

# Ueber die Entgiftung der Toxine durch die Superoxyde, sowie thierische und pflanzliche Oxydasen.

Von  
**N. Sieber.**

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des Institutes für experimentelle Medicin in Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 29. Mai 1901.)

---

Anlässlich meiner gemeinschaftlich mit Prof. M. Nencki und Frau Dr. Schumoff-Simanowski ausgeführten Untersuchung über die Entgiftung der Toxine durch die Verdauungssäfte<sup>1)</sup> haben wir gefunden, dass allerdings einzelne Toxine wie z. B. das Diphtherie- und Tetanotoxin durch die Verdauungssäfte sehr energisch zerstört werden, sodass ihre Unschädlichkeit bei Verabreichung per os dadurch vollkommen erklärt wird. Andererseits fanden wir bei der Fortsetzung unserer Untersuchung,<sup>2)</sup> dass andere Toxine, wie z. B. das Abrin, von keinem der Verdauungssäfte weder einzeln, noch im Gemisch in dem Maasse verändert werden, dass dadurch ihre Unschädlichkeit bei Verabreichung per os erklärt werden könnte. Es müssen also noch andere Factoren sein, welche im Verdauungscanal die Entgiftung des Abrins bewirken. Um der Frage näher zu treten, habe ich daher die Einwirkung solcher oxydirender Agentien, welche mit den Oxydationsvorgängen im Organismus Analogien haben, auf die Toxine untersucht. Ich wählte dazu das Wasserstoffsuperoxyd und Calciumsuperoxyd. Dieses letztere Salz, dessen Spaltung in Kalk und

---

1) Nencki, Sieber und Schumoff-Simanowski. Centrälb. für Bacter., erste Abtheil., Bd. 23, S. 840.

2) S. Dzierzowski und N. Sieber. Archives des Sciences biologiques, Bd. VIII.

Sauerstoff im Verdauungstractus und den Geweben schon von M. Nencki und J. Zaleski<sup>1)</sup> constatirt wurde, war für meinen Zweck ganz besonders geeignet. Das Calciumsuperoxyd =  $\text{CaO}_2$ , durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Kalkwasser dargestellt, ist ein weisses krystallinisches, in Wasser unlösliches Pulver, das 4 Moleküle Krystallwasser enthält. Bei Zimmertemperatur trocken aufbewahrt, hält es sich lange unverändert. Bei der Bruttemperatur dagegen mit Wasser angerührt, zersetzt es sich, wie ich gefunden habe, allmählich unter Entwicklung von Sauerstoff. Als in einem Versuche 5 g Calciumsuperoxyd mit 100 ccm. Wasser übergossen und bei  $37^\circ$  in einem mit Ableitungsröhrchen versehenen Kölbchen aufgestellt wurden, begann schon nach etwa einer viertel bis halben Stunde eine lebhafte Gasentwicklung. Am nächsten Tage, circa 18 Stunden später, wurde eine Probe des entweichenden Gases über Quecksilber aufgefangen und die quantitative Bestimmung ergab, dass das Gas aus 48 Volumprocent Sauerstoff und 52 Volumprocent Stickstoff — von der eingeschlossenen Luft herrührend — bestand.

Lässt man nun Diphtherietoxin-, Tetanotoxin- oder Abrinlösungen vom bekannten Giftwerthe (es sind die 3 Toxine, mit denen ich bis jetzt experimentirte) mit  $\text{CaO}_2$  bei Bruttemperatur stehen, so werden in kurzer Zeit diese 3 Toxine vollkommen entgiftet. So wurde beispielsweise vom Abrin die für Meerschweinchen 20fach tödtliche Dose durch 0,5 g schon in 10 Minuten entgiftet. In anderen Versuchen wurden 5 ccm. Abrinlösung, wovon 0,001 ccm. für Meerschweinchen einfach tödtliche Dose war, durch 0,5 g  $\text{CaO}_2$  innerhalb vier Stunden entgiftet. Ebenso wurden 5,0 ccm. Diphtherie- resp. Tetanotoxinlösung, die 1000fach tödtliche Dose repräsentirend, durch 0,5 g Gorit innerhalb einiger Stunden entgiftet. Kontrollversuche mit gleichen Mengen Kalkhydrat zeigten, dass das letztere den Toxinen gegenüber unvergleichlich weniger wirksam war. Wasserstoffsuperoxyd war insofern für

---

1) Nencki und Zaleski. Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 487.

meine Versuche ungeeignet, als es für die Thiere selbst bei subcutaner Injection giftig ist. Ich benutzte eine 2%ige Lösung, wovon 1 ccm. = 0,02 g  $H_2O_2$ , Meerschweinchen subcutan injicirt, eine diffuse, harte Schwellung und Entzündung des Unterhautzellgewebes verursachte. Erst die halbe Dose davon, nämlich 0,5 ccm. = 0,01%  $H_2O_2$ , wurde von den Thieren ohne merklichen Schaden vertragen. Durch 0,5 ccm. dieser  $H_2O_2$ -Lösung wurden 10—100fach tödtliche Abrindosen in 10—15 Minuten, vom Diphtherie- und Tetanotoxin sogar 600fach tödtliche Dosen nach wenigen Stunden entgiftet. Die energische Zerstörung der Toxine durch diese Oxydationsmittel war für mich eine Aufforderung, auch die Wirkung der in der letzten Zeit so eingehend und vielseitig von vielen Autoren wie z. B. von Schönbein, Traube, Pflüger, Schmiedeberg, Jaquet, Salkowski, Spitzer, Medwedeff, Abelous und Biarnès, Bertrand, Bourquelot und viele Anderen mehr untersuchten pflanzlichen und thierischen Oxydasen auf die Toxine zu prüfen.

