

## Weiteres über die spezifische Hemmung der Labwirkung.

Von  
S. G. Hedin.

(Der Redaktion zugegangen am 6. Dezember 1911.)

In meiner letzten Mitteilung habe ich gezeigt, daß durch Behandlung von neutralen Infusionen der Magenschleimhäute von Kalb, Meerschweinchen und Hecht mit schwachem Ammoniak und darauffolgendem Neutralisieren erhaltene Hemmungskörper in spezifischer Weise nur oder vorzugsweise die Wirkung des arteigenen Labenzym hemmen.<sup>1)</sup> Die Hemmungskörper werden aus den entsprechenden Zymogenlösungen in der gleichen Weise erhalten, sind aber trotzdem verschieden. Seitdem ist es mir gelungen, auch aus der neutralen Infusion des Schweinemagens durch Behandlung mit Ammoniak eine Substanz herzustellen, welche die Wirkung des Schweinelabs hemmt, aber die Wirkung der anderen untersuchten Labenzyme nicht beeinflusst. Auch habe ich Gelegenheit gefunden, die vorher erhaltenen Hemmungskörper etwas näher zu studieren und miteinander zu vergleichen. Über die angedeuteten Untersuchungen wird im folgenden berichtet.

### Hemmungskörper vom Meerschweinchen.

In der letzten Mitteilung wurde gezeigt, daß die neutrale Infusion der Magenschleimhaut bereits eine schwache Labwirkung zeigt, was nach dem früher Mitgeteilten auch beim Kalbsmagen der Fall ist. Beim Behandeln der neutralen Infusion mit Ammoniak geht die Labwirkung in Hemmung über und bei darauffolgender Behandlung mit HCl kommt Labwirkung wieder zum Vorschein, was alles mit den für den Kalbsmagen gefundenen Tatsachen im Einklang steht. Wurde das Kalbszymogen zunächst mit HCl behandelt und erst dann mit NH<sub>3</sub>, so wurde kein H. K. erhalten. Ganz dasselbe finden wir bei der

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 242, 1911.

neutralen Infusion des Magens vom Meerschweinchen, wie aus folgendem Versuch ersichtlich:

Zymogen wurde zunächst mit HCl aktiviert (10 ccm + 2 ccm 1%ige HCl 15 Min. ohne Erwärmen) und neutralisiert: darauf wurde mit  $\text{NH}_3$  (10 ccm + 2 ccm 0.1 norm.  $\text{NH}_3$  15 Min. bei  $37^\circ$ ) behandelt und neutralisiert . . . . . A

Das ursprüngliche Zymogen wurde, ohne aktiviert zu werden, mit der in A beim Aktivieren zugekommenen Menge NaCl versetzt, dann wie in A mit  $\text{NH}_3$  behandelt und neutralisiert . . . . . B

Folgende Gerinnungszeiten wurden erhalten:

|                         |                              |                       |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 1 ccm Lab von Meerschw. | + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$ | 18 $\frac{1}{2}$ Min. |
| 1 „ „ „                 | + 2 „ A                      | 18                    |
| 1 „ „ „                 | + 2 „ B                      | Keine Labung in 3 St. |

Beim H. K. vom Kalb konnte gezeigt werden, daß die Reihenfolge, in welcher Milch, Lab und H. K. miteinander vermischt werden, von Bedeutung war für die Größe der Hemmung, indem eine stärkere Hemmung erhalten wurde für den Fall, daß Enzym und H. K. zunächst vermischt und die Milch dann zugegeben wurde, als wenn die Milch vom Anfang an zugegen war. Dasselbe gilt auch für den H. K. vom Meerschweinchen:

|                     |                              |             |                       |
|---------------------|------------------------------|-------------|-----------------------|
| Milch               | + 1 ccm $\text{H}_2\text{O}$ | + 1 ccm Lab | 15 $\frac{1}{2}$ Min. |
| „                   | + 1 „ H. K.                  | + 1 „ „     | 47 „                  |
| (Lab + 1 ccm H. K.) | 10 Min. bei Zimmertemp.      | + Milch     | 72 „                  |

