

Die Wirkung des Pankreassaftes auf das Hämolysin des Cobragiftes und seine Verbindungen mit dem Antitoxin und Lecithin.

Von

Yutaka Teruuchi.

(Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie, Direktor: Geheimrat Prof. Dr. P. Ehrlich. [Experimentell-biologische Abteilung: Dr. H. Sachs.])
(Der Redaktion zugegangen am 19. April 1907.)

Im folgenden möchte ich mir erlauben, über einige Beobachtungen zu berichten, die aus äußeren Ursachen unvollständig bleiben mußten, die aber doch einiges Interesse bieten, um einen kurzen Bericht zu rechtfertigen. Es handelt sich um die Einwirkung der Verdauungssäfte auf das Cobrahämolysin und seine Verbindungen, die es einerseits mit dem Lecithin, andererseits mit dem Antitoxin eingeht. Zur Verfügung stand mir reiner Pankreassaft und der zur Aktivierung notwendige Darmsaft, die beide in trockenem Zustande waren und vom Hunde stammten. Ich verdanke sie dem freundlichen Entgegenkommen von Herrn Dr. London in St. Petersburg. Das geeignete Verdauungsgemisch bestand aus 0,25 g getrockneten Pankreassafts + 0,07 g getrockneten Darmsafts + 10 ccm physiologischer (0,85%iger) Kochsalzlösung. Das Gemisch blieb 1—2 Stunden bis zur klaren Lösung bei 37° stehen. Es wirkte auf Eiweiß proteolytisch (Mettsche Methode) und stark lipolytisch auf Fett und in Übereinstimmung mit den Angaben von P. Mayer, sowie Schumoff-Simanowski und Sieber¹⁾ auch auf Lecithin, wie besondere Vorversuche zeigten. Dieses Verdauungsgemisch wurde zur Einwirkung auf Cobragift, Lecithin

¹⁾ P. Mayer, Biochemische Zeitschrift, Bd. 1, S. 39, 1906. C. Schumoff-Simanowski und N. Sieber, Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 50, 1906. Cf. auch C. Neuberg und E. Rosenberg, Berliner klin. Woch., 1907, Nr. 2.

und Antitoxin benutzt.¹⁾ Zur Kontrolle wurde stets ein Versuch mit dem zuvor durch $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen auf 70° inaktivierten Gemisch angestellt.

Zur Untersuchung der hämolytischen Wirksamkeit des Cobragifts wurde Ziegenblut verwandt. Die Giftlösung wurde in absteigenden Mengen zu je 1 ccm 5%iger Blutaufschwemmung gefügt. Die Ablesung des Resultates erfolgte nach zweistündigem Verbleiben bei 37° und nachfolgendem 18–20stündigem Aufenthalt im Eisschrank. Zur Aktivierung des Cobragifts diente je 0,1 ccm einer 0,1%igen Lecithinlösung. Die hämolytische Wirksamkeit des Cobragiftes ist aus folgender Tabelle 1 zu ersehen.

Tabelle 1.

Hämolytische Wirksamkeit des Cobragiftes.
1 ccm 5%iges Ziegenblut + 0,1 ccm 0,1%iges Lecithin.

Mengen des Cobragifts ($\frac{1}{10000}$ %ige Lösung) ccm	Hämolyse
1,0	komplett
0,75	„
0,5	fast komplett
0,35	mäßig
0,25	„
0,15	wenig
0	0

Die Einwirkung des Pankreassaftes auf Cobragift wurde in der Weise vorgenommen, daß 4 ccm $\frac{1}{200}$ %ige Cobragift-

¹⁾ Besondere Kontrollversuche hatten gezeigt, daß weder Pankreassaft noch Darmsaft allein die beobachteten Wirkungen ausübten. Offenbar spielt bei der Fermentwirkung die chemische Struktur der Toxine eine wesentliche Rolle. So fand Sieber (Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI), daß Darmsaft Diphtherietoxin, aber nicht Tetanustoxin zerstört, während beide Toxine durch aktivierten Pankreassaft angegriffen wurden. In meinen Versuchen war auch reiner, frischer, flüssiger Hundedarmsaft, der mir gleichfalls von Herrn Dr. London in gütiger Weise überlassen wurde, nicht imstande, auf das Cobragift, Antivenin und Cobragiftlecithin einzuwirken.

lösung mit 1 ccm Pankreassaft 18 Stunden bei 37° belassen wurden. Zur Kontrolle wurde ein Gemisch mit inaktiviertem Saft in der gleichen Weise behandelt. Nach 18 Stunden wurden die Gemische mit physiologischer Kochsalzlösung auf 8 ccm aufgefüllt, so daß also eine $\frac{1}{400}$ ige Giftkonzentration resultierte. Die Wertbestimmung zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2.