Nach den Untersuchungen der meisten Autoren ist die Wirkung dieser Oxydasen unabhängig von Lebensprocessen der Zelle. Nach Abelous und Biarnès<sup>1)</sup> wird die oxydirende Eigenschaft dieser Körper durch Erhitzen auf 70° vernichtet. Die Oxydation, welche durch diese Substanzen verursacht wird, ist mit Sauerstoffabsorbtion und  $CO_2$ -Ausscheidung verbunden. Pepsin, Papaiotin verdauen die Oxydasen nicht. Die Oxydasen gehen nicht durch Pergamentscheidewand hindurch. Als Reagentien, durch welche die Anwesenheit der Oxydasen bewiesen wird, sind: 1. Guajactinctur, 2. Reactiv von Röhmann und Spitzer (Paraphenylendiamin,  $\alpha$ -Naphtol und Soda), 3. ein Reactiv, bestehend aus wässeriger Lösung 1‰ des Metatoluidins und Paraphenylendiamins in alkalischer Lösung und andere mehr. In meinen Versuchen bediente ich mich hauptsächlich der Guajactinctur.

Verschiedene Organe des gleichen Thieres, sowie Organe von verschiedenen Thieren enthalten diese Oxydasen in ver-

---

<sup>1)</sup> Abelous et Biarnès, Comp. rend. de la Société de Biologie, 1896, 1897 und 1898.

schiedenen Quantitäten. Das Gewebe eines jungen Individuums oxydirt viel intensiver als das Gewebe eines alten. Da nach Abelous et Biarnès die Globulinoxidasen durch reines Wasser nicht extrahirbar sind, so schlagen sie dafür vor, die Lösungen von Neutralsalzen als wie: 10%iges ClNa, 2%iges Fluornatrium und 8%iges salpetersaures Kali. Slowzow<sup>1)</sup> hat vorgeschlagen, 6%ige Salmiaklösung zum Ausziehen der Oxydase aus der Parotis vom Hunde zu verwenden. Bei meinen Versuchen verwendete ich die Oxydasen aus Milz und Fibrin aus Kalbsblut und der Parotis vom Hunde. Fibrin aus Pferdeblut erwachsener Thiere, wie schon Abelous und Biarnès angeben und ich bestätigt gefunden habe, enthält keine Oxydase. Dagegen erwies sich Fibrin aus dem Blute gegen Diphtherie hoch immunisirter Pferde als sehr reich an Oxydase und auch sehr wirksam gegen die Toxine. Ich komme weiter unten hierauf zurück. Eine pflanzliche Oxydase habe ich aus der Schwarzwurzel dargestellt.

Die Versuche mit den Oxydasen haben nun ergeben, dass sie sehr energisch zerstörend auf das Diphtherie- und Tetanotoxin einwirken. Dagegen war die Entgiftung des Abrins nur eine sehr geringe. Beispielsweise zerstörte 1,0 ccm. nach der im experimentellen Theil angegebenen Vorschrift dargestellter Emulsion aus der Milz, der Parotis, dem Kalbsfibrin die 100—600fache tödtliche Dose des Diphtherie-, 100—200fache des Tetanotoxins, bei Bruttemperatur in wenigen Stunden.

In den meisten meiner Versuche habe ich zwar das Gemisch von Toxin und Oxydase, bevor es den Meerschweinchen injicirt wurde, mehrere bis 24 Stunden im Thermostaten stehen gelassen. Ich habe aber gesehen, dass, wenn das Gemisch von Toxin und Oxydase sofort den Thieren injicirt wurde, auch dann die Entgiftung der Toxine nicht ausblieb. Ich injicirte auch Meerschweinchen und Kaninchen in die eine Körperhälfte die 10—20fache tödtliche Dose des Toxins und sofort darauf in die andere die Oxydase, auch in diesen Versuchen blieben die Thiere am Leben.

---

1) Slowzow. Dissertation, russisch. J. 1900.

Zu höchst interessanten Resultaten führten die Versuche mit dem Fibrin normaler und gegen die Diphtherie immunisirter Pferde. Während das Fibrin der ersteren keine direkt Guajactinctur bläuende Oxydase enthält, sondern erst nach Zusatz von Wasserstoffsperoxyd bläuende, sogenannte indirekte Oxydase enthält — Linossier's,<sup>1)</sup> ferments oxydants —, erhielt ich bei gleicher Behandlung aus dem Fibrin immunisirter Pferde Extracte, die Guajactinctur sofort intensiv bläuten und auf die Toxine, ebenso wie die Milz oder Parotisextracte vernichtend wirkten. Allgemein war die Oxydasewirkung am intensivsten bei den frisch bereiteten Extracten. Nach einiger Zeit lässt die Wirkung nach. Bemerkenswerth ist es, dass bei Bruttemperatur die Oxydasen länger als bei niedriger Temperatur haltbar sind. Selbstverständlich bei Ausschluss der Fäulniss, wodurch die Oxydasen, ähnlich wie durch höhere Temperaturen, stärkere Säuren und Alkalien, zerstört werden.

