

intellektueller Ausfallserscheinungen als Folge dieser Maßnahme zu zeigen. Wir können also den Schluß ziehen, daß in Fällen von Dystonia musculorum deformans diese Gehirnabschnitte selektiv geopfert werden können, ohne daß man dadurch irgendwelche motorischen, sensiblen, geistigen oder antriebsmäßigen Ausfallserscheinungen verursachen würde. Dieses ist eine sehr eindrucksvolle Demonstration der großen Sicherheitsbreite und Anpassungsfähigkeit des jugendlichen Gehirns beim Menschen.

Literatur. ¹ COOPER, I. S.: Science **119**, 417—418 (1954). — ² COOPER, I. S.: Science **121**, 217—218 (1955). — ³ COOPER, I. S., and N. POLOUKHINE: J. Amer. Geriatr. Soc. **3**, 839—859 (1955). — ⁴ COOPER, I. S.: J. Amer. Geriatr. Soc. **4**, 1171—1181 (1956). — ⁵ COOPER, I. S., and N. POLOUKHINE: J. Amer. Geriatr. Soc. **4**, 1182—1207 (1946). — ⁶ BRAVO, B., and I. S. COOPER: J. Amer. Geriatr. Soc. **5**, 651—655 (1957). — ⁷ FAIRMAN, D., and R. S. SCHWAB: J. Amer. Geriatr. Soc. **4**, 1240 bis 1245 (1956). — ⁸ ENGLAND, A., and R. S. SCHWAB: J. Amer. Geriatr. Soc. **5**, No 12, 1219—1232. — ⁹ PARKINSON, J.: An

essay on shaking palsy. London: Whittingham & Rowland 1817. — ¹⁰ SCHWAB, R. S., and J. S. PRICHARD: Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **65**, 489—501 (1951). — ¹¹ BUCY, P. C., and J. T. CASE: Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **41**, 721 (1939). — ¹² KLEMM, R. M.: Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **44**, 926 (1940). — ¹³ WALKER, A. E.: J. nerv. ment. Dis. **116**, 766—775 (1952). — ¹⁴ PUTNAM, T. J.: Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **40**, 1049 (1938). — ¹⁵ MEYERS, R.: Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **44**, 445 (1940). — ¹⁶ SPIEGEL, E. A., H. T. WYCS and C. THUR: J. Neurosurg. **8**, 452 (1951). — ¹⁷ FENELON, F., and F. THIEBAUT: Rev. neurol. **83**, 280 (1950). — ¹⁸ GUIOT, G., et S. BRION: Sem. Hôp. Paris **1952**, Nr 49, 2095—2099. — ¹⁹ NARABAYASHI, H., and T. OKUMA: Proc. Jap. Acad. **29**, 310—318 (1953). — ²⁰ TALAIRACH, J., H. HECAEN, M. DAVID, M. MONNIER et J. DE AJURIAGUERRA: Rev. neurol. **81**, 4—24 (1949). — ²¹ HASSLER, R., and T. RIECHERT: Proc. roy. Soc. Med. **48**, 469—470 (1955). — ²² COOPER, I. S.: Surg. Gynec. Obstet. **99**, 207—219 (1954). — ²³ COOPER, I. S.: The neurosurgical alleviation of Parkinsonism. Springfield, Ill.: C. Thomas Publ. 1956.

ORIGINALIEN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ERYTHROPOIETISCHE WIRKUNG POLYCYTHÄMISCHER SEREN*

Von

A. CLOTTEN und R. CLOTTEN

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Freiburg i. Br. (Direktor Prof. Dr. Dr. h. c. L. HEILMEYER)

Die Existenz eines humoralen, die Erythropoiese stimulierenden Prinzips im peripheren Blut wird heute zumindest bei bestimmten pathologischen Veränderungen als gesichert betrachtet. Diesem humoralen Faktor(en) werden jene essentiellen Stoffe gegenübergestellt, welche für die Hämopoiese von allgemeiner Bedeutung sind (Vitamin B₁₂, Folsäure, Eisen, Kobalt usw.).

Das von CARNOT und DEFLANDRE¹ 1906 erstmals im Plasma anämischer Kaninchen nachgewiesene „Hämopoietin“, später Erythropoietin genannt², hat nun in den vergangenen Jahren zu zahlreichen Untersuchungen angeregt und verschiedene Hypothesen über Bildungsstätte und Natur dieses Stimulans aufgebracht.

Die zuerst allgemein vertretene Ansicht, daß die Sauerstoffspannung des Knochenmarkes das auslösende Agens für die Erythropoiese darstelle, wurde durch die Versuche von GRANT und ROOT³ an Hunden, durch die von BERK u. Mitarb.⁴ an menschlichem Knochenmark sowie durch die von THOMAS⁵ an Erythroblastenkulturen widerlegt. REISSMAN⁶ konnte an Parabioseratten nachweisen, daß die verminderte Sauerstoffspannung des Knochenmarks über die Aktivierung des humoralen Erythropoietins zur Stimulierung der Erythropoiese führt.

Die bekannte Tatsache, daß Kobaltgaben eine gesteigerte Erythrocytenbildung mit vermehrter peripherer Reticulocytenausschwemmung im Gefolge haben, wurde auf eine Hemmwirkung dieses Elements auf die sauerstoffübertragenden Fermente zurückgeführt, was jedoch nicht unwidersprochen geblieben ist (LAFORET und THOMAS⁷). Die Versuche von GOLDWASSER u. Mitarb.⁸ haben im Gegensatz zu dieser früheren Auffassung der Kobaltwirkung zeigen können, daß auch dieses Element über die Aktivierung des humoralen, die Erythropoiese fördernden Faktors seine Wirkung entfaltet.

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. L. HEILMEYER zum 60. Geburtstag.

