

Ueber Lab und Antilab.

Von

Dr. S. Korschun aus Charkow.

(Aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.
Direktor Geh.-R. Prof. P. Ehrlich.)

Der Redaction zugegangen am 13. Juli 1902.

Die hemmende Wirkung des normalen Pferdeserums auf die Labgerinnung der Milch wurde zuerst von Hammarsten beobachtet und dann von Rödén¹⁾ eingehend untersucht, der darthat, dass diese Eigenschaft des Serums auch nach Dialyse weiter besteht und bei Erwärmen über 70° aufgehoben wird. Später gelang es zuerst Morgenroth²⁾ und dann Briot³⁾ unabhängig von einander, durch wiederholte Labinjectionen die Antilabwirkung dem Serum von Thieren — Ziegen und Kaninchen — mitzuteilen, welches normaler Weise diese Fähigkeit entweder nicht oder nur in ganz geringem Grade besass, also durch Immunisirung ein specifisches Antilab zu erzeugen.

I. Beruht die labhemmende Wirkung des Pferdeserums auf einem Antilab oder auf Kalkbindung?

Die Möglichkeit der Immunisirung mit Lab führte Morgenroth zu der Annahme, dass die labhemmende Wirkung normaler Sera, besonders des Pferdeserums, die in manchen Fällen nicht viel hinter der des Serums immunisirter Ziegen zurücksteht, gleichfalls auf einen wirklichen Antikörper zurückzuführen sei, der ein physiologisches Analogon des durch Immunisirung erzielten Antilabs darstellt. Briot untersuchte ebenfalls das Antilab des normalen Pferdeserums und konnte ebenso wie

1) S. Ref. in Maly's Jahresbericht Bd. 17. 1887. S. 160.

2) Morgenroth, Centralbl. f. Bakteriologie Bd. 26. 1899.

3) Briot, Thèse de Paris 1900.

Röden dessen Thermolabilität (Zerstörung durch dreistündiges Erwärmen auf 62°) feststellen.

Die Wirkung des Antilabs, des immunisatorisch erzeugten sowohl, wie des natürlich vorkommenden, beruht nach der jetzt wohl allgemein herrschenden Anschauung auf einer spezifischen Beeinflussung, der Vereinigung beider Substanzen zu einer unwirksamen Verbindung. Bezüglich der labhemmenden Wirkung normaler Sera haben jedoch in neuerer Zeit Fuld und Spiro¹⁾ die Ansicht ausgesprochen, dass dieselbe nicht auf der Anwesenheit eines in dem angegebenen Sinne wirkenden Antikörpers beruhe, sondern dass das Wesen der labhemmenden Wirkung in einer Entziehung der zur Gerinnung nöthigen Kalksalze bestehe, die durch das Pseudoglobulin des Serums gebunden würden. Nach der Meinung dieser Autoren geht das Pseudoglobulin eine Verbindung mit dem Kalk der Milch ein, die, obschon in Wasser löslich, doch relativ wenig dissociirt ist. Deshalb kann das Paracasein, das sich in der ersten Phase der Labwirkung bildet, sich mit den Kalksalzen zur Bildung des unlöslichen Paracaseincalciums nicht verbinden (zweite Phase der Labwirkung — Käsebildung). Nach der Ansicht der beiden Forscher berechtigen weder die Unfähigkeit, zu dialysiren, noch die Zerstorbarkeit bei verhältnissmässig niedrigen Temperaturen zu dem Schlusse der Zugehörigkeit des Antilabs zu den eigentlichen Antikörpern. Denn das Pseudoglobulin wird bei der Dialyse gleichfalls nicht aus der Lösung gefällt und dringt auch nicht durch die thierische Membran und die Temperatur, bei der es coagulirt (68—70°), entspricht etwa derjenigen, bei welcher die Antilabwirkung des Blutserums aufhört.

Inzwischen haben sich jedoch Fuld und Spiro selbst von der Unhaltbarkeit ihrer Annahme überzeugt und der eine von ihnen²⁾ gibt in einer vorläufigen Richtigstellung nun Folgendes wieder:

1) Fuld und Spiro, Diese Zeitschrift Bd. XXXI, H. 1 u. 2. 1900.

2) Fuld, Hofmeister's Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. II, H. 4. 1902.

«Morgenroth fand, dass nach Labinjectionen das Serum mancher Thiere die Eigenschaft gewinnt, die Labwirkung zu verhindern: unabhängig von ihm fand Briot dasselbe. Die Wirkung des so erhaltenen Immunserums betrifft, wie ich bestätigen kann, das Ferment. Auch die Wirkung normalen Blutes auf die Labgewinnung hat, wie Röden und Morgenroth annehmen, einen ähnlichen Grund. Die von Spiro und mir früher betonte Kalkbindung spielt jedenfalls nur eine secundäre Rolle. Ich werde an anderer Stelle diese Verhältnisse erörtern und erwähne sie nur, um unsere älteren Angaben im Einverständniss mit Herrn Dr. Spiro zu berichtigen.»

Wenn wir trotz dieser Richtigstellung nochmals auf die Frage zurückkommen, so hat dies seinen Grund darin, dass wir glauben, dass die Methoden, mit denen wir die wahre Antikörpurnatur der labhemmenden Substanz nachgewiesen haben, von allgemeiner Bedeutung sind und auch in anderen Fällen der Art von Wichtigkeit sein können. Ausserdem ist auch die Annahme von Fuld und Spiro als ein Beweismittel gegen die Präsomption der Ehrlich'schen Theorie von Gruber¹⁾ ins Feld geführt worden, so dass eine vollkommene Klarlegung der Frage geboten erscheint.

Bevor ich zur Beschreibung meiner Versuche übergehe, halte ich es für nöthig, einige Bedingungen zu erwähnen, deren Einhaltung beim Arbeiten mit Lab von der grössten Wichtigkeit ist.

1. Die Herkunft und Beschaffenheit der Milch haben einen grossen Einfluss auf die Resultate der Versuche. Die Milch von verschiedenen Thieren, die vollkommen frisch ist, zeigt sich für die Einwirkung des Labs in verschiedenem Grade empfänglich. Auch ändert sich die Empfindlichkeit der Milch gegen die Einwirkung des Labs sehr rasch beim Stehen bei Zimmertemperatur. Deshalb präparirte ich, um Milch von ein und derselben Beschaffenheit zu haben, stets auf einmal 10 Liter Milch möglichst kurze Zeit nach dem Melken in einer Flasche in der Weise, dass ich zur Conservirung derselben 1% Chloroform hinzufügte, sie im Verlauf des ersten Tages zu wiederholten Malen gut durchschüttelte und immer im Eisschrank aufbewahrte. Unter solchen Umständen wurde die Entwicklung von Mikroorganismen in der Milch verhindert und die Empfindlichkeit derselben gegen die Einwirkung des Labs blieb für lange Zeit unverändert.

1) Gruber, Münchner med. Woch. 1901. Nr. 49.

2. Um Störungen durch die Schwankungen der Antilabwirkung des Serums verschiedener Individuen, sowie eine Abschwächung derselben beim Aufbewahren des Serums in flüssigem Zustande zu vermeiden, präparirte ich eine grosse Menge Serum von einem Pferd, füllte es in kleine Fläschchen und bewahrte es, wie dies im Institut allgemein mit derartigen labilen Substanzen geschieht, bei -10° gefroren auf. Zu Versuchen wurde jedesmal ein neues Fläschchen aufgethaut.