### Experimenteller Theil.

Zu den Versuchen mit Calciumsperoxyd benutzte ich das von der chemischen Fabrik von Heyden Nachfolger in Dresden unter dem Namen «Gorit» käufliche Präparat. Das krystallwasserhaltige Salz, das 4 Moleküle Krystallwasser enthält, sollte, entsprechend der Zersetzungsgleichung  $\text{CaO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{Ca(OH)}_2 + \text{O}$  für je 1 g des Salzes 77 cem. Sauerstoff, auf 0° und 760 mm. Barometerstand bezogen, liefern. Das käufliche Präparat enthielt weniger Krystallwasser und ergab, mit Jod und unterschwefligsaurem Natron titrirt, durchschnittlich 90 cem. Sauerstoff für 1,0 g des Calciumsperoxyds. Je ein halbes Gramm des  $\text{CaO}_2$  wurde mit der Toxinlösung, die 10facher bis 1000facher tödtlicher Dose entsprach, vermischt und im Thermostaten 10 Minuten bis 24 Stunden stehen gelassen. Da, wo die Giftdose klein war, wurde sie mit Wasser verdünnt, sodass das Volumen der Flüssigkeit 2—5 cem. betrug. Nach Verlauf der bestimmten Zeit wurde die Emulsion mit

1) Linossier, Comp. rend. de la Soc. de Biologie, 1898, p. 373.

etwas Wasser zu einem dünnen Brei angerührt und einem Meerschweinchen subcutan eingespritzt. An der Injectionsstelle entstanden immer subcutane Verhärtungen, von dem nicht gelösten Kalk herrührend, denn selbst in Fällen, wo die Thiere nicht die geringsten specifischen Krankheitserscheinungen zeigten und gleich in den ersten Tagen nach der Injection ihr Körpergewicht zugenommen hatte, waren die Verhärtungen an den Injectionsstellen immer vorhanden.

Wie man aus den nachfolgenden Tabellen ersieht, haben 0,5 g des Calciumsuperoxyds sowohl das Abrin wie das Diphtherie- und Tetanotoxin, auch in den stärksten Giftdosen, mit denen ich experimentirte, nach 24 stündiger, auch kürzerer Einwirkungszeit entgiftet. Wahrscheinlich ist die entgiftende Wirkung noch viel grösser und in meinen späteren Versuchen behalte ich mir vor, die Grenzwirkung des Calciumsuperoxyds zu ermitteln. Die erhaltenen Resultate sind ohne weitere Erklärung aus den nachfolgenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle I.  
Einwirkung des Calciumsuperoxyds auf Abrin.  
Tödliche Dose Abrin = 0,001 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge des Calciumsuperoxyds	Einwirkungsdauer des Calciumsuperoxyds auf Abrin vor der Injection	Gewicht des Meerschweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	50 fache	0,5 g	15 St.	350 g	390 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	100 »	0,5 »	20 »	530 »	580 »	
3	200 »	0,5 »	20 »	540 »	570 »	
4	200 »	0,25 »	5 »	370 »	395 »	
5	500 »	0,5 »	4 »	410 »	480 »	
6	500 »	0,25 »	4 »	585 »	630 »	
7	1000 »	0,5 »	4 »	420 »	520 »	
8	1000 »	0,5 »	4 »	320 »	—	Am 5. Tage nach der Injection gestorben an Lungenentzünd.
9	1000 »	0,5 »	4 »	305 »	420 »	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
10	2000 »	0,5 »	4 »	600 »	610 »	
11	3000 »	0,5 »	5 »	400 »	410 »	
12	5000 »	0,5 »	5 »	360 »	380 »	

Tabelle II.

Einwirkung des Calciumsuperoxyds auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des Diphtherietoxins = 0,005 cem.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftlosen	Menge des Calciumsuperoxyds	Einwirkungsdauer des Calciumsuperoxyds auf Diphtherietoxin vor der Injection	Gewicht des Meerschweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	20fache	0,5 g	15 St.	440 g	480 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	100 »	0,5 »	20 »	450 »	490 »	
3	200 »	0,5 »	4 »	365 »	420 »	
4	400 »	0,5 »	4 »	560 »	600 »	
5	600 »	0,5 »	4 »	270 »	310 »	
6	1000 »	0,5 »	4 »	400 »	420 »	

Tabelle III.

