

# Über Hemmung der Labwirkung.

## I. Mitteilung.

Von

S. G. Hedin.

(Der Redaktion zugegangen am 13. April 1909.)

Gelegentlich früherer Untersuchungen über die antitrypsische Wirkung von nativem Serumalbumin habe ich gefunden:<sup>1)</sup>

1. Die Hemmung der Trypsinwirkung beruht in ausgesprochener Weise auf der Reihenfolge, in welcher die drei auf einander einwirkenden Substanzen vermischt werden. Wenn das Enzym und der Hemmungskörper zunächst vermischt werden und das Substrat nachher zugegeben wird, ist die Hemmung größer, als wenn Substrat und Hemmungskörper vermischt und das Enzym dann zugesetzt wird.

2. Die Hemmung wächst bis zu einer gewissen Grenze mit der Zeit, während welcher Enzym + Antikörper vor dem Zugeben des Substrats aufbewahrt werden.

3. Die so gefundene obere Grenze der Hemmung steigt mit der Temperatur, bei welcher die Mischung Enzym + Hemmungskörper gehalten wird, bevor das Substrat zugesetzt wird.

4. Die maximale Hemmung ist unabhängig von der Menge Wasser, welche während des Aufbewahrens der Enzym-Antikörpermischung zugegen ist, wenn nur dafür Sorge getragen wird, daß nach dem Zugeben des Substrats die Wassermenge in allen Proben die gleiche bleibt.<sup>2)</sup>

5. Wenn das native Serumalbumin mit 0,2%iger Essigsäure einige Stunden bei 37° gehalten wird, verliert es zum größten Teil sein Vermögen, in neutraler Lösung das Trypsin zu neutralisieren. In größeren Mengen zugegeben vermag es noch eine gewisse Hemmung auszuüben, aber dieselbe ist nun-

<sup>1)</sup> Journ. of physiol., Bd. XXXII, S. 390, 1905.

<sup>2)</sup> Bio-chemical Journ., Bd. I, S. 474, 1906.

mehr von der Reihenfolge, in welcher die Agenzien vermischt werden, unabhängig.<sup>1)</sup>

6. Wird eine Mischung von Enzym und Hemmungskörper so lange aufbewahrt, daß die maximale Hemmung erreicht ist, und dann wie eben angegeben mit Essigsäure behandelt, so wird das Enzym nicht wieder in wirksamer Form erhalten.<sup>2)</sup>

Diese Ergebnisse werden am einfachsten durch die Annahme erklärt, daß das Enzym in irreversibler oder nur schwer reversibler Weise am Hemmungskörper verfestigt wird, welche Verfestigung eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt und in ausgiebigerer Weise erfolgt je höher die Temperatur ist. Da auch das Substrat vor seiner Zersetzung mit dem Enzym sich verbindet, wird die am Hemmungskörper verfestigte Enzymmenge geringer in Gegenwart von dem Substrat als ohne dasselbe. Das Vermögen, das Enzym an sich zu verfestigen, verliert das native Serumalbumin unter Behandlung mit Essigsäure. Trotzdem wird das einmal am Hemmungskörper verfestigte Enzym nicht bei Behandlung mit Essigsäure wieder frei.

Deshalb könnte es vielleicht auch in Frage gestellt werden, ob nicht das Enzym unter der Einwirkung des Hemmungskörpers einfach zerlegt werde. Meine Versuche mit Trypsin geben keine direkte Antwort auf diese Frage; nur scheint es mir deswegen nicht um eine Abtötung sich zu handeln, weil die neutralisierte Enzymmenge in jedem Fall einen maximalen Betrag erreicht, welcher erst beim Zugelien von mehr Hemmungskörper wieder ansteigt. Das Vermögen des Hemmungskörpers, das Trypsin zu neutralisieren, wird also verbraucht, und in der Tat konnte ich auch nachweisen, daß derselbe mit Trypsin derart gesättigt werden kann, daß von neu zugesetztem Trypsin nichts mehr neutralisiert wird. Wenn das Enzym durch den Hemmungskörper schlechthin abgetötet wäre, dann würde der Prozeß nicht aufhören, bis alles Trypsin zerstört worden wäre. Meiner Ansicht nach würde es also am ehesten um eine irreversible oder nur sehr schwer reversible Verbindung zwischen dem Hemmungskörper und dem Trypsin sich handeln.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 412, 1907.

<sup>2)</sup> Bio-chemical Journ., Bd. I, S. 474, 1906.

Bekanntlich enthält normales Serum eine Substanz, welche die labende Wirkung des Chymosins auf Milch zu hemmen vermag (Hammarsten und Rödén).<sup>1)</sup> Die Hemmung wird nicht durch Dialyse des Serums aufgehoben. Pferdeserum hemmt am kräftigsten, aber auch Ochsen- und Kaninchen- und Schweineserum zeigen eine ausgesprochene Hemmung. Nach Fuld und Spiro enthält das Serum neben dem Hemmungskörper, welcher am Pseudoglobulin gebunden ist, auch eine labähnliche Substanz, welche in dem Euglobulin vorkommt.<sup>2)</sup> Da die Hemmungswirkung sehr leicht zu studieren ist, war es verlockend, zu prüfen, ob die oben für Trypsin und Serumalbumin erwähnten Befunde auch für Lab und Serum sich bestätigen lassen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in folgendem Bericht enthalten.