1 ccm 5%iges Ziegenblut + 0,1 ccm 0,1%iges Lecithin.

Mengen des Cobragiftes ($\frac{1}{400}$ ige Lösung) ccm	Mit aktivem Ver- dauungssaft digeriertes Gift	Mit inaktiviertem Ver- dauungssaft digeriertes Gift
1,0	wenig	komplett
0,5	Spur	„
0,25	0	„
0,15	0	„
0,1	0	„
0,05	0	„
0,025	0	fast komplett
0,015	0	wenig
0,01	0	„
0	0	0

Es ergibt sich also, daß der Pankreassaft das Cobrahämolyisin in erheblichem Grade angreift und es seiner Wirksamkeit beraubt.

In gleicher Weise ließ sich eine deutliche, wenn auch nicht so markante Einwirkung des Verdauungsgemisches auf die aktivierende Funktion des Lecithins konstatieren.

1 ccm 1%ige Lecithinlösung¹⁾ wurde mit 1 ccm des Pankreassaftes, in einem gleichzeitig angestellten Kontrollversuch mit 1 ccm des inaktivierten Gemisches 18 Stunden lang bei 37° digeriert. Sodann wurden je 8 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt und die aktivierende Wirkung dieser einer 0,1%igen Lecithinlösung entsprechenden Gemische geprüft (s. Tabelle 3).

¹⁾ Lecithin wurden 10% in Methylalkohol gelöst und aus dieser Originallösung durch 10faches Verdünnen mit 0,85%iger Kochsalzlösung eine 1%ige Lösung hergestellt.

Tabelle 3.

1 ccm 5% iges Ziegenblut + 0,1 ccm 0,1% iges Cobragift.

Menge des Lecithins (0,1% ige Lösung) ccm	Mit aktivem Gemisch digeriertes Lecithin	Mit inaktiviertem Gemisch digeriertes Lecithin
0,1	komplett	komplett
0,075	„	„
0,05	stark	„
0,035	mäßig	„
0,025	wenig	mäßig
0,015	Spur	„
0	0	0

Im Gegensatz zu den beiden Komponenten (Cobragift und Lecithin) wird das resultierende Reaktionsprodukt, das Lecithid des Cobragiftes, in keiner Weise durch den Pankreassaft angegriffen. Zur Demonstration dieser Tatsache wurde in folgender Weise vorgegangen:

4 ccm $\frac{1}{200}$ % iges Cobragift + 0,15 ccm 10% ige Lecithinlösung (in Methylalkohol) blieben zunächst 24 Stunden im Eisschrank stehen, um die Lecithidbildung eintreten zu lassen. Sodann wurde 1 ccm des Pankreassaftes zugesetzt, das Gemisch 18 Stunden bei 37° digeriert und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 8 ccm aufgefüllt. Ein Parallelversuch unterschied sich nur durch die Verwendung inaktivierten Verdauungssaftes. Die hämolytische Wirksamkeit der Gemische ist in Tabelle 4 notiert.

Tabelle 4.

1 ccm 5% iges Ziegenblut.

Mengen der Gemische (entsprechend einer $\frac{1}{400}$ % igen Cobragift- lösung) ccm	Mit aktivem Ver- dauungssaft digeriertes Gemisch	Mit inaktiviertem Ver- dauungssaft digeriertes Gemisch
0,1	komplett	komplett
0,075	„	„
0,05	stark	mäßig
0,035	wenig	wenig
0,025	Spur	Spur
0,015	0	0
0	0	0

Die Tabelle zeigt, daß ein Gemisch von Cobragift und Lecithin, das eine Zeitlang vorher gestanden hat, im Gegensatz zum nativen Cobragift nicht mehr durch den Pankreassaft angegriffen wird. In gleicher Weise erwies sich übrigens das von Kyes in reinem Zustande isolierte Cobralecithid der Pankreasverdauung gegenüber resistent. Zu diesem Versuche diente das von Kyes in reinem Zustande gewonnene komplette Lecithidpräparat, das ein weißes Pulver darstellt.

4 ccm einer 0.1%igen Lecithidlösung + 1 ccm Pankreassaft blieben 18 Stunden bei 37° stehen. Kontrolle mit inaktiviertem Pankreassaft. Auffüllen der Gemische auf 8 ccm. Resultierende Lecithidkonzentration = 0.05% (s. Tab. 5).

Tabelle 5.

Mengen des Cobralecithids (0.05%) ccm	Hämolyse von 1 ccm 5%iges Ziegenblut	
	a durch mit aktivem Pankreassaft digeriertes Cobralecithid	b durch mit inaktiviertem Pankreassaft digeriertes Cobralecithid
0.1	komplett	komplett
0.075	„	„
0.05	wenig	mäßig
0.025	Spur	Spur
0.015	„	„
0	0	0

Wir haben also in dem Verhalten zum Pankreasferment eine weitere neue Eigenschaft kennen gelernt, welche das Cobralecithid in markanter Weise von den Ausgangsmaterialien, und insbesondere von dem nativen Cobragift differenziert.