Einwirkung des Calciumsuperoxyds auf Tetanotoxin.  
Tödliche Dose des Tetanotoxins = 0,005 cem.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftlosen	Menge des Calciumsuperoxyds	Einwirkungsdauer des Calciumsuperoxyds auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meerschweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	20fache	0,5 g	20 St.	380 g	420 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	50 »	0,5 »	20 »	400 »	460 »	
3	100 »	0,5 »	5 »	350 »	390 »	
4	200 »	0,5 »	4 »	300 »	340 »	
5	400 »	0,5 »	4 »	240 »	270 »	
6	600 »	0,5 »	4 »	415 »	450 »	
7	1000 »	0,5 »	4 »	430 »	450 »	

Ich theile hier gleich die Resultate der Versuche mit den Toxinen und Wasserstoffsuperoxyd mit. Wie aus den Tabellen ersichtlich, sind sie viel weniger günstig, als wie mit dem Calciumsuperoxyd und bei Anwendung grösserer Mengen von  $H_2O_2$  waren sie noch schlechter.

Tabelle IV.

Einwirkung des Wasserstoffsperoxyds auf Abrin.  
Tödliche Dose des Abrins = 0,001 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge des Wasserstoff-speroxyds	Ein-wirkungs-dauer des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Abrin vor der Injection	Gewicht des Meer-schweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	50fache	0,5 ccm.	24 St.	385 g	402 g	Am Leben.
2	50 »	1 »	24 »	375 »	400 »	» »
3	100 »	1 »	24 »	365 »	—	Am 2. Tage gestorben.
4	100 »	0,5 »	4 St. 30 Min.	365 »	295 g	Ist am Leben geblieben.
5	100 »	1 »	24 St.	470 »	495 »	Gesund geworden.
6	100 »	0,5 »	24 »	440 »	465 »	» »
7	200 »	1 »	24 »	415 »	—	Am 2. Tage gestorben.
8	500 »	1 »	24 »	395 »	315 g	» 4. » »
9	500 »	1 »	3 × 24 St	435 »	340 »	» 8. » »
10	1000 »	1 »	4 × 24 »	285 »	330 »	Ohne Reaction am Leben geblieben.
11	2000 »	0,5 »	24 St. 30 Min.	450 »	—	Am 2. Tage gestorben.

Tabelle V.

Einwirkung des Wasserstoffsperoxyds auf Tetanotoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Tetanotoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge des Wasserstoff-speroxyds	Ein-wirkungs-dauer des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meer-schweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	0,5 ccm.	24 St.	385 g	430 g	Am Leben geblieben.
2	20 »	0,5 »	24 »	465 »	495 »	» » »
3	100 »	0,5 »	3 × 24 St.	525 »	595 »	» » »
4	100 »	0,5 »	24 St.	370 »	450 »	» » »
5	200 »	0,5 »	3 × 24 St.	380 »	460 »	» » »
6	400 »	0,5 »	24 St.	370 »	460 »	» » »
7	600 »	0,5 »	24 »	360 »	300 »	Gestorben.
8	1000 »	0,5 »	24 »	380 g	—	Gestorben am 2. Tage.
9	10 »	0,5 »	15 Min.	430 »	450 g	Am Leben geblieben.
10	20 »	0,5 »	15 »	555 »	600 »	» » »

Tabelle VI.

Einwirkung des Wasserstoffsperoxyds auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Diphtherietoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge des Wasserstoff-speroxyds	Ein-wirkungs-dauer des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf Diphtherie-toxin vor der Injection	Gewicht des Meer-schwein-chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	0,5 ccm.	24 St.	355 g	370 g	Gesund.
2	20 »	0,5 »	24 »	370 »	410 »	»
3	100 »	1 »	2 × 24 St.	400 »	430 »	Infiltrat. Gesund.
4	100 »	0,5 »	24 St.	395 »	420 »	Gesund.
5	200 »	0,5 »	24 »	430 »	450 »	»
6	400 »	1 »	24 »	450 »	470 »	Infiltrat. Gesund.
7	400 »	0,5 »	24 »	480 »	500 »	Gesund.
8	600 »	0,5 »	24 »	360 »	395 »	Infiltrat. Gesund.
9	10 »	0,5 »	15 Min.	615 »	660 »	Gesund.
10	20 »	0,5 »	15 »	595 »	640 »	»

**Versuche mit den Oxydasen.**

Um wirksame Oxydasen aus der Milz, Parotis und Fibrin zu bekommen, bin ich nach mehrfachen Versuchen bei folgendem Verfahren stehen geblieben:

Fein zerkleinertes Organ resp. Fibrin wird nach Abelous und Biarnès mit dem 5- bis 10fachen Gewichte 8%iger Kalisalpetarlösung 1 bis 2 Tage unter Zusatz von Chloroform,

um die Fäulniss zu verhüten, stehen gelassen. Hierauf wird die Lösung von den Gewebsresten durch ein Tuch filtrirt und in das Filtrat  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  bis zu einem Gehalte von 50% eingetragen; es entsteht ein voluminöser Niederschlag, welcher abfiltrirt und direkt in einem Pergamentschlauch gegen fließendes Wasser so lange dialysirt wird, bis im Schlauchinhalt kein Ammonsulfat mehr vorhanden ist. Da dieses Auswaschen 3 bis 4 Tage dauert, so ist es zweckmässig, dem Schlauchinhalt einige Stückchen Thymol zuzusetzen. Bei geringster Fäulniss ist die Einwirkung der Oxydasen auf Guajactinctur und auch die entgiftende Wirkung auf die Toxine vernichtet. Werden solche, gewöhnlich übel-süsslich riechende Lösungen mit etwas Wasserstoffsperoxyd versetzt, so wird zwar die Guajactinctur dadurch intensiv gebläut, eine Entgiftung der Toxine findet aber nicht statt. Es folgt daraus, dass die entgiftende Wirkung den sogenannten indirekten Oxydasen oder nach G. Linossier<sup>1)</sup> Peroxydasen nicht zukommt.