3. Die leichte Zersetzbarkeit der Lablösung und die Thatsache, dass selbst das zu verschiedenen Zeiten von ein und derselben Fabrik bezogene Lab oft ganz bedeutende Unterschiede in Bezug auf sein Verhalten zur Milch aufweist, machte die genaue und dauernde Standardisirung einer grösseren Labmenge nöthig. Es wurden deshalb je 100 ccm. 0.85% ige Kochsalzlösung mit 10 g Labpulver versetzt, die Mischung drei Stunden intensiv im Apparat geschüttelt, wonach je 5 ccm. in entsprechend grosse Fläschchen gebracht und bei -10° gefroren aufbewahrt wurden. Für jeden Tag wurde ein neues Fläschchen benutzt, mit dem eine 1% ige Lösung bereitet wurde. Der Inhalt des Fläschchens wurde mit 45 ccm Leitungswasser verdünnt und 15 Minuten im Schüttelapparat geschüttelt, worauf die Flüssigkeit durch Centrifugiren von den in ihr befindlichen unlöslichen Labpulverpartikelchen befreit wurde. Zur Lösung des Labs hatte ich der physiologischen Kochsalzlösung das Leitungswasser vorgezogen, um nach Möglichkeit der Anwesenheit freien Alkalis vorzubeugen, welches fast stets von den Flaschen an die Kochsalzlösung abgegeben wird¹⁾ und nachtheilig auf das Lab einwirkt.

4. Ich habe mich in den folgenden Versuchen der von Morgenroth (l. c.) angegebenen Methode bedient, welche die genaue Bestimmung der eben noch wirksamen minimalen Labmenge zur Grundlage hat. Da es im Folgenden sich um die genaue Feststellung absoluter Verlabungswerthe handelt und der Werth dieser Methode von Briot bezweifelt worden ist, will ich einige vergleichende Versuche vorausschicken, die den Vorzug dieses Verfahrens vor der üblichen Labbestimmung, die ausschliesslich bei höherer Temperatur stattfindet, darthun.

Dass thatsächlich bei dem gewöhnlichen Verfahren, bei dem die Labwirkung in der Wärme ($37-40^{\circ}$) stattfindet, in der bei geringen Labmengen langen Zeit, die bis zur Wirkung verläuft, eine ganz erhebliche Labvernichtung stattfindet, die bei $+8^{\circ}$, der Temperatur, bei welcher in dem Morgenroth'schen Verfahren die Fermentwirkung verläuft, unterbleibt, geht aus den folgenden Versuchen hervor.

Absteigende Mengen Lab werden in Reagensgläser vertheilt und nach Auffüllung auf gleiches Volumen mit Leitungswasser je 10 ccm Milch hinzugefügt. Es werden gleichzeitig zwei identische Reihen angestellt, die eine Serie Reagensröhren wird sofort in das Wasserbad von

¹⁾ S. Morgenroth, l. c.

38—40° gesetzt, die andere bleibt nach dem Morgenroth'schen Verfahren über Nacht im Eisschrank und kommt am folgenden Tag ins Wasserbad. Ich erhielt stets einen Unterschied im Wirkungswerth des Labs, der 1:3—4 betrug. So bestimmte ich z. B. in einem der Versuche die Minimalgerinnungsdosis des Labs nach der Wärme-Methode auf 0.004, nach der Kälte-Methode auf 0.00095 ccm der 1%igen Lösung, erhielt also einen Unterschied von 1:4 zu Gunsten der letzteren. Dass es sich hier um eine wirkliche Abschwächung des Labs durch den Einfluss der schädlichen, höheren Temperatur handelt, ist daraus zu ersehen, dass häufig dieselbe Erscheinung eintritt, wenn man vor dem Zufügen der Milch die Reagensröhrchen mit Lab 3 Stunden bei 37° hält und dann nach dem Kälteverfahren den Labungswerth bestimmt. Es verdient demnach, trotz der Zweifel Briot's, die Morgenroth'sche Kältemethode den Vorzug, die sich ja auch in den Händen Field's bestens bewährt hat.

Ich komme nun zur Schilderung meiner Versuche, die den Zweck hatten, die Art der Antilabwirkung des Pferdeserums nochmals festzustellen. Wenn die Annahme der Kalkbindung richtig wäre, so müssten die bei der durch Serum bewirkten Neutralisation der Labwirkung beobachteten Erscheinungen ganz dieselben sein, die wir wahrnehmen, wenn man gewisse chemische Substanzen, die mit dem Kalk der Milch unlösliche oder schwer dissociirbare Verbindungen eingehen, zur Milch fügt, wie z. B. oxalsaures Natrium. Wenn man zu einer bestimmten Menge Lab oxalsaures Natrium in beständig gesteigerten Quantitäten zufügt, so wird die Gerinnung eines gewissen Quantum — 10 ccm — Milch zunächst entsprechend später eintreten, bis die Milch schliesslich, wenn durch genügenden Zusatz oxalsauren Salzes alles Calcium derselben gebunden ist, das Vermögen, zu gerinnen, überhaupt verloren hat, soviel Lab man auch zufügt. Ich bestimmte eine minimale Quantität oxalsauren Natriums, die die Milch ihrer Fähigkeit, unter der Einwirkung von Lab zu gerinnen, beraubt, in folgender Weise. In eine Reihe von Reagensgläschen, von denen jedes 1 ccm 1%ige Lösung — etwa das 1400fache der eben wirksamen Menge — enthält, wurden verschiedene Mengen 1%ige oxalsaure Natriumlösung hinzugefügt und darnach das Flüssigkeitsvolumen egalisiert. Nach Verlauf von 15 Minuten wurden dann in jedes Reagensgläschen

10 ccm Milch gegossen und diese Mischung ins Wasserbad von 40° gebracht (s. Tabelle I).

Tabelle Nr. 1.

| 1,0 ccm 1% ige Lablösung. | | |
|---------------------------|---------|------------------|
| + 1% oxalsaures Natrium. | | |
| 1. | 0,8 ccm | flüssig. |
| 2. | 0,7 " | " |
| 3. | 0,65 " | " |
| 4. | 0,6 " | part. Gerinnsel. |
| 5. | 0,55 " | fest. |
| 6. | 0,5 " | " |
| 7. | 0,45 " | " |

Der Einfachheit wegen bezeichnen wir die Mischung von 1,0 ccm Lab (1%) + 0,65 ccm 1%iges oxalsaures Natrium mit Lo. Wenn wir also zu 10 ccm Milch die ganze Lo-Mischung = 1,0 ccm 1%ige Lablösung + 0,65 ccm oxalsaures Natrium hinzufügen, so bleibt die Milch flüssig. Sehen wir nun, wie sich dasselbe Volumen Milch verhält, wenn man zu demselben Bruchtheile der Lo-Mischung zufügt. Um jede Begünstigung durch die Versuchsbedingungen auszuschliessen, wurde ein geringer Ueberschuss von oxalsaurem Natrium (0,8 ccm statt 0,65 ccm) dem Lo-Gemisch zu Grunde gelegt. Ich füge also der Milch zu:

| 1% oxalsaures Natrium + 1% Lablösung. | | |
|---------------------------------------|---------|---------|
| 1. | 0,4 ccm | 0,5 ccm |
| 2. | 0,2 " | 0,25 " |
| 3. | 0,12 " | 0,14 " |
| 4. | 0,08 " | 0,1 " |

Das Volumen der Flüssigkeit wurde ausgeglichen und darauf je 10 ccm Milch hinzugefügt.

