

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin u. Kriminalistik der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. E. FRITZ)

**Milieubedingte Beeinflussungen
einer Antigen-Antikörperreaktion***
**Reaktionen in Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration
und der Hofmeisterschen Reihe**

Von

GÜNTHER DOTZAUER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Februar 1958)

Die Stärke einer spezifischen Blutgruppenreaktion wird bekanntlich durch die Natur der Rezeptoren der Erythrocytenoberfläche bzw. der Isoagglutinine oder der Antikörper bestimmt, ebenfalls vom Untersuchungsmilieu, d. h. dem Suspensionsmittel der Blutzellen, der Zeit und der Temperatur.

Uns beschäftigte speziell die Frage, ob Eingriffe in das physikochemische Zustandsbild der Erythrocyten deren Agglutinabilität verändern würden. Wir ließen verschiedene Neutralsalzlösungen auf unbehandelte Blutkörperchen einwirken. Ferner boten wir unterschiedliche Elektrolytkonzentrationen an und prüften dann, ob diese Vorgänge, besonders die Anionenpermeation, Folgen für den Ablauf der spezifischen Agglutination haben würden.

Wie unsere von der hypotonen bis zur hypertonen Hämolysegrenzzone durchgeführten Testungen ergaben, ist die Reaktionsbereitschaft der Erythrocyten von optimalen Salzkonzentrationen abhängig. Weiter stellte sich heraus, daß nach abgeschlossener Permeation der angebotenen Anionen unterschiedlich starke Reaktionen auftraten. Reiht man die Ergebnisse entsprechend ihrem Ausfall ein, erkennt man eine Abhängigkeit von der Hofmeisterschen Reihe.

Zum Verständnis der Befunde halten wir es vor Bekanntgabe der Untersuchungsmethode und der Ergebnisse für zweckdienlich, auf die bei der Blutgruppenreaktion miteinander reagierenden Kräfte und besonders auf die Funktion der Blutzelle kurz einzugehen.

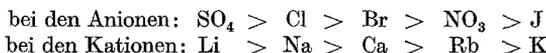
In seinen Arbeiten stellte HOFMEISTER Beziehungen zwischen Neutralsalzen und verschiedenen Kolloiden her. Er setzte Gelatinescheiben bei neutraler Reaktion Salzlösungen von äquivalenter Konzentration aus und verfolgte dann deren *Wasser-*

* Vortrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin, Juni 1957, in Heidelberg.

gehalt. Aber nicht nur Quellungsunterschiede sondern auch die *Erstarrungszeit* und *Erstarrungstemperatur* sowie die *Viscosität* wurden zur Wirkung der Anionen und der Kationen in Beziehung gesetzt.

In Folge wurde die *Löslichkeitsbeeinträchtigung* verschiedener *Eiweiße* geprüft. Es wurde herausgestellt, daß eine Großzahl biologischer Prozesse in bezug auf *Reaktionsablauf* und *-stärke* in Abhängigkeit zum Anionen- bzw. Kationenangebot steht. Die jeweilige Reaktionsfolge stellte man in einer nach HOFMEISTER benannten Reihe dar. Eine zusammenfassende Würdigung fanden die auf HOFMEISTER zurückgehenden Befunde durch EICHLER in seiner 1950 erschienenen „Pharmakologie anorganischer Anionen“.

Nicht nur *kolloidale Modellsubstanzen* sondern auch Zellen wurden hinsichtlich ihres Reaktionsvermögens geprüft. Die *Hämolysegrenzwerte* menschlicher Erythrocyten sind z. B. von einer Anionenreihe abhängig. Die *Hämolisierbarkeit* steigert sich in folgender Reihe:



Der Lösungszustand der Membrankolloide wird also steigend vom Sulfat bis zum Jodid beeinflußt.

Welche Wirkung üben Sulfationen auf menschliche Erythrocyten aus? In Gegenwart von SO_4 zeigen rote Blutkörperchen eine *geringere Quellungstendenz* als bei den übrigen Anionen. Von gewissen Konzentrationen an soll es nach WILBRANDT sogar zu einer *Schrumpfung* der Zellen kommen. Ferner macht sich die geringere hydratisierende Wirkung der SO_4 in der Löslichkeitsbeeinträchtigung der *Globuline* und einer Begünstigung der *Gelatinierung* bemerkbar.