Der eigentliche Bildungsort dieses experimentell nachgewiesenen humoralen Faktors im tierischen und menschlichen Organismus ist eine bis heute noch ungeklärte Frage. Nach den Untersuchungen von VAN DYKE u. Mitarb.^{9, 10} an endokrin aktiven Organen wurde als mögliche Bildungsstätte der Hypophysenvorderlappen zur Diskussion gestellt, da Extrakte aus diesem, selbst nach Entfernung aller anderen trophischen Hormone, noch eine die Erythropoiese stimulierende Wirkung aufwiesen. Im krassen Widerspruch hierzu stehen die an hypophysektomierten Tieren durchgeführten Versuche, bei denen stets nach experimentell erzeugten Anämien eine gesteigerte erythropoietische Wirksamkeit des Plasmas nachgewiesen werden konnte^{11, 12}. JACOBSON u. Mitarb.¹³ stellten Extrakte aus den verschiedensten Organen her, wobei nur die aus der Niere gewonnenen eine stimulierende Wirkung zeigten. MIRAND und PRENTICE¹⁴ konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigen. Daß die Niere bei diesem Geschehen jedoch eine wesentliche Rolle spielen muß, ergaben die kürzlich veröffentlichten klinischen Beobachtungen von FORSELL¹⁵ (s. auch ^{13, 14, 16, 17}). Dieser Autor konnte bei einer relativ großen Anzahl von Nephropathien der verschiedensten Genese, die sämtlich eine sekundäre Polycythämie aufwiesen, die Beobachtung machen, daß nach Entfernung der kranken Niere in praktisch allen Fällen die Polycythämie verschwand.

Daß auch das lymphatische und hämopoietische Gewebe nicht die Bildungsstätte dieses Wirkstoffes sein kann, wurde von LINMAN und BETHELL¹⁸ durch Bestrahlungsversuche und von ERSLEV und LAVIETES¹⁹ an HN₂-vergifteten Kaninchen bewiesen.

Wie in der Frage nach der möglichen Bildungsstätte, so sind auch über die vermutliche chemische Natur des erythropoietischen Faktors die Auffassungen sehr unterschiedlich. Auf Grund der Arbeiten von BORSOOK u. Mitarb.²⁰ u. a.^{19, 21, 22} darf in dieser Hinsicht nur als gesichert gelten, daß diese humorale Substanz keinen hochmolekularen Eiweißkörper dar-

stellt. Die daraus in der Literatur gezogenen Schlüsse über die eigentliche chemische Natur dieses Stoffes^{19, 22, 23-28} sind bis heute rein spekulativer Art. Erst die wirkliche Isolierung und weitgehende Reindarstellung des hier wirksamen Prinzips wird die Richtigkeit der einen oder der anderen Auffassung beweisen.

Es steht heute auf Grund zahlreicher Untersuchungen fest, daß nicht nur das Plasma sekundärer Anämien der unterschiedlichsten Genese diesen Faktor vermehrt enthält, sondern daß er darüber hinaus auch bei symptomatischen und idiopathischen Polycythämien nachweisbar ist (CONTOPOULOS^{29, 30}, APPELS und KELLER³¹, LIPP, HEILMEYER und CLOTTEN³²). Daß jedoch auch das normale Plasma stets eine bestimmte Konzentration dieses Stoffes enthält, welcher zur Aufrechterhaltung eines konstanten Erythrocytenspiegels regulatorisch wirksam ist, konnte durch die Versuche von GURNEY u. Mitarb.³³ nachgewiesen und auch durch eigene Untersuchungen wahrscheinlich gemacht werden³².

Auf Grund der bis heute vorliegenden Untersuchungen sollte durch unsere Arbeiten versucht werden, folgende Fragen zu klären:

1. Ist aus den klinischen Daten und Symptomen oder den Laborbefunden der beobachteten Fälle von symptomatischen oder idiopathischen Polycythämien ein Hinweis für die erythropoietische Aktivität bzw. Inaktivität des zu untersuchenden Plasmas gegeben.

2. Besteht eine Parallelität zwischen erythropoietischer Aktivität des Serums von polycythämischen Patienten und der Schwere des jeweiligen Krankheitsbildes.

Darüber hinaus sollte die Möglichkeit untersucht werden, aus aktiven Polycythämie- und Normalseren den oder die hier wirksamen Faktoren zu isolieren, um damit einen näheren Einblick in deren chemische Natur zu gewinnen.

Methodik

I. Material.

Für diese Untersuchungen wurden im allgemeinen 500 ml Blut polycythämischer Patienten durch Venenpunktion entnommen und in evakuierten, mit Heparin versetzten (0,5 ml Heparin + 5 ml 0,9%ige NaCl je 500 ml Blut) Flaschen aufgefangen. Für Vergleichsuntersuchungen im Normalplasma wurden in gleicher Weise entnommene Blutspenderkonserven verwandt.

II. Reagentien.

1. Pufferlösung p_H 3,6. 10 ml Pyridin (z. Chromat.) und 100 ml Eisessig p. a. (99–100%) werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

2. Enteiweißungsmischung. 1 Teil Aceton p. a. und 3 Teile Methanol absolut p. a. werden gemischt.

3. Färbelösungen.

a) 0,2%ige Lösung von Ninhydrin in Aceton.

b) Natriumnitroprussid-Cyanidreagens zum Sulfhydrilnachweis nach TOENNIES und KOLB³⁴.

c) Platinchlorid-Kaliumjodid-Reagens zum Nachweis von Schwefel nach TOENNIES und KOLB³⁴.

d) Toluidinblau zum Nachweis metachromatisch reagierender Substanzen: 0,125%ige Lösung von Toluidinblau in 96%igem Äthanol.

e) Somogyi-Reagens zur Darstellung reduzierender Polysaccharide nach FRENCH u. Mitarb.³⁵.

f) Reagens zum Nachweis von Peptiden nach REINDEL und HOPPE³⁶.

4. 1 n-HCl.

