überging. In ungefähr derselben Weise verhielt sich das Euglobulin, das eine hellgrüne Farbe hatte. Das Pseudoglobulin ging leider infolge eines Mißgeschicks größtenteils verloren, weshalb es in den folgenden Versuchen in verdünnterer Form verwendet wurde, damit das Material ausreichte. Die Lösung des Pseudoglobulins war hübsch grünblau. Das Albumin war in Lösung kräftig rotbraun.

Stickstoffanalysen nach *T. Theorell*, Cholesterin- und Lipid-Phosphoranalysen nach *Fiske-Subarow* mit Stufenphotometer nach Extraktion mit Alkohol in Soxhletapparaten ergaben folgende Werte:

Tabelle LXVI.

Fraktion	Eiweiß %	mg Cholesterin		mg Lecithin		Cholesterin : Lecithin
		pro cem	pro g Eiweiß	pro cem	pro g Eiweiß	
Fibrinogen . .	3,59	0,108	3,01	0,246	6,85	0,44
Euglobulin . .	18,44	0,408	2,21	1,19	6,46	0,34
Pseudoglobulin	2,51	0,250	10,0	0,632	25,2	0,40
Albumin . . .	10,37	0,515	4,97	1,59	15,3	0,32

Für die folgenden Ausschüttelungsversuche wurde die Euglobulinlösung ihres hohen Eiweißgehalts halber mit gleichen Volumina physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Nach diesem relativ energischen Reinigungsverfahren sind also immer noch nicht unbeträchtliche Mengen Lipide in den Eiweißkörpern vorhanden. Die beiden letzten, die Pseudoglobulin- und die Albuminfraktion, waren diesmal im Vergleich mit Fibrinogen und Euglobulin besonders lipidreich. Der Cholesterin : Lecithinquotient zeigt hier ungewöhnlich kleine Unterschiede, doch ist zu bemerken, daß Fibrinogen immer noch den höchsten (0,44) und Albumin den niedrigsten (0,32) hat.

Darauf wurde p_H in allen Fraktionen nach Zusatz verschiedener Mengen Säure und Lauge bestimmt. Für das Albumin wurde elektrometrische Titrierung mittels Glockenelektrode benutzt, wobei das Potential mit einer Kalomelektrode mit gesättigtem Kaliumchlorid verglichen wurde. Der Kontakt zwischen dem Gefäß mit Albuminlösung und dem Gefäß mit gesättigtem Kaliumchlorid, in das das Ablaufrohr der Kalomelektrode hineingetaucht war, wurde durch ein Rohr mit erstarrtem Agar, gesättigt mit Kaliumchlorid, vermittelt. Für das Fibrinogen und die Globuline erwies sich diese Methode als unanwendbar, da Eiweiß an der Platinaelektrode ausgefällt wurde und ein falsches, variables Potential gab. Für diese Lösungen wurde p_H mittels Chinhydronelektrode gegen eine n/10 KCl-Kalomelektrode bestimmt. Alle Messungen wurden im Wasserthermostat bei 18° C ausgeführt.

Die Resultate werden aus nachstehenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle LXVII.

A. Fibrinogen (3,59%).

	Zugesetzt NaOH n/10 ccm pro ccm Fibrinogen			0	Zugesetzt HCl n/10 ccm pro ccm Fibrinogen		
	0,1	0,06	0,04		0,03	0,1	0,2
p_H .	7,83	7,20	6,85	6,07	5,56	4,77	4,21

B. Euglobulin (9,22%).

	ccm NaOH n/10 pro ccm			0	ccm HCl n/10 pro ccm	
	0,13	0,10	0,05		0,1	0,2
p_H .	7,82	7,12	6,43	5,86	5,07	4,51

C. Pseudoglobulin (2,51%).

	ccm NaOH n/50 pro ccm				0	ccm HCl n/50 pro ccm		
	0,15	0,10	0,075	0,05		0,10	0,20	0,30
p_H .	7,56	6,97	6,50	6,14	5,86	5,46	5,10	4,74

D. Albumin (10,37%).

	ccm NaOH n/10 pro ccm				ccm HCl n/10 pro ccm										
	0,12	0,08	0,04	0	0,04	0,08	0,14	0,20	0,28	0,36	0,46	0,54	0,64	0,74	0,84
p_H .	7,73	7,29	6,91	6,56	6,16	5,87	5,58	5,32	5,07	4,90	4,57	4,34	4,19	4,03	3,91

Vorstehende Werte sind in den Abb. 11 bis 14 in den mit I bezeichneten Kurven graphisch wiedergegeben.

Ausschüttelungsversuche mit Äther.

In diesem Versuch, wie auch im folgenden Nr. 25, wurde eine von der bisherigen etwas abweichende Technik verwendet, indem die Ätherextraktionen in möglichst gleich großen Zentrifugierröhren von 10 ccm gemacht wurden, die mit gewöhnlichen, guten Korken verschlossen wurden. Anstatt des früher angewendeten Schaukelns wurden jetzt die Röhren in einer Schüttelmaschine mit hin und her gehender Bewegung angebracht, die in der Minute etwa 100 ganze Ausschläge machte. Die Mischung wurde dadurch bedeutend effektiver, so daß die Röhren nach beendigtem Schütteln regelmäßig zentrifugiert werden mußten, um Ätherschicht und Eiweißlösung zu trennen. Eine Reihe rein methodischer Versuche wies eine gute Reproduktionsfähigkeit auf (vgl. Versuch 26!), ferner die überraschende Tatsache, daß das zugesetzte Volumen Äther innerhalb weiter Grenzen für das Resultat der Ausschüttelung bedeutungslos war.

A. *Fibrinogen*. 3 ccm Fibrinogenlösung (3,59%) wurden mit n/10 HCl und n/10 NaOH gemäß Tabelle LXVII versetzt, wonach das Volumen auf 3,3 ccm in allen Proben ergänzt wurde. p_H wurde auf der Kurve, Abb. 11 I, abgelesen. Dann wurden 3 ccm neutraler Äther zu allen Proben hinzugefügt, die darauf 12 Stunden geschüttelt wurden. In den Röhren Nr. 4 bis 10 war nach dem Schütteln ein nach der sauren Seite hin immer mehr zunehmender Niederschlag vorhanden. Zur Trennung der Flüssigkeitsschicht wurden die Röhren zentrifugiert.

Die Ätherschicht wurde abpipettiert und darauf in gewöhnlicher Weise gespült. Der ganze Extrakt aus jeder Röhre wurde zu einer Cholesterinbestimmung im Stufenphotometer benutzt.

Tabelle LXVIII.

Nr.	Zugesetzt n/10 NaOH ccm	Zugesetzt n/10 HCl ccm	p_H	mg Cholesterin ausgeschüttelt pro ccm Fibrinogenslg.	Aussehen
1	0,24	—	7,50	0,037	Klar
2	0,18	—	7,20	0,028	
3	0,12	—	6,85	0,036	
4	0,06	—	6,45	0,057	
5	—	—	6,07	0,108	
6	—	0,06	5,72	0,092	Leichter Niederschlag in der Berührungsschicht
7	—	0,12	5,43	0,075	
8	—	0,18	5,20	0,059	Niederschlag in der Berührungsschicht, Flüssigkeit trübe
9	—	0,24	4,99	0,030	
10	—	0,30	4,82	Spuren	Starker Niederschlag in der Berührungsschicht, Flüssigkeit trübe

Die Resultate sind graphisch in Abb. 11, Kurve III wiedergegeben.

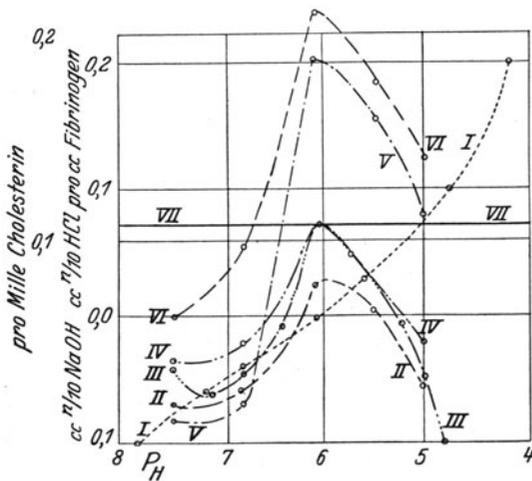


Abb. 11.

- I. Titrationskurve.
- II. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 3 Std.
- III. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 12 Std.
- IV. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 3 + 12 Std.
- V. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension in 3 Std. ausgeschütteltes Cholesterin.
- VI. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension nach weiteren 12 Std. ausgeschütteltes Cholesterin.
- VII. Gesamter Cholesteringehalt der Fibrinogenlösung.

Wie bereits vorher vermutet wurde, zeigt das Fibrinogen ein sehr deutlich ausgesprochenes Maximum für die Ausschüttelmöglichkeit des Cholesterins bei $p_H = 6$. Da es gut denkbar war, daß die geringe ausschüttelbare Cholesterinmenge zwischen $p_H = 6,85$ und $7,50$ nicht von vornherein in freier Form vorhanden gewesen sein dürfte, wohl aber während der zwölfstündigen Ätherbehandlung aus dem Fibrinogen frei gemacht wurde, wurde der Versuch mit zuerst nur dreistündiger Ätherbehandlung wiederholt, worauf zentrifugiert und abpipettiert wurde. Um Material zu sparen, wurden weniger Proben untersucht. Dann wurde neuer Äther zugegeben und nochmals 12 Stunden geschüttelt. Zu jeder Probe wurden 3 ccm Fibrinogenlösung genommen. Nach Zusatz von $n/10$ NaOH und $n/10$ HCl wurde das Volumen auf 3,3 ccm ergänzt. Jede Probe wurde mit 3 ccm Äther ausgeschüttelt. Die Cholesterinanalysen wurden wie oben ausgeführt. Die Resultate findet man in nachstehender Tabelle.

Tabelle LXIX.

Nr.	NaOH ccm	HCl ccm	p_H	mg Cholesterin pro ccm Fibrinogen, ausgeschüttelt nach 3 Std.	mg Cholesterin pro ccm Fibrinogen, ausgeschüttelt nach weiteren 12 Std.	Summa nach 3 + 12 Std.
				Kurve II		Kurve IV
1	0,24		7,50	0,018	0,021	0,039
2	0,12		6,85	0,026	0,023	0,049
3	0	0	6,07	0,077	0,028	0,105
4		0,12	5,43	0,065	0,010	0,075
5		0,24	4,99	0,029	0,020	0,049

In Abb. 11 findet man diese Resultate in den Kurven II und IV.

Bei einem Vergleich mit Kurve III und Tabelle LXXII findet man, daß Kurven III und IV bei p_H 6,07 und auf der sauren Seite zusammenfallen, während auf der alkalischen Seite von $p_H = 6,07$ in 3 + 12 Std. mehr Cholesterin ausgeschüttelt wird als in nur 12 Stunden. Das Bindungsverhältnis des Cholesterins zu Eiweiß scheint überhaupt sowohl in diesem als auch in den vorhergehenden und folgenden Versuchen auf der alkalischen Seite von $p_H = 6$ etwas anders beschaffen zu sein als auf der sauren, indem in der ersteren Verbindung Cholesterin-Eiweiß im Verlauf der Ätherbehandlung sukzessiv gelöst wird, was auf der sauren Seite größeren Schwierigkeiten unterworfen zu sein scheint (vgl. Versuch 23).

Dreistündiges Schütteln war nicht hinreichend, um bei $p_H = 6,07$ alles Cholesterin zu extrahieren, wogegen 12 Stunden vollauf genügen.