Das Lab wurde nach den Vorschriften Hammarstens aus Kalbsmägen bereitet;<sup>3)</sup> nur wurde die Salzsäure am Ende nicht neutralisiert, sondern durch Dialyse entfernt. Das Serum wurde in einigen Fällen durch Neutralisieren, Verdünnung mit Wasser und Dialyse für die Versuche vorbereitet; in anderen wurde das Dialysieren weggelassen. Das Neutralisieren ist deshalb nicht zu umgehen, weil Lab bei alkalischer Reaktion leicht zerstört oder jedenfalls unwirksam wird. Das einfach neutralisierte Serum scheint viel stärker hemmend zu wirken als das außerdem dialysierte, wie weiter unten des näheren erwähnt wird.

Die in einer Lablösung oder einer Mischung von Lab und Hemmungskörper vorhandene relative Menge freien Labs kann aus der für die Labung von Milch nötigen Zeit berechnet werden. Bei meinen Versuchen wurden immer 10 ccm Milch angewandt und zwar bei zu vergleichenden Proben die gleiche Milch. Das gebrauchte Volumen der Lablösung oder der Mischung von Lab und Hemmungskörper war in allen zu vergleichenden Proben dasselbe und überstieg in keinem Falle 2 ccm. In solchen Fällen, wo die Wirkung von einer Lablösung mit der von Mischungen aus Lab und Hemmungskörper zu vergleichen war, wurde der

<sup>1)</sup> Upsala läkaref. förh., Bd. XXII, S. 546, 1887.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 132, 1900.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LVI, S. 26, 1908.

Lablösung so viel Wasser in Kubikzentimetern zugegeben, wie in den übrigen Proben Kubikzentimeter Hemmungskörper vorhanden war. Alle Bestimmungen der Labungszeiten wurden bei 37° ausgeführt, und die gebrauchten Lösungen wurden auf diese Temperatur vorgewärmt, einige Fälle ausgenommen, wo die Lab-Hemmungskörpermischung behufs Bestimmung des Einflusses der Temperatur bei anderen Temperaturen gehalten wurde.

Bekanntlich gilt für die Labwirkung das Enzymzeitgesetz, welches besagt, daß, wenn in verschiedenen mit einander zu vergleichenden Proben verschiedene Enzymmengen (p) vorhanden sind, die für Labung nötigen Zeiten (t) den Labmengen umgekehrt proportional sind. Es ist also für alle Proben  $p \cdot t =$  eine Konstante, und da für alle Proben t bestimmt wird, können aus den erhaltenen Zeiten vergleichbare Zahlen für die Enzymmengen erhalten werden.<sup>1)</sup> Für kurze Labungszeiten (große Labmengen) habe ich das Gesetz weniger zuverlässig gefunden; für lange Zeiten (kleine Labmengen) wird derselbe auch wegen der Schwierigkeit, die Gerinnungszeit zu bestimmen, weniger brauchbar. Bei meinen Versuchen habe ich Gerinnungszeiten von 10—90 Minuten am brauchbarsten gefunden. Aber auch für Zeiten, welche außerhalb dieser Grenzen liegen, muß eine kurze Gerinnungszeit einer größeren Labmenge entsprechen als eine längere Zeit, wenn auch das obige Gesetz nicht streng gültig sein mag.

#### Einfluß der Reihenfolge des Mischens.

Versuch 1. Der Hemmungskörper war mit 1 Volumen Wasser verdünntes, neutralisiertes und dialysiertes Ochsen Serum. Die Agenzien werden in derselben Reihenfolge angeführt, in welcher dieselben zugesetzt wurden. In den Proben, wo Hemmungskörper und Lab zunächst vermischt wurden, wurde die Milch nach etwa 5 Minuten bei 37° zugefügt. Die Ziffern sind die Koagulationszeiten.

1 ccm Lab, 1 ccm Hemmungskörper oder Wasser.

Ohne Hemmungskörper	6 Min.
Milch + Hemmungskörper + Lab	9 „
(Hemmungskörper + Lab) 5 Min. + Milch.	Keine Labung in 3 Std.

<sup>1)</sup> Vgl. Ergebnisse d. Physiol., Bd. I, S. 468.

1 ccm Lab.  $\frac{1}{2}$  ccm Hemmungskörper.

Ohne Hemmungskörper	4 $\frac{1}{2}$ Min.
Milch + Hemmungskörper + Lab	4 $\frac{1}{2}$ „
(Hemmungskörper + Lab) 5 Min. + Milch.	Keine Labung in 2 Std.

Versuch 2. Pferdeserum, neutralisiert, verdünnt mit 1 Volumen H<sub>2</sub>O und dialysiert. Dasselbe wurde vor dem Gebrauch mit 9 Volumen H<sub>2</sub>O versetzt; von dem so erhaltenen Hemmungskörper wurde 1 ccm angewandt.

	0,5 ccm Lab	0,25 ccm Lab
Ohne Hemmungskörper	5 Min.	6 $\frac{1}{2}$ Min.
Milch + Hemmungskörper + Lab	5 $\frac{1}{2}$ „	9 $\frac{1}{2}$ „
(Hemmungskörper + Lab) 15 Min. + Milch	7 $\frac{1}{2}$ „	27 „

Aus diesen Versuchen ist also zu ersehen, daß die Reihenfolge des Mischens eine sehr große Rolle spielt und zwar in dem gleichen Sinne wie in dem Falle von Trypsin und Serumalbumin. Aus dem Versuch 2 geht außerdem hervor, daß der Einfluß der Reihenfolge um so mehr ausgesprochen ist, je geringer die zugefügten Enzymmengen sind: Dies folgt noch deutlicher aus folgendem Versuch.