Eine Verbindung zwischen der von WILBRANDT festgestellten *Volumenabnahme* sowie dem *räumlichen Aneinanderrücken* der Oberflächenaggregate mit den Befunden von HOFMEISTER an den *Kolloiden* ist gegeben. Uns erscheint die Ableitung wichtig, daß die Anionen die Hydratation gewisser hydrophiler organischer Kolloide verändern. Die Rezeptoren der *Erythrocytenoberfläche* sowie die *Serumeiweißkörper* wären demnach in ihrer Löslichkeit und ihrer Viscosität durch Anionen zu beeinflussen und damit auch eine spezifische Agglutination. Andererseits sind derartige Eingriffe auch unter diesem Blickpunkt zu betrachten:

Bei der *Antigen-Antikörperreaktion* handelt es sich um Auseinandersetzungen zwischen *Kolloiden*. Der Grad der *Solvation* der beteiligten Systeme ist von der Art des Lösungsmittels abhängig. Eine *Verminderung* der *Kohäsionskraft* hydrophiler Kolloide ist nach NETTER gleichbedeutend mit einer *Zunahme* der *Affinität* zu H_2O . Eine *Entquellung* müßte also umgekehrt eine *Steigerung* der Kohäsionskräfte nach sich ziehen. Falls sich demnach nachweisen läßt, daß eine Veränderung des Untersuchungsmilieus die Reaktionsstärke beeinträchtigt, bieten sich verschiedene Deutungen an.

Wir unternahmen es, einen Ausschnitt des Problems am Beispiel verschiedener Neutralsalz- bzw. Elektrolytkonzentrationseffekte zu studieren.

Methoden und Material

Frisch entnommenes Blut wurde sofort in Elektrolytlösungen unterschiedlicher Molarität suspendiert. Um einen Anionenaustausch ablaufen zu lassen, wurden die Erythrocyten viermal sehr schonend gewaschen (1500 U/min, je 10 min). Nach Abpipettierung der Waschflüssigkeit wurde der Erythrocytenbrei jeweils vorsichtig mit frischer Ausgangslösung aufgeschüttelt. Der Austausch dauerte bei Zimmertemperatur 15 min, insgesamt also viermal 15 min. Die Prüfung der Agglutinabilität

der Erythrocyten erfolgte sofort nach Abschluß des Anionenaustausches nach weiteren 2 Std sowie nach 24 Std jeweils mit inaktivierten Isoseren sowie M- bzw. N-Seren. Erythrocytendichte 3%. Die Verdünnungsflüssigkeit der auszuwertenden Seren war mit der Suspensionsflüssigkeit der Blutkörperchen identisch. Kontrolluntersuchungen wurden in jeder Reihe mitgeführt. Titerablesung bei Zimmertemperatur 15 min nach Ansatz. Geprüft wurden folgende Salze: NaCl, NaBr + 2 H₂O, Na₂SO₄ + 10 H₂O, Na₂HPO₄ + 2 H₂O, CaCl₂, Ca(NO₃)₂ + 4 H₂O.

Ergebnisse

Die Versuche mit einem jeden dieser Salze führten zu einem für jedes Elektrolyt typischen Ausfall der Agglutination. Einzelagglutinat wie Titerhöhe wurden durch die Anionen im Sinne der Hofmeisterischen Reihe beeinflusst. In einer halb-quantitativen Darstellung erkannten wir gleiche, abhängige Anionen-Wirkungen.

Im *hypertonen* Milieu trat eine Hämolyse bei folgenden Konzentrationen ein: In mol/2—3 bei NaBr, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂, NaCl; mol/6—7 bei Ca(NO₃)₂.

Eine unspezifische Hämolyse bei *Salzmangel*: In mol/10—12 bei Na₂SO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂; mol/13 bis 14 bei NaBr; mol/16 bei NaCl; mol/17—18 bei Ca(NO₃)₂.

Spontanagglutinationen wurden in der prä-hämolytischen Zone in Gegenwart von Na₂HPO₄, CaCl₂, Ca(NO₃)₂ gesehen.

Die Blutzellen waren bis zur Hämolyse agglutinabel. In *niederen* Elektrolytkonzentrationen wurde *kein* Titerabfall bei NaCl, NaBr, Ca(NO₃)₂ festgestellt. — Bei Na₂SO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂ sank der Titer im hämolytischen Bereich.

Ein Titerabfall wurde im *hypertonen* Milieu bei allen Salzen gesehen. Optimale Titer in Gegenwart folgender Elektrolytkonzentrationen: Na₂SO₄ mol/5—7; CaCl₂ mol/6; Na₂HPO₄ mol/8—7; NaCl mol/14—6; NaBr mol/13—6; Ca(NO₃)₂ mol/17—13.

