

Der Mechanismus der Blutkörperchensenkung

VI. Mitt. Zur beschleunigten Blutkörperchensenkung und Fibrinogenvermehrung durch Lipopolysaccharid-Injektionen bei Versuchstieren

Von G. BRITTINGER, F.-H. KAYSER, G. NASS und G. RUHENSTROTH-BAUER

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München (Direktor: Professor Dr. A. BUTENANDT)

(Z. Naturforsch. **17 b**, 606—609 [1962]; eingegangen am 19. Mai 1962)

1. Lipopolysaccharide aus mehreren Bakterienarten wurden bei Kaninchen auf ihre senkungserzeugenden Eigenschaften getestet; in allen Fällen ergab sich drei Tage nach der Injektion eine beschleunigte Blutkörperchensenkung.

2. Auch Ratten und Meerschweinchen reagieren auf die intraperitoneale Injektion von LPS aus *E. coli* nach drei Tagen mit einer beschleunigten Blutkörperchensenkung.

3. Die senkungserzeugenden und fibrinogenvermehrenden Eigenschaften des LPS aus *E. coli* sind an den Lipoidanteil der Molekeln gebunden, da bei Kaninchen sowohl mit freiem Lipoid A, wie mit an Casein gekoppeltem Lipoid eine beschleunigende Senkung und eine Fibrinogenvermehrung hervorgerufen werden kann.

4. Auf wiederholte LPS-Injektionen in geeigneten Dosen und Zeitabständen reagieren die Kaninchen nicht mehr mit einer beschleunigten Senkung und Fibrinogenvermehrung; die Tiere sind tolerant geworden.

Wie in früheren Arbeiten beschrieben wurde^{1,2}, führt die intravenöse oder intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden aus verschiedenen Bakterien beim Kaninchen nach 2—3 Tagen zu einer beschleunigten Blutkörperchensenkung. Diese gleicht in allen bisher untersuchten Eigenschaften der beschleunigten Senkung des Menschen, namentlich wird auch sie durch das Auftreten bestimmter Plasmafaktoren, der Agglomerine, bedingt. Deshalb kann man die experimentelle Blutkörperchensenkung beim Kaninchen als Modell der beschleunigten Blutkörperchensenkung des Menschen betrachten. Neben der beschleunigten Senkung bewirkt die Injektion der Lipopolysaccharide beim Kaninchen eine Fibrinogenvermehrung im Plasma auf das 2- bis 3-fache des Normalwertes². Der zeitliche Ablauf dieser beiden Wirkungen ist verschieden; daraus geht hervor, daß Senkungsbeschleunigung und Fibrinogenvermehrung nach Lipopolysaccharid-Injektion in keiner direkten Beziehung zueinander stehen.

Im folgenden wird über Versuche berichtet, die das Zustandekommen der beschleunigten Senkung und Fibrinogenvermehrung nach Lipopolysaccharid-Injektionen weiter klären sollten.

Material und Methoden

1. Die senkungserzeugenden Eigenschaften von Lipopolysacchariden wurden bei Kaninchen wie beschrieben² getestet.

2. Bei den Untersuchungen an Ratten wurden 5 bis 8 Monate alte Tiere (BAL) verwendet; bei den Meerschweinchen handelte es sich um ca. 8 Monate alte Tiere. Bei beiden Species wurden verschiedene Lipopolysaccharid-Mengen (s. Ergebnisse) in 1 ml Phosphatpuffer (0,035-m. Na₂HPO₄, 0,004-m. MgCl₂, 0,025-m. KCl, pH 7,0) gelöst und intraperitoneal injiziert. Die Blutgewinnung bei den Ratten geschah aus der Bauchorta, bei den Meerschweinchen durch Herzpunktion.

3. Die Messung der Blutkörperchensenkungs-Geschwindigkeit erfolgte nach der Methode von WESTERGREN³. Eine Beschleunigung über 10 mm in der ersten Stde. wurde als positiv bewertet; die Normalwerte liegen bei 1—2 Millimeter.

4. Die Bestimmung der Fibrinogen-Konzentration im Plasma der Tiere wurde nach der Methode von MARX^{2,4} durchgeführt. Als Normalgrenze wurde auf Grund von Vorversuchen 250 mg-% festgesetzt.

5. Die Erythrozyten-Konzentration im Blut der Versuchstiere wurde mittels eines Hämoskops (Hellige, Freiburg/Brsg.) bestimmt.

6. Die Spaltung des Lipopolysaccharids aus *E. coli* (Hoechst, Op.Nr. 2470) in Lipoid und degradiertes Polysaccharid wurde nach Arbeiten von MORGAN⁵, GOE-

¹ G. RUHENSTROTH-BAUER, G. BRITTINGER, E. GRANZER u. G. NASS, Dtsch. med. Wschr. **85**, 803 [1960].