Versuch 3. Neutralisiertes Pferdeserum, das so weit mit H<sub>2</sub>O verdünnt war, daß 1 ccm  $\frac{1}{240}$  ccm Serum enthielt. Von dieser Flüssigkeit wurde 1 ccm als Hemmungskörper angewandt.

	0,25 ccm Lab	0,125 ccm Lab	0,0625 ccm Lab
Ohne Hemmungskörper	13 $\frac{1}{4}$ Min.	26 $\frac{3}{4}$ Min.	39 Min.
Milch + Hemmungskörper + Lab	15 „	29 $\frac{1}{2}$ „	46 „
(Hemmungsk. + Lab) 20 Min. + Milch	17 „	45 „	154 „

### Einfluß der Zeit und Temperatur.

Versuch 4. Eine Mischung von Hemmungskörper (Ochsen-serum) und Lab wurde bei 16° bereitet und aufbewahrt. Nach unten angegebenen Zeiten wurde mit ausgenommenen Proben die Gerinnungszeit bestimmt.

Ohne Hemmungskörper	4 $\frac{1}{2}$ Min.
Nach $\frac{1}{2}$ Min. bei 16°	9 $\frac{1}{2}$ „
„ 1 „ „ 16°	19 $\frac{1}{2}$ „
„ 2 „ „ 16°	30 „
„ 3 „ „ 16°	40 „

Versuch 5. Zwei gleiche Mischungen von Lab und Hemmungskörper wurden bereitet und aufbewahrt, die eine bei 16°, die andere bei 37°. Nach verschiedenen Zeiten wurden mit gleichen Proben (2 ccm) die Koagulationszeiten bei 37° bestimmt.

Zeit des Aufbewahrens	bei 16°	bei 37°
5 Min.	13 Min.	16½ Min.
15 "	13 "	—
20 "	13 "	20½ "
30 "	13 "	20½ "

Die Koagulationszeit steigt also bis zu einem Maximum beim Aufbewahren der Lab-Hemmungskörpermischung, und das Maximum der Koagulationszeit liegt desto höher, bei je höherer Temperatur die Mischung gehalten wird. Es mag bemerkt werden, daß in Versuch 5 gewisse Proben der Lab-Hemmungskörpermischung, wenn sie der bei 37° gehaltenen Milch zugesetzt wurden, eine Temperatur von 16° besaßen und also die Temperatur der Milch ein wenig herabsetzten. Darum sind wohl die mit diesen Proben erhaltenen Koagulationszeiten ein wenig zu hoch im Vergleich mit den bei 37° gehaltenen Proben. Der Einfluß der Temperatur mag deshalb ein wenig größer sein, als aus den erhaltenen Ziffern zu erschließen ist.

#### Einfluß der Verdünnung der Lab-Hemmungskörpermischung.

Versuch 6. Gleiche Volumina von Lab + Hemmungskörper wurden folgendermaßen mit Wasser versetzt.

1 ccm Lab + 1 ccm verdünntes Pferdeserum	ohne Wasser	A
1 " + 1 "	+ 3 ccm H <sub>2</sub> O	B
1 " + 1 "	+ 8 "	C

Nachdem die Mischungen ½ Stunde bei 37° gehalten worden waren, wurde Wasser zugegeben wie folgt:

Zu A	8 ccm H <sub>2</sub> O
" B	5 "
" C	kein Wasser

Während der Bindung des Enzyms am Hemmungskörper waren also die Wassermengen in den drei Proben verschieden,

aber nachher wurde durch Zugeben von Wasser überall die gleiche Konzentration hergestellt. Dann wurden mit je 1 ccm von A, B und C die Labungszeiten bestimmt:

A	20 Min.
B	20
C	18
Ohne Hemmungskörper	14

Versuch 7. In der gleichen Weise wurden in drei Proben verschiedene Wassermengen mit den gleichen Mengen Lab und Hemmungskörper versetzt, so daß die Proben folgende Totalvolumina ausmachten:

2 ccm	A
6 "	B
10 "	C

Nach 45 Minuten bei 37° wurden alle Proben mit Wasser bis 10 ccm aufgefüllt. Mit je 1 ccm wurden dann die Labungszeiten ermittelt:

A	25½ Min.
B	25½
C	26½
Ohne Hemmungskörper	16

Der letzte Versuch beweist also, daß die während des Neutralisierens vorhandene Menge Wasser auf die Menge des schließlich gebundenen oder neutralisierten Enzyms keinen Einfluß ausübt. Die Wassermenge mag wohl für die Geschwindigkeit der Bindung von Bedeutung sein. Es wäre wohl möglich, daß der Endzustand langsamer erreicht wird, je mehr Wasser vorhanden ist, ohne daß der Endzustand selbst durch die Wassermenge beeinflußt wird. Dies ist wahrscheinlich die Ursache, warum in Versuch 6 die Mischung C eine etwas kürzere Labungszeit ergab als A und B. In Versuch 7, wo die Mischungen eine längere Zeit (45 Min.) vor der Bestimmung der Labungszeiten bei 37° gehalten wurden, war in allen Proben praktisch der gleiche Endzustand erreicht.

#### Inaktivierung des Hemmungskörpers.

Wie oben angeführt wurde, geht das hemmende Vermögen des Serumalbumins auf die Trypsinverdauung bei der Behand-

lung des Serumalbumins mit Essigsäure verloren. Die Einwirkung der Essigsäure auf den Hemmungskörper des Labs habe ich nicht eingehend geprüft. Nur so viel glaube ich behaupten zu können, daß das Hemmungsvermögen durch kurzdauernde Behandlung (1—2 Stunden) bei  $37^{\circ}$  mit 0,2%iger Essigsäure nicht wesentlich geschädigt wird. Viel effektiver ist die Behandlung mit Salzsäure. Die folgenden Versuche zeigen, daß es mir immer gelungen ist, durch mehr oder weniger intensive Behandlung mit Salzsäure die Hemmungswirkung des Serums aufzuheben. Zunächst wurde neutrales, lange dialysiertes Ochsen Serum geprüft.