B. Euglobulin. 3 ccm 9,22%iger Euglobulinlösung wurden in jedes Röhrechen hineinpipettiert und dann mit n/10 NaOH und n/10 HCl nach Tabelle LXXIV versetzt. Das Volumen wurde in allen Röhren auf 4 ccm ergänzt; Ausschütteln mit 3 ccm Äther zuerst 12 Stunden, wonach der Äther abpipettiert und wie früher nachgespült wurde. Die vereinigten Ätherportionen aus jeder Röhre wurden verdunstet. Der ganze Extrakt aus jeder Röhre wurde zu einer Bestimmung verwendet. Dann wurde das Ausschütteln mit neuen 3 ccm Äther weitere 12 Stunden wiederholt. Die Resultate der in üblicher Weise im Stufenphotometer ausgeführten Analysen sind in nachstehender Tabelle wiedergegeben.

Tabelle LXX.

Nr.	Zugesetztes NaOH ccm	Zugesetztes HCl ccm	p _H	Cholesterin pro Kubikzentimeter Euglobulin, ausge- schüttelt in 12 Std. Kurve III mg	Cholesterin pro Kubikzentimeter Euglobulin, aus- geschüttelt in weiteren 12 Std. mg	Summe aus- geschütteltes Cholesterin in 12 + 12 Std. Kurve IV mg	Aussehen
1	0,42	—	8,0	0,132	0,012	0,144	} Vollständig klar
2	0,36	—	7,5	0,131	0,036	0,167	
3	0,28	—	7,0	0,135	0,042	0,177	
4	0,17	—	6,5	0,128	0,045	0,173	
5	0,04	—	6,0	0,177	0,013	0,190	
6	—	0,135	5,5	0,172	0,015	0,187	Niederschlag, auszentrifugiert in der Berührungsschicht, Flüssigkeit opak
7	—	0,33	5,0	0,100	0,061	0,161	Starker Niederschlag, auszentri- fugiert in der Berührungs- schicht, Flüssigkeit trübe
8	—	0,60	4,5	0,064	0,032	0,096	Starker Niederschlag, auszentri- fugiert in der Berührungs- schicht, Flüssigkeit stark getrübt

Aus denselben Gründen, die schon hinsichtlich des Ausschüttelns des Fibrinogens angegeben wurden, wurde auch hier ein Versuch mit nur dreistündiger Ätherbehandlung gemacht. Resultat:

Tabelle LXXI.

Nr.	p _H	Cholesterin pro Kubikzentimeter Euglobulin, ausgeschüttelt in 3 Stunden. Kurve II mg
1	7,5	0,086
2	6,5	0,069
3	5,86	0,165
4	4,5	0,027

Bei $p_H = 5,86$ ist demnach in 3 Stunden nahezu ebensoviel Cholesterin extrahiert worden wie in 12 Stunden, während auf der alkalischen Seite in 3 Stunden viel weniger Cholesterin in den Äther übergegangen ist als in 12 Stunden, bei $p_H = 6,5$ nur ungefähr die Hälfte in Analogie mit den Verhältnissen beim Fibrinogen. Aus den Kurven III und IV

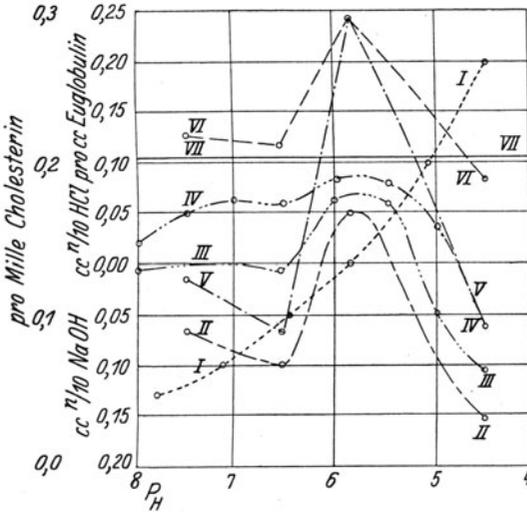


Abb. 12.
 I. Titrationskurve.
 II. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 3 Stunden.
 III. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 12 Stunden.
 IV. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 12 + 12 Stunden.
 V. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension in 3 Stunden ausgeschütteltes Cholesterin.
 VI. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension in weiteren 12 Std. ausgeschütteltes Cholesterin.
 VII. Gesamter Cholesteringehalt der Euglobulinlösg.

kommt noch eine Analogie mit dem oben berührten Verhalten betreffs des Fibrinogens zum Vorschein, nämlich daß die Bindung Cholesterin —Euglobulin auf der alkalischen Seite von $p_H = 6$ im Verlauf der Ätherbehandlung leichter gelöst wird als auf der sauren Seite. In diesen Lösungen waren anscheinend infolge des hohen Eiweißgehalts (vgl. auch D) nicht einmal 12 + 12 Stunden Ätherbehandlung bei $p_H = 6$ und 5,5 völlig ausreichend, um das ganze vorhandene Cholesterin zu extrahieren.

C. Pseudoglobulin (2,51%). 3 ccm Lösung wurden in jede Röhre gegeben; n/50 NaOH und n/50 HCl gemäß Tabelle zugesetzt. Das Volumen wurde überall auf 4 ccm ergänzt. Ausschütteln mit 3 ccm Äther erst 12 Stunden, danach mit neuem Äther weitere 12 Stunden. Aus denselben Gründen wie in A und B wurde nachher eine dreistündige Ätherbehandlung an gewissen neu hergerichteten Pseudoglobulin-, NaOH- bzw. HCl-Mischungen vorgenommen. Die Resultate sind mit in Tabelle LXXII aufgenommen. Der ganze Extrakt aus jeder Ausschüttelung wurde zu einer Cholesterinbestimmung im Stufenphotometer benutzt.

Tabelle LXXII.

Nr.	Na OH ccm	H Cl ccm	p_H	Cholesterin pro Kubikzentimeter Pseudoglobulin ausgeschüttelt		Summe 12 + 12 Std. Kurve IV mg	Cholesterin pro Kubik- zentimeter Pseudo- globulin, aus- geschüttelt in 3 Std. Kurve II mg	Aussehen
				in 12 Std. Kurve III	in weiteren 12 Std.			
				mg	mg			
1	0,45	—	7,56	0,226	0,010	0,236	0,210	Klar Geringer Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung klar Stärkerer Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung opak Noch stärkerer Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung opak Starker Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung opak. Niederschlag abzentrifugiert Starker Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung opak. Niederschlag abzentrifugiert
2	0,30	—	6,97	0,214	0,018	0,232	—	
3	0,15	—	6,50	0,240	Spuren	0,240	0,210	
4	—	—	5,86	0,220	0,010	0,230	0,210	
5	—	0,15	5,64	0,222	0,019	0,241	—	
6	—	0,30	5,46	0,230	0,016	0,246	—	
7	—	0,60	5,10	0,213	0,029	0,242	0,200	
8	—	0,90	4,74	0,212	0,021	0,233	—	

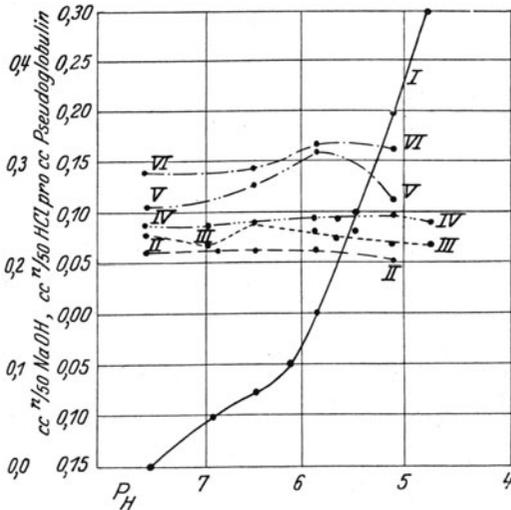


Abb. 13.

- I. Titrationskurve.
- II. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 3 Std.
- III. Cholesterin, ausgeschütt. nach 12 Std.
- IV. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 12 + 12 Std.
- V. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension in 3 Std. ausgeschütteltes Cholesterin.
- VI. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension in weiteren 12 Std. ausgeschütteltes Cholesterin.
- VII. Gesamter Cholesteringehalt der Pseudoglobulinlsg.

Aus der Tabelle sowie aus der graphischen Darstellung in Abb. 13 geht hervor, daß sich hinsichtlich des Pseudoglobulins ganz andere Verhältnisse geltend machen als in A und B. Bei keinem der untersuchten Werte für c_H kann eine Bindung des Cholesterins an Eiweiß festgestellt

Tabelle LXXIII.

Nr.	NaOH ccm	HCl ccm	pH	Cholesterin, ausgeschüttelt pro Kubik- zentimeter Albumin				Aussehen nach Ätherbehandlung und Zentrifugieren
				In 12 Stdn. Kurve III		In 3 Stdn. Kurve II		
				In weiteren 12 Stunden mg	Summe hieraus Kurve IV mg	In 3 Stdn. Kurve II mg		
1	0,3	—	7,50	0,405	0,010	0,415	0,394	Beide Flüssigkeitsschichten klar. Niederschlag in der Berührungsschicht, beide Flüssigkeitsschichten klar. Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung opak. Starker Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung getrübt. Starker Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung getrübt, ein Teil des Niederschlags abzentrifugiert. Geringerer Niederschlag in der Berührungsschicht, Eiweißlösung opak, kein Niederschlag abzentrifugiert.
2	0,15	—	7,00	0,396	0,019	0,415	—	
3	0	0	6,56	0,417	0,021	0,438	0,394	
4	—	0,15	6,08	0,388	0,035	0,423	—	
5	—	0,30	5,78	0,410	0,058	0,468	0,354	
6	—	0,45	5,53	0,252	0,035	0,287	—	
7	—	0,60	5,31	—	0,044	—	—	
8	—	0,90	4,96	0,109	0,044	0,153	0,163	
9	—	1,20	4,70	0,133	0,080	0,213	—	
10	—	1,50	4,48	0,137	—	—	—	
11	—	1,80	4,28	0,094	0,099	0,193	—	
12	—	2,00	4,12	0,159	—	—	—	

Gesamtcholesteringehalt: 0,515 ‰

Die erhaltenen Werte sind graphisch in Abb. 14 wiedergegeben.

werden, schon eine dreistündige Ätherbehandlung genügt, um den größten Teil — 84% — des vorhandenen Cholesterins zu extrahieren. Zwar war die Pseudoglobulinlösung zufolge des oben Gesagten (S. 67) bedeutend weniger konzentriert als die Euglobulinlösung, aber ihre Konzentration hatte doch dieselbe Größenordnung wie die des Fibrinogens, während trotzdem die Ausschüttelversuche in den beiden Fällen ganz verschiedene Resultate gaben.

Selbstredend ist es einzig und allein auf Grund dieser Versuche schwierig, sich darüber zu äußern, ob der Unterschied zwischen Eu- und Pseudoglobulin in dem nativen Blutplasma wirklich vorhanden ist. Es kann nur vermerkt werden, daß in bezug auf die beiden Globulinlösungen sowohl die Farbe als auch der Cholesterin- und Lecithin-gehalt pro Gramm Eiweiß und das Verhalten beim Ausschütteln mit Äther wesentliche Unterschiede aufwies. Man kann sich indes denken, daß alle diese während der Darstellung entstanden sind.

