

SONDERDRUCK AUS

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN. UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 15

31. OKTOBER 1936

Nr. 44, S. 1594/1596

HÄMOGLOBINURIE UND VITAMIN C.

Von

Dr. L. ARMENTANO und Dr. A. BENTSÁTH.

Aus der Medizinischen Klinik der kgl. ung. Franz Joseph-Universität in Szeged, Ungarn
(Dir.: o. ö. Prof. Dr. ST. RUSZNYÁK).

In Nature (Lond.) 137, Nr 3474 (30. Mai 1936) hatten wir Gelegenheit, über einen mit C-Vitamin erfolgreich behandelten Fall von paroxysmaler (Kälte) Hämoglobinurie zu berichten.

Der Mechanismus der Entstehung der paroxysmalen Hämoglobinurie (Hbu.) ist trotz der Seltenheit dieser Krankheit nahezu vollkommen geklärt. DONATH und LANDSTEINER konnten schon 1904 feststellen, daß im Blute derartiger Kranker ein Autohämolysin nachzuweisen ist, das aus einem thermostabilen und einem thermolabilen Teil besteht. Der thermostabile Teil (Amboceptor) unterscheidet sich insofern von den übrigen bekannten Hämolysinen, daß er sich nur bei Einwirkung der Kälte mit den roten Blutkörperchen (E.) verkettet. Der thermolabile Teil entspricht dem Komplementgehalt des normalen Blutes. Der Anfall kommt zustande, indem durch die Abkühlung eines Körperteiles der hämolysierende Amboceptor an die E. gekettet wird; dadurch werden diese sensibilisiert und durch die Einwirkung des Komplements im Kreislauf des körperwarmen Blutes gelöst. Der Grad der sichtbaren Hbu. hängt von der Menge des infolge der Hämolyse freigewordenen Blutfarbstoffes ab. Wird der Schwellenwert der Niere durch die Menge des freien Hb. überschritten, dann wird dieses durch die Nieren ausgeschieden. Auf diese Weise werden auch die abortiven bzw. larvierten Formen dieser Krankheit verständlich. Der paroxysmalen Hbu. geht demnach stets die intravitale Hämolyse voraus. Die Entstehung des Autohämolysins ist weniger klar. Bekanntlich findet man bei einem großen Teil der an paroxysmalen Hbu. leidenden Kranken eine positive WaR. bzw. ist in der Anamnese Lues nachzuweisen; DONATH und LANDSTEINER gelang dieser Nachweis unter 99 Fällen 95mal. Bei der Entstehung des Hämolysins spielt demnach die Lues offenbar eine Rolle. Nach den Ergebnissen der bisher über diesen Gegenstand ausgeführten Untersuchungen sind die die positive WaR. gebenden Stoffe mit dem hämolysierenden

Amboceptor nicht identisch; mit Hilfe verschiedener Verfahren ist die Trennung dieser beiden Faktoren gelungen (MORO und NODA YAMADA, MATSUO, JANCsó u. a.). E. MEYER und EMMERICH nehmen an, daß wiederholte Blutungen im Organismus einen autoimmunisatorischen Vorgang hervorrufen, der dann zur Bildung des Hämolysins führen soll. Nach den Untersuchungen von WICHELS üben die E. des Kranken nur dann eine Antigenwirkung aus, wenn der Organismus in einen allergischen Zustand gelangt ist. Diesen allergischen Zustand soll die Lues schaffen. Auf diese Weise wären die im allergischen Organismus zustandekommenden Blutungen imstande, den autoimmunisatorischen Prozeß in Gang zu bringen, Autohämolysin hervorzurufen. Für die Richtigkeit dieser Auffassung scheinen auch die Versuchsergebnisse LÜDTKES zu sprechen.

SALEN will die Sensibilisierung der E. auf kolloidchemischem Wege erklären. Seiner Ansicht nach nimmt durch die Abkühlung die Dispersität gewisser Blutkolloide ab. Durch die veränderte Dispersität werden auch die physikalischen Eigenschaften der Kolloide verändert. Auf die Einwirkung der Kälte werden die grobdispertierten Kolloidteilchen von gewissen Zellen (in erster Linie von den älteren E.) aufgenommen; diese Zellen verlieren dann die Fähigkeit, sich geldrollenförmig anzuordnen, d. h. sie verhalten sich wie sensibilisierte Zellen.

