

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Ueber den Nachweis von Saponinen und anderen hämolysch wirkenden Substanzen mit Hilfe der Blutgelatine

Riedl, Erna

[1930]

Nachweis von hämolysch wirkenden Stoffen in Pilzen

Nachweis von hämolytisch wirkenden Stoffen in Pilzen.

Es ist bekannt, dass in einigen Pilzen stark hämolytisch wirkende Substanzen vorkommen z.B. im Knollenblätterpilz. Die Hämolysewirkung wurde schon wiederholt zur Unterscheidung einzelner Pilze herangezogen, wobei man vor allem hoffte eine einfache Unterscheidungsmöglichkeit zwischen giftigen und essbaren Pilzen zu finden.

Die Hämolyseversuche wurden bisher in der Regel so durchgeführt, dass man wässrige kochsalzhaltige Auszüge aus den betreffenden Pilzen herstellte und unter Zusatz von Blut auf Hämolyse prüfte. Die dunkle Farbe der Auszüge und die mit dem Blut häufig auftretenden Fällungen wirkten dabei sehr störend. Zu praktisch brauchbaren Ergebnissen haben diese Versuche bisher noch nicht geführt.

Es schien daher nicht aussichtslos mit Hilfe der Blutgelatine, bei der diese Schwierigkeiten wegfallen besser zum Ziel zu kommen. Diese Methode ist zweifellos empfindlicher und hat auch den Vorteil, dass nur kleine Mengen Untersuchungsmaterial notwendig sind.

Zu den nachstehenden Versuchen wurden hauptsächlich getrocknete Schwämme verwendet. Eine Ausnahme war *Hypholoma fasciculare* von dem auch frische Exemplare vorlagen

Es zeigte sich dabei, dass die getrockneten Exemplare des Pilzes schwächer hämolytisch wirkten, als die ~~frischen~~ frischen. Aus einer Arbeit von Friedberger und Brossa geht hervor, dass die Pilzhämolytine sich gegen verschiedene Blutsorten auch verschieden verhalten. Bei meinen Versuchen habe ich ausschließlich defibriniertes Rinderblut verwendet.

Um gleichzeitig eine Lokalisierung der Pilzhämolytine durchführen zu können wurden aus verschiedenen Teilen der Pilze Schnitte hergestellt und diese in ungefähr 3%iger Blutgelatine eingelegt. Die verwendete Gelatine war 8%ig und hatte eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 7.4$. Die Präparate wurden gleichzeitig mit einer Schale voll Wasser auf Kühlplatten gebracht und mit einer Glasglocke überdeckt, *Um* sie in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre zu halten, denn erst nach vielen Stunden konnte der Auftritt der hämolytischen Höhe beobachtet werden. Es ergaben sich dabei folgende Resultate.

Clavaria aurea Goldgelber Korallenpilz	+	⊙	
Clavaria flava Gelblicher Korallenpilz	+	⊙	auf 24 Nadeln Pflanz Jämlype
Clavaria botrytis rötlicher Korallenpilz		⊙	
Sparassis crispa Krause Glucke	+	⊙	auf 24 Nadeln Pflanz Jämlype
Calocera viscosa Klebriger Hörnling	+		Küchle Jämlype
Polyperus ovinus Schafeuter	+		Pflanz Jämlype
Polyperus confluens Semmelpilz	+	⊙	Küchle Jämlype
Pholiota mutabilis Stockschwämmchen	+		auf 1 Nadel Küchle Jämlype
Armillaria mellea Hallimasch	+		Pflanz Jämlype
Lepiota procera Parasolschwamm	+		Pflanz Jämlype
Lactaria deliciosa Echter Reizher	+		Pflanz Jämlype
Lactaria vellerea wolliger Milchling			
Amanita muscaria Fliegenpilz	+		Pflanz Jämlype in den Sammler
Hypholoma fasciculare büscheliger Schwefelkopf	+		Küchle Jämlype
Boletus bovinus Kuhpilz			Pflanz
Russula alutacea Ledertäubling			(Pflanz)
Paxillus atrotomentosus Sammfuss Krämpling			
Boletus edulis Steinpilz			auf 48 Nadeln Pflanz Jämlype in den Sammler
Boletus luteus Butterpilz			
Boletus scaber Birkenpilz		⊙	
Psalliota arvensis Schafchampignon	+		Küchle Jämlype
Psalliota campestris Wiesenchampignon	+	⊙	Pflanz Jämlype
Boletus rufus Rothhäufchen			