Die Milch gerann rasch in sämtlichen Reagensgläsern. Es ist dies ohne Weiteres aus dem Chemismus der Oxalsäurewirkung zu verstehen, da in einem Gemisch von 1,0 ccm Lab + 0,8 ccm oxalsaures Natrium sich das Lab in freiem Zustande befindet und seine Wirkung auf die Milch nur in Folge der Bindung der Kalksalze durch das oxalsaure Natrium paralysirt wird. Bei der Fractionirung der Lo-Mischung ver-

mindert sich die Menge des oxalsauren Natriums, mithin bleibt ein Theil der Kalksalze der Milch gelöst, und die Milch gerinnt trotz der relativ geringeren Mengen Lab.

Aus eben demselben Grunde tritt ein Gerinnen der Milch ein, wenn zu dem Gemisch von 1,0 cem Lab + 0,8 cem oxalsaures Natrium nicht 10 cem Milch, sondern mehr, z. B. 20 oder 30 cem, oder, was dasselbe ist, zu dem Gemisch von 1 cem Lab + 0,8 cem oxalsaures Natrium + 10 cem Milch, das flüssig bleibt, neue Portionen Milch hinzugegossen werden.

Ebenso ist es klar, dass die Milch, zu der die ganze Lösung zugesetzt wird, flüssig bleibt, trotz des weiteren Hinzuthuns von Lab. In das Reagensgläschen Nr. 3 in der Tabelle Nr. 1 nahm ich zuerst 1 cem, dann noch 1 cem 1^o eige Lablösung und die Milch blieb flüssig. Erst nach weiterem Hinzuthun von 1 cem trat eine unbedeutende Käsebildung ein, was durch die Anwesenheit von Kalksalzen in den Labpräparaten und auch im Leitungswasser, welches zur Lösung des Labs gedient hatte, zu erklären ist.

Vollkommen analoge Erscheinungen hätten wir beobachten müssen, wenn die Antilabwirkung des Pferdeserums von der Bindung der Kalksalze der Milch durch das letztere abhängig wäre. Jedoch die folgenden Versuche geben ein durchaus anderes Bild.

Die Bestimmung der Antilabwirkung des Pferdeserums wurde auf zweierlei Weise vorgenommen. Bei einer Reihe von Versuchen wurde eine gewisse Menge Lab als constante Grösse genommen und die Quantität Serum festgestellt, die zu seiner Neutralisirung erforderlich ist. Bei der anderen wurde eine bestimmte Menge Serum als constante Grösse gewählt und die Maximalmenge Lab festgesetzt, die, mit Serum gemischt, kein Gerinnen der Milch mehr ergab.

Im ersten Fall wurden in die Reagensgläschen, von denen jedes die gleiche Menge Lab enthielt, verschiedene Quantitäten Pferdeserum gefüllt, worauf man sie bei Zimmertemperatur 15 Minuten lang stehen liess. Dann kamen je 10 cem Milch hinzu. Nun wurde das Minimalquantum Serum bestimmt, bei welchem die Milch noch flüssig blieb. Diese Bestimmung

wurde zugleich in verschiedenen Reihen mit 0,5 cem, 0,1 und 0,05 1^o iger Lablösung vorgenommen.

Tabelle 2.

| | 1 ^o ige Lablösung | | | 1 ^o ige Lablösung | | | 1 ^o ige Lablösung | | |
|---|------------------------------|----------|---|------------------------------|----------|---|------------------------------|----------|---|
| | Pferdeserum | Resultat | | Pferdeserum | Resultat | | Pferdeserum | Resultat | |
| | cem | cem | | cem | cem | | cem | cem | |
| 1 | 0,5 | 0,8 | ○ | 0,1 | 0,145 | ○ | 0,05 | 0,08 | ○ |
| 2 | 0,5 | 0,75 | ○ | 0,1 | 0,140 | ○ | 0,05 | 0,075 | ○ |
| 3 | 0,5 | 0,7 | ○ | 0,1 | 0,135 | ○ | 0,05 | 0,07 | ○ |
| 4 | 0,5 | 0,65 | ○ | 0,1 | 0,130 | ○ | 0,05 | 0,065 | ○ |
| 5 | 0,5 | 0,6 | + | 0,1 | 0,125 | ○ | 0,05 | 0,06 | ○ |
| 6 | 0,5 | 0,55 | + | 0,1 | 0,120 | ○ | 0,05 | 0,055 | + |
| 7 | 0,5 | 0,5 | + | 0,1 | 0,115 | + | 0,05 | 0,05 | + |
| 8 | 0,5 | 0,45 | + | 0,1 | 0,110 | + | 0,05 | 0,045 | + |

+ fest; ○ flüssig.

Wie die Tabelle ergibt, war zum Neutralisiren von 0,5 cem 1^o iger Lablösung 0,65 cem Pferdeserum erforderlich: zum Neutralisiren von 0,1 cem Lab — 0,12 cem Serum und zum Neutralisiren von 0,05 Lab — 0,06 Serum. Wenn wir eine Mischung von 0,5 cem Lab + 0,65 cem Serum als Einheit annehmen und sie mit Lo bezeichnen, so sehen wir, dass Fractionen von Lo ebenso wenig wie die ganze Lo-Mischung im Stande sind, die Milch gerinnen zu machen. So blieb die Milch flüssig, wenn zu ihr

1. $Lo = 0,5 \text{ cem Lab} + 0,65 \text{ Serum}$,
2. $\frac{1}{5} Lo = 0,1 \text{ cem Lab} + 0,125 \text{ Serum}$,
3. $\frac{1}{10} Lo = 0,05 \text{ cem Lab} + 0,065 \text{ Serum}$.

hinzugefügt wurden. Es besteht also eine genaue Proportionalität zwischen angewandter Labmenge und der zur Neutralisation derselben nöthigen Serummenge.

Zu demselben Ergebniss kam man, wenn eine bestimmte Menge Serum als constante Grösse angenommen wurde.

Tabelle 3.

| | Pferde- serum | 1% ige Lablösung | Resultat | Pferde- serum | 1% ige Lablösung | Resultat |
|---|------------------|---------------------|----------|------------------|---------------------|----------|
| 1 | 0.3 ccm | 0.160 | + | 0.15 ccm | 0.082 | + |
| 2 | 0.3 | 0.156 | + | 0.15 » | 0.080 | + |
| 3 | 0.3 » | 0.152 | + | 0.15 » | 0.078 | + |
| 4 | 0.3 » | 0.148 | + | 0.15 » | 0.076 | + |
| 5 | 0.3 » | 0.144 | + | 0.15 » | 0.074 | ○ |
| 6 | 0.3 | 0.140 | ○ | 0.15 » | 0.072 | ○ |
| 7 | 0.3 » | 0.136 | ○ | 0.15 » | 0.070 | ○ |
| 8 | 0.3 » | 0.132 | ○ | 0.15 » | 0.068 | ○ |
| 9 | 0.3 | 0.128 | ○ | 0.15 | 0.066 | ○ |

+ fest; ○ flüssig.

Lo = 0.3 ccm. Pferdeserum + 0.14 Lab.

$\frac{1}{2}$ Lo = 0.15 » » » + 0.074 Lab.