In Anbetracht des luischen Ursprungs spielt bei der Behandlung der paroxysmalen Hbu. natürlicherweise in erster Linie die antiluische Therapie eine Rolle; in zahlreichen Fällen kommt es darauf zur Besserung, nicht selten auch zur vollkommenen Heilung. Im einschlägigen Schrifttum finden jedoch zahlreiche Fälle Erwähnung, bei denen die antiluische Behandlung erfolglos bleibt. Man versucht daher wiederholt Mittel anzuwenden, die in vitro imstande sind, die Donath-Landsteiner-Reaktion (DLR.) zu verhindern. Nach LINDBOM und PRINGSHEIM soll das Cholesterin, nach BURMEISTER das CaCl_2 bzw. das NaCl fähig sein, die sensibilisierten E. vor der Auflösung zu schützen. Bei den Versuchen LICHTMANNs erwies sich die Leberbehandlung erfolgreich. An Kranken blieben aber die Versuche mit den erwähnten Stoffen wie auch andere Verfahren — z. B. Auto- oder Heteroserum usw. — zum großen Teil wirkungslos (KUMAGAI und NAMBA), auf der anderen Seite häufen sich im Schrifttum die Fälle, bei denen die Paroxysmen durch die antiluische Behandlung nicht zum Schwinden zu bringen sind. Während unserer Forschungen auf dem Gebiete des Vitamin C-Stoffwechsels verabreichten wir einem an typischer paroxysmaler Hbu. leidenden Kranken eine größere Menge Ascorbinsäure intravenös, um zu untersuchen, ob dadurch infolge der Änderung des Nierenschwellenwertes die Hbu. etwa beeinflußt werde. Überraschenderweise trat schon nach der ersten Vitamin C-Injektion der bis dahin

leicht auslösbare Anfall nicht mehr auf. Wir lassen einen Auszug aus der Krankengeschichte folgen:

36 Jahre alter Landwirt. Aufgenommen am 10. XII. 1935. Anamnese: Seit 2 Jahren tritt — sobald er bei kalter Witterung barfuß arbeitet — blutiger Harn auf; gleichzeitig besteht oft Frösteln, Schwindelgefühl und an den folgenden Tagen auffallende, allgemeine Schwäche. Das Blutharnen dauert nur einen Tag. In jüngeren Jahren Lues. St. pr.: Blasse Gesichtsfarbe, mäßiges Lungenemphysem, über den großen Gefäßen leises, systolisches Geräusch; Milz nicht zu tasten. Im Harn ganz geringe Mengen Eiweiß. Zahl der E. 2 500 000. Hb. 42%, weiße Blz. 8100, Thrombocyten 270 000. Capillarresistenz nach BORBÉLY 32 Hg/cm. E.-Resistenz: bei 0,42 beginnende, bei 0,34 vollständige Hämolyse. WaR.: ++++.

Am 13. XII. nach einem kalten Fußbad von 15 Minuten typischer paroxysmaler Hbu.-Anfall.

18. XII.: Donath-Landsteiner positiv. Die 30 Minuten lang dauernde Abkühlung der Füße löst abermals einen typischen Hbu.-Paroxysmus aus (Schüttelfrost, Temperatur bis 39,4°, Milzschwellung usw.). Die vor dem Anfall sowie während desselben bestimmte E.-Resistenz gegen hypotonische NaCl-Lösung beträgt 0,42—0,32.

28. XII.: 600 mg Vitamin C intravenös. 5 Minuten später versacht die nun 15 Minuten dauernde Abkühlung weder Hbu. noch andere Erscheinungen, obwohl die DLR. auch jetzt positiv ausfällt.

14. I.: Nach 15 Minuten währendem Abkühlen typischer Hbu.-Anfall.

Hierauf wird bei diesem Kranken die systematische Behandlung mit Ascorbinsäure eingeführt. Vom 16. bis 31. I. erhält er täglich 300 mg Vitamin C intravenös.