Der salzfrei ausgewaschene Schlauchniederschlag enthält den grössten Theil der Oxydase und in der Lösung ist nur wenig davon enthalten. Bei meinen Versuchen erwies es sich als das Zweckmässigste, diesen Niederschlag mit 0,85%iger  $\text{ClNa}$  zu einer Emulsion zu verreiben und nach Zusatz der Toxinlösungen bei der Bruttemperatur auf die letzteren einwirken zu lassen. Man kann auch die salzfreie Oxydase abfiltriren, mit Alkohol und Aether nachwaschen und im Vacuum über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  trocken aufbewahren. Die Wirkung solcher getrockneten Präparate ist etwas schwächer. Bei meinen Versuchen über die entgiftende Wirkung der Oxydasen benutzte ich meistens den durch die Dialyse salzfrei ausgewaschenen Schlauchinhalt. Der flockige Niederschlag wurde in der Schlauchflüssigkeit zu einer Emulsion fein zerrieben und 0,5 bis 5 ccm. dieser Emulsion mit den Toxinlösungen

---

<sup>1)</sup> G. Linossier, Comp. rend. de la Société de Biologie, 1898, Seite 372.

von bekanntem Giftgehalte vermischt. Der Gehalt an festem Rückstand in solcher Emulsion schwankt natürlich je nach dem Material, aus welchem sie bereitet wurde, innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Die Emulsionen aus der Milz z. B. enthalten mehr feste Stoffe als wie die aus dem Fibrin. Ich fand in meinen Emulsionen den Procentgehalt an festem Rückstand zwischen 0,03% bis 0,1%. Wie viel darin Oxydase und wie viel indifferente beigemengte Eiweissstoffe sind, das entzieht sich vorläufig jeder genaueren Bestimmung. Die Bläuung der Guajactinctur durch diese Emulsionen aus thierischem Material, wie Milz, Parotis oder Fibrin, war ziemlich gleich und bedeutend schwächer als wie durch die pflanzlichen Oxydasen, durch welche *ceteris paribus* die Guajactinctur intensiv blau gefärbt wird.

Aus dem oben Gesagten geht hervor, dass ich nur mit in Salpeterlösungen löslichen thierischen Globulinoxidasen, nicht aber mit den wasserlöslichen Oxydasen experimentirte. Wahrscheinlich wirken auch die wasserlöslichen thierischen Oxydasen auf die Toxine gleich wie die in Salpeter löslichen; wenigstens wurden durch die einzige wasserlösliche pflanzliche Oxydase aus der Scorzenerawurzel, mit der ich experimentirte, die Toxine ebenfalls entgiftet. Die Gemische der Oxydaseemulsionen mit den Toxinlösungen liess ich, bevor ich sie den Thieren injicirte, vorerst 15 Minuten bis 24 Stunden im Thermostaten stehen. Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, wird durch die Oxydasen relativ am energischsten das Diphtherietoxin entgiftet, indem 1 ccm. der Oxydaseemulsion die 600—800fach, nicht aber die 1000fach tödtliche Dose unwirksam macht. Schon schwächer ist die Wirkung auf das Tetanotoxin, indem 1 ccm. der Emulsion höchstens die Wirkung der 200fach tödtlichen Dose paralysirt. Auf Abrin erwiesen sich die von mir untersuchten Oxydasen als sehr wenig wirksam, indem 1 ccm. der Oxydaseemulsion nicht mehr als die einfach tödtliche Dose entgiftete. Uebrigens lasse ich jetzt die 3 Tabellen folgen, aus welchen das Resultat ersichtlich ist.

Tabelle VII.

Einwirkung der Oxydase aus KalbSMilz auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Diphtherietoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxydase	Einwirkungsdauer der Oxydase auf Diphtherietoxin vor der Injection	Gewicht des Meer-schweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	5 ccm.	24 St.	410 g	480 g	} Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	10	2	24	420	470	
3	20	5	24	345	400	
4	20	2	24	220	245	
5	20	1	24	375	—	
6	100	5	24	265	290	
7	100	2	24	430	455	
8	100	1	24	480	505	
9	200	1	24	265	290	
10	400	1	24	305	325	
11	500	1	24	400	415	
12	600	1	24	350	380	
13	1000	1	24	350	—	
14	10	2	15 Min.	308	325	
15	10	2	30	265	300	
16	10	2	1 St.	315	345	
17	20	2	2	295	330	
18	20	2	5	400	420	

Einwirkung der Oxydase aus Parotis vom Hunde auf Diphtherietoxin.