Aus den aufgeführten Versuchen ist ersichtlich, dass zwischen den Quantitäten Lab und den Quantitäten Serum, die zum Neutralisiren des ersteren erforderlich sind, eine directe Proportionalität besteht. Die geringe Einschränkung in der Weise, dass kleinere Quantitäten Serum im Stande sind, verhältnissmässig grössere Quantitäten Lab zu neutralisiren, ist ja nur eine scheinbare, da minimale Labüberschüsse bei geringen Mengen verborgen bleiben, bei grösseren Mengen Lab zur Geltung¹⁾ kommen.

Wir sehen also, dass in diesem Fall im Gegensatz zur wirklichen Kalkbindung eine Lo-Dosis auch beim Fractioniren eine Lo-Dosis bleibt. Dementsprechend ist es auch ganz gleichgiltig, auf welches Volumen Milch man ein bestimmtes Lo-Gemisch einwirken lässt, wie Tabelle 4 anschaulich macht.

1) Siehe auch Ehrlich über Diphtherietoxin- und Antitoxin. Transactions of the Jenner Institute of Preventive Medicine, London, 1899.

Tabelle 4.

| | + Lab 1% | 0,15 ccm Pferdeserum | | | |
|----|----------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | + 5 ccm Milch | + 10 ccm Milch | + 15 ccm Milch | + 20 ccm Milch |
| 1 | 0,07 ccm | + | + | + | + |
| 2 | 0,065 | + | + | + | + |
| 3 | 0,06 | + | + | + | + |
| 4 | 0,055 | + | + | + | + |
| 5 | 0,05 | + | + | + | + |
| 6 | 0,045 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 7 | 0,04 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 8 | 0,035 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 9 | 0,03 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 10 | 0,025 | ○ | ○ | ○ | ○ |

+ fest; ○ flüssig.

Jetzt erübrigt es noch, zu sehen, wie sich die Milch, der man das Lo-Gemisch von Lab und Pferdeserum zugesetzt hat, verhält, wenn neue Portionen Lab hinzukommen. Hierzu benutzte ich Reagensgläschen mit einer Mischung von Lab und Serum, die eben noch einen ganz kleinen Ueberschuss von Antilab enthielten. So z. B. nahm ich in der Tabelle 4 das Gläschen 6, dessen Inhalt längere Zeit (5 Stunden) im Wasserbad bei 40° flüssig geblieben war, und setzte ihm 0,1 ccm 1%ige Lablösung hinzu. Das Gerinnen erfolgte in einigen Secunden. Auch die verhältnissmässig weit von der Gerinnung entfernten, einen grösseren Ueberschuss des Antilabs enthaltenden Proben gerannen schnell nach Versetzung mit 0,1 ccm Lab. Man kann also in diesem Falle Lo durch einen sehr geringen Labzusatz in L₊ überführen, im Gegensatz zu dem Verhalten bei Oxalsäurezusatz, wo Lo auch bei Zufügung grosser Labmengen sich nicht ändert.

Es hat also die Wirkung des Pferdeserums mit der Veränderung der Kalkmenge des Serums in ihrem Wesen nichts zu thun, wie dies jetzt auch Fuld und Spiro annehmen.

In dem Abschnitt III werden wir zeigen, dass das Serum des Pferdes und anderer Thiere unter gewissen Umständen auch andersartige Antilabwirkungen vermitteln kann. Es gelingt jedoch leicht, in einer später zu beschreibenden Weise diese zweite «antireactive» Wirkung durch geeignete Massnahmen (Dialyse) auszuschneiden und isolirt mit der Substanz zu arbeiten, die wir als wahres Antilab ansehen müssen.

II. Ueber immunisatorische Erzeugung von Anti-Antilab

Ein wichtiges Beweismittel, dass das Antilab des normalen Pferdeserums als ein specifischer Antikörper aufzufassen ist, konnten wir dadurch beibringen, dass es uns gelang, durch Immunisirung mit Hülfe desselben ein Anti-Antilab zu erzielen.

Ueber Anti-Antifermente liegt bis jetzt nur eine Beobachtung von Wendelstadt vor.

Wendelstadt¹⁾ erhielt Anti-Antikörper dadurch, dass er zunächst Kaninchen mit Blutegelextract immunisirte, deren Serum die gerinnungshemmende Wirkung desselben aufhob, und dieses Serum wiederum einer Ratte subcutan und einem Kaninchen intravenös injicirte. Das Blutserum der in solcher Weise immunisirten Thiere besass die Fähigkeit, die Wirkung des Blutegelkaninchenserums zu neutralisiren, d. h. die gerinnungshemmende Wirkung des Blutegelextracts auch in Gegenwart des primären Immunserums zu erhalten.

Ich injicirte einer Ziege im Laufe von 70 Tagen 3100 ccm Pferdeserum subcutan, je 550—700 ccm auf einmal, im Ganzen in fünf Injectionen.

Am neunten Tage nach der letzten Injection wurde dem Thiere Blut entnommen, und seine Wirkung auf die Antilabwirkung des Pferdeserums geprüft. Die Anti-Antilabwirkung des Serums dieser «Pferdeserum-»Ziege ist in folgender Weise ermittelt worden. In einer Reihe von Reagensgläsern werden bei Zimmertemperatur je 0,15 ccm dialysirtes²⁾ Pferdeserum und 1 ccm Pferdeziegenserum gethan, und nach Verlauf von

1) Wendelstadt. Ueber einen Antikörper gegen Blutegelextract. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie. Vol. IX. Fasc. V u. VI.

2) S. hierüber Abschnitt III.

30 Minuten verschiedene Mengen 1% ige Lablösung. Die Mischung in den Reagensgläschen wird mit Leitungswasser auf je 2 ccm gebracht und abermals, immer bei Zimmertemperatur, 15 Minuten sich selbst überlassen. Hierauf folgte die Labbestimmung mit 10 ccm Milch. Gleichzeitig wurde eine Kontrolle mit normalem Ziegenserum vorgenommen. Nachstehende Tabelle Nr 5 zeigt die Resultate dieser Versuche.

Tabelle Nr. 5.

| | 0,15 ccm Pferdeserum dialys. | | | | |
|----|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--|---|
| | + Lab 1% | + 1,0 ccm 0,85 %ige Kochsalzlösung | + 1,0 Normalziege- serum | + Serum der immunisirten Ziege 1,0 ccm 0,5 ccm | |
| 1 | 0,12 | + | + | + | + |
| 2 | 0,11 | + | + | + | + |
| 3 | 0,10 | + | + | + | + |
| 4 | 0,09 | + | + | + | + |
| 5 | 0,08 | + | ○ | + | + |
| 6 | 0,075 | + | ○ | + | + |
| 7 | 0,070 | + | ○ | + | + |
| 8 | 0,065 | + | ○ | + | + |
| 9 | 0,060 | ○ | ○ | + | + |
| 10 | 0,055 | ○ | ○ | + | + |
| 11 | 0,050 | ○ | ○ | + | + |
| 12 | 0,04 | ○ | ○ | + | + |
| 13 | 0,03 | ○ | ○ | + | + |
| 14 | 0,02 | ○ | ○ | + | + |
| 15 | 0,01 | ○ | ○ | + | + |
| 16 | 0,009 | ○ | ○ | + | ○ |
| 17 | 0,008 | ○ | ○ | + | ○ |
| 18 | 0,007 | ○ | ○ | + | ○ |
| 19 | 0,006 | ○ | ○ | + | ○ |
| 20 | 0,005 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 21 | 0,004 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 22 | 0,003 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 23 | 0,002 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 24 | 0,001 | ○ | ○ | ○ | ○ |

+ fest: ○ flüssig.