Versuch 8. 5 ccm Hemmungskörper + 5 ccm 0,2%ige HCl wurde 2 Stunden bei  $16^{\circ}$  gehalten. Dann wurde mit 2,7 ccm  $^{1}_{10}$ -N-NaOH neutralisiert und ferner 7,3 ccm Wasser zugegeben, so daß die ganze Flüssigkeit 20 ccm ausmachte. Mischung A.

Von allen Reagenzien wurden dieselben Mengen wie in A vermischt: nur wurden die Säure und das Alkali vermischt, bevor dieselben dem Hemmungskörper zugefügt wurden. Die Einwirkung der Säure auf den Hemmungskörper fiel also weg. Mischung B.

Von A und B wurde je 0,5 ccm mit der gleichen Labmenge versetzt und 20 Minuten bei  $37^{\circ}$  vor dem Zugeben der Milch aufbewahrt.

Einer Kontrollprobe mit Wasser anstatt Hemmungskörper wurde Säure und Alkali wie in B zugesetzt.

Ohne Hemmungskörper	9 Min.
Mit A (Behandlung mit HCl)	10
B (keine Behandlung mit HCl)	135

Das mit HCl behandelte Serum ergab also keine Hemmung, wohl aber das nicht mit HCl behandelte.

Versuch 9. Lösungen A und B wurden wie in Versuch 8 bereitet; nur war die Menge Hemmungskörper geringer, und derselbe wurde in A nur eine Stunde mit 0,1%iger HCl bei  $16^{\circ}$  behandelt. Nach dem Neutralisieren von A wurden zu verschiedenen Zeiten Proben von A und B ausgenommen und nach Zusatz von Lab die Gerinnungszeiten wie oben ermittelt.

	Nach					
	10 Min.	25 Min.	40 Min.	60 Min.	80 Min.	100 Min.
Ohne Hemmungskörper .	9 Min.					
Mit A . . . . .	8	6	8½	9	9	9
Mit B . . . . .	28	32	34	35	35	35

Versuch 10. Lösungen wurden wie in Versuch 9 hergestellt.

	Nach 10 Min.	½ Std.	2 Std.	4 Std.	5 Std.
Ohne Hemmungskörper	20 Min.	19½ Min.	21 Min.	23 Min.	24 Min.
Mit A	17	11	13	24	22
» B	keine Labung nach 6 Std.				

In den Versuchen 9 und 10 zeigt der mit HCl behandelte Hemmungskörper mit Lab versetzt zu Anfang sogar eine kürzere Labungszeit als die Proben ohne Hemmungskörper. Im Anfang begünstigt also der mit HCl behandelte Hemmungskörper die Labung der Milch. Bald wird aber die Gerinnungszeit dieselbe wie für die Proben ohne Hemmungskörper. Woran diese begünstigende Einwirkung auf die Labung beruht, kann ich vor der Hand nicht entscheiden. Wahrscheinlich ist es wohl, daß diese Wirkung immer im Serum vorhanden ist, daß aber dieselbe in nicht mit HCl behandelten Proben durch die hemmende Wirkung verdeckt wird. Daß die begünstigende Wirkung nicht immer zutage tritt, könnte wohl an einer unvollständigen Zerstörung der Hemmungswirkung liegen.

Die obigen Versuche über die Behandlung des Hemmungskörpers mit HCl wurden mit Ochsen Serum ausgeführt. Ganz analoge Resultate wurden mit Pferdeserum erhalten.

Versuch 11. Mit einem Volumen Wasser verdünntes, neutralisiertes und dialysiertes Pferdeserum wurde wie oben zur Bereitung von Lösungen A und B verwendet. Die Behandlung mit 0,1%iger HCl wurde nur 15 Minuten bei 37° fortgesetzt.

Das Lab wurde sofort nach dem Neutralisieren zugesetzt und nach 15 Minuten bei 37° wurden die Gerinnungszeiten genommen:

Ohne Hemmungskörper	5 Min.
Mit A	5 "
B	keine Labung in 60 Min.

Die Zeit und die Temperatur für die Behandlung mit HCl sowie die Stärke der Säure ist von allergrößter Bedeutung. Das dialysierte Ochsen Serum, welches bei meinen ersten Versuchen angewandt wurde, verliert seine hemmenden Eigenschaften schon beim Behandeln mit 0,1% iger HCl während 1 Stunde bei 16°. Mit 1 Volumen Wasser verdünntes, neutralisiertes und dialysiertes Pferdeserum hemmte nach der gleichen Behandlung in sehr ausgesprochener Weise die Labwirkung, aber nicht nach 1/2 Stunde mit 0,1% iger HCl bei 37°. Nach Aufbewahren des Serums während 2 Wochen bei etwa 8° wurde aber die Hemmungswirkung durch 0,1% ige HCl in 1/2 Stunde bei 16° vernichtet. Viel widerstandskräftiger erwies sich dasselbe Pferdeserum, wenn es unmittelbar vor dem Versuche einfach mit 1 Volumen Wasser verdünnt und neutralisiert wurde. Dasselbe wurde nicht durch 0,1% ige HCl während 1 Stunde bei 37° seiner hemmenden Eigenschaften beraubt, wohl aber durch 0,2% ige HCl während 1/2 Stunde bei 37°.