D. *Albumin* (10,37%). 3 ccm Albuminlösung wurden mit n/10 NaOH und n/10 HCl gemäß Tabelle LXXIII versetzt. Das Volumen wurde auf 5 ccm ergänzt. Schütteln mit 3 ccm Äther erst 12 Stunden, dann weitere 12 Stunden. Analog mit dem vorhergehenden Versuch wurde dann ein Versuch mit Ätherbehandlung während nur 3 Stunden gemacht; das Resultat desselben wird ebenso wie das der vorhergehenden hier unten angeführt.

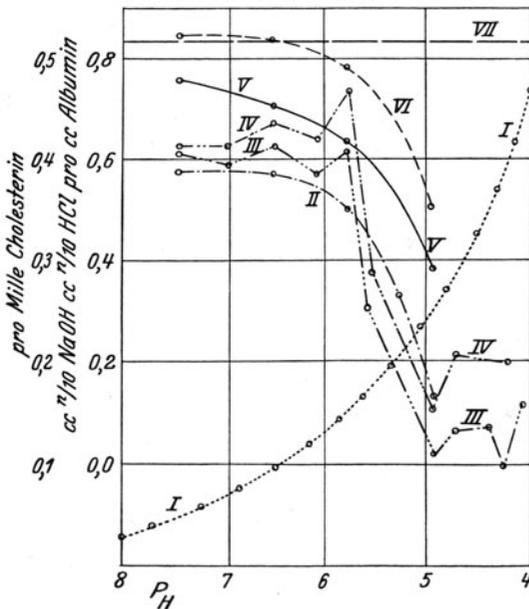


Abb. 14.
 I. Titrationskurve.
 II. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 3Std.
 III. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 12Std.
 IV. Cholesterin, ausgeschüttelt nach 12 + 12 Std.
 V. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension in 3 Std. ausgeschütteltes Cholesterin.
 VI. Nach Zusatz von Cholesterinsuspension in weiteren 12 Std. ausgeschütteltes Cholesterin.
 VII. Gesamter Cholesteringehalt der Albuminlösung.

Die Untersuchung des Albumins weist, wie zu erwarten war, von den vorhergehenden abweichende Ergebnisse auf. Auf der alkalischen Seite von $p_H = 5,5$ ist also das Cholesterin mit Äther zum großen Teile schon nach 3 Stunden ausgeschüttelt, während in allen Fällen sogar ein 12 + 12 Stunden langes Ausschütteln nicht genügte, um es vollständig zu extrahieren. Ebenso wie bezüglich des Euglobulins (B) kann man wohl den hohen Eiweißgehalt als Erklärung für dies Verhalten ansehen.

Bei $p_H = 5,5$ tritt eine plötzliche Veränderung ein, indem, wie es scheint, hier das Cholesterin an das Eiweiß gebunden wird. Diese Bindung bleibt dann bei weiterer Steigerung der Wasserstoffionenkonzentration, soweit diese verfolgt wurde (also bis $p_H = 4,12$), bestehen. Die etwas variierenden Werte zwischen $p_H = 4$ und 5 beruhen offenbar auf technische Schwierigkeiten beim Trennen der Ätherschicht von der Eiweißlösung mit ihren großen Mengen an ausgefälltem Eiweiß.

Mit dieser auf der sauren Seite von $p_H = 5,5$ eintretenden Bindung zwischen Albumin und Eiweiß bekommt man ungesucht eine Erklärung für das bereits früher (Versuch 23) beanstandete Verhalten, daß auf der sauren Seite vom Ausschüttelmaximum des Cholesterins aus dem Plasma ($p_H = 5,5$ bis 6) das Cholesterin fester gebunden erscheint als auf der alkalischen Seite desselben Maximums.

Es handelte sich zunächst darum, zu entscheiden, wie sich die Verhältnisse gestalten, wenn zu den verschiedenen Eiweißfraktionen eine Cholesterinsuspension hinzugefügt wird. Erst seien in Kürze die Resultate einiger Vorversuche mitgeteilt:

Aus den in A bis D 3 + 12 bzw. 12 + 12 Stunden ätherbehandelten Eiweißlösungen wurde der Äther notdürftig ausgelüftet, worauf eine gewisse kleine Menge Cholesterin in Suspension zu jeder Lösung zugesetzt wurde. Eine Senkungsprobe in den Röhren bei $p_H = 7,5$ ergab für Fibrinogen und Euglobulin eine unbedeutend gesteigerte Suspensionsstabilität infolge des Cholesterinzusatzes, in bezug auf Pseudoglobulin und Albumin eine relativ starke Steigerung der Stabilität, während erneute Ätherausschüttelproben in allen übrigen Röhren zeigten, daß das zugesetzte Cholesterin in den zwei ersten Fraktionen *zum großen Teil auf der alkalischen Seite von $p_H = 6$ gebunden wurde*, wodurch also das Resultat mit der Senkungsprobe zufriedenstellend erklärt werden zu können schien.

Nun wurden folgende Versuche angestellt:

Aus jeder Eiweißlösung wurden durch Zusatz von NaOH bzw. HCl neue Proben, ähnlich wie die dreistündigen Ausschüttelungen in A, B, C und D bereitet. Dann wurden 2 Tropfen 0,72 %iger Cholesterinsuspension zugesetzt, was ungefähr 0,04 ccm ausmachte, also 0,29 mg Cholesterin oder etwa 0,1 mg pro Kubikzentimeter Eiweißlösung. Die Röhren wurden 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen, worauf 3 ccm Äther hinzugefügt und in üblicher Weise 3 Stunden lang

ausgeschüttelt wurde. Danach wurde nochmals mit neuem Äther 12 Stunden ausgeschüttelt. Die Resultate der Cholesterinanalysen sind in Tabelle LXXIV mitgeteilt.

Tabelle LXXIV.

I Nr.	II Eiweißlösung	III p_H	IV			V		VII
			% ₀₀ Cholesterin ausgeschüttelt in					
			3 Std.	12 Std.	weiteren 3 + 12 Std.			
1	Fibrinogen	7,50	0,011	0,051	0,062	—	0,01	
2	"	6,85	0,019	0,078	0,097	—	0,01	
3	"	6,07	0,190	0,021	0,211	+	0,11	
4	"	5,43	0,161	0,018	0,179	+	0,10	
5	"	4,99	0,112	0,027	0,139	+	0,08	
6	Euglobulin	7,50	0,125	0,093	0,218	+	0,04	
7	"	6,50	0,089	0,122	0,211	+	0,02	
8	"	5,86	0,298	0,000	0,298	+	0,13	
9	"	4,50	0,095	0,097	0,192	+	0,07	
10	Pseudoglobulin	7,56	0,256	0,033	0,289	+	0,05	
11	"	6,50	0,273	0,016	0,289	+	0,06	
12	"	5,86	0,312	0,012	0,324	+	0,10	
13	"	5,10	0,261	0,048	0,309	+	0,06	
14	Albumin	7,50	0,281	0,043	0,524	+	0,09	
15	"	6,56	0,455	0,065	0,520	+	0,06	
16	"	5,78	0,418	0,073	0,491	+	0,06	
17	"	4,96	0,296	0,060	0,211	+	0,13	

Kolumne VII in dieser Tabelle gibt die 3-Stunden-Werte an, reduziert um die früher unter A bis D gefundenen 3-Stundenwerte. Theoretisch würde der Unterschied in dieser Kolumne, wenn das ganze zugesetzte Cholesterin extrahiert würde und ebensoviel des vorher in den Eiweißlösungen vorhandenen, wie in den vorhergehenden Versuchen 0,10 mg ausmachen. Selbstredend können nur starke Abweichungen in Betracht gezogen werden, da es die Technik kaum erlaubt, die Ziffern allzu sehr zu drücken. Die in der Tabelle LXXIV gefundenen Werte sind in den Abb. 11 bis 14 in den Kurven V und VI graphisch wiedergegeben.

Es ist absolut sicher, daß in Nr. 1 und 2 das zugesetzte Cholesterin an das Fibrinogen gebunden worden ist, während in Nr. 3 bis 5 das zugesetzte Cholesterin wieder extrahiert wurde. In Nr. 6 bis 7 ist ein Teil des zugesetzten Cholesterins ziemlich sicher an das Euglobulin gebunden worden, während in Nr. 8 das zugesetzte Cholesterin extrahiert worden zu sein scheint. Nr. 9 läßt sich nicht mit Sicherheit beurteilen. Das Pseudoglobulin scheint, allein nach Kolumne VII zu urteilen, einen Teil Cholesterin auf der alkalischen und sauren Seite von $p_H = 5,86$ gebunden zu haben, doch das Resultat aus der darauffolgenden zwölf-

stündigen Ausschüttelung macht dies weniger glaubhaft; dies ist es auch a priori mit Bezugnahme auf die Resultate der früheren Ausschüttelversuche an dieser Fraktion.

Was endlich das Albumin anbelangt, so läßt sich hier auch keine Bindung des zugesetzten Cholesterins mit Sicherheit feststellen, wenigstens nicht an dem biologisch interessantesten Punkte, $p_H = 7,5$.

Die Versuche 21 bis 23 haben gezeigt, daß in Pferdeplasma, versetzt mit steigenden Mengen Salzsäure, das Cholesterin des Plasmas zwischen $p_H = 6$ und $5,5$ in solcher Form vorhanden ist, daß es beim Ausschütteln mit Äther viel leichter als bei anderen Wasserstoffionenkonzentrationen extrahiert wird. Bei Versuchen mit reinen Eiweißfraktionen erwies es sich, daß dieses Verhalten auf der alkalischen Seite von $p_H = 6$ ausschließlich auf den Fibrinogen- und Euglobulinfraktionen beruht, welche hier das Cholesterin auf die eine oder andere Weise in schwer extrahierbarer Form festhielten; auf der sauren Seite von $p_H = 5,5$ konnte, außer bei den vorher erwähnten Fraktionen, auch in bezug auf das Albumin eine solche „Bindung“ des Cholesterins in schwer extrahierbarer Form nachgewiesen werden. Das Pseudoglobulin endlich zeigte bei keiner der untersuchten Wasserstoffionenkonzentrationen eine sichere Tendenz zur Bindung. Die Existenz dieses Eiweißkörpers in dem nativen Plasma wird ja heute sehr in Frage gestellt (vgl. S. 67).

Alle Eiweißfraktionen waren in dieser Darstellung ziemlich arm an Cholesterin. Man dürfte sich wohl kaum irren in der Annahme, daß bei den hier vorgenommenen energischeren Reinigungsoperationen — Waschen und zweimaliges Ausfällen — ein Teil Lipotide in das Waschwasser bzw. in die Mutterlauge übergegangen sind. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob die relative Cholesterinarmut dazu beigetragen, daß die Eiweißkörper zugesetztes Cholesterin aufnehmen und es in einer mit Äther schwer extrahierbaren Form binden konnten. Es stellte sich heraus, daß dies tatsächlich mit Fibrinogen und Euglobulin auf der alkalischen Seite von $p_H = 6$ der Fall ist, während auf der sauren Seite von $p_H = 5,5$ eine solche Verbindung nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte, wie auch in keiner der untersuchten Pseudoglobulin- und Albuminproben.