Der Effect des Pferdeserums ist nach Zugabe von 1 cem Immunserum um das Zwölffache schwächer geworden. Die Minimaldosis Lab, die 10 cem Milch zum Gerinnen bringt, kommt nach Morgenroth's Verfahren in diesem Versuche 0,0007 cem gleich.

Wenn wir die Antilabwirkung des Pferdeserums durch die Zahl der Minimaldosen Lab, die von 0,15 cem des Serums neutralisirt werden, ausdrücken (wir bezeichnen die Minimaldosis Lab mit T), bekommen wir folgende Zahlen.

1. 0,15 cem Pferdeserum neutralisirt circa 86 T (0,06 : 0,0007).

2. 0,15 cem Pferdeserum + 1,0 cem Immunserum neutralisiren 7 T (0,005 : 0,0007).

3. 0,15 cem Pferdeserum + 0,5 cem Immunserum neutralisiren 13 T.

Um den Grad der Thermolabilität des Anti-Antikörpers kennen zu lernen, ist eine Reihe von Versuchen angestellt worden, die in der Tabelle Nr. 6 niedergelegt sind. Die Versuche wurden genau in derselben Weise vorgenommen, wie dies bei der Bestimmung der Anti-Antilabwirkung des Serums der immunisirten Ziege dargelegt wurde.

Aus der unten aufgestellten Tabelle 6 geht hervor, dass die Antilabwirkung des Pferdeziegenserums eine bedeutende Abschwächung schon bei einer Temperatur von 70° erleidet, und bei einstündigem Erwärmen bis zu 80° wird sie vollständig aufgehoben, denn der Unterschied zwischen Lo ohne Immunserum und nach Hinzufügen von 0,5 cem Immunserum, bis zu 80° erwärmt, ist derartig minimal, dass er nicht in Betracht kommen kann.

1. Lo = 0,15 cem Pferdeserum + 0,1 cem 1° ige Lablösung.

2. Lo = 0,15 cem Pferdeserum + 0,5 cem Pferdeziegenserum auf 80° eine Stunde erhitzt + 0,09 cem 1° ige Lablösung.

Es ist also das Anti-Antilab eine Substanz, die sich auch thermischen Einflüssen gegenüber als typisches Immunisirungsproduct kennzeichnet.

Tabelle Nr. 6.

| | 0.15 ccm Pferdeserum dialysirt | | | | | |
|----|--------------------------------|--|--|---|----------------|----------------|
| | 1 Lab- lösung ccm | +0.85% Kochsalz- lösung 0.5 ccm | — Pferde- ziegenserum activ 0.5 ccm | — 0.5 ccm Pferdeziegenserum erhitzt ¹⁾ 1 1/2 Std. 70° | 30 Min. 75° | 1 Stunde 80 |
| 1 | 0.12 ccm | + | + | + | + | + |
| 2 | 0.11 | + | + | + | + | + |
| 3 | 0.1 | ○ | + | + | + | + |
| 4 | 0.09 | ○ | + | + | + | ○ |
| 5 | 0.08 | ○ | + | + | + | ○ |
| 6 | 0.07 | ○ | + | + | ○ | ○ |
| 7 | 0.06 | ○ | + | ○ | ○ | ○ |
| 8 | 0.05 | ○ | + | ○ | ○ | ○ |
| 9 | 0.04 | ○ | + | ○ | ○ | ○ |
| 10 | 0.03 | ○ | + | ○ | ○ | ○ |
| 11 | 0.02 | ○ | + | ○ | ○ | ○ |
| 12 | 0.01 | ○ | + | ○ | ○ | ○ |
| 13 | 0.009 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 14 | 0.008 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

— fest: ○ flüssig.

Wir sahen, in wie hohem Grade das Immuserum die Antilabwirkung des Pferdeserums abschwächt, und es drängt sich nur noch die Frage auf, ob diese Erscheinung nicht möglicher Weise abhängt von der Fähigkeit des Pferdeziegenserums, gleich dem Lab die Milch gerinnen zu machen, wodurch es den Effect des Labs erhöhen würde.

Ich stellte deshalb Versuche an hinsichtlich der Wirkung grösserer Menge Pferdeziegenserum auf Milch. Gleichzeitig wurden genau dieselben Versuche mit normalem Ziegenserum und Pferdeserum vorgenommen.

Die völlig negativen Resultate finden sich in nachstehender Tabelle Nr. 7.

¹⁾ Beim Erhitzen wurde das Serum zweimal mit Leitungswasser verdünnt.

Tabelle Nr. 7.

| | Milch | Pferdeziege | Norm. Ziege | Pferd | Resultat |
|---|--------|-------------|-------------|-------|-----------|
| 1 | 10 ccm | 1 ccm | 1 ccm | 1 ccm | } flüssig |
| 2 | | 3 | 3 | 3 | |
| 3 | | 5 | 5 | 5 | |
| 4 | 2 ccm | 1 | 1 | 1 | |
| 5 | | 2 | 2 | 2 | |
| 6 | | 3 | 3 | 3 | |
| 7 | | 5 | 5 | 5 | |

Man kann die Resultate meiner bisherigen Versuche folgendermaassen zusammenfassen:

1. Es besteht eine directe Proportionalität zwischen den Quantitäten des Labs und denjenigen des Pferdeserums, welche zum Neutralisiren des Labes erforderlich sind.

2. Bei bestimmten Mengenverhältnissen zwischen Lab und Pferdeserum bekommt man eine vollkommen neutrale Mischung (Lo-Mischung), die auch bei wechselnden Volumen Milch unwirksam bleibt, im Gegensatz zu neutralen Gemischen von Lab und oxalsaurem Natrium, die durch Zufügen von Milch von Lo in L+ übergehen.

3. Theile der Lo-Mischung sind ebenso unfähig, die Milch zum Gerinnen zu bringen, wie die ganze Lo-Mischung selbst, im Gegensatz zum Verhalten einer mit Lab und oxalsaurem Salz hergestellten Lo-Mischung.

4. Die Milch, welche mit Lo-Mischung aus Lab und Serum flüssig bleibt, gerinnt schnell, wenn man einen geringen Ueberschuss an Lab hinzufügt, was bei oxalsaurem Salz-Zusatz nicht der Fall ist.

5. Wenn man einer Ziege grosse Mengen Pferdeserum subcutan injicirt, so bekommt ihr Blutserum eine spezifische, gegen das Antilab gerichtete Wirkung, die

auf der Anwesenheit des thermolabilen Anti-Antilab beruht.

6: Es ist mithin der unumstössliche Beweis erbracht, dass im Pferdeserum ein spezifisches Antilab existirt, welches direct auf Lab in derselben Weise wie Antitoxin auf Toxin einwirkt.

III. Ueber einen zweiten labhemmenden Factor des Serums (Pseudo-Antilab).

Nachdem die Antikörpernatur der in den vorausgehenden Abschnitten behandelten labhemmenden Substanz des Pferdeserums festgestellt war, wurde die gegenseitige Beeinflussung von Lab und Serum noch einem weiteren eingehenden Studium unterworfen, das zu ferneren interessanten Aufschlüssen über das Verhalten des Labs zum Serum führte, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

Wir werden im Folgenden diejenige Menge Lab, welche durch eine bestimmte, willkürlich gewählte Serummengge eben vollkommen neutralisirt wird, so dass also weder freie Lab- noch Antilabelemente bestehen, als Lo-Dosis bezeichnen, ein derartiges Gemisch als Lo-Gemisch. Es entspricht dieses dem Vorgehen Ehrlich's bei der Bestimmung des Diphtherieserums, bei der als Lo-Menge des Diphtheriegiftes dasjenige Quantum bezeichnet wird, welches durch die willkürlich gewählte Immunitätsinheit des Serums eben vollkommen neutralisirt wird. Natürlich kann man ebenso gut bei der Lo-Bestimmung von einer constanten Labmenge ausgehen.