Bemerkenswert ist das Verhalten vom H. K. beim Erhitzen auf  $100^\circ$ , wie aus folgenden Versuchen mit H. K. vom Meerschweinchen hervorgeht. Der H. K., in gewöhnlicher Weise bereitet, wurde zunächst mit 7 Volumen Wasser verdünnt und dann 15 Minuten in dem Wasserbade gekocht. Darauf wurde sein Verhalten zu verschiedenen Labenzymen geprüft, wobei folgende Gerinnungszeiten erhalten wurden:

|  | Lab von               |                       |                      |                       |                       |
|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|  | Meerschweinchen       | Kalb                  | Schwein              | Hecht                 | Schaf                 |
| 1 ccm Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$ | 16 $\frac{1}{2}$ Min. | 16 $\frac{1}{2}$ Min. | 7 $\frac{1}{2}$ Min. | 17 $\frac{1}{2}$ Min. | 13 $\frac{1}{2}$ Min. |
| 1 „ „ + 2 „ H. K.                      | >2 St.                | 16 $\frac{1}{2}$ „    | 9 „                  | 17 „                  | 14 „                  |

Der Versuch zeigt, daß auch der aufgekochte H. K. vom Meerschweinchen die Wirkung des Meerschweinchenlaba hemmt und daß die Spezifität der Hemmung auch nach dem Kochen erhalten bleibt.

In einem anderen Versuch wurde der Einfluß des Kochens auf das Zymogen geprüft, mit und ohne vorangegangene Behandlung mit Ammoniak, sowie nach Behandlung mit Salzsäure. Zur selben Zeit wurde die Hemmung des mit  $\text{NH}_3$  ohne Kochen erhaltenen Hemmungskörpers untersucht. Die verschiedenen Lösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Hemmungskörper wurde wie oben aus dem Zymogen mit  $\text{NH}_3$  (10 Min. bei  $37^\circ$ ) hergestellt . . . . . A

So erhaltener H. K. wurde 15 Minuten in dem Wasserbade gekocht . . . . . B

Das Zymogen wurde zunächst, ohne mit  $\text{NH}_3$  behandelt zu werden, mit der in A vorhandenen Menge  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt und dann 15 Minuten in dem Wasserbade gekocht . . . C

Aus dem Zymogen wurde zunächst mit  $\text{HCl}$  Lab hergestellt, worauf dasselbe wie oben gekocht wurde . . . D

Hierauf wurden die Lösungen A, B, C, D mit 3 Volumen Wasser verdünnt und in ihrem Verhalten zu verschiedenen Labenzymen geprüft. Die Resultate sind aus folgender Tabelle zu ersehen.

|  | Lab von            |         |                    |                    |                    |
|--|--------------------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|
|  | Meerschweinchen    | Schwein | Schaf              | Pferd              | Kalb               |
| 1 ccm Lab + 1 ccm $\text{H}_2\text{O}$ | 15 Min.            | 12 Min. | 14 Min.            | 13 Min.            | 15 Min.            |
| 1 „ „ + 1 „ A                          | 53 $\frac{1}{2}$ „ | 12 „    | 14 „               | 13 „               | 14 $\frac{3}{4}$ „ |
| 1 „ „ + 1 „ B                          | 54 $\frac{1}{2}$ „ | 12 „    | 14 „               | 13 „               | 14 $\frac{1}{2}$ „ |
| 1 „ „ + 1 „ C                          | 54 $\frac{1}{2}$ „ | 12 „    | 14 „               | 13 „               | 14 $\frac{1}{2}$ „ |
| 1 „ „ + 1 „ D                          | 15 „               | 12 „    | 13 $\frac{1}{2}$ „ | 12 $\frac{1}{2}$ „ | 14 $\frac{1}{4}$ „ |

Der Hemmungskörper hemmte folglich die Wirkung des Meerschweinchenlaba ebensogut nach Kochen (B), wie ohne Erhitzen (A), und zwar scheint es für das Hemmungsvermögen des gekochten Zymogens gleichgültig zu sein, ob das Kochen mit (B) oder ohne (C) vorangegangene Behandlung mit  $\text{NH}_3$  erfolgt. Dagegen wurde beim Kochen des mit Salzsäure be-

handelten Zymogens (des freien Labs) kein H. K. erhalten (D). Ferner ist auch aus diesem Versuche zu ersehen, daß die Spezifität der Hemmung auch nach dem Kochen des Hemmungskörpers erhalten bleibt.

Sind denn der durch Behandeln des Zymogens mit  $\text{NH}_3$  und der durch Aufkochen desselben erhaltene Hemmungskörper vollkommen identisch?