III. Papier.

Schleicher & Schüll 2043a, 100 × 12 cm.

IV. Apparatur.

Zu diesen Untersuchungen wurde im wesentlichen die von HEILMEYER u. Mitarb.³⁷ beschriebene Versuchsanordnung gewählt. Lediglich zur Trennung der Substrate wurden infolge der größeren Streifenlänge entsprechend dimensionierte Kammern verwendet.

V. Versuchstiere.

Zur Testung der Substrate auf ihre erythropoietische Aktivität wurden männliche weiße Wistar-Ratten von 120–160 g Körpergewicht verwandt. Vor Versuchsbeginn wurden diese Tiere für Wochen vorher auf eine einheitliche Diät gesetzt.

Jedes Substrat wurde jeweils 5 Ratten in einer einmaligen Injektion intraperitoneal verabreicht, nachdem diese Tiere vor der Injektion 3mal auf ihre Erythrocyten- und Reticulocytenwerte vorgezählt worden waren. Das für die Zählungen erforderliche Blut wurde aus der Schwanzvene entnommen. Tiere, die hierbei Reticulocytenwerte von 30‰ und darüber aufwiesen, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen.

Zwei Tage nach der letzten Vorzählung erfolgte dann die Injektion der zu untersuchenden Probe, wonach vom 2. bis zum 6. Tage nach der Injektion der Erythrocyten- und Reticulocyten Spiegel auf etwaige Veränderungen hin kontrolliert wurde.

Die Zählung dieser Formelemente erfolgte nach den in der Klinik üblichen Methoden.

VI. Vorbereitung der Substrate.

Das in der oben geschilderten Weise gewonnene heparinisierte Blut wurde zur Gewinnung des Plasmas zentrifugiert, nach der Trennung das Plasma entnommen und die Erythrocyten verworfen. Ein Teil des so gewonnenen Plasmas (im allgemeinen 25 ml) wurde bis zur direkten Testung am Tier sofort tief gefroren. Das restliche Plasma gelangte dann nach einer der nachfolgend geschilderten Methoden zur Aufarbeitung.

1. Enteiweißung nach BORSOOK u. Mitarb.²⁰. Das Plasma wird mit 1 n-HCl auf ein p_H von 5,5 eingestellt und anschließend für 15 min im kochenden Wasserbad unter gelegentlichem Umrühren gehalten. Nachdem sich ein festes Koagulum gebildet hat, wird ein der Menge verwendeten Plasmas entsprechendes Volumen destilliertes Wasser zugesetzt, sorgfältig gemischt und erneut für 5 min gekocht. Nach Abzentrifugieren des Eiweißniederschlags wird dieser dreimal mit kleinen Portionen kochenden destillierten Wassers gewaschen, zentrifugiert und Waschflüssigkeiten und 1. Zentrifugat vereinigt. Der resultierende fast klare Extrakt wird dann im Vakuum zur Trockne eingengt.

2. Enteiweißung mit Alkohol-Acetongemisch. Ein Teil Plasma wird unter ständigem Schütteln in 3 Teile dieser Mischung eingetragen und danach für 15 min auf dem Wasserbad soweit erhitzt, daß ein Kochen des Gemisches verhindert wird. Um ein Verdampfen des organischen Lösungsmittels zu vermeiden, wird diese Erhitzung in mit Petrischalen oder großen Uhrgläsern bedeckten Kolben vorgenommen. Nach Abzentrifugieren des ausgefallenen Eiweißes wird der Niederschlag dreimal mit kleinen Mengen warmer Aceton-Alkoholmischung nachgewaschen. Die vereinigten Extrakte werden dann ebenfalls im Vakuum zur Trockne eingengt.