Nun wurde die Behandlung unterbrochen und in der Zeit zwischen dem 1. II. und 31. V. 8 mal mittels 30 Minuten lang dauerndem Abkühlen versucht, einen Anfall hervorzurufen, stets ohne Erfolg. Donath-Landsteiner war zwar bei jedem Versuch positiv, bei dem letzten jedoch bloß in der Verdünnung 1 : 1 bzw. 1 : 2.

Es war demnach eine intravenöse Vitamin C-Injektion von 600 mg imstande, den Hbu.-Anfall ganz zu verhindern. Um den Wirkungsmechanismus und die Wirkungsdauer festzustellen, war zu untersuchen, ob bei dem Kranken eine Hypovitaminose nachweisbar war oder nicht. Zu diesem Zwecke erhielt der Kranke — wie oben beschrieben — täglich 300 mg Ascorbinsäure intravenös, wobei der Zeitpunkt beobachtet wurde, bei dem mit dem Harn 50% des eingeführten Vitamin C ausgeschieden werden (mit Hilfe des jodometrischen und des Dichlorphenol-Indophenolverfahrens). Zur Sättigung bedurfte der Kranke einer Zeitdauer von 13 Tagen, er litt demnach an einem hochgradigen „Vitamindefizit“. Nach Erreichung der Sättigung traten weder spontane noch künstlich erzeugte Anfälle auf.

Vitamin C ist also imstande, das Auftreten der paroxysmalen Hbu. zu verhindern. Inwiefern es sich dabei um eine dauernde oder bloß um eine vorübergehende Wirkung handle, kann natürlicherweise erst durch weitere Beobachtungen

entschieden werden. Der letzte Versuch, auf künstlichem Wege einen Anfall hervorzurufen, wurde 4 Monate nach der letzten Ascorbinsäure-Injektion ausgeführt; zu diesem Zeitpunkt war der Vitamin C-Schutz noch aktiv.

Will man diese Wirkung des Vitamin C erklären, dann hat man an verschiedene Möglichkeiten zu denken; Zunächst konnte das Blut des Kranken seinen Komplementgehalt eingebüßt bzw. konnte es eine antikomplementäre Wirkung angenommen haben; solche Zustände können bei der paroxysmalen Hbu. — insbesondere nach häufigen Anfällen — vorkommen. Um in dieser Hinsicht Klarheit zu schaffen, wurde der Komplementgehalt des Blutes mehrfach bestimmt:

Zu diesem Zwecke wurde zunächst die hämolysierende Fähigkeit des Amboceptors in gewohnter Weise festgestellt. Zum Titrieren verwendeten wir eine 5proz. Hammelerythrocytenemulsion und 1 ccm 20fach verdünnten Meerschweinchenserums. Das Hämolysin wurde in der vierfachen Konzentration des Endtiters verwendet. Das hämolytische System wurde mit steigenden Mengen 10fach verdünnten Menschenserums vermischt, so daß eine Serie aus Verdünnungen, die 0,01—0,1 ccm nativem Serum entsprechen, bestand. Das Reagensröhrchen, in dem die Hämolyse bei 37° in 10 Minuten vollständig war, ergab das Maß der Blutkomplementmenge. Dieser Wert entsprach bei unserem Kranken 0,03 nativem Serum. Zwei Wochen nach Aussetzen der Vitamin C-Behandlung erhielten wir denselben Wert.

Unter ähnlichen Versuchsbedingungen fanden wir bei normalen Individuen Werte von 0,03—0,04.

Für das Vorhandensein des Komplements spricht noch die stets positive DLR., die auch dann positiv ausgefallen war, wenn bei dem Kranken kein Anfall ausgelöst werden konnte.

Da — wie schon erwähnt — anzunehmen war, daß die Hbu. durch das Vitamin C bloß durch die Hebung des Nierenschwellenwertes verhindert wurde, beachteten wir bei den Abkühlungen stets das Verhalten des Serums. Während vor der Behandlung mit Vitamin C das Serum im Anfall stets hämoglobinhaltig war, konnte nach der Behandlung die Hämolyse im Serum niemals nachgewiesen werden. *Durch die Ascorbinsäure wurde demnach die Hbu. infolge der Verhinderung der intravitalen Hämolyse verhindert*, wie dies auch durch unsere in vitro-Versuche bestätigt wird.