Für die Lo-Bestimmung ist es nun die erste Voraussetzung, die Versuchsbedingungen festzustellen, in denen die vollkommene gegenseitige Sättigung von Lab und Antilab erfolgt unter Bedingungen, die eine Zerstörung des Labs durch irgendwelche andere Einflüsse ausschliessen. Schon aus diesem Grunde war es klar, dass bei der Wärmemethode, von der wir eingangs gezeigt haben, dass sie eine Zerstörung von Lab bedingt, die Lo-Bestimmung unrichtige Resultate ergibt: in der That fanden wir, dass, wie die folgende Tabelle 8 zeigt, bei der Wärmemethode anscheinend mehr Lab durch eine

bestimmte Serummenge neutralisirt wird, als bei der Kältemethode. Dass hierbei nicht nur Zerstörung durch Wärme, sondern auch andere Factoren mitwirken, zeigten die weiteren Untersuchungen.

Tabelle Nr. 8.

Lo-Bestimmung Lab + Pferdeserum 15 Min. Zimmertemperatur.

| 1% ige Lablösung | Pferdeserum | Kältemethode | Wärmemethode |
|---------------------|-------------|--------------|--------------|
| 0.5 ccm | 1.16 ccm | ○ | ○ |
| | 1.12 | ○ | ○ |
| | 1.08 | ○ | ○ |
| | 1.04 | | ○ |
| | 1.00 | + | ○ |
| | 0.96 | + | ○ |
| | 0.92 | + | ○ |
| | 0.88 | + | ○ |
| | 0.84 | + | ○ |
| | 0.80 | + | ○ |
| | 0.76 | + | ○ |
| | 0.72 | + | ○ |
| | 0.68 | + | ○ |
| | 0.64 | + | + |
| | 0.60 | + | |

+ fest; = part. Gerinnsel; ○ flüssig.

Es wurde zunächst eine Mischung von Lab und Pferdeserum hergestellt, die so gewählt war (0,5 1% ige Lablösung + 0,72 Pferdeserum), dass, wenn die Reagensröhrchen mit derselben und 10 ccm Milch direct in das Wasserbad von 38—40° gesetzt wurden, gerade keine Gerinnung eintrat. Es war dies also eine Lo-Mischung nach dem Wärmeverfahren. Diese Lo-Mischung enthielt aber, wie oben gezeigt, nach der Kältemethode geprüft, noch einen erheblichen Lab-Ueberschuss. Nun untersuchte ich, ob dieser Lab-Ueberschuss constant bleibt, oder sich ändert, wenn das Gemisch längere Zeit stehen bleibt. Ich liess also zu diesem Behufe die Mischungen von Lab und

Serum 16, 32, 48, 64 und 128 Minuten bei Zimmertemperatur stehen und suchte nach dieser Zeit das noch vorhandene active Lab zu bestimmen. Der dazu nöthige Weg war ziemlich umständlich. Er bestand darin, dass von jeder einzelnen Zeitfraction 5 Reagensröhrchen angestellt wurden. Eines von diesen Röhrchen kam sofort nach Milchzusatz in den Eisschrank. In 4 anderen Röhrchen wurde bestimmt, welche Zeit der Erwärmung auf $38-40^{\circ}$ nothwendig ist, um das Gemisch auf den Lo-Werth der Kältemethode überzuführen. Wir fanden, s. Tab. Nr. 9, dass man nach 76 Minuten Zimmertemperatur das Gemisch 50 Minuten erwärmen muss, um es völlig unwirksam zu machen. Bei einer vorgängigen Einwirkung von 32 Minuten brauchte man nur 30 Minuten zu erwärmen, um Lo zu erreichen, bei einer Einwirkung von 64 Minuten nur mehr 15 Minuten, während bei einer Dauer von 128 Minuten schon nach 6 Minuten Erwärmen die Gerinnung ausblieb. Eine besondere Kontrolle, die aus der Zimmertemperatur sofort in den Eisschrank kam (1. Columne), zeigte, dass nach 128 Minuten gegenseitiger Berührung bei Zimmertemperatur das freie Lab beinahe vollkommen verschwunden war, indem nur noch partielle Gerinnung eintrat. Es geht aus diesem Versuch hervor, dass schon bei Zimmertemperatur eine bestimmte Menge Serum successive immer grössere Mengen Lab unwirksam macht, so dass bei längerer Dauer des Versuchs schliesslich die Grenzwerte von Zimmertemperatur und $38-40^{\circ}$ sich nähern.

Das Verhalten tritt noch besser vor Augen bei folgender Vornahme des Versuchs. Drei Reihen Reagensgläschen mit Lo-Mischung, die nach dem Wärmeverfahren bestimmt ist, wurden verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, und zwar eine Reihe der Zimmertemperatur, die andere mit gleichem Inhalt — 32° C., und die dritte 40° C. Nach 5, 10, 15 u. s. w. Minuten, wie es in der Tabelle Nr. 5 gezeigt ist, wurde aus jeder Reihe ein Probirgläschen genommen, 10 ccm Milch hinzugegossen, und diese Mischung bis zum folgenden Tage in den Eisschrank gebracht, um darauf ins Wasserbad von $38-40^{\circ}$ C. zu kommen.

Tabelle Nr. 9.

| Die Zeit der gegenseitigen Berührung Lab und Blutserum in Lo-Mischung vor dem Zusatz der Milch bei Zimmertemperatur | Der Aufenthalt der Lo-Mischung im Wasserbad bei 38–40° nach dem Zusatz von 10 ccm Milch | | | | |
|---|---|--------|---------|---------|---------|
| | 0 | 6 Min. | 15 Min. | 30 Min. | 50 Min. |
| 16 Minuten | + | + | + | + | ○ |
| 32 | + | + | + | ○ | ○ |
| 48 | + | + | ○ | ○ | ○ |
| 64 | + | + | ○ | ○ | ○ |
| 128 | — | ○ | ○ | ○ | ○ |

+ fest; + fast fest; — kleines Gerinnsel; ○ flüssig; Lo = 0.5 ccm 1%ige Lablösung + 0.72 ccm Pferdeserum.

Tabelle Nr. 10.

| Die gegenseitige Berührung Lab und Pferdeserum in Lo-Mischung (0.5 ccm 1%ige Lablösung + 0.72 ccm Pferdeserum) | Bei Zimmer-temperatur | Bei 32° C. | Bei 40° C. |
|--|-----------------------|------------|------------|
| 5 Minuten | + | + | ○ |
| 10 | + | + | ○ |
| 16 | + | ○ | ○ |
| 32 | + | ○ | ○ |
| 48 | + | ○ | ○ |
| 64 | + | ○ | ○ |
| 128 | — | ○ | ○ |

Auf solche Weise verschwand das freie Lab fast complet aus der Mischung bei Zimmertemperatur nach 128 Minuten, und complet bei + 32° C. nach 16 Minuten, und bei 40° C. fand es sich schon nach 5 Minuten nicht mehr vor.