Tabelle 1

	Patient, Alter, Geschlecht	Diagnose	Aktivi- tät	Milz- tumor	Blutdruck mm Hg	Blutwerte					Vorbehandlung
						Hämo- globin g-%	Erythro- cyten Mill.	Leuko- cyten	Thrombo- cyten	Reticulo- cyten ‰	
1	J. N., 51, ♂	Polycythämie	0	negativ	155/105	23,0	6,31	9800	510000	27	
2	H. F., 62, ♂	Polycythämie	0	negativ	190/95	21,0	7,00	8900	547000	17	
3	E. B., 76, ♂	Polycythämie	+	positiv	130/80	20,0	8,20	28700	902000	16	
4	H. T., 56, ♂	Polycythämie	+	positiv	170/85	19,0	8,90	27900	1600000		
5	E. S., 45, ♂	Polycythämie	+	negativ	170/105	17,8	8,30	11700	623000	28	
6	K. S., 62, ♂	Polycythämie	+	positiv	220/125	21,2	7,19	5900	596000	26	
7	E. B., 25, ♂	Polycythämie	+	negativ	130/80	19,0	5,00	11300	195000	17	
8	E. S., 56, ♂	Polycythämie	+++	negativ	140/100	19,2	8,56	19300	576000	17	
9	S. G., 57, ♂	Polycythämie	0	negativ	180/125	23,0	6,80	5800	200000	9	
10	F. S., 53, ♂	Polycythämie	+	positiv	160/95	20,6	6,16	14000	192000	12	
11	J. M., 50, ♂	Polycythämie	++	positiv	125/80	16,8	8,30	39000	166000	4	
12	E. L., 58, ♂	Polycythämie	++	negativ	220/110	16,4	7,90	4050	600000	23	
13	G. W., 50, ♂	Polycythämie	+++	negativ	170/90	22,0	9,20	14800	220000	2	
14	E. D., 64, ♂	Polycythämie	0	positiv	120/75	20,8	4,80	10700	327000		1951: 10 mC P ³² , 1953: 10 mC P ³² , 1954: 9,5 mC, 1955: 8 mC, 1956: 8,5 mC, 1957: 8 mC 1955: 9 mC P ³²
15	K. P., 55, ♂	Polycythämie	0	positiv	130/80	20,6	8,24	5400	168000	9	1954: 10 mC P ³²
16	B. E., 52, ♂	Polycythämie	+	negativ	170/100	22,0	6,50	14200	920000	28	1957: 3 mC P ³²
17	A. S., 52, ♂	Polycythämie	+	positiv	170/110	16,0	7,00	9900	1900000	45	1954: Milz- bestrahlung
18	S. S., 37, ♂	Polycythämie	+	negativ	165/120	22,0	7,84	5200	290000	16	1956: 3 mC P ³² , 1957: 6 mC P ³²
19	H. Z., 59, ♀	Polycythämie	+	positiv	120/80	16,0	7,31	6000	584000	14	1957: 7,5 mC P ³²
20	W. S., 51, ♂	Polycythämie	+	positiv	170/120	20,0	6,00	8400	172000	10	1955: 3mal P ³² - Behandlung, Gesamtdosis 16,5 mC
21	E. B., 61, ♂	Polycythämie	++	negativ	150/90	18,5	6,40	6300	153000	15	1954: 9 mC P ³²
22	G. B., 63, ♂	Polycythämie	++	positiv	220/110	18,8	6,08	8900	224000	9	1951: 5 mC, 1954: 9 mC, 1956: 5 mC P ³²
23	E. W., 52, ♂	Polycythämie	+++	negativ	160/85	19,8	4,92	4700	152000	6	1953: 6 mC P ³²
24	E. B., 52, ♀	Polycythämie	+++	negativ	165/105	21,4	8,20	5200	128000		
25	G. G., 55, ♂	Polyglobulie	0	negativ	170/90	19,8	7,80	6400	230000	3	
26	A. H., 50, ♂	Polyglobulie	0	negativ	200/110	16,5	5,00	8500			
27	T. Z., 62, ♂	Polyglobulie	++	negativ	190/85	17,1	6,50	5200	297000	20	
28	A. A., 57, ♂	Polyglobulie	++	negativ	185/100	20,8	7,10	8350	70000	19	
29	L. K., 58, ♂	Polyglobulie	+++	negativ	150/80	19,3	6,90	10000	200000	18	
30	O. L., 51, ♂	Polyglobulie	+++	negativ	170/90	19,2	5,80	7200	490000	5	
31	E. H., 60, ♀	Hypertonie	+++	negativ	220/100	15,8	4,25	9200			

0 = negativ, kein Anstieg der Reticulocyten bei allen 5 Versuchstieren nach Injektion von 3 ml Plasma/100 g Körpergewicht.

+ = Reticulocytenanstieg bis 50% gegenüber dem Ausgangswert; ++ = Reticulocytenanstieg bis 100% gegenüber dem Ausgangswert; +++ = Reticulocytenanstieg bis 150% und mehr gegenüber dem Ausgangswert.

Das auf diese Weise gewonnene trockne Material des enteiweißten Plasmas wurde dann in kleinen Mengen destillierten Wassers wieder aufgenommen. Zur Testung des enteiweißten Plasmas gelangten auch von den so hergestellten Konzentraten Mengen zur Injektion, die 3 ml Vollplasma entsprachen.

VII. Hochspannungselektrophoretische Trennung der enteiweißten Plasmakonzentrate.

Nach Entnahme der zur Prüfung der Aktivität des Gesamtkonzentrats erforderlichen Menge wurden die entweder nach der Methode von BORSOOK oder mit Hilfe von Alkohol-Aceton-Enteiweißung hergestellten Substrate der hochspannungselektrophoretischen Trennung bei einem p_H von 3,6 unterworfen. Die hierbei jeweils zur Trennung gelangende Substratmenge entsprach durchschnittlich 10–20 ml Vollplasma. Die Auftrennung erfolgte bei 60 V/cm für $3\frac{1}{2}$ Std.

Nach dem Lufttrocknen der Streifen wurde zur Festlegung des Trennergebnisses ein 3 cm breiter Streifen in der Laufrichtung abgetrennt und mit

Ninhydrin gefärbt. Entsprechend der Lage der sich hierbei darstellenden Aminosäurefraktionen erfolgte dann eine Aufteilung des ungefärbten Streifenteiles in gleichmäßig breite Abschnitte, wobei die kathodische Seite der Pherogramme (basische Substanzen) in 5, die Gruppe der neutralen Aminosäuren in 2 und die der anodisch wandernden sauren Substanzen in 8 Abschnitte unterteilt wurde. Diese Einteilung geschah völlig willkürlich und wurde nur von der Lokalisation der sich mit Ninhydridfärbung darstellenden 3 Hauptgruppen im Elektrophoresediagramm abhängig gemacht.

Die so festgelegten Abschnitte wurden anschließend zerschnitten und in die Spitze eluiert³⁶. Nach Elution der sich auf diese Weise in den Spitzen konzentrierenden Substanzmengen in Wasser wurden diese bis zur Testung am Tier tief gefroren.

Da in der Literatur zum Teil die außerordentliche Sauerstoffempfindlichkeit des erythropoietisch wirkenden Faktors diskutiert wird^{29–31, 40–42}, eine solche große Empfindlichkeit jedoch nur mit der Verschie-

bung eines Oxydo-Redoxsystems in Einklang zu bringen ist (z. B. der Oxydation von SH-Verbindungen zu SS-Verbindungen), versuchten wir, einen Oxydationsschutz bzw. eine Reduzierung dadurch zu erreichen, daß wir sowohl dem Vollplasma wie auch den entweißten Gesamtkonzentraten oder den wie oben beschrieben hergestellten Eluaten Ascorbinsäure im Überschuß zusetzten. Die Prüfung der hier verwandten Ascorbinsäuremengen ergab, daß durch auch noch so große Mengen Vitamin C kein Anstieg der Reticulocyten bei einer einmaligen Injektion zu erreichen ist.