Tricholoma terreus Erdritterling
 Tricholoma rutilans rötlicher
 Ritterpilz
 Tricholoma personatum lilastidiger
 Ritterpilz
 Russula emetica Speiteufel
 Hydnium imbricatum Habichtspilz
 Scleroderma vulgare Kartoffelbovist
 Russula foetens Stinktaubling
 Amanitopsis vaginata Scheidenpilz
 Gomphidius glutinosus Kuhmaul
 Boletus suptmentosus Ziegenlippe
 Lactarius volemus Brätling
 Cantharellus cibarius Pfifferling
 Polyporus perennis Dauer-Porling
 Riesenrötling
 Weisser Baumschwamm
 Grauer Baumschwamm
 Panterwulstling
 Rhodosporus Prunulus Pflaumen-
 räsling
 Paxillus involutus Kahler
 Krämpfling
 Lauchschwindling
 Hydnium reparedum Rehpilz
 Speisetäubling
 Inoloma traganus Lila Dickfuß

+	⊙	<i>hüblige Gänsele Rogge, Linsen & Hirse</i>
	⊙	
+	⊙	<i>hüblige Gänsele</i>
+		<i>Speise Gänsele</i>
<i>Hydn</i>	⊙	
	⊙	
+		
<i>Hydn</i>	⊙	
<i>(Hydn)</i>	⊙	
	⊙	
+		<i>hüblige Gänsele</i>
<i>Hydn</i>		
+	⊙	<i>Speise Gänsele</i>
+	⊙	
+	⊙	
(+)	⊙	
	⊙	

Lycoperdon gemmatum	Warzen Stäubling		
Hygrophorus ceracens	Wachsgelber Säftling	(+)	⊙
Lactaria torminosa	Giftreiz er		
Maronenröhrling			⊙
Gebrechlicher Täubling		+	

Aus der Tabelle ergibt sich, dass bei viel mehr Pilzen Hämolyse eintrat als man erwartet hatte. In den meisten Fällen tritt sie aber erst nach 12 - 24 Stunden auf und zwar ist in der Zeitdauer kein Unterschied zwischen giftigen und essbaren Pilzen zu bemerken. Die kürzeste von mir beobachtete Zeit bis zur Hämolyse auftritt hatte sogar ein essbarer Schwamm und zwar *Pholiota mutabilis* mit einer Stunde,

Auch in der Grösse der Höfe die nach Ablauf einer bestimmten Zeit festgestellt wurde ist kein Unterschied zu sehen. Bei jungen Schwämmen trat die Hämolyse früher auf als bei alten, doch wurde der Umfang des Hofes bei den alten Schwämmen bedeutend grösser die Methode der Blutgelatine ermöglichte eine Lokalisierung der Pilzhämolyse. Die Hämolyse tritt nämlich bei den meisten Pilzen zuerst und am deutlichsten in den Sporenträgern

(Lamellen, Röhrechen, Stacheln) auf. Dies liess sich auch bei *Amanita muscaria* beobachten, der in keinem Teil mit Ausnahme der Lamellen (und da auch nur schwach) Hämolyse zeigte, Speziell wurde von diesem Pilz die Oberhaut untersucht, doch auch sie wirkte nicht hämolytisch. Aus den vorliegenden Versuchen ergibt sich, dass die Giftigkeit der Schwämme und die Pilzhämolyse in keinem nachweisbaren Zusammenhang stehen. Bei der Untersuchung zeigten einige Schwämme eigentümliche in der Blutgelatine noch nicht beobachtete Ringbildungen, die manchmal gleichzeitig mit den Hämolysehöfen, manchmal für sich allein auftraten.

Der Schwammschnitt ist von einer verdichteten Schichte umgeben in welcher die Blutkörperchen intensiver gefärbt sind, und dichter beieinander liegen, (ohne aber die für die Agglutination charakteristische Zusammenballung zu zeigen). Sie liegen auch in einer anderen Höhe als die unveränderten Blutkörperchen ausserhalb der Verdichtungszone. An der Berührungzone entsteht (vielleicht durch den Höhenunterschied) ein halb durchsichtiger Ring, in dem sich vereinzelte Blutkörperchen befinden.

In der Verdichtungszone befinden sich bei einigen Pilzen ausserdem noch ringförmig (konzentrisch) gelagerte sekundäre Verdichtungen, doch sind die Blut-

körperchen dieser Zone alle in gleicher Höhe.

Um die Entstehung dieser Ringbildungen erklären zu können, wurden folgende Versuche gemacht:

I.) 1. Doppelte Gelatinschichte

Blutgelatine wurde auf 2 Objektträger gleichmässig aufgestrichen und auf der Kühlplatte halb erstarren gelassen. Dann wurde ein Schwammschnitt auf den einen Objektträger gelegt und mit dem anderen überdeckt. Nach 48 Stunden trat Ausbildung der Verdichtungszone ein.