Die theoretische Erklärung für die hier mitgeteilten Erscheinungen zu geben dürfte schwer fallen, da es bis auf weiteres völlig unklar ist, welcher Natur eine derartige Verbindung Cholesterin—Eiweiß sein sollte. Betreffs des Euglobulins hat man vielleicht eine Erklärungsmöglichkeit in dem Umstand, daß sein isoelektrischer Punkt und also das Minimum der Ladung bei $p_H = 5,5$ (vgl. S. 8) beinahe mit dem Ausschüttelmaximum des Cholesterins zusammenfällt. Der isoelektrische Punkt des Fibrinogens ist nicht sicher bekannt (vgl. S. 8), weshalb

hier ein Ausgangspunkt für einen physikalisch-chemischen Erklärungsversuch fehlt, falls man nicht kühn sein will, die Sache umzuwenden und anzunehmen, daß die hier in bezug auf das Verhältnis zwischen Fibrinogen und Cholesterin gefundenen Tatsachen zu einem gewissen Grade dafür sprächen, daß der isoelektrische Punkt des Fibrinogens bei p_H ungefähr = 6 liege, was an und für sich kaum undenkbar scheint. Die Ausschüttelversuche mit Albumin gaben jedoch Resultate, welche gewissermaßen gegen die Bedeutung des isoelektrischen Gebiets für das in Rede stehende Phänomen sprechen, da auch hier eine „Bindung“ des Cholesterins auf der sauren Seite von $p_H = 5,5$ nachgewiesen wurde, obzwar die isoelektrische Reaktion des Albumins bei $p_H = 4,7$ bis $4,8$ liegen dürfte.

Eine gewisse oberflächliche Ähnlichkeit zeigen die gefundenen Resultate mit dem Phänomen, das von *Bungenberg de Jong* und *Kruyt*(10) unter dem Namen „Koazervation“ beschrieben wurde. Das Verhalten zwischen Cholesterin und Eiweiß auf diese Weise zu erklären, stößt indes auf unüberwindbare Schwierigkeiten, weil erstens es zweifelhaft ist, ob Cholesterin überhaupt im Plasma als ein hydrophiles Kolloid angesehen werden kann; zweitens das Cholesterin keine isoelektrische Reaktion hat; drittens das Eiweiß, ausgeschüttelt mit Äther, kein Maximum an Ausflockung und also an Dehydratation beim Maximum des ausschüttelbaren Cholesterins aufweist, sondern der Niederschlag im großen ganzen sukzessive nach der sauren Seite hin zunimmt.

Unter solchen Umständen erscheint es Verfasser am sichersten, bei dem heutigen Stand der Sache von einer theoretischen Erklärung der Bindung Cholesterin-Eiweiß abzusehen und sich damit zu begnügen, ihre tatsächliche Existenz zu konstatieren.

Die Resultate einiger Modellversuche werden hier kurz mitgeteilt: Nach *Sörensen* (88) kristallisiertes Ovalbumin in 4,5%iger Lösung, versetzt mit wechselnden Mengen NaOH zu Wasserstoffionenkonzentrationen zwischen 10^{-5} und 10^{-8} und danach mit Cholesterinsuspension versetzt, hatte, wie es sich bei Ätherausschütteln herausstellte, kein Cholesterin gebunden, sondern das ganze zugesetzte Cholesterin ging in zwölf Stunden in den Äther über.

In derselben Weise ging es mit 2%igen Wasserlösungen von synthetischem Lecithin, welche mittels Phosphatpuffer auf verschiedenen p_H zwischen 5,5 und 8 eingestellt und dann mit Cholesterinsuspension versetzt wurden: auch hier war das ganze zugesetzte Cholesterin in zwölf Stunden mit Äther extrahierbar.

Die bisher bei Versuch 24 mitgeteilten Resultate lenken unwillkürlich die Gedanken darauf, daß es interessant wäre, zu untersuchen, wie sich die Cholesterinsuspension verhält, wenn sie dem Plasma zu-

gesetzt wird, nämlich, ob etwas in nicht mit Äther ausschüttelbarer Form gebunden wird in Analogie mit den Verhältnissen bei reinen Fibrinogen- und Euglobulinlösungen, oder ob diese beiden Eiweißstoffe im Plasma mit Cholesterin „gesättigt“ sind.

Vorbereitende Versuche in dieser Richtung haben ergeben, daß verschiedene Pferdeplasma sich hierbei verschieden verhalten (was ja zu erwarten ist). In einer Reihe Fälle tritt eine unzweideutige Bindung (vgl. auch Versuch 25) bis zu 30 bis 50 % des zugesetzten Cholesterins auf, in anderen dagegen findet man es quantitativ in ausschüttelbarer Form wieder. Die Bedingungen für diese Bindung: Einfluß der Temperatur, Cholesteringehalt des Plasmas vor dem Zusatz, die Konzentration der verschiedenen Eiweißkörper, vielleicht auch Lecithin, Seifen, Gallensäuren u. ä., sind noch gar nicht aufgeklärt, weshalb es nicht erstaunlich ist, wenn die Verhältnisse von Plasma zu Plasma variieren.

Versuch 25. Wiederholte Cholesterin- und Lecithinbehandlungen des Plasmas. Senkungsversuche, Gesamtlipoidbestimmungen und Ätherausschüttelversuche.

Pferdeplasma wurde wiederholte Male teils mit 4 %iger Suspension von reinem, synthetischem Lecithin (L), teils mit Cholesterinsuspension 0,79 % in 0,04^{0/100}iger Seiflösung (K), teils der Kontrolle halber mit H₂O nach folgendem Schema versetzt:

K I = 1 Volumen Plasma + 0,2 Volumen Cholesterinsuspension,
L I = 1 „ „ + 0,2 „ Lecithinsuspension,
O I = 1 „ „ + 0,2 „ H₂O

wurden in der Winkelzentrifuge klar zentrifugiert.

Extraktion eines Teiles von allen drei mit Alkohol im Soxhlet.

K II = 1 Volumen K I + 0,133 Volumen Cholesterinsuspension,
L II = 1 „ L I + 0,133 „ Lecithinsuspension,
O II = 1 „ O I + 0,133 „ H₂O

wurden klar zentrifugiert, Soxhletextraktion an einem Teil von L II.

K III = 1 Volumen K II + 0,1 Volumen Cholesterinsuspension
+ 0,0133 Volumen 22,5%iger NaCl,
L III = 1 Volumen L II + 0,1 Volumen Lecithinsuspension
+ 0,0133 Volumen 22,5%iger NaCl,
O III = 1 Volumen O II + 0,1 Volumen H₂O
+ 0,0133 Volumen 22,5%iger NaCl.

Wie vorher zentrifugiert. Soxhletextraktion eines Teiles von allen drei.

Nach diesen Verdünnungen sind:

$$\frac{\text{Vol. K III, L III, O III}}{\text{Vol. unverdünntes Plasma}} = 1,56,$$

d. h. ungefähr dieselbe Verdünnung, die früher angewendet wurde.

Stickstoffanalysen an K III, L III und O III mit der Hypobromitmethode nach *T. Teorell* ergaben folgende Werte (Eiweiß = N · 6,25):

K III = 4,89%,
L III = 4,85%,
O III = 4,86%.

Nicht einmal bei dieser energischen Lecithinbehandlung hatte sich demnach der Eiweißgehalt des Plasmas geändert. An den in üblicher Weise behandelten Soxhletextrakten wurden Cholesterinanalysen mit Stufenphotometer, P-Analysen nach *Fiske-Subarow* mit Stufenphotometer ausgeführt. T = Extrakt des ursprünglichen Plasmas.

Die Resultate gehen aus der Tabelle LXXV hervor.

Tabelle LXXV.

Extrakt	‰ Cholesterin berechnet auf unverdünntes Plasma	Durch- schnitts- wert	‰ Lecithin berechnet auf unverdünntes Plasma	Durch- schnitts- wert	Bemerkungen
T	0,848 0,848	} 0,848	0,866 0,884	} 0,875	
K I	0,934 0,962		} 0,948		—
L I	0,812 0,807	} 0,810		1,50 1,48	} 1,49
O I	0,853 0,859		} 0,856	—	
L II	0,730 0,725	} 0,727		1,79 1,79	} 1,79
K III	1,08 1,12		} 1,10	0,875 0,875	
L III	0,611 0,619	} 0,615		1,51 1,51 1,53	} 1,52
O III	0,827		0,827	0,888 0,888	

Die Tabelle zeigt, daß Cholesterin, wenigstens in den kleinen Mengen, um die es sich hier handelt, sich proportional dem Zusatz löst, vergleiche T, K I und K III. Lecithin hingegen scheint sich schon beim ersten Zusatz bis zur Sättigung gelöst zu haben, nachdem L I ungefähr = L III ist. Der hohe Wert von L II beruht darauf, daß es nicht völlig fertigzentrifugiert war, als die Probe entnommen wurde: größte Geschwindigkeit war nötig, damit alle diese Behandlungen des Plasmas nicht zu lange Zeit in Anspruch nahmen.

Der Cholesteringehalt im L-Extrakt sank stetig, T > L I > L II > L III. Es schien wahrscheinlich, daß das Lecithin nur von dem

„freien“, d. h. mit Äther ausschüttelbaren, Cholesterin mitgerissen habe, ebenso daß das zugesetzte Cholesterin in der K-Serie wenigstens teilweise in „freier“ Form vorhanden sei. Um dies zu erforschen, wurden Ausschüttelversuche mit Äther, zwölf Stunden mit gleichen Volumina Äther, angestellt.

Die Cholesterinanalysen mit Stufenphotometer gaben folgende Resultate:

Tabelle LXXVI.

	% ₀₀ Cholesterin ausschüttelbar mit Äther, berechnet auf unverdünntes Plasma		Durchschnittswert % ₀₀
K III . . .	0,572	0,563	0,568
L III . . .	0,249	0,255	0,252
O III . . .	0,456	0,460	0,458

In O III wurde das „freie“ Cholesterin durch Ausschütteln mit Äther auf 0,458 %₀₀ bestimmt. Das „gebundene“ beträgt dann 0,827 — 0,458 = 0,369 %₀₀. In L III wurde das „freie“ Cholesterin in gleicher Weise bestimmt auf 0,252 %₀₀, d. h. das gebundene beträgt 0,615 — 0,252 = 0,363 %₀₀. Nachdem also in O III und L III gleich viel „gebundenes“ Cholesterin vorhanden ist, so muß *durch die Lecithinbehandlung ausschließlich „freies“ Cholesterin aus dem Plasma entfernt worden sein.*

Eine entsprechende Berechnung für K III gibt folgende Resultate: Gesamtcholesterin 1,10 %₀₀, freies, mit Äther ausschüttelbares Cholesterin 0,518 %₀₀; das gebundene Cholesterin 0,53 %₀₀. K III hält demnach *mehr sowohl „gebundenes“ als auch mit Äther ausschüttelbares Cholesterin als O III.*

Schließlich wurden auch Senkungsproben mit je einem Volumen von K III, L III und O III nach Zusatz von 0,7 Volumen ungewaschener Blutkörperchen gemacht.

Tabelle LXXVII.

	30 Min. mm	60 Min. mm	90 Min. mm	120 Min. mm	150 Min. mm
K III . . .	2,5	5	8,5	11	14
L III . . .	2,5	10	20	27	33
O III . . .	3	15	28	38	45

Sowohl K III als auch L III haben also eine geringere Senkungsgeschwindigkeit als O III. Der gesamte Lipoidgehalt in den beiden ersteren ist indessen größer als in der letzteren.

Tabelle LXXVIII.

	Cholesterin ‰	Lecithin ‰	Cholesterin + Lecithin ‰
K III . . .	1,10	0,875	1,98
L III . . .	0,61	1,52	2,13
O III . . .	0,85	0,88	1,73

Nach dieser Ausrechnung sollte L III die geringste Senkungsgeschwindigkeit haben, aber es ist gar nicht so selbstverständlich, daß Cholesterin und Lecithin in derselben Konzentration eine ebenso stark verzögernde Fähigkeit besitzen. Richtiger wäre es natürlich, nur vom Eiweiß ungebundenes Cholesterin + ebensolches Lecithin zusammenzurechnen; da es aber bis auf weiteres keine Möglichkeit gibt, die Quantität des letzteren zu beurteilen, kann diese Berechnung hier nicht durchgeführt werden.