Ergebnisse und Diskussion

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse des Aktivitätsgrades verschiedener Plasmen zusammengestellt. Die erythropoietische Aktivität wurde auf Grund des Reticulocytenpiegels nach einmaliger Injektion von 3 ml Plasma je 100 g Körpergewicht an jeweils 5 Ratten beurteilt (Tabelle 1).

Die mit + bezeichnete Aktivität wurde für eine solche bis zu 50 %, die mit ++ bis zu 100 % und die mit +++ bis und über 150 % des Reticulocytenanstieges nach Injektion gegenüber dem mittleren Ausgangswert gewählt.

Die Zusammenstellung bezüglich der injizierten Plasmen in dieser Tabelle ist durch folgende Serien gekennzeichnet:

1. Plasma von Patienten mit Polycythaemia vera, deren Blutwerte annähernd alle diagnostischen Kriterien aufwiesen und die bis zur Testung noch keinerlei Behandlung bekommen hatten (1—8). In dieser Gruppe waren 2 Plasmen ohne jeglichen Effekt, 5 Plasmen von einer eindeutigen Wirksamkeit und 1 Plasma von einer starken erythropoietischen Aktivität. Der unterschiedliche Aktivitätsgrad bzw. die Inaktivität bei 2 Fällen in dieser Serie findet keine Erklärung durch die erhobenen Befunde.

2. Plasma von Patienten mit Polycythaemia vera, deren Blutwerte jedoch mehr dem Bild einer Polyglobulie zuzuordnen wären (9, 10, 12 und 13) und von einem Falle einer beginnenden Erythroleukämie (11). Auch diese Serie zeigt eine wechselnde und mit den vorliegenden Symptomen nicht in Korrelation zu bringende Aktivität. Jedoch erscheint hier gegenüber der Serie 1 eine durchschnittlich höhere erythropoietische Wirksamkeit vorzuliegen.

3. Plasma von Patienten mit Polycythaemia vera (14—24), die jedoch in unterschiedlicher Dosierung und zu verschiedenen Zeitabständen mit radioaktivem Phosphor (P^{32}) vorbehandelt worden waren. Ein wesentlich unterschiedlicher Aktivitätseffekt in dieser Gruppe besteht gegenüber der Serie 1 nicht.

4. Plasma von Patienten mit Polyglobulie unterschiedlicher Genese (Lungenemphysem, Pulmonalsklerose, Herzvitien usw.) sind in dieser letzten Serie (25—30) mit einem Fall von Hypertonie (31) zusammengefaßt. In dieser Gruppe zeigten mit Ausnahme zweier Patienten alle übrigen Fälle eine durchwegs gesteigerte Aktivierung der Erythropoiese in einer Intensität, die noch ausgeprägter als die in Serie 2 erscheint.

Wie aus der Tabelle 1 zu ersehen ist, sind also in allen Gruppen Fälle zu beobachten, deren Plasma in der angewandten Dosierung keine erythropoietische Wirkung besitzt. Hierbei war auf Grund der klinischen

Symptome und der Laborbefunde keinerlei Unterschied zu den Patienten zu beobachten, deren Plasma positiv im Sinne einer Stimulierung der Erythropoiese reagierte. Die erythropoietisch aktiven Plasmen wiesen eine sehr unterschiedliche Stimulationsintensität auf. Auch hierin zeigte sich keine Korrelation zwischen der Höhe des Reticulocytenanstieges und damit an Gehalt von erythropoietischem Wirkstoff und den klinischen Befunden. Zwischen dem Plasma unbehandelter Polycythämien mit typischen Blutveränderungen und dem solcher, die mit P^{32} vorbehandelt worden waren, konnte kein Aktivitätsunterschied beobachtet werden. Lediglich bei den Polycythämien mit atypischen Blutbefunden und den symptomatischen Polycythämien (Polyglobulien) war eine durchwegs gesteigerte erythropoietische Aktivität gegenüber den übrigen Polycythämien zu beobachten,

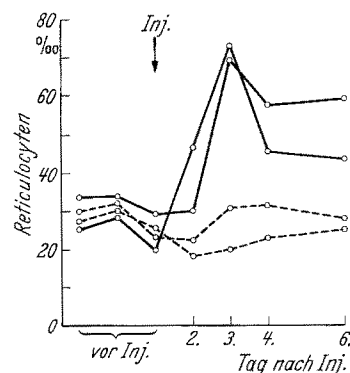


Abb. 1. o—o Polycythämieserum; o---o Normalserum

wobei auch hier keinerlei Beziehung zwischen Art der Erkrankung und dem Ausfall des Testes festzustellen war.

Somit läßt sich auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse allgemein sagen, daß die Variation der erythropoietischen Aktivität im Plasma offenbar unabhängig von der Ätiologie und Symptomatologie des Krankheitsbildes idiopathischer und symptomatischer Polycythämien ist. Eine Proportionalität zwischen Gehalt des Plasmas an erythropoietischem Wirkstoff und Intensität des Krankheitsbildes konnte nicht gefunden werden.

Untersuchungen zur Isolierung des Erythropoietins

Da alle in der Literatur beschriebenen Angaben über die vermutliche Natur des Erythropoietins darin übereinstimmend sind, daß es sich bei dieser Substanz offensichtlich um keinen hochmolekularen Eiweißkörper handelt, schien uns der Versuch zu dessen Isolierung mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese aussichtsreich.

Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Konzentrate aus aktivem polycythämischem Plasma und solche aus Normalplasma hinsichtlich ihrer erythropoietischen Wirksamkeit nochmals überprüft. Wie die Abb. 1 zeigt, kommt es nach Injektion des Extraktes aus Polycythämieplasma im Gegensatz zu dem aus Normalplasma zu einem signifikanten Anstieg der Reticulocyten. Die Erythrocyten zeigten auch in dieser Versuchsserie erwartungsgemäß innerhalb der Beobachtungszeit keinen Anstieg, im Gegensatz zu den Untersuchungen von APPELS und KELLER³¹. Ihre Kontrolle diente uns nur zur Ausschließung eventueller

sekundärer Anämien und der daraus resultierenden Reticulocytose.