2. Einfache Gelatinschichte.

Blutgelatine wurde auf einem Objektträger gleichmässig verteilt und auf der Kühlplatte halb erstarren gelassen. Dann wurde ein Schwammschnitt darauf gelegt und mit einem Deckglas überdeckt. Die Ausbildung der Verdichtungszone erfolgte nach ungefähr 48 Stunden.

II.) Schwammauzüge.

a) 0.5g goldgelber Korallenpilz wurde mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung ungefähr 12 Stunden unter öfterem Schütteln extrahiert. Dann wurde das Filtrat mit der gleichen Menge einer Blutaufschwemmung versetzt; Die Farbe schlägt schnell in Braun um.

b) 0.5g Erdritterling wurden mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung ungefähr 12 Stunden unter öfterem Schütteln

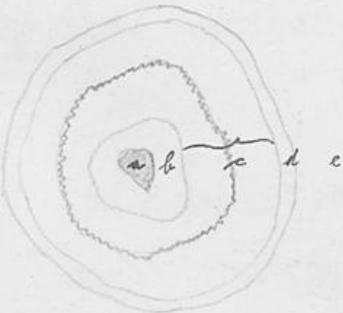
extrahiert . Das Filtrat wurde mit der gleichen Menge Blutaufschwemmung versetzt . Die Farbe schlägt in braun um und nach ungefähr 3 Stunden tritt Hämolyse ein .

III.) Schwammschnitte wurden in eine Blutlösung (ohne Gelatinezusatz) eingelegt. Nach kurzer Zeit während der das Präparat unter dem Mikroskop nicht verschoben werden darf , zeigt sich folgendes Bild:



Erdritterling.

a Schnitt, b Hämolytischer Hof ,
c unveränderte Blutschichte, d verdichtete Zone, e unveränderte Blutschichte .



Lilastidiger Ritterpilz.

a Schnitt, b hämolytischer Hof, c verdichtete Zone (Blutkörperchen sind stärker gefärbt, sie liegen alle in einer Höhe, sind aber zwei mal ringförmig in verschiedener Dichte angeordnet.)
d halbdurchsichtige Zone (durch das Zusammen-

treffen von c und e.) e Blutkörperchen liegen in einer anderen Höhe als bei c , sie sind aber sonst normal.

IV.) Es wurden Schnitte durch Stoffe gemacht, bei denen eine ähnliche Ringbildung z.B. durch agglutinierend wirkende Substanzen erwartet wurde.

Semen Ricinus ----- zeigte nichts.

Gerbstoffdrogen Radix Tormentilla zeigten nichts .
Cortex Quercus

bestrahltes Cholesterin + Blutgelatine---nach 3 Stunden
starke Hämolyse.

bestrahltes Cholesterin + Reisstärkegelatine ----- nichts

V.) Die Blutkörperchen in der Gelatine wurden durch
Stärke ersetzt.

Schwammschnitt + Reisstärkegelatine ----- Verdichtungsring
pH = 7.4 wie in der Blut-
gelatine .

(Eine Stärkekörnerfreie Zone , Verdichtungszone , eine
Zone in der die Stärkekörner scheinbar in einer anderen
Höhe liegen , dann normale Zone .)

Schwammschnitt + Kartoffelstärkegelatine ----- Verdichtungsring
(Eine ganz schmale Zone ohne Stärkekörner , Verdichtungs -
zone , zweiter Stärkekörnerfreier Ring , aussen normal.)

Um etwas über die Eigenschaften der ring -
bildenden Substanzen zu erfahren wurden nachstehende Ver-
suche unternommen .

VI. Dialysiersversuche ; Schnitte durch Schwämme wurden
verschieden lange in Wasser , Alkohol und Aether gelegt,
getrocknet, dann in Blut-(oder Reisgelatine)eingelegt,
um zu sehen ob sich die wirksamen Substanzen der Pilze
dadurch herauslösen lassen .

A Schnitte nach 3 Stunden Beobachtung

8 Std. ausgelaugt	H ₂ O	Alkohol	Äther
Blutgelatine	Hämolyse	Hämolyse	Hämolyse
Reisstärkegelatine	Stärkekörnerfreier Hof	Ringbildung	Ringbildung
26 Std. ausgelaugt	H ₂ O	Alkohol	Äther
Blutgelatine	-	Hämolyse	Hämolyse
Reisstärkegelatine	-	Ringbildung	Ringbildung

B Schnitte nach 24 Stunden beobachtet:

8 Std. ausgelaugt	H ₂ O	Alkohol	Äther
Blutgelatine	⊙	⊙	⊙
Reisstärkegelatine	⊙	⊙	⊙
26 Std. ausgelaugt	H ₂ O	Alkohol	Äther
Blutgelatine	⊙	⊙	⊙
Reisstärkegelatine	⊙	⊙	⊙

Die Ringe treten in Reisstärkegelatine früher auf und werden grösser als in Blutgelatine. Die Ringe der Schwammschnitte, welche man in Aether gelegt hatte, werden bedeutend grösser als die von den Schwämmen, welche man in Wasser legte aber auch grösser als von Schwämmen, die in Alkohol lagen und von frischen Schwämmen.