1	20fache	2 ccm.	24 St.	380 g	440 g	} Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20	1	24	245	290	
3	50	0,5	24	330	385	
4	60	1	24	410	460	
5	100	1	24	370	405	
6	200	1	24	350	390	
7	400	1	24	285	315	
8	10	1	15 Min.	250	280	
9	20	1	30	285	320	

Tabelle VIII.

Einwirkung der Oxydase aus Kalbsfibrin auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Diphtherietoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxydase	Einwirkungsdauer der Oxydase auf Diphtherietoxin vor der Injection	Gewicht des Meerschweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10 fache	2 ccm.	15 Min.	375 g	390 g	} Alle Thiere gesund.
2	20 »	2 »	30 »	408 »	448 »	
3	100 »	2 »	4 St.	386 »	420 »	
4	200 »	2 »	24 »	353 »	390 »	
5	400 »	2 »	24 »	348 »	389 »	
6	600 »	2 »	24 »	359 »	390 »	
7	800 »	2 »	24 »	388 »	405 »	

Einwirkung der Oxydase aus dem Fibrin von gegen Diphtherie hochimmunem Pferde auf Diphtherietoxin.

Das Serum dieses Pferdes enthielt 250 Heileinheiten in einem Cubikcentimeter.

1	10 fache	1 ccm.	15 Min.	250 g	280 g	} Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20 »	1 »	30 »	285 »	325 »	
3	100 »	1 »	5 St.	275 »	310 »	
4	200 »	1 »	24 »	305 »	360 »	
5	400 »	1 »	24 »	310 »	330 »	
6	600 »	1 »	24 »	350 »	370 »	

Einwirkung der im Vacuum während 2 Monaten aufbewahrten Oxydase auf Diphtherietoxin.

0,65 g in 65 ccm. physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst.

1	10 fache	2 ccm.	24 St.	410 g	440 g	} Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20 »	2 »	24 »	350 »	392 »	
3	100 »	2 »	24 »	385 »	435 »	
4	200 »	2 »	24 »	364 »	390 »	

Einwirkung der gekochten Oxydase aus Kalbsmilz auf Diphtheritoxin.

1	20 fache	2 ccm.	24 St.	350 g	—	Tod am nächsten Tage.
2	10 »	2 »	24 »	285 »	—	» » 2. Tage.
3	2 »	2 »	24 »	300 »	—	» » 2. »

Tabelle IX.

Einwirkung der Oxydase aus Kalbssmilz auf Tetanotoxin.  
Tödtliche Dose des verwendeten Tetanotoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxydase	Einwirkungsdauer der Oxydase auf Diphtherietoxin vor der Injection	Gewicht des Meerschweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	2 ccm.	24 St.	425 g	450 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20 »	2 »	24 »	328 »	360 »	
3	20 »	2 »	24 »	335 »	380 »	
4	100 »	5 »	24 »	430 »	460 »	
5	100 »	5 »	24 »	520 »	550 »	
6	200 »	5 »	24 »	485 »	525 »	

Einwirkung der gekochten Oxydase aus Kalbssmilz auf Tetanotoxin.

1	20fache	2 ccm.	24 St.	450 g	—	Tod am nächsten Tage.
2	10 »	5 »	24 »	550 »	—	Tod am zweiten Tage.

Einwirkung der im Vacuum während 2 Monaten aufbewahrten Oxydase auf Tetanotoxin.

0,65 g in 65 ccm. physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst.

1	10fache	2 ccm.	24 St.	310 g	380 g	Tod.
2	20 »	2 »	24 »	390 »	450 »	
3	100 »	2 »	24 »	350 »	—	

Einwirkung der Oxydase aus Hundeparotis auf Tetanotoxin.

1	2fache	0,1 ccm.	21 St.	465 g	495 g	Alle Thiere gesund.
2	2 »	0,5 »	21 »	370 »	398 »	
3	4 »	0,1 »	21 »	350 »	—	
4	10 »	0,5 »	21 »	380 »	425 »	
5	20 »	1 »	21 »	460 »	490 »	
6	100 »	0,5 »	21 »	490 »	500 »	Schwacher Tetanus, nachher gesund.
7	100 »	0,5 »	48 »	465 »	480 »	» » »
8	100 »	1 »	21 »	290 »	330 »	gesund geblieben.

Einwirkung der Oxydase aus Kalbsfibrin auf Tetanotoxin.

1	10fache	2 ccm.	24 St.	450 g	490 g	Alle Thiere gesund.
2	20 »	2 »	24 »	375 »	430 »	
3	100 »	2 »	24 »	320 »	460 »	

Einwirkung der Oxydase aus dem Fibrin von gegen Diphtherie hochimmunen Pferden auf Tetanotoxin.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxydase	Einwirkungsdauer der Oxydase auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meerschweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	2 ccm.	24 St.	395 g	435 g	} Alle Thiere gesund.
2	20 „	2 „	24 „	595 „	650 „	
3	100 „	2 „	24 „	640 „	680 „	
4	200 „	2 „	24 „	600 „	620 „	