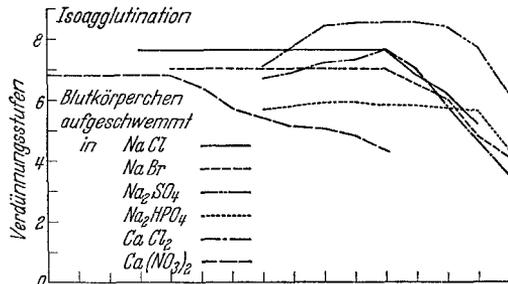


Abb. 1

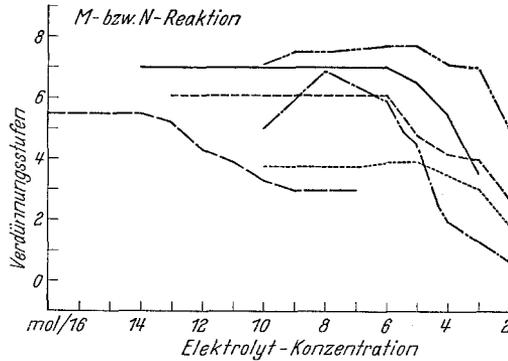
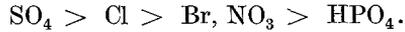


Abb. 2

Besprechung

Die zuvor angeführten Vorgänge lassen sich bei der Auswertung der Stärke der spezifischen Agglutination menschlicher Blutkörperchen mittels Iso- bzw. M- oder N-Seren nachweisen. Sowohl bei der Beurteilung der Reaktionsstärke des Einzelagglutinats als auch der Titerhöhe wurde eine Abhängigkeit in folgender Reihe erkannt:



Die besonders in Gegenwart von SO_4 -Ionen herausfallenden Befunde mit Titersteigerungen von 1—2 Stufen gegenüber den Kochsalzkontrollen können zurückgeführt werden auf: 1. Abnahme des osmotischen Drucks der Zellen, Schrumpfung und damit ein Nährücken der Oberflächenbestandteile; 2. geminderte Löslichkeitstendenz, d. h. eine größere Flockungsfähigkeit der Membrankolloide als Folge einer dehydratisierenden Wirkung.

In Gegenwart von NO_3 -Ionen wird die herabgesetzte spez. Agglutinabilität bedingt: 1. durch eine Steigerung des osmotischen Innendrucks der Blutkörperchen und damit einem räumlichen Auseinanderrücken der Membranaggregat; 2. durch ein größeres Löslichkeitsvermögen der Membrankolloide, das durch die gesteigerte Hydrophilie der Eiweißkörper hervorgerufen wurde.

Nicht nur das Verhalten gegenüber den anorganischen Anionen sondern auch die Abhängigkeit der spezifischen Agglutinabilität von der Elektrolytkonzentration ist interessant. Da jede unserer Testungen vergleichend in äquimolaren Lösungen der verschiedenen Neutralsalze vorgenommen wurde, war es möglich, zur Konzentrationsabhängigkeit Aussagen zu machen. Hinweise über die Elektrolytabhängigkeit der Reaktionen seien vorangestellt.

Die Antigen-Antikörperverbindung wird als Agglutination erst durch Elektrolyte sichtbar gemacht. Elektrolyte in ihren Konzentrationen greifen aber nicht nur in den spezifischen Prozeß einer *Antikörperfixation* und einer *Ladungsminderung* der Zellen ein, sondern rufen auch unspezifische Reaktionen an den Zellen selbst hervor.

Derartige Vorgänge brauchen keineswegs zu Zellaggregationen oder zu unspezifischen Agglutinationen zu führen, hierauf waren unsere Versuchsanordnungen nicht abgestellt; wir sind vielmehr der Frage einer eventuell herauszustellenden Abhängigkeit der Reaktionsstärke einer spezifischen Agglutination von der Salzkonzentration nachgegangen.

KOSSOVITCH und CANAT, OTTENSOOSER, FORSMAN, sowie LANDSTEINER und WELECKI äußerten sich zu diesem Problem bei verschiedenen Antigen-Antikörpermodellen. Welche Feststellungen trafen wir bei der *Isoagglutination* bzw. der M-N-Reaktion?

Im *hypertonen* Milieu wurde bei allen Salzen der bekannte Titerabfall gesehen. Der optimale Titer sank bei der Isoagglutination um etwa 35%, bei der M-N-Reaktion sogar um etwa 50% des Ausgangswertes ab, sofern man sich den Hämolysegrenzwerten näherte.

Die Zellen waren sowohl im Salzüberschuß als auch bei Salzangel bis zur Hämolyse agglutinabel. Eine komplette Dissoziation des Antigen-Antikörperkomplexes wurde nicht gesehen, selbstverständlich könnte man den Titerabfall in diesen Bereichen derartig auslegen.