Es ist ohne Weiteres klar, dass das Resultat dieser Versuche es anscheinend unmöglich macht, eine genaue Neutralisation des Labs durch das Antilab vorzunehmen, da die Wirkung in hohem Grade wechselnd ist.

Es war vor Allem von Interesse, die Maximalmenge Lab zu bestimmen, die das Pferdeserum bei der Einwirkung auf das Lab bei einer Temperatur von $36-40^{\circ}$ zu neutralisiren im Stande ist.

Zu diesem Zweck bereitete ich sechs Serien Reagensgläschen vor, von denen jedes je 0,5 cem 1%ige Lablösung und in absteigender Menge Pferdeserum enthielt. Das Volumen der Flüssigkeit wurde ausgeglichen und die Reagensgläschen kamen in den Brutschrank bei 37° C. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 Stunden wurde je eine Serie Gläschen aus dem Brutschrank genommen, in jedes derselben je 10 cem Milch gegossen, diese Mischung bis zum folgenden Tage in den Eisschrank ($+ 8^{\circ}$ C.) gestellt, und darnach erst ins Wasserbad von $38-40^{\circ}$ C.

Nach einstündigem Verweilen im Brutschrank hatte die Quantität Serum, die zum Neutralisiren von 0,5 cem Lab erforderlich ist, bedeutend abgenommen und betrug 0,42 cem gegenüber 1,08 nach 15 Minuten Zimmertemperatur. Dieses Abnehmen verlangsamte sich in den 2 folgenden Stunden, um schliesslich, gewöhnlich in 3 Stunden, eine constante Grösse für L_0 zu ergeben, die nach 4, 5 und 6 Stunden unverändert blieb. Nach 2 Stunden betrug in diesem Fall L_0 0,36 cem Serum, nach 3 und 4 Stunden 0,28 cem.

Wir sind also hier zu einem zweiten L_0 -Werthe gelangt, dessen Wesen aufzuklären uns durch weitere Untersuchungen gelang.

Den Schlüssel für das Verständniss dieser Erscheinung lieferte uns das Verhalten des Ziegenserums. Das Ziegenserum übt, wie bereits Morgenroth, der mit der Kältemethode arbeitete, festgestellt hatte, eine Antilabwirkung nicht aus. Ich selbst machte dieselbe Beobachtung bei meiner üblichen Bestimmungsmethode mit 15 Minuten langem Verweilen bei Zimmertemperatur. Dagegen beobachtete ich, dass nach dreistündigem Einwirken von Ziegenserum auf Lab bei 37° eine sehr erhebliche Verminderung der labenden Wirkung eintrat. 1 cem Ziegenserum neutralisirte nach dreistündiger Einwirkung bei 37° 500—700 einfach labende Dosen. So neutralisirte z. B. in einem Versuch 1,0 cem Ziegenserum 0,4 cem

1^o eige Lablösung, während die eben labende Dosis 0,0007 betrug.

Das Ziegenserum behielt beim andauernden Erwärmen, auch nach zweistündiger Einwirkung der Siedehitze, diese seine Wirkung bei, verlor sie dagegen ganz oder zum grössten Theil durch Dialysiren. Es war damit festgestellt, dass im Ziegenserum eine andere, labvernichtende Substanz vorhanden sein musste, die sich in den wichtigsten Eigenschaften von dem typischen Antilab unterschied, nämlich 1. durch Hitzebeständigkeit, 2. durch Dialysirbarkeit und die wir als Pseudo-Antilab bezeichnen. Diese zweite, gegen das Lab gerichtete Substanz findet sich nun auch im Pferdeserum und bedingt die Complication, die wir dann finden, wenn wir bei mittlerer und bei höherer Temperatur Lab und Pferdeserum längere Zeit auf einander einwirken lassen, indem sich dann die beiden labhemmenden Factoren superponiren.

Wir gelangen durch Dialysiren dazu, diesen Factor beim Pferdeserum vollkommen zu entfernen, und gelangen so zu einer Flüssigkeit, die eine Lösung des reinen typischen Antilabs darstellt. Dieses reine Antilab ist durch drei Eigenschaften charakterisirt: 1. Es wird durch Anti-Antilab in seiner Wirkung aufgehoben, 2. nach dem Erhitzen hat es seine Wirksamkeit eingebüsst, 3. es liefert bei der Lo-Bestimmung glatte und sichere Werthe.

Wir lassen hier einige unserer Versuche über den von mir gefundenen zweiten labhemmenden Factor folgen.

Das Pferdeserum wurde in fliessendem Leitungswasser im Laufe von 2 mal 24 Stunden dialysirt. Zur Verhinderung von Bacterienbildung wurden einige Stückchen Campher zugefügt. Nach der Dialyse wurde das Serum durch Centrifugiren vom ausgefallenen Euglobulin befreit und auf seine Antilabwirkung sowohl nach 15 Minuten bei Zimmertemperatur, wie nach dreistündigem Verweilen der Mischung Lab und Serum bei 37° C. untersucht.

Parallel hiermit wurde eine ebensolche Bestimmung mit nicht dialysirtem Pferdeserum vorgenommen. Bei diesen Versuchen nahm ich als constante Grösse in der Regel 0,15 cem

Pferdeserum und bestimmte genau die Menge Lab, die von dieser Menge Serum neutralisirt wird. (Lo-Dosis.)

Als regelmässige Erscheinung zeigte sich bei diesen Versuchen, dass die Antilabwirkung des Pferdeserums nach dem ersteren Verfahren nach der Dialyse nicht nur nicht abgenommen, sondern im Gegentheil stets um ein Geringes zugenommen hatte. So z. B., wenn 0,15 ccm nicht dialysirtes Serum 0,064 ccm 1° ige Lablösung neutralisirt hatte, neutralisirte nach der Dialyse die gleiche Menge Serum 0,075 ccm derselben.

Das gerade Entgegengesetzte jedoch liess sich beobachten bei der Lo-Bestimmung nach der zweiten Methode, d. h. nach dreistündiger gegenseitiger Berührung von Lab und Serum bei einer Temperatur von 37° C. Nämlich das dialysirte Serum hatte im Brutschrank beträchtlich kleinere Mengen Lab gebunden, als das gleiche Serum von der Dialyse.

Tabelle 11.

Methode I. (Lab und Serum in der gegenseitigen Berührung, 15 Minuten bei Zimmertemperatur.)

0,15 ccm Pferdeserum.

Dem nicht dialysirten Serum wird Leitungswasser bis zum Volumen der dialysirten Portion zugefügt.

| 1° ige Lablösung | Pferdeserum nicht dialysirt | Pferdeserum dialysirt | |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | Euglobulin abcentrifugirt | Euglobulin wieder gelöst |
| 0,07 ccm | — | + | + |
| 0,065 | — | + | + |
| 0,060 | — | + | ○ |
| 0,055 | — | ○ | ○ |
| 0,050 | — | ○ | ○ |
| 0,040 | ○ | ○ | ○ |

— fest; ○ flüssig.

Methode II. (Lab und Serum in der gegenseitigen Berührung,
3 Stunden bei 37° C.)