Wie aus den Tabellen Nr. 8 und 9 ersichtlich ist, hat das Fibrin aus dem Blute des gegen Diphtherie immunisirten Pferdes eine Emulsion gegeben, wovon 2 ccm. die 200fach tödtliche Tetanotoxindose und 1 ccm. die 600fach tödtliche Dose des Diphtherietoxins entgiftete. Das Meerschweinch, das ein Gemisch von 1 ccm. Emulsion mit der 1000fachen Diphtherietoxindose erhielt, ist dagegen an Diphtherie gestorben. Dass die entgiftende Wirkung dieser Oxydase nicht etwa davon herrührt, dass das Fibrin mechanisch das Antitoxin mitgerissen habe, geht schon daraus hervor, dass es auch das Tetanotoxin, wenn auch etwas schwächer, entgiftet. Ich habe ferner gesehen, dass proportional der Immunisation auch die Menge der Oxydase zunimmt. Oxydase aus dem Fibrin eines Pferdes, das nur 80 Antitoxineinheiten in seinem Serum hatte, bläute Guajalectinur nur ganz schwach, schon stärker war die Bläuung durch die Oxydase eines Pferdes mit 120 Antitoxineinheiten. Am intensivsten aber bläute die Oxydase des Pferdes mit 250 Antitoxineinheiten. Bis jetzt habe ich meine Beobachtungen an 4 immunsirten und 2 normalen Pferden angestellt. Weitere Versuche werden zeigen, ob diese Proportionalität eine wirklich constante ist. Eine zweite, auffällige Erscheinung, welche das Fibrin gegen Diphtherie immuner Pferde im Vergleich zu dem der normalen zeigt, ist folgende: Wird das Fibrin durch spontane Gerinnung des farblosen Plasmas gewonnen, von dem anhängenden Serum abgepresst, mit Wasser aus-

gewaschen und sodann mit 8%igem Kalisalpeter unter Zusatz von Chloroform 24 Stunden im Thermostaten stehen gelassen, so geht ein Theil des Fibrins in Lösung über und zwar enthält bei immunen Pferden der gelöste Theil die Oxydase. Wird nun die filtrirte Lösung mit dem doppelten Volumen 96%igen Alkohols versetzt, so bildet sich bei normalen Pferden eine Trübung, die erst nach 10—20 Minuten sich flockig, wie geronnenes Eiweiss, zusammenballt und zu Boden setzt. Versetzt man dagegen *ceteris paribus* die Lösung von immunen Pferden mit dem doppelten Volumen 96%igen Alkohols, so entstehen schon in den ersten Minuten nach dem Vermischen längere Schleimfäden, die sich in kürzester Zeit zusammenballen und am Boden setzen. Die Erscheinung erinnert an das Ausfällen von Mucin aus Schleimflüssigkeiten durch Alkohol und ist so auffallend im Vergleich zu dem Verhalten der Extracte von normalen Pferden, dass sie sicher auf einer chemischen Verschiedenheit der aus dem Fibrin entstandenen Substanzen beruht. Je höher das Pferd immunisirt ist, um so mehr geht von dem Fibrin in die Salpeterlösung über und um so prägnanter ist die Erscheinung nach Alkoholzusatz. Während der durch Alkohol erzeugte und abfiltrirte Niederschlag aus dem Blute normaler Pferde durch Guajactinctur nicht gebläut wird, bläut dieser Niederschlag aus dem Blute immuner Pferde die Guajactinctur um so intensiver, je immuner das Pferd gegen die Diphtherie ist.

Dieser auffällige Unterschied in dem Verhalten des Fibrins diphtherieimmuner Pferde fordert auf zu vergleichenden Untersuchungen des Fibrins gegen andere Infectionskrankheiten immunisirter Thiere und eröffnet den Weg zur experimentellen Erforschung der chemischen Vorgänge bei der Immunisation. Meine bisherigen Beobachtungen sind wenig zahlreich, um noch weitere Schlüsse zu ziehen, aber ich setze meine Untersuchung nach dieser Richtung weiter fort und hoffe bald noch mehr interessante Aufklärungen über die Immunität zu ermitteln. Ich benutze hier die Gelegenheit, Herrn Dr. Dzierzowski, dem ich das Blut der gegen Diphtherie in verschiedenen Stadien immunisirten Thiere verdanke, meinen besten Dank dafür auszusprechen.

Von grossem Werthe wird auch die Ermittlung der Thatsache sein, in welcher Beziehung die Oxydase zu den Antikörpern steht, denn schon die Thatsache, dass das Blut der immunisirten Pferde Oxydase enthält, das der normalen aber nicht, deutet auf eine gewisse Beziehung dieser beiden Substanzen zu einander.

#### **Pflanzliche Oxydase.**

Ausser den genannten thierischen Oxydasen habe ich auch eine pflanzliche, von mir aus der Schwarzwurzel (*Scorzonera hispanica*) dargestellte Oxydase auf ihre Wirkung gegen die Toxine untersucht.