Die Abb. 2 zeigt das Ergebnis einer hochspannungselektrophoretischen Auftrennung des Plasmas nach Anfärbung mit Ninhydrin. Hierbei zeigt sich eine deutliche Trennung in die kathodenwärts wandernden basischen, die sich an der Auftragsstelle lokalisierenden

neutralen und die anodenwärts wandernden sauren Bestandteile des Plasmas.

Das so getrennte aktive Substrat wurde anschließend, wie aus der Abb. 3 zu ersehen ist und wie im methodischen Teil geschildert, nach verschiedenen Gruppen vom Papier eluiert und die Eluate nach vorheriger Konzentration tierexperimentell getestet. Hierbei ergaben sich für die einzelnen Fraktionen aus normalem und polycythämischem Plasma die in dieser Abb. 1 schematisch dargestellten Veränderungen des Reticulocytenpiegels im Vergleich zur jeweiligen Ausgangslage. Die Menge der injizierten Fraktion entsprach deren Gehalt in 20 ml Plasma.

Es zeigte sich nun, daß schon im normalen Plasma erythropoietisch wirksame Substanzen vorhanden sind, die jedoch im polycythämischen Plasma zu einem weitaus stärkeren Anstieg der Reticulocyten führen. Der Unterschied zwischen normalem und polycythämischem Plasma ist hierbei jedoch nur rein quantitativer Art. Ein Auftreten neuer, die Erythropoiese stimulierender Faktoren

im polycythämischen Plasma war bei dieser Versuchsanordnung nicht zu beobachten.

Nach diesen bis dahin orientierenden Untersuchungsergebnissen, wobei die Elution der Fraktionen entsprechend ihrer Lage auf dem Pherogramm und der Ninhydrinfärbbarkeit vorgenommen wurde, scheint eine Reihe erythropoietisch wirksamer Substanzen im Plasmaextrakt vorzuliegen. Daß es sich dabei jedoch vorwiegend um zwei aktive Gruppen handelt, wovon die eine um die Auftragsstelle lokalisiert ist, die andere jedoch deutlich davon getrennt weit anodenwärts wandert, geht schon aus der Tatsache hervor,

daß zwischen den einzelnen wirksamen Fraktionen innerhalb dieser beiden Gruppen keine inaktive Fraktion vorkommt.

In dem Versuch, die sich hier darstellenden erythropoietisch aktiven Gruppen chemisch näher zu identifizieren, wurden die Pherogramme aus aktivem und normalem Plasma mit verschiedenen Färbmethoden behandelt. Hierbei ergaben sich die in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Verhältnisse.

Diese Befunde sprechen dafür, daß es sich zumindest bei der um die Auftragsstelle lokalisierenden Gruppe um ein schwefelhaltiges Mucopolysaccharid oder Glykoproteid handelt, welches durch die üblichen Eiweißfällungsmittel nicht ausgefällt wird und sich bei diesem p_H (3,6) elektrisch neutral verhält.

Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den vor kurzem von WINKERT u. Mitarb.⁴³ berich-

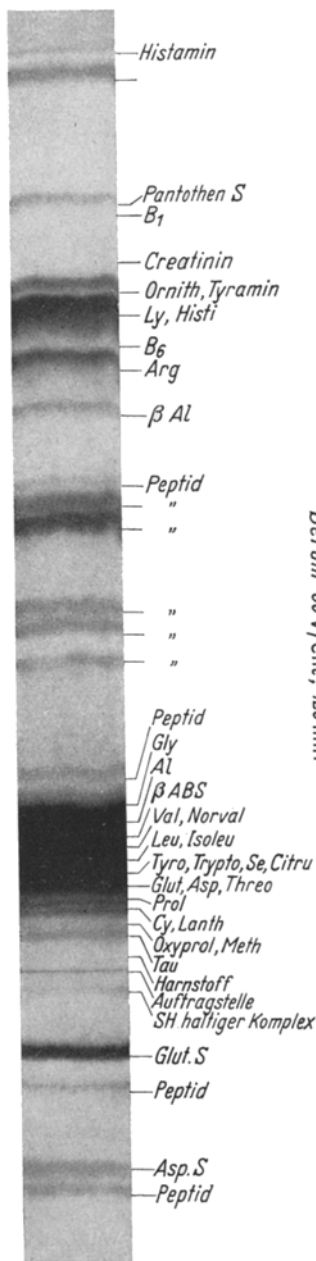


Abb. 2

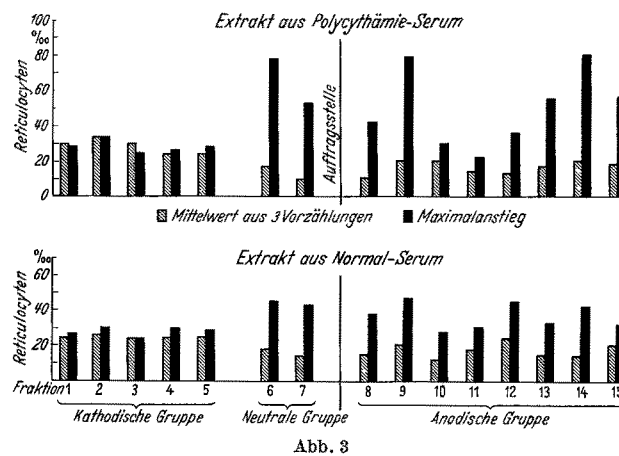


Abb. 3

teten Befunden über eine erythropoietisch wirksame Substanz im Urin, welche ähnliche chemische Eigenschaften aufwies.