0.15 ccm Pferdeserum.

| 1%ige Lablösung | Pferdeserum nicht dialysirt | Pferdeserum dialysirt | |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | | ohne Euglobulin | Euglobulin wieder gelöst |
| 0.22 ccm | + | + | + |
| 0.20 | + | + | + |
| 0.18 | ○ | + | + |
| 0.16 | ○ | + | + |
| 0.14 | ○ | + | + |
| 0.12 | ○ | + | + |
| 0.10 | ○ | + | + |
| 0.095 | ○ | + | + |
| 0.090 | ○ | + | + |
| 0.085 | ○ | + | + |
| 0.080 | ○ | + | + |
| 0.075 | ○ | + | + |
| 0.070 | ○ | + | + |
| 0.065 | ○ | + | + |
| 0.060 | ○ | ○ | ○ |
| 0.055 | ○ | ○ | ○ |
| 0.050 | ○ | ○ | ○ |

+ fest; ○ flüssig.

Es erhob sich nun die Frage, ob der bei der Temperatur des Brutschranks wirkende Stoff zusammen mit dem Euglobulin ausgefallen oder durch die Membran gegangen war? Ich stellte deshalb folgenden Versuch an. Das Pferdeserum wurde in 2 mal 24 Stunden dialysirt, dann sorgfältig mit dem ausgefallenen Niederschlag geschüttelt und in zwei gleiche Portionen getheilt. Die eine wurde in der Centrifuge geschleudert und behutsam vom Bodensatz abgegossen; in der anderen wurde das ausgeschiedene Euglobulin durch Hinzufügen von 0.5% Kochsalz von Neuem aufgelöst. Es zeigte sich nun, dass beide Portionen die gleiche Wirkung auf Lab ausübten. (Siehe

Tabelle 11.) Mithin müssen wir folgern, dass ein bedeutender Theil der Stoffe, die die Labwirkung bei 37° C. nach 3 Stunden beeinträchtigen, mit Leichtigkeit die Thiermembrane durchdringt.

Wir bestimmten nachstehende Grösse für L_0 (siehe Tabelle 11):

I. Nicht dialysirtes Pferdeserum:

nach Methode I: $L_0 = 0,04 \text{ Lab} + 0,15 \text{ Serum.}$

» » II: $L_0 = 0,18 \text{ »} + 0,15 \text{ »}$

II. Dialysirtes Pferdeserum:

A. Erythrocyten entzogen:

nach Methode I: $L_0 = 0,055 \text{ Lab} + 0,15 \text{ Serum.}$

» » II: $L_0 = 0,06 \text{ »} + 0,15 \text{ »}$

B. Erythrocyten gelöst:

nach Methode I: $L_0 = 0,06 \text{ Lab} + 0,15 \text{ Serum.}$

» » II: $L_0 = 0,06 \text{ »} + 0,15 \text{ »}$

Mithin nähern sich die L_0 -Werthe, die mit dialysirtem Pferdeserum nach 15 Minuten gegenseitiger Berührung von Lab und Serum bei Zimmertemperatur, und die nach 3 Stunden bei 37—36° C. im Brutschrank bestimmt sind, einander bis zu vollkommener Uebereinstimmung. (0,055 cem — 0,06 cem Lab nach beiden Methoden.)

Es folgert hieraus die äusserst wichtige Forderung, dass man bei allen Bestimmungen des normalen typischen Antilabs dialysirtes Serum verwendet.

Weiterhin untersuchte ich das Verhalten der Antilabwirkung des Pferdeserums gegenüber höheren Temperaturen.

Ich erhitzte das Blutserum, das ich fünfmal mit Leitungswasser verdünnt hatte.

Hierbei bietet sich die Möglichkeit, das Serum kochen zu lassen, ohne ein Coaguliren des Eiweisses befürchten zu müssen. Das in solcher Weise verdünnte und eine Stunde lang gekochte Pferdeserum besass bei 15 Minuten langem Einwirken bei Zimmertemperatur nur mehr in ganz geringem Maasse die Fähigkeit, das Lab zu neutralisiren.

Aber wenn dieses nichtdialysirte gekochte Serum

während 3 Stunden bei der Temperatur des Brutschrankes auf Lab wirkte, so ergab sich: $Lo = 0,2 \text{ Serum} + 0,16 \text{ Lab}$, das d. h. 1 cem neutralisirte 228 Minimalgerinnungsdosen.

Es handelt sich also bei dem Pseudo-Antilab um eine im hohen Grad thermostabile Substanz.

Ueber die Natur und Wirkungsweise der Substanz wagen wir keine Vermuthung. Auf jeden Fall beruht ihre Function nicht auf einer Kalkbindung, wie die vollständige Proportionalität in der Wirkung verschiedener Mengen derselben zeigt (siehe Tabelle 12).

Die Substanz wirkt auf das Lab direct ein und ist bisher nur durch die von uns beschriebenen Eigenschaften gekennzeichnet.

Tabelle 12.

Lo-Bestimmung mit Ziegenserum nach 3 Stunden bei 37° C.
(Eben labende Dosis = 0,0007 1°-ige Lablösung.)

| Ziegenserum | 1°-ige Lablösung | Resultat |
|-------------|------------------|----------|-------------|------------------|----------|-------------|------------------|----------|-------------|------------------|----------|
| 1.0 | 0.7 | + | 0.5 | 0.35 | + | 0.25 | 0.25 | + | 0.1 | 0.07 | + |
| 1.0 | 0.6 | + | 0.5 | 0.30 | + | 0.25 | 0.2 | + | 0.1 | 0.06 | + |
| 1.0 | 0.5 | + | 0.5 | 0.25 | + | 0.25 | 0.15 | + | 0.1 | 0.05 | + |
| 1.0 | 0.4 | ○ | 0.5 | 0.2 | ○ | 0.25 | 0.1 | ○ | 0.1 | 0.03 | ○ |
| 1.0 | 0.3 | ○ | 0.5 | 0.15 | ○ | 0.25 | 0.08 | ○ | 0.1 | 0.02 | ○ |
| — | — | — | 0.5 | 0.1 | ○ | 0.25 | 0.06 | ○ | 0.1 | 0.01 | ○ |

+ fest; ○ flüssig.

Die so gefundenen Ergebnisse berechtigen mich zu nachstehender Zusammenfassung:

1. Im Blutserum des Pferdes existirt, ausser dem specifischen Antilab ein Pseudo-Antilab, das die Labwirkung aufhebt, wobei es bei Zimmertemperatur langsam, bei 37° aber bedeutend schneller und energischer wirkt. Diese Substanz unterscheidet sich

vom Antilab dadurch, dass sie beim Kochen nicht vernichtet wird und verhältnissmässig leicht durch Thiermembranen dringt.

2. Das im Laufe von 2 mal 24 Stunden dialysirte Pferdeserum ist frei von dem Pseudo-Antilab und neutralisirt das Lab nur dank der Anwesenheit des specifischen Antilabs.

3. Diese Verbindung des Antilabs des Pferdeserums mit dem Lab ist schon nach 15 Minuten gegenseitiger Berührung bei Zimmertemperatur vollendet.

4. Eine correcte Methode der Lo-Bestimmung schliesst in sich, dass man im Laufe von 2 mal 24 Stunden dialysirtes Pferdeserum verwendet und zur Bestimmung des freien Labs das von Morgenroth in Vorschlag gebrachte Verfahren zur Quantitätsbestimmung des Labs befolgt, d. h. die Reagensgläschen mit der Lab-Serum-Milch-Mischung auf 24 Stunden in den Eisschrank stellt, bevor man sie der Einwirkung einer Temperatur aussetzt, die für die Wirkung des Labs geeigneter ist (38—40°).