² G. RUHENSTROTH-BAUER, G. BRITTINGER u. G. NASS, Blut **7**, 193 [1961].

³ A. WESTERGREN, Ergebn. inn. Med. **26**, 577 [1924].

⁴ R. MARX, 5. Sympos. d. Dtsch. Arbeitsgemeinschaft. Blutgerinn.-Forsch. (München), Okt. 1960.

⁵ W. T. J. MORGAN u. W. M. WATKINS, Brit. J. exp. Pathol. **25**, 221 [1944].

BEL⁶, WESTPHAL⁷ und TAKEDA⁸ durchgeführt. Im einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen:

A) Kopplung des Lipopolysaccharids (LPS) an Casein*

90 mg LPS wurden in 18,0 ml Aqua dest. gelöst; dazu wurden 4,5 ml einer 0,1-proz. Caseinlösung gegeben; das Casein war gelöst in 0,1-n. NaOH. Der Ansatz wurde 30 Min. bei 25 °C inkubiert. Danach wurde mit 1-n. und 0,1-n. Essigsäure auf pH 4,6 angesäuert, anschließend 10 Stdn. gegen Aqua dest. dialysiert und dann lyophilisiert.

Ausbeute: 115 mg LPS-Casein-Komplex.

B) Spaltung des LPS-Casein-Komplexes in Lipoid-Casein und degradiertes Polysaccharid

80 mg LPS-Casein-Komplex wurden in 5,0 ml 0,2-n. Essigsäure, die 1% NaCl enthielt, gelöst. Die Lösung wurde 90 Min. im Wasserbad bei 100 °C gehalten und das ausgefallene Lipoid-Casein abzentrifugiert. Der Überstand, der das degradierte Polysaccharid enthielt, wurde 10 Stdn. gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Der abzentrifugierte Niederschlag (das Lipoid-Casein) wurde unter Eiskühlung durch Zusatz von 0,1-n. NaOH in Aqua dest. gelöst und durch Ansäuern erst mit 1-n. und dann mit 0,1-n. Essigsäure auf pH 4,2 wieder ausgefällt und erneut abzentrifugiert. Dieser Niederschlag wurde, wie eben beschrieben, wieder gelöst, 10 Stdn. gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 29 mg Lipoid-Casein, 34 mg degradiertes Polysaccharid.

Nach den Angaben in der Literatur⁸ waren 32 mg Lipoid-Casein und 37 mg degradiertes Polysaccharid zu erwarten gewesen; der Eiweißgehalt des Lipoid-Caseins wurde mit 62% beschrieben⁸. Wir fanden einen N-Gehalt von 11,83%, der nach der Methode CONWAY⁹ bestimmt wurde; das entspricht einem Eiweißgehalt von ca. 72 Prozent.

7. Zur Austestung des LPS-Casein-Komplexes, des Lipoid-Caseins und des degradierten Polysaccharids auf ihre senkungserzeugenden Eigenschaften wurden bestimmte Mengen (s. Ergebnisse) der Substanzen in 5 ml des beschriebenen Phosphatpuffers gelöst und den Kaninchen i.v. injiziert.

8. Lipoid A wurde zur Prüfung auf seine senkungserzeugenden Eigenschaften nach der Vorschrift von LÜDERITZ wie folgt gelöst.

Herstellung der Stammlösung

25 mg Lipoid A aus *E. coli* 08 wurden in 2 ml Pyridin gelöst; diese Lösung wurde in 25,0 ml Aqua dest. unter Rühren eingetropft und anschließend im Rota-

tionsverdampfer bei 35 °C auf 10 ml eingengt. Es wurden erneut 10,0 ml Aqua dest. zugegeben und, wie beschrieben, auf 5 ml eingengt. Diese 5,0 ml Stammlösung waren gelblich opal und geruchlich frei von Pyridin. Es befanden sich also 5 mg Lipoid A in 1 ml H₂O.

Zur Austestung wurden verschiedene Mengen der Stammlösung (s. Ergebnisse) in jeweils 5,0 ml des beschriebenen Phosphatpuffers aufgenommen und den Tieren i.v. injiziert.

Ergebnisse

1. Lipopolysaccharide aus folgenden Bakterienarten wurden auf ihre senkungserzeugenden Eigenschaften beim Kaninchen getestet:

- a) FK 75 (*Salmonella binza*, S-Form),
- b) FK 165 (*Salmonella binza*, R-Form),
- c) FK 25 (*E. coli* 073, S-Form),
- d) Co 086 (*E. coli* 086, S-Form),
- e) Co 08 (*E. coli* 08).

Von jedem Lipopolysaccharid wurden jeweils 2 mg an 2 Kaninchen verabreicht: bei allen Tieren ergab sich 3 Tage nach der LPS-Injektion eine beschleunigte Blutkörperchensenkung.