Bekanntlich hat G. Bertrand<sup>1)</sup> und schon vor ihm der Japaner Hikorokuro Joschida in der Rinde der im südöstlichen Asien einheimischen Rhus-Arten eine stark oxydirende Substanz gefunden. Die späteren umfangreichen Untersuchungen von G. Bertrand, zum Theil mit Bourquelot<sup>2)</sup> ausgeführt, ergaben, dass die Oxydasen mehr oder weniger in allen Pflanzen und in verschiedenen Theilen derselben — in Wurzeln, Knollen, Früchten, chlorophyllhaltigen Theilen derselben und in vielen Pilzen — vorkommen. G. Bertrand benannte diese Oxydasen mit dem Namen «Laccase». Im Gegensatz zu den thierischen Oxydasen wirken die pflanzlichen auch bei saurer Reaction. Es war nun interessant, zu ermitteln, wie sich die pflanzlichen Oxydasen gegen die von mir untersuchten Toxine verhalten werden. Da ich schon früher die Beobachtung machte, dass der wässrige Auszug der Schwarzwurzel Guajactinctur stark bläuet, so habe ich mit der darin enthaltenen Oxydase meine Versuche angestellt. Die frisch vom Markte geholte Schwarzwurzel wurde oberflächlich mit dem Messer durch Abschaben gereinigt, sodann klein zerschnitten, mit chloroformhaltigem Wasser übergossen und 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der durch Tuch colirte wässrige Auszug, welcher die Guajactinctur intensiv bläute, wurde mit pulverigem Ammoniumsulfat

1) G. Bertrand, Comp. rend., 1895, S. 226.

2) G. Bertrand und E. Bourquelot, Comp. rend., 1895, S. 783.

übersättigt, der entstandene flockige Niederschlag abfiltrirt und vom Ammonsulfat durch Dialyse befreit. Um die so erhaltene Oxydase, die stark Guajactinctur bläute, zu reinigen, wurde sie von Neuem in Wasser gelöst, aus der Lösung durch Ammonsulfat ausgefällt und durch Dialyse von dem letzteren befreit. Das so erhaltene Produkt war etwas grau gefärbt und gab alle für die Oxydasen charakteristischen Reactionen. Kurzes Aufkochen genügte, um diese oxydirende Wirkung zu zerstören. Da die so isolirte Oxydase zur vollkommenen Auflösung ziemlich viel Wasser brauchte, so habe ich auch hier nach beendeter Dialyse den flockigen Niederschlag in der Schlauchflüssigkeit fein zerrieben, vermischte die entstandene Emulsion mit den Toxinlösungen von bekanntem Giftwerthe und liess, wie mit thierischen Oxydasen, die Gemische 24 Stunden im Thermostaten stehen. Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, wirkt diese Oxydase auf das Abrin nicht ein. Dagegen wurden durch 2 cem. der Emulsion die 100fach tödtlichen Dosen von Diphtherie- und Tetanotoxin entgiftet.

Tabelle X.

Einwirkung der Oxydase aus der Schwarzwurzel auf Abrin.  
Tödtliche Dose = 0,001 cem.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxydase	Einwirkungsdauer der Oxydase auf Toxin vor der Injection	Gewicht des Meerschweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Tage nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	2 cem.	24 Std.	360 g	350 g	Am 6. Tage tod.
2	50 »	2 »	24 »	370 »	350 »	» 3. »
3	100 »	2 »	24 »	350 »	332 »	» 3. »
4	500 »	2 »	24 »	350 »	—	Tod in der Nacht.

Auf Tetanotoxin (tödtliche Dose = 0,005 cem.)

5	10fache	2 cem.	24 Std.	400 g	440 g	Infiltrate an den Injectionstellen. sonst gesund.
6	20 »	2 »	24 »	380 »	410 »	
7	100 »	2 »	24 »	490 »	535 »	

Auf Diphtherietoxin (tödliche Dose = 0,005 ccm.)

Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxydase	Einwirkungsdauer der Oxydase auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meer-schweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
8	10fache 2 ccm.	24 Std.	295 g	235 g	Infiltrate an den Injectionsstellen, sonst gesund.
9	20 » 2 »	24 »	400 »	415 »	
10	100 » 2 »	24 »	356 »	370 »	

**Schlussfolgerungen.**

1. Das Calcium- und Wasserstoffsperoxyd wirken auf die Toxine der Diphtherie, des Tetanus und das Abrin entgiftend. Die gleiche Wirkung haben die thierischen, sowie die pflanzlichen Oxydasen auf die zwei ersten Toxine, nicht aber auf das Abrin.

2. Die entgiftende Wirkung der Oxydasen geschieht nicht nur in vitro, sondern auch im Thierkörper selbst bei gleichzeitiger Einspritzung einerseits der Toxine, andererseits der Oxydasen in verschiedene Körperstellen.

3. Aus dem Fibrin normaler Pferde wird keine Oxydase mittelst Kalisalpeter extrahirt, wohl aber aus dem Fibrin gegen die Diphtherie immunisirter Pferde.

4. Die Entgiftung der Toxine durch Oxydasen findet nur dann statt, wenn die letzteren die Guajactinctur direkt bläuen. Extracte, welche auf Guajactinctur nicht mehr wirksam sind, sind ohne Wirkung auf die Toxine.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Nencki für seine Unterstützung mit Rath und That bei diesen Untersuchungen meinen herzlichsten Dank auszusprechen.