In *herabgesetzten* Elektrolytkonzentrationen wurden bei den verschiedenen Salzen zwei verschiedene Verhaltensweisen gesehen: Bei NaCl, NaBr und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sank der Titer bis zum hypotonen Hämolysegrenzwert *nicht* ab.

Eine eindeutige Titerminderung wurde jedoch bei Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 und CaCl_2 vermerkt.

Gewisse Elektrolyte erhalten trotz erheblicher Reduzierung des Salzgehaltes plateauähnlich den Titer bis zur Hämolyse. Andere führen zu einem markanten Titerabfall bei abnehmendem Salzangebot: der optimale Titer stellt sich bei diesen lediglich bei einer relativ begrenzten Molarität der Lösung ein.

Die bekannten Aussagen über die Elektrolytkonzentration und ihre Beziehung zur spezifischen Agglutination betrafen zumeist NaCl. Wenn nun letzthin BOYD schreibt, daß geringste Salzkonzentrationen zur Sichtbarmachung einer spezifischen Agglutination ausreichen, so wird man ergänzend sagen müssen, daß der Reaktionsausfall bei den verschiedenen Neutralsalzen nicht nur in Abhängigkeit von unterschiedlichen molaren Konzentrationen steht, sondern daß im hypotonen Bereich entweder der optimale Titer bis zur Hämolyse erhalten bleibt oder bei anderen Elektrolyten ähnlich wie im Salzüberschuß ein Titerabfall gesehen wird.

Zusammenfassung

Jedes Elektrolyt greift individuell in den Ablauf einer Blutgruppenreaktion ein, erkennbar nicht nur an den Konzentrationsabhängigkeiten, sondern auch an der Einordnung in die Hofmeistersche Reihe.

Unsere Befunde ergänzen die Ergebnisse von EAGLE und von S. SCHMIDT. Ersterer hob die stärkere Wirkung der Sulfationen gegenüber den Cl-Ionen bei Antikörpertestungen mit sensibilisierten Coli- oder Typhusbakterien bzw. Hämolysinen hervor. SCHMIDT stellte 1930 ebenfalls die Abhängigkeit der Diphtherie-Toxin-Antitoxin-Flockung von der Hofmeisterschen Reihe heraus.

Literatur

ACEI, D., u. L. LORBER: Über Hämolyse in hypertonischen Salzlösungen und ihr Mechanismus. *Biochem. Z.* **147**, 557—562 (1924). — ALADJEM, F., and M.