Versuch 26. Ätherausschütteln, Cholesterinanalysen, Lecithinanalysen, Eiweißfraktionsanalysen an verschiedenen sedimentierenden Menschenblutproben.

Da es klar schien, daß

1. Cholesterin die Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen verringert,
2. der gesamte Cholesteringehalt des Blutes bisher anscheinend in keinem Zusammenhang mit der Senkungsgeschwindigkeit stand [vgl. doch *Delaria* (16)],
3. Fibrinogen und Globulin bei gewöhnlichem p_H des Plasmas Cholesterin in gebundener Form enthält, und
4. Cholesterin, in Form von Suspension zugesetzt, immer wenigstens größtenteils in freier, mit Äther ausschüttelbarer Form wiedergefunden wird,

so war es wahrscheinlich, ja sogar sicher bei Berücksichtigung des Versuchs 24, daß in pathologischen Plasmen mit hoher Sedimentationsgeschwindigkeit, wo eine Fibrinogenzunahme seit langem bekannt ist (siehe Kapitel II) und auch später eine Globulinzunahme konstatiert wurde [*Fähræus* (23)], im großen ganzen ein verminderter Gehalt an mit Äther ausschüttelbarem Cholesterin anzutreffen sein dürfte. *Diese Abnahme des „freien“ Cholesterins würde dann wenigstens teilweise als verantwortlich für die Abnahme der Suspensionsstabilität gedacht werden können.*

Die Phosphatide haben infolge ihrer Unzugänglichkeit, sie mit Äther auszuschütteln, nicht in derselben, relativ eingehenden Weise wie das Cholesterin behandelt werden können; doch besteht nicht der geringste Zweifel darüber, daß auch die Phosphatide in zwei verschie-

denen Formen vorkommen, teils frei, teils an Eiweiß gebunden, in erster Hand an (Eu-)globulin (siehe Kapitel II, S. 6 ff.) und wahrscheinlich auch an Fibrinogen. Da Lecithin, vermutlich die Phosphatide im allgemeinen, wie auch Cholesterin hemmend auf die Senkung einwirken und die beiden demnach einander müssen substituieren können, während nur das „freie“ Cholesterin, wenigstens zu einem gewissen Grade, für eine quantitative Bestimmung zugänglich ist, so kann man auch nicht erwarten, eine strenge Parallelität zwischen ausschüttelbarem Cholesterin und Suspensionsstabilität zu finden, indes können voraussichtlich grobe Unterschiede, wenigstens im allgemeinen, zum Vorschein kommen.

Ein großer Teil der Blutanalysen in diesem Versuche wurde unter der Leitung des Verfassers von Dr. *I. Schröder*, Helsingfors, ausgeführt, ein anderer Teil besteht aus den vom Verfasser angestellten Ausschüttelproben mit Äther an einer Reihe, aus anderen Gesichtspunkten untersuchten Blutproben, die zu einer demnächst erscheinenden Arbeit von *Westergren*, Verfasser und *Widström* gehören; einige andere Blutproben wurden vom Verfasser eigens für diese Untersuchung beschafft.

Die mit * bezeichneten Nummern wurden von Dr. *Schröder* analysiert. Wie aus der Tabelle LXXIX hervorgeht, ist nur ein Teil von diesen dreimal mit Äther ausgeschüttelt worden, in diesem Falle das letztmal 14 Stunden lang, während die letzte Ausschüttelung der vom Verfasser selbst behandelten Plasmaproben zehn Stunden dauerte. Dieser Unterschied spielt offenbar keine Rolle, zumal bei dieser letzten Extraktion in den allermeisten Fällen das ganze zurückgebliebene Cholesterin extrahiert wurde. In den fünf mit † bezeichneten Fällen dauerte das erste Ausschütteln nur vier Stunden anstatt fünf. Um mit den übrigen vergleichbare Werte zu erhalten, machte Verfasser an der Hand der Kurven in Abb. 16 eine (beliebige) Korrektur nach oben mit 10 % des Vierstundewertes. Es zeigt sich indes, daß dies für das Resultat im großen ganzen keinen Einfluß hat, selbst wenn man mit + 25 % korrigieren würde, also proportional der Ausschüttelzeit, trotzdem eine solche Korrektur sicherlich zu groß wäre. Die Resultate sind in der Tabelle LXXIX nach der gemäß *Westergren* (l. c.) bestimmten Sedimentationsgeschwindigkeit geordnet. Der Hämoglobingehalt ist leider nur in einem Teil der Fälle bestimmt, aber er scheint für die Senkungsgeschwindigkeit eine geringere Rolle zu spielen, als man aus Experimenten *in vitro* zu vermuten Anlaß haben sollte. Fall 14 ist der einzige, in welchem eine starke Anämie festgestellt wurde, aber er hält sich trotzdem ganz in dem zwar ziemlich weiten Rahmen für die Variationen der Senkungsgeschwindigkeit mit dem ausschüttelbaren Cholesterin.

Läßt man die Fälle 5, 6, 24, 26 und 27 bis auf weiteres unberücksichtigt, so geht aus der Tabelle hervor, daß bei steigender Senkungsgeschwindigkeit der Gehalt des mit Äther in fünf Stunden extrahierbaren

Tabelle

Nr.	Senkung in 1 Std. mm	‰ Cholesterin, ausgeschüttelt				A + B + C
		A in 5 Std.	B in noch 5 Std.	A + B	C in noch 10 bis 14 Std.	
1	1	1,47	0,34	1,81	0,03	1,84
		1,47	0,30	1,77	0,03	1,80
2*	1	1,87 (2 Std.)	—	—	0,23 (vgl. A)	2,10
		1,86 (2 ")	—	—	0,26 (" A)	2,12
3*	2	1,59 "	0,16	1,75	Spuren	1,75
		(1,48)?	0,16	?	—	—
4*	3	1,35	0,14	1,49	0,14	1,63
5*	3	0,75	0,11	0,86	0,11	0,97
6*	6	0,95†	—	—	—	—
7*	7	1,68	0,10	1,78	0	1,78
		1,68	0,10	1,78	0	1,78
8	8	1,42	0,23	1,65	0,02	1,67
		1,37	0,32	1,69	0,01	1,70
9	9	1,18	0,47	1,65	0,09	1,74
		1,24	0,36	1,60	0,17	1,77
10*	10	1,85	0,19	2,04	Spuren	2,04
		?	0,20	—	?	—
11	17	1,31	0,25	1,56	?	1,56
		1,37	0,25	1,62	0	1,62
12	17	1,38	0,28	1,66	0,35	2,01
		1,41	0,27	1,68	0,37	2,05
13	18	0,86	0,10	0,96	0,02	0,98
		0,81	0,15	0,96	0,04	1,00
14	30	0,66	0,28	0,94	0,06	1,00
		0,84	0,33	1,17	Spuren	1,17
15	32	0,81	0,30	1,11	0,06	1,17
		0,75	0,18	0,92	0,48	1,40
17*	39	0,50†	—	—	—	—
		0,55†	—	—	—	—
18	41	0,67	0,22	0,89	0,08	0,97
19	49	0,66	0,15	0,81	0,27	1,08
		0,69	0,14	0,83	0,24	1,07
20*	51	0,81†	—	—	—	—
		0,77†	—	—	—	—
21*	52	0,51	0,73	1,24	0,86	2,10
		0,49	—	—	0,86	—
22*	64	1,00	—	—	—	—
		0,93	—	—	—	—
23	66	0,93	0,22	1,15	0,43	1,58
		0,91	0,22	1,13	0,48	1,61
24*	67	1,69†	—	—	—	—
		—	—	—	—	—
25*	68	0,54†	—	—	—	—
		—	—	—	—	—
26	115	1,21	0,44	1,65	0,36	2,01
		1,26	0,39	1,65	0,36	2,01
27	116	1,25	0,20	1,45	0,31	1,76
		1,25	0,28	1,53	0,28	1,81
28*	129	0,09	—	—	—	—
		0,29	—	—	—	—

LXXIX.

Total-Cholesterin ‰	‰ vom Total-Cholesterin in 5 Std. ausgeschüttelt	Total-Eiweiß ‰	Fibrin ‰	Globulin ‰	Albumin ‰	Lecithin ‰	Hämoglobin ‰
1,82	81	7,34	0,27	1,72	5,35	1,86	105
2,11	88	—	—	—	—	—	—
1,75	91	—	—	—	—	—	—
1,95	83	6,58	0,32	2,40	3,86	—	—
0,97	77	5,51	0,34	2,11	3,06	—	—
1,22	78	7,55	0,25	2,47	4,73	—	—
1,78	94	7,31	0,33	1,88	5,10	—	—
1,77	79	6,75	0,31	2,23	4,22	—	78
1,76	69	5,82	0,25	1,62	3,85	—	49
2,04	91	6,78	0,35	1,98	4,45	—	—
1,59	84	6,29	0,34	2,70	3,25	1,85	67
2,03	69	7,30	0,44	2,92	3,94	—	110
1,46	59	7,99	0,43	3,20	4,36	—	100
1,19	62	—	—	—	—	—	25
1,17	70	8,03	0,61	3,35	4,07	1,31	85
1,44	52	5,61	—	—	—	—	—
1,41	37	—	—	—	—	—	—
1,19	56	7,73	—	—	—	—	—
1,08	62,5	—	0,69	2,74	3,94	1,80	87
1,62	49	8,34	0,87	3,73	3,75	—	—
2,38	21	5,82	0,61	—	—	—	—
1,52	63	7,15	0,55	3,41	3,19	—	—
1,60	57,5	6,57	0,46	2,12	3,99	1,43	67
2,54	66,5	8,12	0,81	3,87	3,44	—	—
1,66	30	7,05	0,45	3,82	2,78	—	69
2,01	62	7,39	0,76	3,86	2,77	1,81	62
1,79	70	8,72	1,00	4,25	3,47	1,27	88
1,06	etwa 18	6,19	0,67	3,37	2,15	—	—

Cholesterins, obgleich unter Variationen, allmählich sinkt, während das Cholesterin, das beim dritten Ausschütteln — wo ein solches gemacht wurde — extrahiert wurde, im großen ganzen mit steigender Senkungsgeschwindigkeit zunimmt. Man kann aber bei weitem nicht irgendeine Parallelität zwischen dem Fibrinogen- und Globulingehalt und der Menge „gebundenes“ Cholesterin konstatieren, vgl. z. B. die Fälle 27 und 28. Es erscheint demnach wahrscheinlich, daß der Zustand des Plasma-cholesterins, was angemessen ist, von Fall zu Fall variieren kann.

In Nr. 5 und 6 findet man keinen Erklärungsgrund dafür, weshalb diese nicht hiermit in Einklang stehen. Besonders interessant ist Fall 21, wo man überrascht ist über den hohen Cholesteringehalt ($2,38\%$) im Verhältnis zu der geringen in fünf Stunden ausschüttelbaren Cholesterinmenge ($0,50\%$). Hier haben wir also ein hübsches Beispiel dafür, daß viel Cholesterin gebunden sein kann, trotz des in diesem Falle niedrigen Gesamteiweißgehalts im Plasma. Der Fall ist graphisch in Abb. 16 wiedergegeben (einschließlich des Resultates einer zweistündigen Ausschüttelung). Fall 21 steht in Kontrast zu Nr. 24, der einen verhältnismäßig sehr hohen A-Wert sowie hohen Gesamtcholesteringehalt aufweist. Hier sollte man also, nach den Cholesterinwerten zu urteilen, eine bedeutend geringere Senkungsgeschwindigkeit erwarten. Auf Grund der Eiweißwerte hingegen würde man eher eine höhere Senkungsgeschwindigkeit zu erwarten haben; *diese beiden Wirkungen, sollte man meinen, würden einander neutralisieren*. Dasselbe dürfte auch für Nr. 27 gelten, die zudem einen niedrigen Lecithinwert hat. Den umgekehrten Fall, also außergewöhnlich niedrigen A-Wert und einen im Verhältnis zur Senkungsgeschwindigkeit niedrigen Fibrinwert, trifft man deutlich in Nr. 28 an, weniger in Nr. 25. Die übrigen Fälle weisen nach der einen oder anderen Richtung weniger ausgeprägte Eigenschaften auf.