Wurde nämlich die DLR. (0,25 ccm Serum + 0,1 E.-Suspension + 0,25 physiol. NaCl) derart ausgeführt, daß in der physiologischen NaCl-Lösung auch noch 4 mg Ascorbinsäure gelöst worden waren, dann blieb die Hämolyse aus. Bei der Herstellung einer Verdünnungsserie aus der Ascorbinsäurelösung zeigte sich, daß 2 mg die geringste Menge darstellt, die bei der obigen Zusammenstellung imstande ist, die Hämolyse zu verhindern. Da aber in dem erwähnten System auf die Einwirkung der Ascorbinsäure Säurehämatin entsteht, wiederholten wir die Versuche mit gepufferter Vitamin C-Lösung. Mit Hilfe des gepufferten Vitamin C gelang es aber nicht, die Hämolyse zu verhindern. Die Pufferung mit primärer und sekundärer Phosphatlösung ($^{m}/_{15} \text{Na}_2\text{HPO}_4 = 91,5$ ccm und $^{m}/_{15} \text{KH}_2\text{PO}_4 = 8,5$ ccm; $p_H = 7,8$) wurde ausgeführt, indem

150 mg Ascorbinsäure in 18 ccm Pufferlösung gelöst wurden. Da die DLR. durch hypertonsche Lösungen beeinflusst wird — von der 10proz. Na_2CO_3 -Lösung genügen z. B. schon 0,05 ccm um die DLR. zu verhindern —, erweist sich Na_2CO_3 als ungeeignet, um die Ascorbinsäure zu diesem Zwecke zu neutralisieren, die hier angegebene Pufferlösung übt aber keinen Einfluß auf die DLR. aus.

Die antihämolytische Wirkung des Vitamin C beruht also *in vitro* auf einer Säurenwirkung. Es erscheint uns aber wahrscheinlich, daß die antihämolytische Wirkung des Vitamin C *in vivo* nach einem ganz anderen Mechanismus vor sich gehe. Bei früher ausgeführten Versuchen konnten wir nämlich nachweisen, daß die länger dauernde Verabreichung von Vitamin C auch bei zur Acidose neigenden Individuen keine wesentliche Verschiebung im Säure-Basen-Gleichgewicht verursache.

Der Komplementgehalt im Blute des Kranken erlitt während und nach der Vitamin C-Behandlung keine Änderung, er war in großer Menge auch dann nachweisbar, als es bei dem Kranken nicht gelang, auf künstlichem Wege einen Anfall hervorzurufen. Die Annahme, die Ascorbinsäure könnte etwa durch die Vernichtung des Komplements wirken, wird somit hinfällig. Die *in vitro*-Versuche sprechen einheitlich für diese Tatsache: Vitamin C schützt auch dann, wenn zur DLR. große Mengen frischen Komplements verwendet werden.

Allem Anscheine nach wirkt demnach die Ascorbinsäure auf den Amboceptor. Es soll hier nochmals betont werden, daß die DLR. auch dann positiv geblieben ist, da der künstliche Anfall auch nach $\frac{1}{2}$ Stunde langem Abkühlen nicht erzeugt werden konnte; das Autohämolysin war demnach nicht aus dem Blute des Kranken verschwunden. Wurde jedoch die Menge des Amboceptors nach KUMAGAI und NAMBA bestimmt, dann zeigte sich, daß die Menge desselben wesentlich gesunken war: nun fiel die Reaktion bloß bei der Verdünnung 1 : 2 noch positiv aus. Zu demselben Schluß führt auch der Umstand, daß 5 Minuten langes Abkühlen nicht mehr genügte, um eine positive DLR. zu erzielen. Diese Untersuchungen zeigen, daß durch die von uns verabreichte Vitamin C-Menge das Autohämolysin nicht zum vollkommenen Schwinden aus dem Blut gebracht werden konnte, dieses wurde bloß so stark vermindert, daß die Krankheit in ein larviertes Stadium gelangte. Dasselbe Ergebnis konnten KUMAGAI und NAMBA auch mit der antiluischen Behandlung erzielen. Nach dem oben Gesagten wird auch verständlich, warum es zu den *in vitro*-Versuchen einer verhältnismäßig bedeutend größeren Vitamin C-Menge bedarf als *in vivo*.