Die Vorgeschichte des Serums spielt also in bezug auf dessen Vermögen, der Einwirkung von HCl Widerstand zu leisten, eine sehr wichtige Rolle.

#### Erholung des Hemmungskörpers nach der Einwirkung von HCl.

Wird die Behandlung des Hemmungskörpers mit HCl frühzeitig genug abgebrochen, nachdem die Hemmung eben verschwunden ist, so gewinnt das Serum nach Neutralisieren allmählich einen Teil seines Hemmungsvermögens wieder.

Versuch 12. Pferdeserum wurde mit 1 Volumen Wasser verdünnt und mit Essigsäure für Lackmus neutralisiert. Dann wurde mit 0,2% iger HCl in verschiedenen Fällen verschiedene Zeiten bei 37° behandelt. Nachher wurden die Proben neutralisiert und bei 37° aufbewahrt. Nach verschiedenen Zeiten bei 37° wurde 1 ccm der Lösungen ausgenommen, einer gegebenen Labmenge zugesetzt und nach 15 Minuten bei 37° zur Bestimmung der Gerinnungszeiten verwendet: gleichzeitig wurde eine

Bestimmung der Labungszeit ohne die Gegenwart von Serum ausgeführt.

35 Minuten mit 0,2% iger HCl bei 37°. Nach Neutralisieren wurden folgende Gerinnungszeiten gefunden.

	Sofort	Nach 1 Tag	2 Tage	4 Tage
Ohne Serum	13 Min.	13 Min.	14½ Min.	14 Min.
Mit Serum	13½	31	keine Labung nach 3 Std.	

45 Min. mit 0,2% HCl bei 37°.

	Sofort	Nach 1 Tag	4 Tage	5 Tage	6 Tage
Ohne Serum	14½ Min.	14 Min.	15 Min.	14 Min.	15 Min.
Mit Serum	15	17½	35	40	31

50 Min. mit 0,2% HCl bei 37°.

	Nach 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage
Ohne Serum	13 Min.	15 Min.	13½ Min.	14 Min.
Mit Serum	12½	16½	5	17½

Das nicht mit HCl behandelte Serum ergab mit der gebrauchten Labmenge überhaupt keine Gerinnung. Wie ersichtlich, war die Hemmungswirkung des Serums nach Behandlung mit HCl während 35, 45 und 50 Minuten in allen Fällen bei sofort vorgenommener Prüfung verschwunden. Allmählich erholte sich der Hemmungskörper im ersten Falle (35 Min. mit Säure) in sehr ausgesprochener Weise. Nach 45 Minuten mit HCl war die Erholung entschieden geringer und nach 50 Minuten mit HCl nicht sicher nachweisbar.

Über Freiwerden des Labs aus der Verbindung mit dem Hemmungskörper.

Der Hemmungskörper des Blutserums wird durch Salzsäure gelähmt oder zerstört. Es fragt sich dann, ob nach der Einwirkung des Serums auf Lab das unwirksam gemachte Lab durch Behandlung mit HCl in wirksamer Form wieder gewonnen werden kann. Darauf hinzielende Versuche sind schon von Jacoby ausgeführt worden.<sup>1)</sup> Gleiche Volumina verschieden konzentrierter Proben von Salzsäure wurden mit dem gleichen Volumen dialysierten Pferdeserums versetzt und dann allen Proben dieselbe Menge Lab zugegeben. Nach 15 Minuten wurde Milch zugesetzt. Die Proben mit viel Säure (0,2 und 0,3 ccm 10-n-HCl) wurden bald gelabt, die anderen nicht. Die ange-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. I, S. 67, 1906.

wandte Serummengende war ein mehrfaches der zur Neutralisation des Labs (bei neutraler Reaktion?) notwendigen Quantität.

Die Reaktion blieb in den Proben mit Säure die ganze Zeit vor dem Zugeben der Milch sauer, und es geht aus Jacobys Versuchen nicht hervor, ob das Lab in den sauren Proben überhaupt jemals neutralisiert war. Da der Hemmungskörper durch die Säure gelähmt oder zerlegt wird, so fällt es auch schwer, einzusehen, wie man sich bei saurer Reaktion davon überzeugen kann, daß die Neutralisation stattgefunden hat. Dazu kommt noch, daß bei saurer Reaktion die fällende Wirkung der Säure auf das Casein mit ins Spiel kommt. Jacobys Versuche beweisen also nicht, daß durch den Hemmungskörper inaktiviertes Lab durch Säure derart beeinflußt werden kann, daß die Labwirkung nun zur Geltung kommt.

So viel ich finden kann, muß man mit Rücksicht auf meine obigen Versuche so verfahren, daß man das Lab und den Hemmungskörper zunächst bei neutraler Reaktion so lange miteinander in Berührung läßt, bis die maximale Hemmung eingetreten ist, wozu wohl  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  genügen wird. Diese Mischung wird dann mit einer genau gemessenen Menge Salzsäure versetzt und mit der Säure eine gewisse Zeit bei gegebener Temperatur gelassen. Dann wird mit  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH genau neutralisiert. Mischung A.

Einer gleichen, ebenfalls  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  gehaltenen Lab-Hemmungskörpermischung werden die Salzsäure und die Natronlauge vermischt zugegeben. Mischung B.

Eine Kontrollprobe mit Wasser anstatt Hemmungskörper wird auch mit der Mischung von HCl und NaOH versetzt.