Da es demnach als offenbar angesehen werden muß, daß eine Mehrzahl Faktoren, wahrscheinlich alle Kolloide des Plasmas, von den Kristalloiden ganz zu schweigen, eine Rolle spielen, die wahrscheinlich nicht proportional der Konzentration dieser Kolloide ist, sondern von Fall zu Fall von deren variierendem Zustand in bezug auf Ladung, Oberflächenspannung und Adsorption an die Blutkörperchen abhängt, so kann man von einer statistischen Bearbeitung der Korrelation zwischen „freiem“ Cholesterin und Senkungsgeschwindigkeit keine allzu große Übereinstimmung erwarten.

Nimmt man alle Werte mit, wird der Korrelationskoeffizient $= -0,41 \pm 0,12$, also nicht so hoch, aber eine völlig sichere Korrelation. Berücksichtigt man nur Fälle mit einer Senkungsgeschwindigkeit unter 70 mm, was wohl als motiviert angesehen werden kann, da bei außerordentlich hohen Senkungswerten oft exzeptionelle Verhältnisse der einen oder anderen Art vorliegen, erhält man den Korrelationskoeffi-

zienten = $-0,63 \pm 0,10$. Um die statistische Bearbeitung vollständig zu machen, wird folgendes angeführt, obschon ich infolge der unten erwähnten Umstände keinen besonders großen Wert darauf legen möchte.

Eine Linie, welche sämtliche Observationen ausgleicht, kann infolge deren großer Verteilung nicht gut gezogen werden. Infolgedessen und auch zufolge des geringen Materiales war es am besten, einen präliminaren graphischen Ausgleich unter Ausschluß von Nr. 24 und 26 bis 28 zu bewerkstelligen. Die hierdurch ausgeglichenen Werte des ausschüttelbaren Cholesterins und der Senkungsgeschwindigkeit für einen gegebenen Wert des ersteren dürften jedoch approximativ den Zusammenhang zwischen diesen beiden angeben. Siehe Abb. 15.

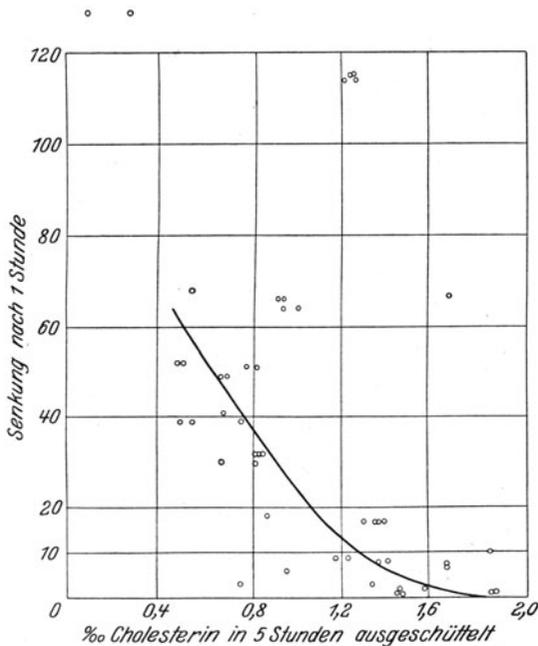


Abb. 15.

Der Korrelationskoeffizient zwischen Senkungsgeschwindigkeit und Gesamtcholesteringehalt wird nur $-0,008 \pm 0,19$, was demnach in seiner Art die im vorhergehenden dargelegten Theorien bekräftigt.

Eine Frage von größter Wichtigkeit für die Beurteilung der mitgeteilten Resultate ist selbstverständlich, in welchem Grade die Menge des in dem nativen Plasma vorhandenen, von Eiweiß nicht gebundenen Cholesterins dem mit Äther nach einer bestimmten Zeit, z. B. fünf Stunden, extrahierten entspricht.

Der Verlauf würde in zwei Abschnitte geteilt werden können: A. Die Extraktion des von Beginn an freien Cholesterins und B. die Extraktion des von vornherein gebundenen Cholesterins, das während des Ausschüttelns aus dem Fibrinogen und den Globulinen dissoziiert wird. Setzt man voraus, daß der Prozeß A rasch verläuft, B hingegen langsam, so weist die Kurve, welche den Zusammenhang zwischen Ausschüttelzeit und extrahierter Cholesterinmenge darstellt, einen Knick auf, wo das freie Cholesterin wenigstens zum größten Teil extrahiert ist, so daß von jetzt ab nur aus den Globulinen dissoziiertes Cholesterin langsam in den Äther übergeht. Dieser Knick kann, was anzunehmen ist, deutlicher werden, wenn relativ viel Cholesterin gebunden ist, während er sich der experimentellen Beobachtung entzieht, wenn nur ein geringer Teil des Cholesterins in gebundener Form vorhanden ist. Andererseits wäre der Fall denkbar, daß A ziemlich langsam verläuft, vielleicht wenig oder nicht rascher als B; in diesem Fall kommt auch kein Knick zum Vorschein, und die Bestimmung des „freien“ Cholesterins durch Ausschütteln mit Äther wird eine ganz konventionelle Sache.

Abb. 16 gibt graphisch das nach verschiedenen Zeiten ausgeschüttelte Cholesterin in Prozenten des gesamten in den Normalfällen 2,

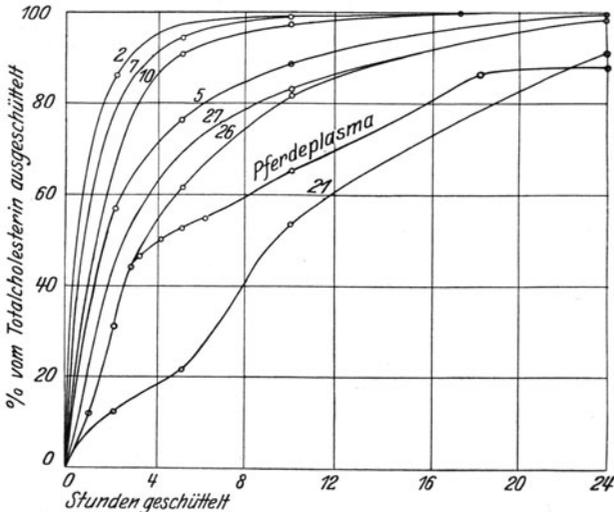


Abb. 16.

7 und 10 wieder, ferner den pathologischen 21 mit ungewöhnlich wenig „freiem“ Cholesterin im Verhältnis zu dem vielen Gesamtcholesterin, sowie 26 und 27, die, wie oben erwähnt wurde, abweichende Verhältnisse aufweisen. Eine Reihe Ausschüttelungswerte, die nicht in der Tabelle

mitgeteilt sind, werden gleichfalls graphisch wiedergegeben. Außerdem ist zum Vergleich des Ausschüttelungsresultat eines normalen, frischen Pferdeplasmas mit aufgenommen worden, das infolge seiner hohen Senkungsgeschwindigkeit, die es darin aufgeschlemmten Blutkörperchen verleiht, und seines hohen Globulingehalts am ehesten mit einem pathologischen Menschenplasma zu vergleichen ist.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß die drei Normalfälle eine Gruppe hyperbelähnlicher Kurven bilden. Zwar sind die Observationen zu wenige, als daß hier ein Knick entdeckt werden könnte, aber dies wäre a priori eine Unmöglichkeit mit der benutzten Technik, da die Hauptmasse des Cholesterins sehr rasch extrahiert wird. 26 und 27 zeigen eine deutliche Streckung der Hyperbel, was gemäß der gemachten Annahme auf dem hier höheren Fibrinogen- und Globulingehalt dürfte beruhen können.

Fall 21 zeigt ein anderes Bild: hier liegt bei drei bis fünf Stunden ein deutlicher Knick vor, der ungesucht entsprechend des bereits oben Gesagten dürfte gedeutet werden können.

Das Ausschütteln des Pferdeplasmas zeigt im Prinzip dieselbe Sache; hier ist der Knick durch mehrere Werte sichergestellt. — Wenn auch hier die Anzahl der Observationen nicht groß ist, scheinen sie doch die Auffassung zu stützen, daß die Bindung des Cholesterins an Fibrinogen und Globulin in verschiedenen Menschenplasmen verschieden fest ist. Will man die Sache auf die Spitze treiben, würde also beispielsweise der hohe Fünfstundenwert im Falle 24 dadurch entstanden sein können, daß eine lockere Bindung Cholesterin—Globulin bzw. Fibrinogen schon nach fünfständigem Ausschütteln zu einem bedeutenden Teil dissoziiert worden und das auf diese Weise freigemachte Cholesterin zusammen mit dem von Anfang an freien extrahiert worden ist. Im Pferdeplasma scheint die Bindung fester zu sein als im Menschenplasma: in Tabelle LXXIX hat ja eine 24stündige Ausschüttelung beinahe durchweg alles vorhandene Cholesterin extrahiert, während dies im Pferdeplasma in den Proben des Verfassers niemals der Fall gewesen ist: das hier erwähnte Pferdeplasma war noch nach einem Ausschütteln von 72 Stunden nicht völlig extrahiert; vgl. auch Versuch 23.

Versuch 27. Lipoiduntersuchungen an auf verschiedene Temperaturen erhitztes Plasma.

Verschiedene Portionen Pferdeplasma wurden bei verschiedenen Temperaturen in Thermostaten nach untenstehendem Schema 5 Stunden lang behandelt, worauf die Plasmaproben aus den Thermostaten herausgenommen wurden; es wurden dann 0,7 Volumen dreimal in physio-

Tabelle LXXX.

Nr.	In den Thermostaten		Senkung nach		
	Temperatur ° C	Bemerkung	40 Min.	60 Min.	120 Min.
1	47,5	still	8	15	36
2	41,7	wird geschüttelt	0,5	1	15
3	41,7	still	0	1	4
4	38	"	2	3	5
5	20	"	89	111	118
6	3	"	89	111	118

logischer Kochsalzlösung ausgewaschene Blutkörperchen hinzugesetzt und die Senkungsprobe gemacht.

Das Resultat stimmt im großen ganzen mit den Ergebnissen überein, die mehrere Forscher vor langem schon gefunden haben: *Nasse* (66), *Sellards* (82), *Wiltshire* (99), *Berczeller* und *Stanker* (3) und am ausführlichsten von *Fähraeus* (23) studiert worden sind. Das Schütteln in Nr. 2 hat jedoch nur teilweise den Effekt der Erhitzung aufzuheben vermocht.

Unmittelbar nach der Thermostatbehandlung wurden an jeder der Plasmaproben mit Äther Ausschüttelversuche angestellt (2 ccm Plasma + 4 ccm Äther, 12 Stunden). Ein anderer Teil der Plasmaproben wurde mit gleicher Volumina gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, zentrifugiert, wonach ein Teil der Mutterlauge nach *Bloor* extrahiert wurde. Dies geschah, weil man sich denken konnte, daß eine Bindung der Phosphatide an Fibrinogen und Globuline bzw. eine Freimachung derselben von diesen in den Mutterlauge der verschiedenen Proben nach Fällung von Fibrinogen und Globulinen durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat verschiedene Lipoidphosphorwerte geben würde. Auch der Cholesteringehalt in den Mutterlauge wurde bestimmt, um zu erforschen, ob auf diese Weise irgendeine Verschiedenheit hinsichtlich des Cholesterins eingetreten sei.