Vorderhand läßt sich diese Frage nicht definitiv beantworten. Die auf beide Weisen erhaltenen Hemmungskörper stimmen darin miteinander überein, daß sie spezifisch nur das arteigene Labenzym hemmen. Dagegen liegt ein Unterschied zwischen beiden in deren Verhalten beim Behandeln mit  $\text{HCl}$ . Der durch Kochen erhaltene Hemmungskörper verliert beim Behandeln mit  $\text{HCl}$  nicht sein Hemmungsvermögen, während die mit  $\text{NH}_3$  hergestellte hemmende Lösung nach Behandlung mit  $\text{HCl}$  freies Lab enthält und nunmehr weder mit  $\text{NH}_3$  noch beim Kochen hemmend wird. Das Verhalten des durch Kochen erhaltenen Hemmungskörpers gegen  $\text{HCl}$  erleuchtet aus folgenden Versuchen:

Die hemmende Lösung wurde einerseits mit 0,2%iger  $\text{HCl}$  eine Nacht im Eisschrank behandelt und neutralisiert (A), andererseits mit der entsprechenden Menge Salzlösung ( $\text{NaCl}$ ) versetzt (B). Zwei verschiedene Versuche über die durch A und B erzeugte Hemmung ergaben folgende Ziffern:

|                         |                              | 1.                    | 2.                    |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 ccm Lab von Meerschw. | + 1 ccm $\text{H}_2\text{O}$ | 13 $\frac{1}{2}$ Min. | 15 $\frac{1}{2}$ Min. |
| 1                       | + 1 " A                      | 20 $\frac{1}{2}$ "    | 26 "                  |
| 1                       | + 1 " B                      | 20 "                  | 23 $\frac{1}{2}$ "    |

Übrigens ist der Einfluß der Reihenfolge, in welcher das Mischen von Milch, Lab und Hemmungskörper vor sich geht, der gleiche für die auf beide Wege hergestellten Hemmungskörper. Mit einer durch Kochen erhaltenen hemmenden Lösung wurden folgende Zahlen erhalten:

|            |                              |                     |                       |
|------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Milch      | + 1 ccm $\text{H}_2\text{O}$ | + 1 ccm Lab         | 15 $\frac{1}{2}$ Min. |
| "          | + 1 " H. K.                  | + 1 " "             | 39                    |
| (1 ccm Lab | + 1 ccm H. K.)               | 10 Min. bei Zimmer- |                       |
|            | temperatur                   | + Milch             | 60                    |

## Hemmungskörper von Hecht.

Durch Behandlung der Zymogenlösung mit  $\text{NH}_3$  in vorher beschriebener Weise und Neutralisieren wurde Hemmungskörper erhalten. Dieser wurde einerseits direkt auf hemmendes Vermögen geprüft (A), anderseits nach 15 Minuten Aufkochen (B). Zur selben Zeit wurde auch aus dem gleichen Zymogen hergestelltes und 15 Minuten gekochtes Lab auf Hemmungsvermögen geprüft (D). Mit verschiedenen Labenzymen wurden folgende Gerinnungszeiten erhalten:

|  | Lab von  |          |         |          |
|--|----------|----------|---------|----------|
|  | Hecht    | Kalb     | Schwein | Schaf    |
| 1 ccm Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$ . . | 13½ Min. | 14½ Min. | 17 Min. | 15½ Min. |
| 1 „ „ + 2 „ A . . .                        | 21 „     | 15 „     | 16 „    | 15 „     |
| 1 „ „ + 2 „ B . . .                        | 20 „     | 14 „     | 16 „    | 14½ „    |
| 1 „ „ + 2 „ D . . .                        | 13½ „    | 12½ „    | 13 „    | 13 „     |

Die Hemmung des arteigenen Labs ist in diesem Falle nicht sehr bedeutend. Trotzdem ist aus dem Versuche deutlich zu ersehen, daß die spezifische Hemmung auch nach dem Aufkochen erhalten bleibt. Das gekochte Lab ergab keine Hemmung. Die Ergebnisse decken sich also vollkommen mit den für den Hemmungskörper von Meerschweinchen erhaltenen.