Die Lösungen A und B enthalten also am Ende die gleichen Bestandteile; nur war A eine Zeit mit HCl behandelt worden, während B die ganze Zeit neutral gehalten wurde. Nach Herstellung der drei Lösungen wurden mit einem gegebenen Volumen derselben die Gerinnungszeiten sofort bestimmt.

Versuch 13. Zur Anwendung kam dialysiertes Ochsen-serum. Der Salzsäuregehalt der Lab-Hemmungskörpermischung war 0,1 %; die Zeit der Einwirkung der Säure war  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^{\circ}$ .

Ohne Hemmungskörper	13 Min.
Mit A	21 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
B	keine Labung in 6 Std.

Eine Labmenge, welche durch die gebrauchte Serummenge praktisch vollständig neutralisiert war, wurde also während  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  durch 0,1 %ige HCl zum größten Teil wieder aktiviert. Daß nicht alles Lab wieder in wirksamer Form erhalten wurde, könnte einerseits an einer Zerstörung von Lab während der Behandlung mit Salzsäure und andererseits an einer unvollständigen Aktivierung des gebundenen Labs liegen. Die gleichen Resultate wurden in folgenden zwei Versuchen erhalten.

Versuch 14. Ochsenserum; Stärke der Säure 0,1 %; Zeit der Einwirkung 1 Stunde bei  $16^{\circ}$ .

Ohne Hemmungskörper	12 Min.
Mit A	18
B	keine Labung in 6 Std.

Versuch 15. Ochsenserum; Stärke der Säure 0,2 %; Zeit der Einwirkung 1 Stunde bei  $16^{\circ}$ .

Ohne Hemmungskörper	10 Min.
Mit A	12
B	25

Ob die Mischung Lab-Hemmungskörper nach stattgehabter Bindung und vor der Behandlung mit HCl kurze oder längere Zeit aufbewahrt wird, scheint mindestens innerhalb gewisser Grenzen ohne Belang zu sein, wie aus folgendem Versuch zu ersehen ist.

Versuch 16. Ochsenserum. Probe  $A_1$ , enthaltend Lab und Hemmungskörper, wurde zunächst 4 Stunden bei  $37^{\circ}$  gehalten, danach mit 0,1 % iger HCl 1 Stunde bei  $16^{\circ}$  aufbewahrt und schließlich genau neutralisiert. Probe  $A_2$  mit den gleichen Mengen Lab und Hemmungskörper wurde in derselben Weise behandelt; nur wurde vor dem Zugeben von HCl  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  aufbewahrt. Mischung B wurde wie gewöhnlich bereitet.

Ohne Hemmungskörper	13 Min.
Mit $A_1$	18
$A_2$	17
B	keine Labung in 6 Std.

Gegen meine Schlußfolgerung, daß bei der Behandlung von Lab-Hemmungskörperverbindung mit HCl das Lab wieder aktiviert wird, könnte vielleicht eingewendet werden, daß das Lab möglicherweise Labzymogen enthielt, welches durch die Säure in aktives Enzym übergeführt wurde. Hierzu möchte ich bemerken, daß das Lab durch langdauernde Behandlung der Magenschleimhaut vom Kalb mit 0,2%iger HCl erhalten wurde, wobei wohl alles Zymogen in Lab verwandelt wurde. Außerdem habe ich, soweit möglich, mich davon überzeugt, daß bei der Behandlung des Labs mit 0,1%iger HCl bei 37° kein Lab frei wird. Einerseits wurde eine Lablösung mit 0,1%iger HCl 1/2 Stunde bei 37° behandelt und dann neutralisiert, andererseits wurde einer Kontrollprobe die Säure und das Alkali vermischt zugegeben. Die Gerinnungszeiten waren:

Nach Behandlung mit HCl	16 1/2 Min.
Ohne	23

Bei einem andern Versuch wurde Lab zusammen mit schon durch HCl zerlegtem Hemmungskörper mit 0,1%iger HCl 1/2 Stunde bei 37° behandelt. Die Kontrollprobe enthielt auch zerlegten Hemmungskörper sowie Säure und Alkali wie oben. Die Labungszeiten waren:

Nach Behandlung mit HCl	16 1/2 Min.
Ohne	21

In beiden Versuchen war also bei der Behandlung mit HCl eine geringe Zerstörung von Lab erfolgt und kein Freiwerden von Lab konnte nachgewiesen werden.

Bei Behandlung mit HCl wird also die Verbindung zwischen Lab und Hemmungskörper gelöst. Es ist wohl auch möglich, daß nach genügend energischer Behandlung der Hemmungskörper dauernd außer Wirkung gesetzt wird. Bei meinen daraufhin gerichteten Versuchen habe ich aber immer gefunden, daß der Hemmungskörper beim Aufbewahren der neutralisierten Lösung bei 37° einen Teil seines Hemmungsvermögens wieder gewinnt. Dies folgt aus dem Befunde, daß die Labungszeit beim Aufbewahren zunimmt, aber nach erneuerter Behandlung der Lab-Hemmungskörpermischung mit HCl wieder abnimmt. Die anfängliche Zunahme der Gerinnungszeit kann nicht allein auf



Am vierten Tage wurden wieder neue Proben ausgenommen und in der gleichen Weise behandelt. Es wurde gefunden:

Für  $A_1$  39 Min. gegen 122 Min vor der Behandlung mit HCl.

$A_2$  22 $\frac{1}{2}$  „ „ 43 „ „ „ „ „ „

Die Erholung des Hemmungskörpers wurde erst am dritten Tage deutlich nachweisbar und war am vierten sehr deutlich. Die Mischung  $A_1$ , welche nur  $\frac{1}{2}$  Stunde mit HCl erhitzt worden war, zeigte nachher die kräftigere Hemmung.