Es zeigte sich aber, daß:

A. die Ausschüttelproben innerhalb der Fehlergrenzen bei allen Plasmaproben dieselben Werte gaben,

B. und auch der Bloorextrakt aus den Mutterlauge hatte nach Aussalzen der Globuline sowohl ungefähr dieselben Lecithin- als auch Cholesterinwerte.

Nach diesen Resultaten zu urteilen, scheinen die großen Variationen in der Suspensionsstabilität durch Wärmebehandlung des Plasmas nicht auf die Lipide zurückgeführt werden zu können.

Versuch 28. Kataphoreseversuche an Plasma und quantitative Bestimmung der verschiedenen Eiweißkörper, welche mit dem elektrischen Strome gewandert sind.

Dieser Versuch, der bereits in einem zeitigen Stadium in einem anderen Zusammenhang angestellt worden ist, wird hier kurz erwähnt, da er trotz gewisser Mängel in der experimentellen Ausführung dennoch, wie Verfasser glaubt, wertvolle Resultate für das allgemeine Raisonement über die Suspensionsstabilität des Blutes gegeben hat (Kap. II). Auch aus anderen Gesichtspunkten schien es berechtigt, diese Versuche anzuführen. Sie wurden nämlich in einer Weise gemacht, wie sie Verfasser in der Literatur nicht gefunden hat, indem das Verhältnis zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Eiweißkörper durch Mikroanalyse der Eiweißfraktionen vor und nach der Kataphorese bestimmt wurde.

Außerdem wurde jede Möglichkeit ausgeschlossen, daß das Material, d. h. die Eiweißkörper des Plasmas durch Aussalzen, Dialysen oder ähnliches, mehr oder weniger denaturiert werden, da nämlich zu den Kataphoreseversuchen das frische Plasma ohne jede Vorbehandlung benutzt wurde. Die Resultate erwiesen sich als gut reproduzierbar. Es war also *nicht* die Absicht, die absolute Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Eiweißkörper unter dem Einfluß eines gewissen Potentialfalles pro Kubikzentimeter zu bestimmen, wozu vollkommenere Anordnungen nötig gewesen wären, sondern nur *das Verhältnis zwischen ihren Wanderungsgeschwindigkeiten zu ermitteln*.

Der benutzte Kataphoreseapparat war eine große Auflage eines von *Michaelis* (63) angegebenen Apparats. Von letzterem unterschied er sich nur durch zwei weitere Öffnungen mit eingeschlifenen Glaspropfen, die in der mittleren der drei Knickungen zu jeder Seite des U-Rohres angebracht wurden. Durch diese Öffnungen konnten nach beendetem Versuch die U-Rohrschenkel oberhalb der Hähne auspipettiert und quantitativ ausgespült werden.

Der Querschnitt des Rohres betrug überall 1 qcm. Die gesamte Länge zwischen den Agarrohrspitzen der Elektroden (s. unten) = 46 cm. Der ganze Apparat war während des Versuchs in einen Wasserthermostaten bei 18° C gestellt.

Nun wurde zuerst das elektrische Leitvermögen in einem frischen Pferdeplasma bestimmt, womit dann der Kataphoreseapparat bis oberhalb der Hähne gefüllt wurde. Nachdem diese geschlossen waren, wurde der obere Teil des Apparats mit KCl-Lösung von demselben Leitvermögen wie das Plasma gespült und dann der Apparat damit gefüllt.

Die unpolarisierbaren Elektroden waren nach folgendem Schema gebaut: Cu/gesättigte Cu SO₄-Lösung/Agar, gesättigt mit KCl/gesät-

tigte KCl-Lösung/Agar, mit KCl gesättigt. Die letzten Agarröhren tauchten ihre Spitzen in die obere Flüssigkeit im Kataphoreseapparat hinein. Zwischen den Elektrodenstippen wurde ein Voltmeter mit Platinaelektroden eingekoppelt.

An demselben Plasma wurden drei Versuche gemacht. Bei jedem wurde der Strom wenigstens 3 Stunden geschlossen gehalten, um genügend Material für die Eiweißfraktionsanalysen zu bekommen. Die Spannung, die ab und zu dadurch geprüft wurde, daß für einen Augenblick der Voltmeterkreis eingekoppelt wurde, sank von anfangs ungefähr 100 Volt recht hastig auf 80 Volt, wo sie dann nahezu konstant blieb, jedoch mit einer Tendenz, noch etwas zu sinken. Da es für den beabsichtigten Zweck nicht notwendig war, die Spannung konstant zu halten, wurde davon Abstand genommen. Rechnet man mit einer Anfangsspannung von 100 Volt und 3300 Ω Widerstand, wird die Stromstärke = 30 Milliamp., was bei einem so großen Querschnitt wie 1 qcm, offenbar eine relativ geringe Stromdichtigkeit ausmacht, weshalb eine nennenswerte Erwärmung des in das Wasserbad hineingesetzten Apparats nicht zu befürchten war.

Nach 3 Stunden wurde der Strom unterbrochen, die Hähne des U-Rohres geschlossen und die Flüssigkeit in den Schenkeln oberhalb der Hähne ausgespült. *Auf der negativen Seite war kein Eiweiß vorhanden*; die Eiweißkörper, welche mit verschiedener Geschwindigkeit nach dem positiven Pol gewandert waren, wurden nach *Theorell* und *Widström* (s. Kap. III) analysiert. Die Resultate sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

Tabelle LXXXI.

	Das gesamte Eiweiß bestand aus		
	Fibrin %	Globulin %	Albumin %
P	3,7	46,2	50,1
Versuch I +	0,9	25,6	73,5
„ I —	6,3	64,7	29,0
„ II +	1,0	24,7	74,3
„ III +	1,4	23,3	75,3
Mittel I, II, III +	1,1	24,5	74,4

Bezeichnungen: P = unbehandeltes Plasma.

Versuch I + = das Eiweiß, das in Versuch I nach dem positiven Pol gewandert ist.

Versuch I — = Probe aus dem Eiweißpfeiler in nächster Nähe des negativen Pols.

Versuch II + = das Eiweiß, das in Versuch II nach dem positiven Pol gewandert ist.

Versuch III + = das Eiweiß, das in Versuch III nach dem positiven Pol gewandert ist.

Wie man sieht, haben die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Eiweißkörper eine Verschiebung in der Zusammensetzung verursacht. Aus den Durchschnittswerten in der untersten Reihe, verglichen mit den Werten in der obersten (P), können die gegenseitigen Relationen zwischen den Durchschnittswanderungsgeschwindigkeiten ohne Schwierigkeit errechnet werden. Bezeichnet man die Wanderungsgeschwindigkeit des Fibrinogens mit a , wird die des Globulins $1,8 a$ und die des Albumins $5,0 a$. Da der Eiweißpfiler nach 3 Stunden 30 bis 40 mm gewandert war, was ohne weiteres abgelesen werden konnte, so wird man verstehen, daß z. B. die Fibrinogenmoleküle im Durchschnitt 6 bis 8 mm gewandert sein müssen; dies ist so viel, daß es *allein* durch Diffusion nicht in die Kammer am positiven Pol gelangt sein kann. In diesem Falle würde übrigens ebensoviel Fibrinogen in der Kammer am negativen Pol angetroffen worden sein; diese war jedoch frei von Eiweiß. Das Fibrinogen würde demnach im Plasma eine *negative* Ladung haben, obzwar *schwächer als Globulin*, und viel schwächer als Albumin, dies unter der Voraussetzung, daß zwischen Ladung und Wanderungsgeschwindigkeit eine Art Proportionalität vorhanden ist. So gibt beispielsweise die Formel von *Burton* [s. *Scott* und *Svedberg* (81)] eine direkte Proportionalität zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit einerseits und der Potentialdifferenz zwischen Partikelchen und Lösungsmittel andererseits an.

Wenn auch die Richtigkeit dieser Form nicht als bewiesen angesehen werden kann, muß man wohl dennoch einen gewissen Zusammenhang zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und dem Potential der Partikelchen („elektrische Oberflächenintensität der Partikelchen“) im Verhältnis zum Lösungsmittel annehmen. Das Resultat gibt demnach eine gewisse Stütze für die *Höbersche* Auffassung von der Einwirkung der Eiweißkörper gegenüber der von *Wöhlisch* vorgebrachten. Siehe weiter Kap. II.

Zusammenfassung.

1. Durch Zusatz einer in bestimmter Weise dargestellten Cholesterinsuspension zu Serum oder Plasma kann ein Teil des Cholesterins in *klare Lösung* übergeführt werden.

2. Lecithin oder Phosphatide aus Serum können in klare Lösung übergeführt werden, wobei sich jedoch zeigt, wenn der ungelöste Überschuß wegcentrifugiert wird, daß ein Teil des Cholesterins davon adsorbiert geworden ist und aus der Lösung verschwindet; dieses Cholesterin rührt von dem mit Äther ausschüttelbaren Teil des Cholesterins her.

3. Die neu hinzugekommenen Lipide werden beim Aussalzen der verschiedenen Eiweißfraktionen mit Ammoniumsulfat sowohl mit der Fibrinogen- als auch mit der Globulinfraktion ausgefällt.

4. Es wurde die vom Verfasser früher gemachte Beobachtung bekräftigt, daß die beim Aussalzen und nun auch in einem Falle bei Elektrodialyse ausgefallenen Fraktionen alle Lipide in gewissen regelmäßigen Proportionen enthalten, so daß der Quotient Cholesterin: Lipoidphosphor sukzessiv sinkt, Fibrinogen > Globulin > Albumin.

5. Die von anderen Autoren nachgewiesene antagonistische Wirkung des Cholesterins und Lecithins auf die Hämolyse der Blutkörperchen kann auch in dieser Arbeit festgestellt werden.

6. Sowohl Cholesterin als auch Lecithin haben einen *kräftig hemmenden Einfluß* auf die Senkung der Blutkörperchen. Dieser Einfluß wird durch eine quantitativ nachgewiesene Adsorption der negativ geladenen Lipide an die Blutkörperchen erklärt. Diese stand mit der durch die Lipide herabgesetzten Oberflächenspannung in Zusammenhang. Durch die Einwirkung von Cholesterin wenigstens konnte dann eine Zunahme der negativen Ladung der Blutkörperchen konstatiert werden.

7. Zwecks Erklärung dieses Effektes, der mit Rücksicht darauf, daß zwischen Blutlipidgehalt und Senkungsgeschwindigkeit keine sichere Korrelation festgestellt werden konnte, schwer faßbar schien, wurden eine Reihe Ausschüttelungsversuche mit Äther an Plasma bei verschiedenem p_H angestellt. Daraus ging hervor, daß das Cholesterin des Plasmas bei $p_H = 5,5$ bis 6 sich in einer leicht extrahierbaren Form befindet, was mit dem isoelektrischen Punkt der Globuline, eventuell des Fibrinogens in Verbindung gesetzt wird.

8. Bei Ätherextraktionsversuchen an dargestellten Eiweißfraktionen wurde diese Vermutung bestätigt. Es stellte sich heraus, daß Fibrinogen und Euglobulin mit Cholesterin eine Verbindung eingehen, die in bezug auf das Fibrinogen bei p_H etwa = 6, betreffs des Euglobulins bei $p_H = 5,5$ bis 6 dissoziiert wurde. Diese Verbindung erwies sich beim Zusatz von Cholesterinsuspension als reversibel. Albumin band Cholesterin nur auf der sauren Seite des obenerwähnten p_H -Gebietes.