## Hemmungskörper vom Kalb.

Bei meinen neuen Versuchen mit Kalbszymogen glaube ich gefunden zu haben, daß die Bildung von Hemmungskörpern bei der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  begünstigt wird einerseits durch vorangegangene Dialyse, anderseits durch Gegenwart von  $\text{NaCl}$ . Die durch Ammoniakbehandlung von nichtdialysiertem und dialysiertem Zymogen erzeugte Hemmung ergab sich in einem Versuche wie folgt:

|  |        |
|--|--------|
| 1 ccm Lab + 1 ccm $\text{H}_2\text{O}$ | 9 Min. |
| 1 „ „ + 1 „ nicht dial. Zymogen        | 13 „   |
| 1 „ „ + 1 „ dial. Zymogen              | 17 „   |

In einem anderen Versuch wurde die Ammoniakbehandlung vorgenommen einerseits in der Gegenwart von 0,9%



|                                    | Lab von   |         |           |           |         |
|------------------------------------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|
|                                    | Kalb      | Pferd   | Schaf     | Meerschw. | Schwein |
| 1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O | 14½ Min.  | 13 Min. | 13 Min.   | 12½ Min.  | 9½ Min. |
| 1 „ „ + 2 „ A                      | 46½ „     | 12 „    | 22 „      | 12 „      | 9 „     |
| 1 „ „ + 2 „ B                      | 42 „      | 12½ „   | 23 „      | 13½ „     | 8½ „    |
| 1 „ „ + 2 „ C                      | >2 Stund. | 13 „    | >2 Stund. | 35 „      | 9½ „    |
| 1 „ „ + 2 „ D                      | 80 Min.   | 19 „    | >2 „      | >1½ Std.  | 20 „    |

Aus diesen Ziffern ist zu ersehen, daß die mit NH<sub>3</sub> erhaltene H. K. spezifisch das Kalbslab hemmt. Doch zeigt derselbe, wie ich immer vorher gefunden habe,<sup>1)</sup> eine gewisse Tendenz, auch das Schafslab zu hemmen. Wahrscheinlich liegt dies an der Verwandtschaft zwischen Rind und Schaf (beide sind Wiederkäuer). Die spezifische Wirkung, und zwar mit einer gewissen Hemmung auch für das Schafslab, finden wir auch bei dem gekochten Hemmungskörper (B), sowie auch, obwohl weniger scharf ausgeprägt, bei dem gekochten Zymogen (C). Das gekochte Lab hemmt dagegen in mehr oder weniger ausgesprochener Weise die Wirkung aller der untersuchten Labsorten.

Das für den obigen Versuch angewandte Kalbszymogen war nicht dialysiert. In einem anderen Versuche wurde das Zymogen vor der Ammoniakbehandlung einer zweitägigen Dialyse gegen destilliertes Wasser unterworfen. Hierauf wurden, wie im vorangehenden Versuch, die Lösungen B und C hergestellt, eine Nacht gegen destilliertes Wasser dialysiert und mit verschiedenen Labenzymen auf hemmendes Vermögen geprüft. Die Resultate sind aus folgender Tabelle zu ersehen.

|  | Lab von |          |          |         |
|--|---------|----------|----------|---------|
|  | Kalb    | Schaf    | Pferd    | Schwein |
| 1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O . . | 15 Min. | 14½ Min. | 13½ Min. | 15 Min. |
| 1 „ „ + 2 „ von B .                    | 40 „    | 21 „     | 13 „     | 14½ „   |
| 1 „ „ + 2 „ „ C .                      | 38½ „   | 18 „     | 13 „     | 14½ „   |

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 74. S. 248. 1911.

Auch hier finden wir folglich die spezifische Wirkung in dem eben besprochenen Sinne wieder, und das Kalbszymogen scheint mit dem Meerschweinchenzymogen auch insofern übereinzustimmen, als die spezifische Hemmungswirkung auch nach dem Kochen mindestens zum Teil erhalten bleibt.

Dagegen sind die Verhältnisse beim Kalb und beim Meerschweinchen darin verschieden, daß das fertige Lab vom Meerschweinchen in der angewandten Konzentration nach dem Aufkochen keine Hemmung zeigte, während das aufgekochte Kalbslab eine kräftige Hemmung ergab, die keine Spezifität aufwies. Dasselbe habe ich auch mit einem anderen Kalbslab gefunden, das durch 3tägige Behandlung des Zymogens mit HCl im Eisschrank erhalten war. Die Ergebnisse waren:

|  | Lab von |         |          |         |
|--|---------|---------|----------|---------|
|  | Kalb    | Schaf   | Schwein  | Pferd   |
| 1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O . . | 12 Min. | 12 Min. | 7 Min.   | 10 Min. |
| 1 „ „ + 2 „ gek. Lab                   | 34 „    | >1 Std. | >1½ Std. | 28 „    |