VII. Die Ringe bildende Substanz wird durch Erhitzen zerstört. Der bei 85° während zwei Stunden getrocknete Schwamm (Erdritterling) gibt mit Reisstärke- und Blutgelatine eine Ringbildung.

Der bei 100° während 2 Stunden getrocknete Schwamm gibt weder mit Blut noch mit Reisstärkegelatine irgend welche Reaktion.

VIII. Die Verdichtungsringe hatten eine gewisse Ähnlichkeit mit den sogenannten Liesegang'schen Ringen. Um eine Diffusion festzustellen wurden folgende Versuche unternommen.

1.) Feste Blutgelatine wurde im Reagenzglas mit 10%igem Schwammauszug überschichtet, doch zeigte sich über Nacht keine Tiefenwirkung.

2.) Feste Reisstärkegelatine wurde im Reagenzglas mit einem 10%igen Schwammauszug überschichtet. Es bildete sich an der Grenzfläche eine durchsichtige Zone doch erfolgte keine weitere Tiefenwirkung.

- IX. Ein kleines Stück eines Glycerin Suppositoriums wurde am Objektträger erhitzt ; bei 37° ist die Masse geschmolzen, dann wurde Reisstärke damit vermischt auf 75° abgekühlt, der Schwammschnitt eingelegt, doch zeigte sich über Nacht keinerlei Reaktion .
- X. Opodeldock wurde am Wasserbade erhitzt, mit Stärke vermischt , dann ein Schwammschnitt eingelegt. Die Masse vertrocknet aber sehr schnell, bevor noch der Schwammschnitt wirken könnte.
- XI. Kieselsäuregallerte: Die Masse wurde nach der Vorschrift von Ostwald hergestellt, doch nicht stehen gelassen bis sie zur Gallerte erstarrt, sondern noch im flüssigen Zustand mit Reisstärke vermischt, auf den Objektträger gebracht und mit den Schnitten belegt. Es zeigte sich auch über Nacht nichts.
- XII. Agar: (Die Masse ist gut) .
0.5g Agar wird in 50 ccm physiologischer Kochsalz - lösung in der Hitze gelöst, auskühlen gelassen und mit Blut versetzt . Die eingelegten Schwammschnitte zeigten Hämolyse , doch keine Ringbildung .
- XIII. Schnitte von Erdritterling wurden zwei Stunden in Xylol gekocht; im Blutgelatine eingelegt, zeigte sich nach ungefähr 24 Stunden Hämolyse , doch keine Ringbildung.

- XIV. a) Es wurde Gelatine mit Methylblau gefärbt , und
b) Gelatine mit saurer Fuchsinlösung gefärbt.

Bei den beiden Präparaten zeigte sich um den Schwamm-
schnitt herum eine Farbstofffreie Zone , in einiger
Entfernung vom Schnitt eine Ringzone, die makroskopisch
wie eine Verdichtung aussieht, mikroskopisch aber
nicht erkennbar war.

- XV. Ein Schwammchnitt wurde auf den Objektträger gelegt,
mit Gelatine überschichtet und auf die Kühlplatte ge-
bracht. Die Gelatine wird fest, doch bildet sich über
dem Schwamm ein Flüssigkeitstropfen aus.

Z u s a m m e n f a s s u n g :

- I, Die Giftigkeit der Schwämme lässt sich auf Grund des
hämolytischen Hofes nicht feststellen.
- II. Die eigentümliche Ringbildung wird durch Verflüssigung
der Gelatine hervorgerufen. Die verflüssigenden Stoffe
in den Schwämmen sind thermolabil und werden durch
Erhitzen auf 100° unwirksam gemacht . Auch durch
Hochen mit Xylol werden sie zerstört , während die
Pilzhämolytine dadurch nicht ihre Wirksamkeit ver-
lieren .

Literatur :

- Friedberger u. Brossa: XV Zeitschr. f. Immunitätsforschung
B. Galli Vallerio, u. M. Bornard XXV, Zeitschr. f. Immunitäts-
forschung