Ein anderes Beispiel der Erholung des Hemmungskörpers liefert Versuch 16. Wie oben angegeben, wurde die Gerinnungszeit durch Behandlung mit HCl von mehr als 6 Stunden (in Probe B) auf 17 Minuten (Probe  $A_2$ ) unter Freiwerden des Enzyms heruntergedrückt. Nach einer Nacht bei 37° war dieselbe wieder auf 33 Minuten gestiegen, konnte aber durch erneuerte Behandlung mit HCl (0,1% 1 Stunde bei 37°) auf 20 $\frac{1}{2}$  Minuten heruntergebracht werden.

Nach dem oben Gesagten vermag der Hemmungskörper des Serums nach nicht zu kräftiger Behandlung mit HCl einen Teil seines Hemmungsvermögens wieder zu gewinnen. Wenn Lab während der Behandlung mit Salzsäure zugegen ist, so geschieht die Erholung des Hemmungskörpers nach Neutralisieren in ausgiebigerer Weise. Dies ist schon aus dem Umstand ersichtlich, daß es mir immer gelungen ist, in einer mit HCl behandelten Mischung von Lab und Hemmungskörper nach Neutralisieren eine Zunahme der Hemmungswirkung wahrzunehmen, während dies in Lösungen von mit HCl behandeltem Hemmungskörper nicht immer gelang. Noch deutlicher geht dies aus folgenden direkt auf die Frage eingestellten Versuchen hervor. Die Anordnung war folgende.

Von zwei Proben mit der gleichen Menge Hemmungskörper wird die eine ( $A_1$ ) mit Lab versetzt und die andere ( $A_2$ ) mit dem gleichen Volumen Wasser. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37° wurden beide mit 0,1% iger HCl behandelt, worauf neutralisiert wurde und nunmehr umgekehrt  $A_1$  mit Wasser und  $A_2$  mit Lab versetzt wurden und zwar in denselben Mengen wie vorher. Die zwei Proben enthielten also am Ende die gleichen Bestandteile, nur wurde in  $A_1$  das Lab vor der Behandlung mit HCl

zugesetzt und in B nach dem Neutralisieren. Eine Kontrollprobe (B) mit Hemmungskörper, der nicht der Einwirkung von HCl ausgesetzt worden war, würde wie oben bereitet. Dann wurden mit den drei Lösungen die Labungszeiten nach verschieden langem Aufbewahren bei 37° ermittelt.

Versuch 18. Pferdeserum. Die Stärke der Salzsäure war 0,1% und die Behandlung mit der Säure dauerte  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°. Die Gerinnungszeiten waren:

	Sofort	Nach 1 Tag	2 Tage
Mit A <sub>1</sub>	8½ Min.	42 Min.	keine Labung nach 6 Std.
„ A <sub>2</sub>	5 „	12½ „	27½ Min.
„ B	kein Labung in 6 Std.		

Nach 1 Tag wurde durch Behandlung einer Probe mit 0,1%iger HCl  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37° geprüft, ob das wieder gebundene Lab noch einmal aktiviert werden konnte. Die für das ursprüngliche Volumen umgerechneten Gerinnungszeiten waren:

Für A <sub>1</sub>	28 Min.	gegen 42 Min.	vor der Behandlung mit HCl.
„ A <sub>2</sub>	15 „	„ 12½ „	„ „ „ „

Das Ansteigen der Gerinnungszeiten während des ersten Tages nach dem Neutralisieren lag also bei A<sub>1</sub> zum Teil an erneuerter Bindung des Labs am Hemmungskörper; bei A<sub>2</sub> konnte keine solche Bindung nachgewiesen werden. Außerdem fällt es auf, daß die Hemmung bei A<sub>1</sub> viel rascher zunimmt als bei A<sub>2</sub>.

Versuch 19. Ochsenserum. Die Behandlung mit Salzsäure (0,1%) dauerte 1 Stunde bei 16°. Die Gerinnungszeiten waren:

	Sofort	Nach 1 Tag
Mit A <sub>1</sub>	21½ Min.	67 Min.
„ A <sub>2</sub>	10½ „	11½ „
„ B	keine Labung in 6 Std.	

Es scheint also, daß das Lab, wenn es während der Behandlung des Hemmungskörpers mit HCl zugegen ist, denselben gegen die Säure gewissermaßen zu schützen vermag. Auch dieser Befund deutet auf eine Art von Verbindung zwischen dem Lab und dem Hemmungskörper hin. Andererseits ist der Hemmungskörper auch nach Behandlung mit Salzsäure imstande, das Lab gegen schädliche Einflüsse (z. B. Hitze) zu bewahren, wie aus den folgenden Versuchen zur Genüge sich ergibt.

Versuch 20. Lösung A enthielt neben Lab ein gewisses Volumen vorher mit HCl behandelter und neutralisierter Hemmungskörper, Lösung B anstatt des Hemmungskörpers ein gleiches Volumen Wasser, aber sonst dieselben Bestandteile wie A. Die Gerinnungszeiten wurden genommen einerseits sofort nach dem Herstellen der Lösungen, anderseits nach Aufbewahren derselben bei 41° während einiger Stunden.

	Sofort	Nach einigen Stunden
Mit A	11½ Min.	11½ Min.
• B	13	152

Fassen wir die obigen Befunde zusammen, so ergibt sich:

1. Die Hemmung ist stärker, wenn Hemmungskörper zunächst mit dem Lab vermischt und die Milch dann zugesetzt wird, als wenn Milch und Hemmungskörper vermischt werden und das Lab erst nachher zugegeben wird. Die im ersteren Falle neutralisierte Enzymmenge ist prozentisch um so größer, je geringer die angewandte Labmenge ist.