Bei unserem Kranken konnten wir noch eine sehr interessante Beobachtung machen: Nach der Sättigung mit Vitamin C (11,5) wurde die *WaR.* negativ und blieb es auch noch weitere 4 Wochen hindurch; auch jetzt ist sie bloß schwach positiv (+ +). Diese Beobachtung spricht auch dafür, daß die Ascorbinsäure auf das

Antigen wirkt, obwohl Luesantigen und Hämolyisin nicht miteinander identisch sind.

Nach der Theorie SALENS sollte Vitamin C in der Dispersität der erwähnten Kolloide des Serums eine Änderung verursachen; es wäre möglich, daß durch die Steigerung der Dispersität die Sensibilisierung der E. verhindert werde. Diesbezüglich bedarf es weiterer Untersuchungen wie auch in bezug auf die Frage, ob durch Vitamin C auch andere Hämolyisine — wie z. B. das Immunchämolyisin, die Hbu. bei Malaria usw. —, ob auch die WaR. bei anderen luischen Individuen (ohne Hbu.) beeinflußt werde u. a. m.

Zusammenfassung: Durch intravenöse Injektionen von Vitamin C (Ascorbinsäure) konnten bei einem an paroxysmaler Hämoglobinurie leidenden Kranken — bei dem ein deutliches Vitamin C-Defizit nachzuweisen war — die spontan auftretenden Anfälle verhindert werden; diese waren sogar auch auf künstlichem Wege nicht mehr auslösbar. Nicht nur in vivo, sondern auch in vitro ausgeführte Versuche bestätigen die Tatsache, daß die Ascorbinsäure fähig ist, die intravitale Hämolyse zu vereiteln. Diese Wirkung des Vitamin C beruht in vivo wahrscheinlich auf der Verminderung der Menge des Autohämolyisins, in vitro offenbar auf einer Säurewirkung. Nach der Sättigung mit Vitamin C wurde die bei dem Kranken vorher positive WaR. vorübergehend (4 Wochen) vollkommen negativ.

Literatur: ARMENTANO, Z. klin. Med. 129, 685 (1936). — BORBÉLY, Münch. med. Wschr. 1930 I, 826. — BURMEISTER, Z. klin. Med. 92, 19 (1921). — DONATH u. LANDSTEINER, Münch. med. Wschr. 1904 II, 1590 — Z. klin. Med. 58, 173 (1906). — JANCsó u. CSIKY, Festschrift Lechner 1915. — KUMAGAI u. NAMBA, Dtsch. Arch. klin. Med. 156, 257 (1925). — LICHTMANN, Med. Klin. 1930 I, 729. — LINDBOM, Z. klin. Med. 79, 147 (1913). — LÜDTKE, Dtsch. med. Wschr. 1924, 103. — E. MEYER, Bethe-Bergmann 6/1, 586. Berlin: Julius Springer 1928. — MORO u. NODA, Münch. med. Wschr. 1909, 545. — PRINGSHEIM, Münch. med. Wschr. 1912, 1757. — SALEN, Acta med. scand. (Stockh.) Suppl. 11, 1, 704 (1925); 75, 612 (1931). — YAMADA, MATSUO zit. nach E. MEYER.

Vitamin Nature of Flavones

In a previous note¹ we reported on the favourable effect of flavones upon the resistance and permeability of the capillary wall in certain pathological conditions. The substances responsible for this activity were tentatively termed 'vitamin P'. The acceptance, however, of