Tabelle 2

Nachweis	Polycythämie-plasma Gruppe		Normalplasma Gruppe	
	I	II	I	II
Platinchlorid-KJ	++	+	(+)	-
Nitroprussid-HCN	++	-	-	-
Somogyi	++	(+)	-	-
Toluidinblau	++	-	-	-
Chlorierung-Benzidin	++	+	(+)	-
Ninhydrin	-	-	-	-

Gruppe I = die sich um den Auftragsstrich lokalisierende Gruppe; Gruppe II = die anodisch wandernde Gruppe.

Für eine Glykoproteidnatur sprechen auch die neuerlich mitgeteilten interessanten Ergebnisse von RAMBACH⁴⁴ u. Mitarb. über die säulenchromatographische Isolierung einer erythropoietisch wirksamen Substanz aus dem Plasma von Kaninchen, die mit Phenylhydrazin behandelt worden waren. Diese Autoren erhielten bei der Trennung der lyophilisierten Kochextrakte angesäuerten Plasmas an Äthylaminoäthylcellulosesäulen hochaktive Fraktionen, die nach Elution eine positive Schiff'sche Reaktion ergaben. Elektrophoretisch wanderten diese Substanzen zwischen dem α_1 und α_2 -Globulin. Die Analyse des Kohlenhydratgehaltes dieser Fraktionen ergab 18%; bemerkenswert hoch und für Glykoproteine charakteristisch war der Gehalt an Neuraminsäure (15%).

Wenn man die bis heute vorliegenden Daten über die Natur des oder der gefundenen Erythropoietine zusammengefaßt, so ergibt sich in etwa folgendes Bild:

1. Der in erythropoietisch aktiven Substraten vorhandene Faktor läßt sich mit den üblichen Eiweißfällungsmitteln, wie Hitzedenaturierung, Fällung mit Alkohol, Trichloressigsäure (7%), Perchlorsäure, nicht ausfällen²⁰.

2. Seine Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff wird unterschiedlich beurteilt. Eine Reihe von Autoren^{29, 30, 39, 40-42} vertritt die Auffassung einer erheblichen O₂-Empfindlichkeit, andere konnten eine solche nicht finden^{28, 29, 43, 44}.

3. Der in der üblichen Versuchsanordnung (Hitze-fällung des angesäuerten Plasmas oder Alkohol-Acetonfällung unter Erwärmen) nachweisbare aktive Faktor ist hitzestabil^{21, 22, 28-30, 42, 45}. Die Angaben über einen zweiten erythropoietisch wirksamen Stoff, der hitzelabil sei^{21, 28}, bedürfen noch der Bestätigung.

4. Die Substanz ist nicht dialysabel^{19, 43, 45}.

5. Durch die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, +4° und -20° tritt kein Aktivitätsverlust ein^{19, 45}.

6. Bei der Niedervoltektrophorese (pH 8,6, Ionenstärke 0,075—0,1) wandert der Faktor mit der α -Globulinfraktion⁴⁴.

7. Die sich hierbei darstellende Substanz ergibt eine positive Schiffsche Reaktion, reagiert mit Lipidfärbemitteln nicht und weist einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten und Neuraminsäure auf⁴⁴.

8. Bei der von uns durchgeführten hochspannungselektrophoretischen Trennung zeigt zumindest die eine der sich darstellenden aktiven Fraktionen eine positive Schwefel-, Sulfhydryl-, Polysaccharid- und Peptidreaktion und weist darüberhinaus mit Toluidinblau ein metachromatisches Verhalten auf³².

Die daraus zu folgernden Schlüsse sprechen für eine Glykoproteid- oder Mucopolysaccharidnatur dieses Stoffes. Inwieweit er mit den von anderen Autoren nachgewiesenen erythropoietisch wirksamen Substanzen in Verbindung zu bringen ist, die hierfür eine Polypeptidnatur²⁶, eine Lipoid-^{21, 28} oder Steroidnatur^{23, 24} angenommen haben, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Zusammenfassung. Es wird über tierexperimentelle und hochspannungselektrophoretische Untersuchungen des bei idiopathischen und symptomatischen Polycythämien im Blut vermehrt auftretenden erythropoietischen Faktors berichtet.

Hierbei konnte weder bei idiopathischen noch bei symptomatischen Polycythämien eine Korrelation zwischen der Ätiologie und Symptomatologie der Erkrankung und der Menge des dabei im Plasma nachweisbaren Stimulans der Erythropoiese festgestellt werden. Desgleichen wurde zwischen unbehandelten und mit P³² vorbehandelten Polycythämien keinerlei Unterschied hinsichtlich der Aktivität der Plasmen beobachtet. Bei Polyglobulien verschiedenster Ursache wurde im allgemeinen eine stärkere erythropoietische Wirksamkeit des Plasmas als bei den Polycythämien nachgewiesen.

Bei Versuchen der hochspannungselektrophoretischen Trennung enteweißter aktiver Substrate ergaben sich zwei erythropoietisch aktive Gruppen, wovon die eine bei pH 3,6 keine Wanderung aufweist

und sich unmittelbar anoden- und kathodenwärts von der Auftragsstelle lokalisiert, während die zweite aktive Gruppe relativ weit anodenwärts wandert. Die sich bei pH 3,6 isoelektrisch verhaltende Gruppe weist eine positive Schwefel-, Sulfhydryl-, Peptid- und Polysaccharid-Reaktion auf und verhält sich metachromatisch nach Färbung mit Toluidinblau. Die anodisch wandernde Gruppe zeigt nur einen Teil dieser färberischen Charakteristika. Die Möglichkeit, daß es sich bei der um die Auftragsstelle lokalisierenden Gruppe um ein Glykoproteid oder um ein Mucopolysaccharid handelt, wird diskutiert, wobei insbesondere auf gleichartige Befunde der jüngeren Literatur hingewiesen wird.