2. Die Wirkung des Hemmungskörpers wird bis zu einer gewissen Grenze größer, je länger die Mischung Lab-Hemmungskörper vor dem Zusatz der Milch aufbewahrt wird und bei je höherer Temperatur.

3. Die Wassermenge der Lab-Hemmungskörpermischung ist für die Menge des schließlich neutralisierten Labs ohne Belang.

4. Durch Behandlung mit 0,1—0,2 % iger Salzsäure, wird der Hemmungskörper gelähmt oder zerstört.

5. Wenn die Behandlung mit Salzsäure nicht eingreifend genug war, erholt sich der Hemmungskörper zum Teil beim Aufbewahren der neutralisierten Lösung bei 37°. Hierfür sind oft mehrere Tage erforderlich.

6. Das einmal neutralisierte Lab einer Lab-Hemmungskörpermischung wird beim Behandeln der Mischung mit Salzsäure wieder zum größten Teil aktiv; beim Aufbewahren der wieder neutralisierten Lösung bei 37° wird aber das Lab noch einmal zum Teil neutralisiert.

Wie ersichtlich stimmen die unter 1, 2 und 3 angeführten Befunde in der Hauptsache mit den für Trypsin und dessen Hemmungskörper im Serum überein, und die beim Trypsin

gegebene Erklärung läßt sich auch für das Lab anwenden. Wir müssen also annehmen, daß der Hemmungskörper deshalb die Labwirkung beschränkt, weil er sich mit dem Lab verbindet, wodurch die Verbindung des Labs mit dem Casein der Milch verhindert wird, und ferner, daß die Verbindung zwischen Lab und Hemmungskörpern mit der Zeit und mit der Temperatur bis zu einer gewissen Grenze zunimmt. Hieraus folgt, daß die Verbindung mindestens zum Teil schwer reversibel oder irreversibel sein muß unter denjenigen Verhältnissen, bei welchen die Koagulation stattfindet. Daß die Wassermenge der Lab-Hemmungskörpermischung ohne Bedeutung ist für die am Ende neutralisierte Enzymmenge, hat wahrscheinlich darin seinen Grund, daß die Verfestigung in oder an einer dispersen Phase (wahrscheinlich dem Hemmungskörper) statthat. Unter solchen Verhältnissen kann die Menge des Wassers nur für die Geschwindigkeit der Bindung, aber nicht für den Umfang derselben maßgebend sein. Wie der Hemmungskörper des Trypsins durch Essigsäure außer Wirkung gesetzt wird, so geschieht dies bei dem Hemmungskörper des Labs durch Salzsäure. Während es mir bis jetzt nicht gelungen ist, den tryptischen Hemmungskörper wieder zu aktivieren, gelingt dies unter Umständen mit dem Hemmungskörper des Labs. Sehr wichtig ist der Befund, daß das einmal neutralisierte Lab mit Salzsäure wieder aktiviert werden kann, was beim Trypsin bis jetzt vergebens versucht worden ist. Dies zeigt, daß das Enzym beim Neutralisieren desselben durch den Hemmungskörper nicht einfach zersetzt wird, sondern nur derart am Hemmungskörper verfestigt wird, daß es bei alkalischer oder neutraler Reaktion nicht wieder frei wird. Bemerkenswert ist auch, daß der Hemmungskörper und das Lab nach stattgehabter Verbindung sich gegenseitig gegen schädliche Einflüsse schützen.

Daß an Antikörper gebundene Toxine und Lysine durch Behandlung mit Salzsäure freigemacht werden können, ist schon vorher und zuerst von Morgenroth gefunden worden. Derselbe konnte mit dem Neurotoxin und dem Hämolysin des Cobragiftes zeigen, daß deren Verbindungen mit experimentell erzeugtem Antikörper in saurer Lösung nicht länger beständig

ist, und es konnte in beiden Fällen die Toxinkomponente freigemacht werden, während allerdings das Antitoxin in freiem Zustande nicht demonstriert werden konnte.<sup>1)</sup>

Dann fanden Morgenroth und Willanen, daß die bei neutraler Reaktion stattgefundene Vereinigung von Diphtheriegift und Antitoxin durch Ansäuern mit HCl in kurzer Zeit gespalten wird.<sup>2)</sup> Daß die Trennung der Toxin-Antitoxinverbindung auf einer Beeinflussung der Toxinkomponente durch die Säure beruht, hält Morgenroth für sehr wahrscheinlich, und dafür sprechen gewissermaßen auch Beobachtungen von Dörr, nach welchen Diphtherie- und Dysenteriegift durch Behandlung mit Säuren unwirksam werden, aber durch Neutralisation bis zur deutlichen Alkalescenz für Lackmus in relativ kurzer Zeit zurückverwandelt werden.<sup>3)</sup> Dies mag erwähnt werden in Anbetracht des verschiedenen Verhaltens beim Lab. Beim Freiwerden des Labs aus der Verbindung mit dem Hemmungskörper geschieht dies nach den obigen Untersuchungen infolge der lähmenden oder zerlegenden Einwirkung der Säure auf den Hemmungskörper.

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschr., 1905, Nr. 50, und Arbeiten aus dem pathol. Inst. zu Berlin. Berlin, Hirschwald 1906.

<sup>2)</sup> Virchows Archiv, Bd. CXC, S. 371, 1907.

<sup>3)</sup> Wiener klin. Wochenschr., Bd. XX, S. 5—8.