Weitere Versuche betrafen die Wirkung des Pankreassaftes auf das Antitoxin des Schlangengiftes. Zur Anwendung kam das durch Calmette von Pferden gewonnene «Antivenin».

1 ccm Antivenin + 1 ccm Pankreassaft wurden ebenso wie die gleichzeitig mit inaktiviertem Pankreassaft angestellte Kontrolle 18 Stunden

bei 37° gehalten. Sodann wurden die Gemische mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 ccm aufgefüllt.

Absteigende Mengen dieser Gemische wurden mit je 0,15 ccm einer $\frac{1}{1000}$ ige Cobragiftlösung (entsprechend 2 komplett lösenden Dosen) 4 Stunden lang bei Zimmertemperatur digeriert, worauf Zusatz von 1 ccm 5% iges Ziegenblut + 0,1 ccm einer 0,1% igen Lecithinlösung erfolgte. Das Ergebnis zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6.

1 ccm 5% iges Ziegenblut + 0,15 ccm $\frac{1}{1000}$ ige Cobragift + 0,1 ccm 0,1% iges Lecithin.

Mengen des Antivenins ccm	Mit aktivem Pankreassaft digeriertes Antivenin	Mit inaktiviertem Pankreassaft digeriertes Antivenin
0,1	Spur	0
0,05	»	0
0,025	wenig	0
0,015	komplett	0
0,01	»	0
0,005	»	Spur
0,0025	»	stark
0,0015	»	komplett
0,001	»	»
0	»	»

Nachdem somit festgestellt war, daß der Pankreassaft sowohl auf das native Cobragift, als auch auf das Antivenin in erheblichem Grade zerstörend einwirkt, mußte es von Interesse erscheinen, zu untersuchen, wie sich ein neutralisiertes Gemisch von Cobragift und Antitoxin der Wirkung des Pankreassaftes gegenüber verhält.

Das neutralisierte Gemisch bestand aus 36 ccm $\frac{1}{100}$ iger Cobragiftlösung + 12 ccm Antivenin + 24 ccm 0,85% iger Kochsalzlösung. Dieses Gemisch, in dem eine $\frac{1}{200}$ ige Cobragiftkonzentration resultiert, erwies sich bereits nach 2stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur als völlig neutralisiert, wie es Tabelle 7 zeigt.

Tabelle 7.

1 ccm 5%iges Ziegenblut + 0,1 ccm 0,1%iges Lecithin.

Menge des neutralen Gemisches ccm	Hämolyse
1,0	}
0,5	
0,25	
0,15	
0	

Das Neutralgemisch blieb nunmehr noch 48 Stunden lang im Eisschrank stehen. Sodann wurden 4 ccm desselben mit 0,15 ccm 0,85%iger Kochsalzlösung und 1 ccm Pankreassaft 18 Stunden bei 37° digeriert. Das Verdauungsgemisch wurde sodann auf 8 ccm aufgefüllt, so daß also eine $\frac{1}{400}$ %ige Cobragiftkonzentration vorhanden war. Gleichzeitig wurde der entsprechende Versuch mit inaktiviertem Pankreassaft angestellt. Die hämolytische Wirkung der Gemische ist in Tabelle 8 notiert.

Tabelle 8.

1 ccm 5%iges Ziegenblut + 0,1 ccm 0,1%iges Lecithin.

Menge der Gemische ccm	Mit aktivem Pankreassaft digeriertes Neutralgemisch	Mit inaktiviertem Pankreassaft digeriertes Neutralgemisch
1,0	komplett	}
0,5	·	
0,35	·	
0,25	stark	
0,15	wenig	
0,1	Spur	
0	0	

Die Tabelle zeigt das auffällige Resultat, daß das neutralisierte Gemisch durch die Einwirkung des Pankreasferments wieder hämolytisch wirksam geworden ist. Zwar ist nicht entfernt die gesamte Toxinmenge wieder frei geworden, aber doch immerhin etwa $\frac{1}{10}$ der überhaupt vorhandenen Giftmenge, und, was besonders bemerkenswert