2. Gruppen von jeweils 3 Ratten erhielten 1, 2, 4 oder 5 mg LPS aus *E. coli* (Hoechst Op.Nr. 2470). Nach 3 Tagen wurde bei den Tieren die Senkung bestimmt. Ratten, die 4 oder 5 mg LPS erhalten hatten, wiesen eine beschleunigte Senkung auf, deren 1-Stundenwerte zwischen 10 und 30 mm lagen.

3. Der unter 2 beschriebene Versuch wurde auch bei Meerschweinchen durchgeführt; 4 der 6 Tiere, die 4 oder 5 mg LPS erhalten hatten, zeigten eine beschleunigte Senkung.

4. Tab. 1 zeigt LPS aus *E. coli* bzw. deren Derivate, die bei Kaninchen auf ihre senkungserzeugenden und Fibrinogen-vermehreren Eigenschaften getestet wurden.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß mit Ausnahme des degradierten Polysaccharids alle LPS-Derivate beim Kaninchen zu einer beschleunigten Senkung und einer Fibrinogenvermehrung führen; jedoch mußten von dem Lipoid A im Vergleich zu den anderen LPS-Derivaten größere Mengen verwendet werden, um eine beschleunigte Senkung und eine Fibrinogenvermehrung hervorzurufen. Außer-

⁶ C. TAL u. W. F. GOEBLE, J. exp. Medicine **92**, 25 [1950].

⁷ O. WESTPHAL u. O. LÜDERITZ, Angew. Chem. **66**, 407 [1954].

* Casein-Hammarsten.

⁸ Y. TAKEDA, N. NIKASAI, M. ARAKI u. T. ODAKA, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **307**, 49 [1957].

⁹ E. J. CONWAY u. E. O'MALLEY, Biochem. J. **36**, 655 [1942].

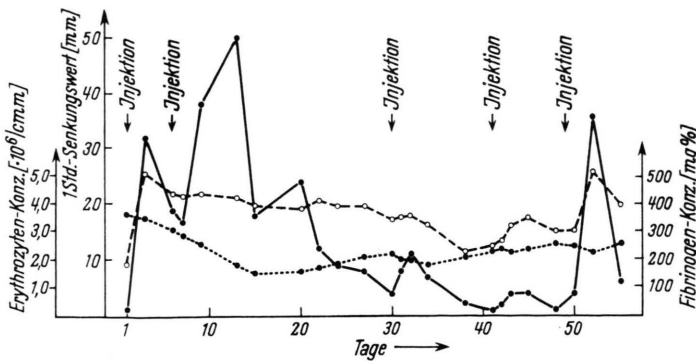


Abb. 1.
Verlauf der Blutkörperchensenkung (●—●—●),
Fibrinogen-Konzentration (○—○—○) und
Erythrozyten-Konzentration (●·····●·····) im
Zitratblut beim Kaninchen während 55 Tagen
nach mehreren i.v.-Injektionen von jeweils
2 mg Lipopolysaccharid aus *E. coli*.

	injizierte Menge/Tier [mg]	Senkung	Fibri- nogen
LPS (Hoechst)	1—2	+	+
LPS-Casein	2	+	+
Lipoid-Casein	2	+	+
degr. Polysacch.	2	—	—
Lipoid A	3—4	+	+

Tab. 1. Senkungserzeugende und fibrinogen-vermehrnde
Wirkung von LPS aus *E. coli* und dessen Bestandteilen.

dem war das Ausmaß der Senkungsbeschleunigung und der Fibrinogenvermehrung nach Lipoid A-Injektion geringer als nach der Verabreichung der anderen Substanzen.

5. In der Literatur wird beschrieben^{10, 11}, daß sich die Fieber- und Leukozytenreaktion nach LPS-Injektionen durch kleine, tägliche LPS-Dosen unterdrücken lassen; die Tiere sind „tolerant“ geworden.

Es wurde nun untersucht, wie sich die beschleunigte Senkung und die Fibrinogenvermehrung nach wiederholten LPS-Gaben beim Kaninchen verhalten: zunächst wurden 5 Tage lang an 4 Kaninchen täglich 0,01 mg LPS (Hoechst Op.Nr. 2470) verabreicht; 2 der Tiere starben während dieser Behandlung. Den anderen beiden Kaninchen wurden nach weiteren 3 Tagen 2 mg LPS injiziert; beide Tiere bekamen trotz der Vorbehandlung eine beschleunigte Senkung. In einer weiteren Versuchsreihe wurden deshalb andere LPS-Dosen und Zeitintervalle zwischen den einzelnen Injektionen verwendet: 10 Kaninchen erhielten 3 Tage nach der ersten LPS-Dosis (2 mg) erneut 2 mg LPS i.v. injiziert. Nach dieser zweiten Injektion starben 3 Tiere. Den restlichen 7 Kaninchen wurde 2 Tage nach dem Abklingen

der Senkung erneut 2 mg LPS injiziert; der Zeitraum bis zur Normalisierung der Senkung nach der zweiten Injektion war bei den verschiedenen Kaninchen unterschiedlich. Während des Versuches wurden bei den Kaninchen die Senkung, die Fibrinogen-Konzentration im Plasma und die Erythrozyten-Konzentration in Abständen von Tagen bestimmt.