Literatur. ¹ CARNOT, P., et C. DEFLENDRE: C. R. Acad. Sci. (Paris) **143**, 384 (1906). — ² BONSDORFF, E., u. E. JALAVISTA: Acta physiol. scand. **16**, 150 (1948). — ³ GRANT, W. C., and W. S. ROOT: Physiol. Rev. **32**, 449 (1952). — ⁴ BERK, L., J. H. BURCHENAL, T. WOOD and W. B. CASTLE: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **69**, 316 (1948). — ⁵ THOMAS, E. D.: Blood **10**, 612 (1955). — ⁶ REISSMAN, K. R.: Blood **5**, 372 (1950). — ⁷ LAFORET, M. T., and E. D. THOMAS: J. biol. Chem. **218**, 595 (1956). — ⁸ GOLDWASSER, E., L. O. JACOBSON, W. FRIED and L. PLZAK: Science **125**, 1085 (1957). — ⁹ DYKE, D. C. VAN, A. N. CONTOPOULOS, B. S. WILLIAMS, M. E. SIMPSON, J. H. LAWRENCE u. H. M. EVANS: Acta haemat. (Basel) **11**, 203 (1954). — ¹⁰ DYKE, D. C. VAN, M. B. SIMPSON, A. M. CONTOPOULOS and H. M. EVANS: Blood **12**, 539 (1957). — ¹¹ JACOBSON, L. O., L. PLZAK, W. FRIED and E. GOLDWASSER: Nature (Lond.) **177**, 1240 (1956). — ¹² MIRAND, E. A., and T. C. PRENTICE: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **96**, 49 (1957). — ¹³ JACOBSON, L. O., E. GOLDWASSER, W. FRIED and L. PLZAK: Nature (Lond.) **179**, 633 (1957). — ¹⁴ MIRAND, E. A., and T. C. PRENTICE: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **96**, 49 (1957). — ¹⁵ FORSELL, J.: Acta med. scand. **161**, 169 (1958). — ¹⁶ JACOBSON, L. O., E. GOLDWASSER, W. FRIED and L. F. PLZAK: Trans. Ass. Amer. Physcs **70**, 305 (1957). — ¹⁷ NAETS, J. P.: Nature (Lond.) **181**, 1134 (1958). — ¹⁸ LINMAN, J. W., and E. H. BETHELL: Blood **12**, 123 (1957). — ¹⁹ ERSLEV, A. J., and P. H. LAVIETES: Blood **9**, 1055 (1954). — ²⁰ BORSOOK, H., A. GRAYBIEL, G. KEIGHLY and E. WINDSOR: Blood **9**, 734 (1954). — ²¹ TEI, YU-TIN: J. Chosen med. Ass. **28**, 1, 173, 179, 185 (1938). — ²² LOESCHKE, H. H.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **3**, 346 (1950). — ²³ GLEY, P.: Bull. Acad. nat. Méd. (Paris) **138**, 435 (1954). — ²⁴ GLEY, P., and J. DELORE: C. R. Soc. Biol. (Paris) **149**, 635 (1955). — ²⁵ LINMAN, J. W., and E. H. BETHELL: Blood **11**, 310 (1956). — ²⁶ SLANN-WHITE JR., W. R., E. A. MIRAND and T. C. PRENTICE: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **96** (1957). — ²⁷ LINMAN, J. W., E. H. BETHELL and M. G. LONG: J. Lab. clin. Med. **51**, 816 (1958). — ²⁸ LINMAN, J. W., and M. G. LONG: Blood **13**, 226 (1958). — ²⁹ CONTOPOULOS, A. N., J. A. LAWRENCE, R. K. MCCOMBS and M. E. SIMPSON: Clin. Res. Proc. **5**, 30 (1957). — ³⁰ CONTOPOULOS, A. N., R. MCCOMBS, J. H. LAWRENCE and M. E. SIMPSON: Blood **12**, 614 (1957). — ³¹ APPELS, A., u. H. M. KELLER: Folia haemat., N. F. **1**, 309 (1957). — ³² LIPP, A., L. HEILMEYER u. R. CLOTTEN: Transactions of the 6th Congr. of the European Society of Haematology, Kopenhagen, 1957. — ³³ GURNEY, C. W., E. GOLDWASSER and C. PAN: J. Lab. clin. Med. **50**, 534 (1957). — ³⁴ TOENNIES, G., and J. J. KOLB: Analyt. Chem. **23**, 823 (1951). — ³⁵ FRENCH, D., D. W. KNAPP and J. H. PAZUR: J. Amer. chem. Soc. **72**, 5150 (1950). — ³⁶ REINDEL, F., and W. HOPPE: Naturwiss. **40**, 221, 245 (1953). — ³⁷ HEILMEYER, L., R. CLOTTEN, I. SANO, A. STURM jr. u. A. LIPP: Klin. Wschr. **1954**, 831. — ³⁸ DECKER, P.: Naturwiss. **38**, 287, 288 (1951). — ³⁹ HODGSON, G., and J. TOHÁ: Blood **9**, 299 (1954). — ⁴⁰ HODGSON, G., J. TOHÁ u. O. QUAPPE: Acta physiol. lat.-amer. **1**, 271 (1951). — ⁴¹ KLINGELHOEFFER, K. O.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **250**, 467 (1948). — ⁴² DÖRING, G. K., u. H. H. LOESCHKE: Pflügers Arch. ges. Physiol. **251**, 220 (1949). — ⁴³ WINKERT, J., A. S. GORDON, S. J. PILIERO and P. T. MEDICI: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **98**, 351 (1958). — ⁴⁴ RAMBACH, W. A., J. A. COPPER and H. L. ALT: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **98**, 602 (1958). — ⁴⁵ J. Lab. clin. Med. **48**, 933 (1956). — Blood **12**, 1101 (1957). — ⁴⁶ STOHLMAN jr., F., and G. BRECHER: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **91**, 1 (1956); **95**, 797 (1957).