erscheint, ist der Umstand, daß erheblich mehr Toxin in wirksamer Form vorhanden ist, als man nach dem Ergebnis von Tabelle 2 bei der Einwirkung des Pankreassaftes auf das Toxin allein erwarten durfte. Es muß also der Pankreassaft einmal die neutrale Verbindung Toxin-Antitoxin gespalten haben, dann aber in seiner Wirkung auf das Toxin gehemmt worden sein. Man dürfte nicht fehlgehen, wenn man annimmt, daß diese Hemmung dadurch bedingt ist, daß das Antitoxin resp. das Serumeiweiß für das Pankreasferment ein geeigneteres Objekt darstellt als das Cobragift, und daß daher in einem Gemisch beider zunächst das Antitoxin der Zerstörung unterliegt. Die Restitution des Giftes wird man sich dann am einfachsten in der Weise vorstellen können, daß durch die verdauende Wirkung des Pankreasferments auf das Antitoxinmolekül das letztere dermaßen verändert wird, daß es das bereits gebundene Toxin wieder frei werden läßt. Es handelt sich also um analoge, in gewisser Hinsicht aber entgegengesetzte Verhältnisse, wie in den bekannten Versuchen Morgenroths,¹⁾ dem es gelang, aus dem neutralisierten Gemisch von Cobragift und Antitoxin die beiden Komponenten durch Einwirkung von Salzsäure wieder zu gewinnen. Das Gegensätzliche ist darin gelegen, daß bei dem Vorgehen Morgenroths das Toxinmolekül durch die Salzsäure derart umgewandelt wird, daß es mit dem Antitoxin nicht reagiert, durch Lecithinzusatz aber in das hämolytische Lecithid übergeführt werden kann, während bei den von mir beschriebenen Versuchen durch den Angriff des Antitoxins letzteres dauernd seiner Toxin bindenden Funktion beraubt wird. Theoretisch betrachtet, stellt der von mir erhobene Befund offenbar eine ergänzende Bestätigung der schönen Versuchsergebnisse Morgenroths dar, indem er auf anderem Wege zu denselben Resultaten führt, daß es nämlich gelingt, die neutralisierte Verbindung von Toxin und Antitoxin zu spalten.

Im Anschluß daran möchte ich noch eine merkwürdige Beobachtung nicht unerwähnt lassen, welche darauf hinzuweisen

¹⁾ J. Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr., 1905, Nr. 50, und Arbeiten aus dem patholog. Institut in Berlin, 1906.

scheint, daß die Restitution des Toxins ausbleibt, wenn das neutrale Toxin-Antitoxingemisch vorher Lecithin gebunden hat.

4 ccm des im vorigen Versuch beschriebenen Neutralgemisches wurden nach 24stündigem Lagern im Eisschrank mit 0,15 ccm einer 10%igen Lecithinlösung versetzt und nochmals 24 Stunden aufbewahrt, sodann erfolgte Zusatz von 1 ccm Pankreassaft, in dem gleichzeitig angesetzten Kontrollversuch Zusatz von 1 ccm inaktiviertem Pankreassaft. Die Gemische wurden 18 Stunden bei 37° gehalten und sodann auf 8 ccm aufgefüllt, so daß eine 1,400%ige Giftkonzentration resultierte. Die hämolytische Wirkung zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9.

Menge der Gemische ccm	Hämolyse von 1 ccm 5%igem Ziegenblut durch das	
	mit aktivem Pankreassaft digerierte Gemisch	mit inaktiviertem Pankreassaft digerierte Gemisch
1,0	fast komplett	fast komplett
0,5	wenig	wenig
0,25	Spürchen	Spur
0,15	»	Spürchen
0,1	»	•
0	0	0

Die hämolytische Wirkung, welche aus der Tabelle ersichtlich ist, dürfte wohl durch das Lecithin allein bedingt sein, da das zum Versuch verwandte Gemisch ja einer ca. 0,2%igen Lecithinlösung entspricht. Dagegen fällt der Gegensatz, in dem Tabelle 9 zu dem in Tabelle 8 notierten Resultat steht, auf. Augenscheinlich ist das unter dem Einfluß des Pankreassaftes entstehende Freiwerden des Toxins aus der neutralen Toxin-Antitoxinverbindung durch den vorherigen Zusatz des Lecithins vermieden worden. Man könnte sich demnach vorstellen, daß die Bindung: Toxin-Antitoxin durch die weitere Verankerung des Lecithins an das Toxin eine Festigung erfährt, welche die Toxin restituierende Wirkung des Pankreassaftes verhindert. Weitere Untersuchungen, auf deren Fortführung

ich leider aus äußeren Gründen verzichten mußte, werden für die Analyse der eigenartigen Erscheinung erforderlich sein.

Zusammenfassung.

1. Reiner, mit Darmsaft aktivierter Hundepankreassaft wirkt zerstörend auf das Cobrahämolyisin, das Antivenin, aber nicht auf das Cobralecithid. Reiner Hundedarmsaft übt diese Wirkungen nicht aus.

2. Pankreassaft restituiert aus einem neutralen Gemisch von Cobragift und Antitoxin einen Teil des Toxins.

3. Nach Vereinigung des Toxin-Antitoxingemisches mit dem Lecithin scheint das Freiwerden des Toxins unter dem Einfluß des Pankreassaftes nicht mehr zu erfolgen.