9. Abgesehen von den Phosphatiden, deren kolloider Zustand im Plasma mittels Ätherausschüttelung nicht studiert werden kann, wurde die Hypothese aufgestellt, daß nur das von Fibrinogen und Globulinen ungebundene Cholesterin hemmend auf Aggregation und

Senkung der Blutkörperchen einwirke. Bei 28 Ätherausschüttelversuchen an normalen und pathologischen Menschenplasmen zeigte es sich, wie erwartet war, daß zwischen Gesamtcholesteringehalt und Senkungsgeschwindigkeit keine Korrelation vorliegt, während eine statistisch vollauf bewiesene, negative Korrelation zwischen der in fünf Stunden ausschüttelbaren Menge Cholesterin und der Senkungsgeschwindigkeit vorhanden war; der Korrelationskoeffizient war, wenn alle Werte mitgenommen wurden, $-0,41 \pm 0,12$, während, wenn nur die Senkungswerte unter 70 mm pro Stunde in Betracht gezogen wurden, der Korrelationskoeffizient $-0,63 \pm 0,10$ betrug.

10. Die von anderen Autoren gefundenen Variationen in der Senkungsgeschwindigkeit durch Erhitzen von Plasma sind nicht auf die Lipide zurückzuführen.

11. Kataphoreseversuche direkt an Plasma ergaben als Resultat, daß sich die Wanderungsgeschwindigkeiten für Fibrinogen, Globulin und Albumin wie 1 : 1,8 : 5 verhielten.

Nach Abschluß dieser Arbeit ergreife ich die Gelegenheit, meinen Dank Herrn cand. med. *G. Widström* auszusprechen wegen der wertvollen Hilfe, die er mir bei einem Teil der Analysenarbeit und auch in anderen Hinsichten geleistet hat. Gleichzeitig möchte ich auch Dr. *I. Schröder*, Helsingfors, dafür danken, daß mir von ihr die Möglichkeit gewährt wurde, einen Teil ihrer unter meiner Leitung ausgeführten Analysen in der vorliegenden Arbeit aufzunehmen.

Literatur.

- 1) *Bechhold* und *Reiner*, Münch. med. Wochenschr. **31**, 891, 1920.
- 2) *Berczeller*, diese Zeitschr. **66**, 218, 1914. — 3) *Berczeller* und *Stanker*, Internat. Zeitschr. f. phys. Chem. **3**, 133, 1917. — 4) *Blix* und *Löwenhielm*, Biochem. Journ. **22**, 1313, 1928. — 5) *Bloor*, Journ. of biol. Chem. **22**, 133, 1915. — 6) *Derselbe*, ebendasselbst **24**, 231, 1916. — 7) *Brinkman* und *van Dam*, Münch. med. Wochenschr. **48**, 1550, 1921. — 8) *Dieselben*, diese Zeitschr. **108**, 35, 1920. — 9) *Brinkman* und *Wastl*, ebendasselbst **124**, 25, 1921. — 10) *Bungenberg de Jong* und *Kruyt*, Kolloidzeitschr. **50**, 39, 1930. — 11) *Bürger*, Ergebn. d. inn. Med. **34**, 583, 1928. — 12) *Cashin* und *Moravek*, Amer. Journ. of Physiol. **82**, 294, 1927. — 13) *Chick*, Biochem. Journ. **8**, 404, 1914. — 14) *Clemente*, Ref.: Kongreßzentralbl. **38**, 935, 1925. — 15) *Cohn*, Physiol. Reviews **5**, 349, 1925. — 16) *Delaria*, Ref.: Ber. über d. ges. Physiol. **51**, 297, 1929. — 17) *Fex*, diese Zeitschr. **104**, 82, 1920. — 18) *Fiske* und *Subarow*, Journ. of biol. Chem. **66**, 375, 1925. — 19) *Frankenthal*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **42**, 501, 1925. — 20) *Frisch* und *Starlinger*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **24**, 142, 1921. — 21) *Fujii*, Journ. of Biochem. **3**, 393, 1924. — 22) *Funck*, diese Zeitschr. **124**, 148, 1921. — 23) *Fähraeus*, The Suspension-Stability of the Blood, Acta med. scand. **55**,

- 1, 1921. — 24) *Gabbe*, Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 1133. — 25) *Gardner* und *Williams*, Biochem. Journ. **15**, 363, 1921. — 26) *Grossmann*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **42**, 496, 1924. — 27) *Grün* und *Limpächer*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 1926, S. 1350; 1927 S. 147. — 28) *György*, diese Zeitschr. **115**, 71, 1921. — 29) *Handovsky* und *Wagner*, ebendasselbst **31**, **32**, 1911. — 30) *Handovsky*, *Lohmann* und *Bosse*, Pflügers Arch. f. Physiol. **210**, 50, 1925. — 31) *Hardy*, Journ. of Physiol. **33**, 251, 1905/06. — 32) *Haslam*, Biochem. Journ. **7**, 492, 1913. — 33) *Hattori*, diese Zeitschr. **119**, 45, 1921. — 34) *Herzfeld* und *Klinger*, ebendasselbst **83**, 42, 1917. — 35) *Höber*, Pflügers Arch. f. Physiol. **101**, 627, 1904. — 36) *Höber*, Phys. Chem. d. Zelle und d. Gewebe. S. 608ff. Leipzig 1924. — 37) *Iscovesco*, C. r. d. l. Soc. d. Biol. **62**, 630, 1907. — 38) *Janke* und *Kropacsy*, diese Zeitschr. **213**, 154, 1929. — 39) *Jarisch*, Pflügers Arch. f. Physiol. **186**, 299, 1921; **194**, 337, 1922. — 40) *Jorpes*, Acta med. scand. **68**, 510, 1928. — 41) *Kanai*, Pflügers Arch. f. Physiol. **197**, 583, 1923. — 42) *Katz* und *Leffkowitz*, Ergeb. d. inn. Med. **33**, 267, 1928. — 43) *Kleinmann*, diese Zeitschr. **174**, **43**, 1926. — 44) *Koch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 181, 1902. — 45) *Kugelmass*, Arch. int. de physiol. **21**, 139, 1923. — 46) *Kürten*, Pflügers Arch. f. Physiol. **185**, 248, 1920. — 47) *Lapponi*, Annali d'Igiene **34**, 801, 1924. — 48) *Lasch*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **42**, 548, 1924. — 49) *Leathes* und *Raper*, The fats, Ed. Longmans, Green Co., London 1925. — 50) *Lewis*, Kolloidzeitschr. **5**, 91, 1909. — 51) *Ley*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **26**, 59, 1922. — 52) *Lifschütz*, diese Zeitschr. **48**, 373, 1913. — 53) *Derselbe*, ebendasselbst **52**, 211, 1913 und **54**, 212, 1913. — 54) *Linzenmeier*, Zentralbl. f. Gynäkol. 1920, S. 816. — 55) *Derselbe*, Pflügers Arch. f. Physiol. **186**, 272, 1921. — 56) *Linzenmeier* und *Hirsch*, Ber. ü. d. ges. Gynäkol. u. Geburtsh. **10**, 429, 1920. — 57) *Macheboeuf*, Bull. Soc. Chim. Biol. **8**, 464, 1925. — 58) *Derselbe*, ebendas. **11**, 269, 485, 1929. — 59) *Mangin* und *Henri*, C. r. d. l. Soc. Biol. **56**, 866, 1904. — 60) *Marie*, ebendas. **89**, 504, 1923. — 61) *Matsumura*, Kolloidzeitschr. **32**, 173, 1923. — 62) *Mayer* und *Terroine*, C. r. d. l. Soc. Biol. **62**, 398, 1907. — 63) *Michaelis*, Praktikum der physikal. Chem. Berlin 1924. — 64) *H. J. Mueller*, Journ. of Biol. Chem. **25**, 549, 1916. — 65) *E. Müller*, Beitr. z. pathol. Anat. und z. allg. Pathol. **80**, 140, 1928. — 66) *Nasse*, Das Blut. Bonn 1836. — 67) *Neuschlosz*, Pflügers Arch. f. Physiol. **181**, 17, 1920. — 68) *Derselbe*, Ref.: Ber. ü. d. ges. Physiol. **49**, 717, 1929. — 69) *Derselbe*, ebendas. **51**, 504, 1929. — 70) *Nordbö*, diese Zeitschr. **190**, 150, 1927. — 71) *v. Oettingen*, ebendasselbst **118**, 67, 1921. — 72) *Pincussen* und *Juliusburger*, ebendasselbst **177**, 140, 1926. — 73) *Porges* und *Neubauer*, ebendasselbst **7**, 152, 1908. — 74) *Quagliarello*, Arch. di Sc. biol. **8**, 35, 1926; Ref.: Ber. ü. d. ges. Physiol. **36**, 647, 1926. — 75) *Remesow*, diese Zeitschr. **218**, 86, 1930. — 76) *Resch*, ebendas. **78**, 297, 1917. — 77) *Rona* und *Deutsch*, ebendasselbst **171**, 89, 1926. — 78) *Rossier*, Arch. de Physique biol. **5**, 212, 1928; Ref.: Ber. ü. d. ges. Physiol. **42**, 102, 1927. — 79) *Salomon*, *de Potter* und *Valtis*, C. r. d. l. Soc. Biol. **92**, 1410, 1925. — 80) *Schemensky*, Verh. d. deutsch. Ges. f. inn. Med. **35**, 227, 1923. — 81) *Scott* und *Svedberg*, Journ. Amer. Chem. Soc. **46** (2), 2700, 1924. — 82) *Sellards*, John Hopkins Hosp. Bull. **19**, 271, 1908. — 83) *Stern*, diese Zeitschr. **187**, 315, 1927. — 84) *Derselbe*, ebendasselbst **203**, 313, 1928. — 85) *Derselbe*, Arch. f. exper. Pathol. und Pharm. **112**, 129, 1927. — 86) *Stuber* und *Funck*, diese Zeitschr. **126**, 142, 1921. — 87) *Svedberg* und *Sjögren*, Journ. Amer. Chem. Soc. **50** (2), 3318, 1928. — 88) *Sörensen* und *Høytrup*, C. r. trav. Lab. Carlsberg, XII, 164, 1915–1917. — 89) *T. Teorell*, Acta med. scand. **68**, 305,

1928. — 90) *H. Theorell*, diese Zeitschr. **175**, 297, 1926. — 91) *Tominaga*, ebendasselbst **140**, 230, 1923. — 92) *Troensegaard* und *Koudahl*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **153**, 111, 1926. — 93) *Wacker* und *Hueck*, diese Zeitschr. **100**, 84, 1919. — 94) *de Waele*, Ann. d. Physiol. **3**, 94, 1927. — 95) *Weidmann* und *Sundermann*, Arch. of derm. and syph. **12**, 679, 840, 1925. — 96) *Weil* und *Claude*, C. r. d. l. Soc. Biol. **64**, 125, 1908. — 97) *Westergren*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **26**, 577, 1924. — 98) *Wiechmann*, Klin. Wochenschr. **13**, 601, 1923. — 99) *Wiltshire*, Journ. of Pathol. and Bacteriol. **17**, 282, 1912/13. — 100) *Windaus*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 1909, S. 238. — 101) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 110, 1910. — 102) *Wöhlisch*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **40**, 137, 1924. — 103) *Wöhlisch* und *Schloss*, Zeitschr. f. Biol. **85**, 542, 1927.