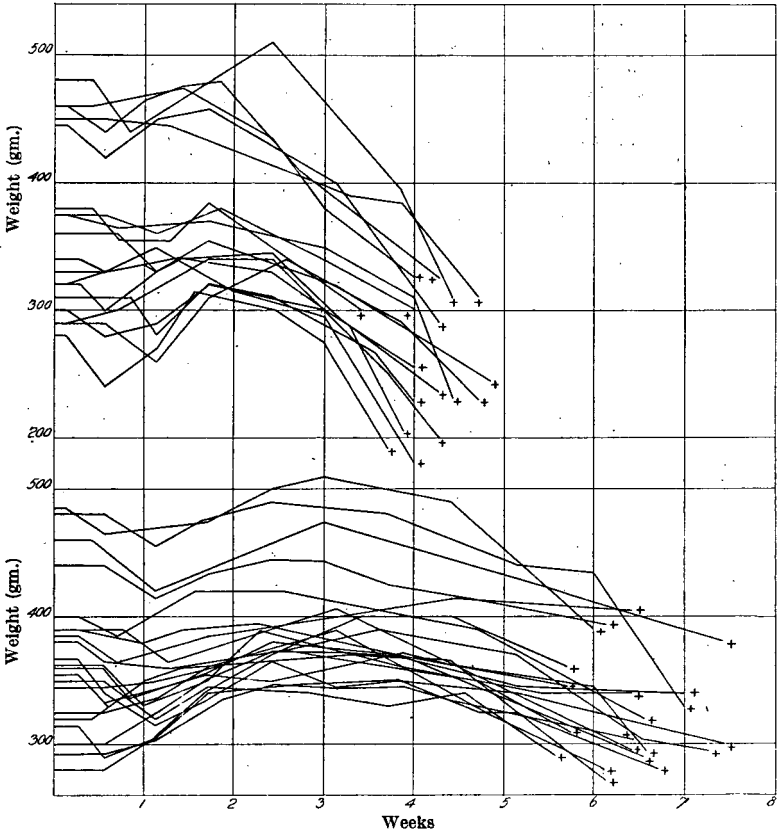


FIG. 1. Weight curves of guinea pigs receiving a scurvy diet without (above) and with (below) the addition of 'Citrin'.

the vitamin nature of these dyes depended on the experimental demonstration of the symptoms of deficiency.

Thirty-eight guinea pigs, weighing 280-485 gm., were placed on the Sherman - La Mer - Campbell scurvy diet. The components of the food were autoclaved for one hour and a half at 120° C., ammonia being added to the water of the autoclave. Twenty-

one of the animals received 1 mgm. 'Citrin'² daily, this substance being the crystalline flavone fraction of lemon juice. A smaller additional group of animals received mixed food.

The weight curves of the animals (17), receiving the scurvy diet only, are represented in the upper part of Fig. 1. The curves of the animals end with death. They show the usual rapid fall after the second week of the experiment, death occurring on average at 28.5 days. The weight declines on the average from 359 gm. to 242 gm.

The data of the second group, receiving 'Citrin', are represented in the lower part of Fig. 1. The administration of flavone was discontinued at the end of the sixth week. Compared with the first group, these animals live distinctly longer, on the average 44 days. At 34-38 days no animal from this group had died, while all animals in the first group were dead. There is also a marked difference in the weight curves, which fail to show the pre-mortal rapid decline, the average weight of 365 gm. falling to 342 gm. only.

Since the food contained no ascorbic acid, the animals could not be expected to live indefinitely. All the animals of both groups showed the typical clinical symptoms of scurvy. On autopsy all the animals showed the typical fragility of bones, looseness of teeth and swelling of joints. There was, however, a very marked difference in the intensity of hæmorrhages in both groups. In our protocols the hæmorrhages were noted, according to their extent, by one, two or three crosses. The relation of the number of crosses given per 100 animals in the first and second group was 212 to 68 for hæmorrhages of the costal joints, 77 to 14 for intestinal hæmorrhages, 224 to 71 for different articular hæmorrhages, and 178 to 33 for hæmorrhages in the muscles. The vitamin P seems thus to have a marked and somewhat specific influence on the capillary system. This agrees with our clinical observations.

A third and smaller group of animals, receiving mixed food, showed normal growth. A preliminary experiment with half the number of animals gave identical results.

These results suggest that experimental scurvy, as commonly known, is a deficiency disease caused by the combined lack of vitamin C and P.

This research was sponsored by the Josiah Macy, Jr., Foundation, New York.

A. BENTSÁTH.

Institute of Medical Chemistry ST. RUSZNYÁK.

and the Medical Clinic, A. SZENT-GYÖRGYI.

Szeged.

¹ NATURE, 138, 27 (July 4, 1936).

² Deut. Med. Wochsch., Nr. 33, 1325 (1936).