LIEBERMANN: The antigen-antibody reaction. I. The influence of sodium chloride concentration on the quantitative precipitine reaction. *J. Immunol.* **69**, 117—130 (1952). — BOYD, W. C.: Fundamentals of immunology, 3. Aufl. New York: Interscience Publ. 1956. — BRODY, O. V.: Microelectrophoretic studies on human erythrocytes. Ph. D. Thesis, Harvard University 1954. — BRUNS: *Zit. bei HÖBER*. — CHORINE, V.: Utilisation des anticoagulants salins. *Rev. Immunol. (Paris)* **6**, 193—208 (1940). — COULTER, C. B.: The isoelectric point of red blood cells and its relation to agglutination. *J. gen. Physiol.* **3**, 309—324 (1921). — EAGLE, H.: Specific agglutination and precipitation. *J. Immunol.* **18**, 393—417 (1930). — EICHLER, K.: Pharmakologie anorganischer Anionen. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — EISENBERG, PH., u. R. VOLK: Untersuchungen über die Agglutination *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* **40**, 155—195 (1902). — FORSSMANN, J., TH. WADSTEIN u. G. FISCHER: Der Einfluß verschiedener Salzkonzentrationen auf die Hämagglutination. *Acta path. microbiol. scand.* **7**, 205—237 (1930). — FRITZE, E.: Oberflächeneigenschaften der Blutzellen. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **257**, 12—19 (1953). — FRITZE, E., u. P. DOERING: Die elektrische Ladung und der isoelektrische Punkt der Blutzellen und deren Beziehung zur Zellfunktion. *Klin. Wschr.* **1952**, 19—22. — GIACOMELLO, G.: The permeability of red corpuscle membrane for sulfate ions. *Ark. Kemi (Stockh.)* **4**, 11—16 (1952). — Rona **161**, 235—236 (1953). — HAFFNER, F.: Über den Mechanismus von Hämolyse und Agglutination durch Ionen. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **196**, 15—60 (1925). — HIRSCHFELD, L.: Untersuchungen über die Hämagglutination und ihre physikalischen Grundlagen. *Arch. Hyg. (Berl.)* **63**, 237—286 (1907). — HÖBER, R.: Physiologische Chemie der Zellen und Gewebe. 6. Aufl. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1926. 7. Aufl. Bern: Stämpfli 1947. — HÖBER, R., u. S. L. ORSKOV: Untersuchungen über die Permeierungsgeschwindigkeit von Anelektrolyten bei den roten Blutkörperchen verschiedener Tierarten. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **231**, 599—615 (1933). — HOFMEISTER, F.: Die Lehre von der Wirkung der Salze, 2. Mitt. Naunyn-Schmiedebergs *Arch. exper. Path. Pharmak.* **24**, 247—260 (1887/88). — Zur Lehre von der Wirkung der Salze, 6. Mitt. Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. exp. Path. Pharmak.* **28**, 210—238 (1890/91). — KLEINSCHMIDT, A.: Morphologische Untersuchungen über die Erythrocytenmembran. *Acta haemat. (Basel)* **13**, 337—351 (1955). — KOSSOVITZ, F., et J. CANAT: Contribution à l'étude des facteurs physiques et chimiques du phénomène d'isohémoagglutination. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **135**, 1100—1104 (1941). — LANDSTEINER, K., u. ST. WELECKI: Über den Einfluß konzentrierter Lösungen von Salzen und Nichteletrolyten auf die Agglutination und Agglutininbindung. *Z. Immun.-Forsch.* **8**, 397—403 (1911). — LEY, R.: Untersuchungen über die Agglutination roter Blutkörperchen. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **197**, 599—610 (1922). — LOEB, J.: Die Eiweißkörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen. Berlin: Springer 1924. — LUCKNER, H., u. LO-SING: Über die Geschwindigkeit des Austausches von Chlor- und Bicarbonationen durch die Blutkörperchengrenzschicht. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **239**, 277—285 (1938). — LUDEWIG, ST., and A. CHANUTIN: Factors influencing the agglutination of red cells, red blood cell stroma, and lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **179**, 271—278 (1949). — MOND, R., u. H. GERTZ: Vergleichende Untersuchungen über Membranstruktur und Permeabilität der roten Blutkörperchen verschiedener Säugetiere. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **221**, 623—632 (1929). — MOND, R., u. R. HÖBER: Physikalische Chemie der Blutkörperchen-Sedimentierung. *Klin. Wschr.* **1922**, 2412—2414. — MOND, R., u. H. HOFFMANN: Untersuchungen an künstlichen Membranen, die elektiv anionenpermeabel sind. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **220**, 194—202 (1928). — NORTHPROP, J. H., and J. FREUND: The agglutination of red blood cells. *J. gen. Physiol.* **6**, 603—613 (1924). — NORTHPROP, J. H., and P. H. DE KRUIF: *Zit. bei HÖBER*. — OLIVER, J., and L. BARNARD: Influence of electrolytes. *J. gen. Physiol.* **7**, 99—122

(1925). — OTTENSOOSER, F., u. A. LENZINGER: Stromaagglutination und Kochsalzkonzentration. *Z. Immun.-Forsch.* **81**, 354—366 (1933/34). — PASSOW, H.: Untersuchungen über die Ionenpermeabilität roter Blutkörperchen. *Habil.-Schr. Hamburg* 1956. — PIPER, W., u. G. RUHENSTROTH-BAUER: Proteinadsorption an menschlichen Erythrocyten. *Klin. Wschr.* **1956**, 11—15. — RADSMA, W.: Agglutination roter Blutkörperchen und Hofmeistersche Reihen. *Biochem. Z.* **89**, 211 bis 219 (1918). — ROSS, S., and A. M. SILBERSTEIN: Hemolysis by colloidal electrolytes. *J. Colloid. Sci.* **9**, 157—165 (1954). — SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie, 2. Aufl. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1955. — SCHMIDT, S.: Role des electrolytes dans la réaction entre toxine et antitoxine diphtériques. Flocculation des toxines purifiés en présence de divers sels. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **103**, 101—103 (1930). — SPEK: Zit. bei HÖBER. — WILBRANDT, W.: Die Permeabilität roter Blutkörperchen für einfache Zucker. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **241**, 302—309 (1939). — Die Abhängigkeit der Ionenpermeabilität der Erythrocyten vom glykolytischen Stoffwechsel. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **243**, 519—536 (1940). — Die Ionenpermeabilität der Erythrocyten in Nichtleiterlösungen. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **243**, 537—556 (1940). — Untersuchungen über langsamen Ionenaustausch durch die Erythrocytenmembran. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **246**, 291—306 (1942).

Prof. Dr. DOTZAUER, Hamburg 13, Harvestehuderweg 10