Es ergab sich übereinstimmend bei den 7 Tieren, daß sich die Senkung nach der dritten LPS-Injektion höchstens geringfügig beschleunigte; auch die Fibrinogen-Konzentration änderte sich nach der dritten Injektion nicht wesentlich. Abb. 1 zeigt diese Befunde an einem Beispiel; es zeigt zugleich, daß die Fibrinogen-Konzentration nicht immer zur Norm abgefallen sein muß, um nach der dritten Injektion keine wesentliche Beschleunigung der Senkung und Vermehrung des Fibrinogens mehr hervorzurufen.

Spätere LPS-Injektionen können jedoch bei demselben Tier wieder zu Senkungsbeschleunigung und Fibrinogenvermehrung führen (Abb. 1). Abb. 1 ist außerdem ein weiterer Beleg² dafür, daß die Fibrinogen-Konzentration und die Erythrozyten-Konzentration bei den Tieren in keiner direkten Beziehung zu den Senkungswerten steht, da die gleiche Fibrinogen-Konzentration und gleiche Erythrozyten-Konzentration bei demselben Tier von einer starken oder geringen Senkungsbeschleunigung begleitet sein kann.

Diskussion

Unsere Versuche zeigen, daß nicht nur Kaninchen auf die Injektion von 1—2 mg LPS mit einer beschleunigten Senkung reagieren, sondern daß auch

¹⁰ P. B. BEESON, J. exp. Medicine **86**, 29 [1947].

¹¹ G. W. RAFTER, R. D. COLLINS u. W. B. WOOD, Trans. Ass. Amer. Phys. **72**, 323 [1959].

bei Ratten und Meerschweinchen durch LPS-Injektion eine beschleunigte Senkung auszulösen ist. Außerdem wurden inzwischen LPS aus insgesamt 8 Bakterienarten beim Kaninchen auf ihre senkungserzeugenden Eigenschaften getestet; in jedem Fall konnte bei den Tieren am dritten Tag nach der LPS-Injektion eine beschleunigte Senkung festgestellt werden. Es ist also weder die senkungserzeugende Eigenschaft auf LPS aus einer Bakterienart beschränkt, noch ist die Beantwortung einer LPS-Injektion mit einer beschleunigten Senkung nur bei einer Tierspecies zu finden.

Die senkungserzeugenden und fibrinogenvermehrenden Eigenschaften des LPS aus *E. coli* sind an den Lipoidanteil der Molekeln gebunden, da bei Kaninchen sowohl mit dem freien Lipoid A wie mit dem an Casein gekoppelten Lipoid eine beschleunigte Senkung und Fibrinogenvermehrung hervorgerufen werden kann. Es ist bekannt^{7, 12}, daß auch andere Reaktionen auf LPS-Injektion, wie Fieber und Steigerung der natürlichen Resistenz beim Ka-

ninchen durch den Lipoidanteil des LPS ausgelöst werden.

Kaninchen beantworten wiederholte LPS-Injektionen nicht mehr mit Fieber- und Leukozytenreaktionen^{10, 11}; die Tiere sind tolerant geworden. Ebenso treten Senkungsbeschleunigung und Fibrinogenvermehrung bei den Tieren nach mehrmaliger LPS-Verabreichung nicht mehr auf, wenn man bei der LPS-Behandlung geeignete Dosen und Zeiten zwischen den einzelnen Injektionen verwendet.

Nach dem Gesagten scheint es berechtigt, zu den beim Kaninchen durch LPS-Injektion ausgelösten Reaktionen auch die Senkungsbeschleunigung und Fibrinogenvermehrung zu rechnen.

Wir danken Herrn Professor Dr. O. WESTPHAL und Herrn Dr. O. LÜDERITZ (Freiburg/Brsg.) für die Überlassung der Lipopolysaccharide, des Lipoids A und dessen Lösungsvorschrift, Fräulein B. WOLFF für ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, den Farbwerken Hoechst (Frankfurt/M.) und den Behring-Werken (Marburg) für die Unterstützung der Arbeit.

¹² J. G. HOWARD, D. ROWLEY u. A. C. WARDLAW, Nature [London] 179, 314 [1957].