Von spezifischer Hemmung kann hier keine Rede sein, zumal die Hemmung für Schweinelab und für Schafslab bedeutender ausfiel als für Kalbslab. Ein anderer Versuch wurde derart ausgeführt, daß das Lab vor dem Aufkochen einer 2tägigen Dialyse unterworfen wurde. Mit verschiedenen Enzymen wurden dann folgende Hemmungserscheinungen erhalten:

|  | Lab von |         |         |          |
|--|---------|---------|---------|----------|
|  | Kalb    | Schaf   | Schwein | Pferd    |
| 1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O . . | 8½ Min. | 10 Min. | 6 Min.  | 12½ Min. |
| 1 „ „ + 2 „ gek. Lab                   | 47 „    | 77 „    | >50 „   | 16 „     |

Die Ergebnisse waren folglich dieselben wie vorher.

Auch in einer anderen Hinsicht unterscheidet sich aber die Hemmung durch das gekochte Lab von der durch das mit Ammoniak behandelte Zymogen. Im ersteren Falle bleibt nämlich das Reihenfolgephänomen aus, wie folgende Gerinnungszeiten, erhalten mit 5 verschiedenen gekochten Labpräparaten, zeigen:

|   | 1.      | 2.       | 3.     | 4.      | 5.      |
|---|---------|----------|--------|---------|---------|
| Milch + 1 ccm H <sub>2</sub> O + 1 ccm Lab . . . . .                        | 11 Min. | 14½ Min. | 9 Min. | 9½ Min. | 9½ Min. |
| Milch + 1 ccm gek. Lab . . . . .  | 18      | 23½      | 14     | 19      | 29½     |
| (1 ccm Lab + 1 ccm gek. Lab) 10 Min. bei Zimmertemperatur + Milch . . . . . | 18½     | 23½      | 14½    | 20      | 30½     |

Derselbe Versuch, ausgeführt mit einem Hemmungskörper, welcher durch Ammoniakbehandlung des in 2 angewandten Zymogens erhalten war, ergab folgende Ziffern:

|   |         |
|---|---------|
| Milch + 1 ccm H <sub>2</sub> O + 1 ccm Lab . . . . .                | 13 Min. |
| + 1    > H.K. + 1    >    > . . . . .                               | 29      |
| (1 ccm Lab + 1 ccm H. K.) 10 Min. bei Zimmertemp. + Milch . . . . . | 52      |

In diesem Falle, wie bei allen von mir ausgeführten Versuchen mit dem durch Ammoniakbehandlung des Zymogens hergestellten Hemmungskörper wird das Reihenfolgephänomen erhalten. Da dieses, wie ich an anderer Stelle entwickelt habe,<sup>1)</sup> wahrscheinlich daran liegt, daß das Lab an dem Hemmungskörper verfestigt wird, und da ferner das gekochte Lab dieses Phänomen nicht zeigt, so folgt, daß die hemmende Substanz im gekochten Lab das wirksame Lab an sich zu verfestigen nicht vermag.

Das Hemmungsvermögen des aufgekochten Labs verschwindet oft beim Aufbewahren der Lösung und besonders leicht beim Dialysieren. Hieraus darf man aber nicht folgern, daß die hemmende Substanz dialysierbar ist. Bis jetzt ist es mir nämlich nicht gelungen, im konzentrierten Dialysat irgend welche hemmende Substanz nachzuweisen.

Die Hemmung, welche durch das aufgekochte Lab ergeben wird, unterscheidet sich also in zweierlei Weise von der durch den oben beschriebenen, mit Ammoniak aus dem Zymogen erhaltenen Hemmungskörper erzeugten Hemmung:

Einmal ist die Hemmung durch das gekochte Lab nicht artspezifisch und

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift. Bd. 52. S. 412, 1907.

zweitens wird das Enzym nicht an der hemmenden Substanz verfestigt.

Da das Lab aus dem Zymogen durch Behandlung desselben mit Salzsäure hergestellt wurde, und die Eigenschaften der hemmenden Substanzen, welche aus dem Zymogen vor und nach der Behandlung mit Salzsäure erhalten werden, so verschieden sind, so scheint es wahrscheinlich, daß eben die Behandlung mit Salzsäure den Hemmungskörper im Zymogen zerlegt und den im Lab vorhandenen Hemmungskörper entstehen läßt. Mit Rücksicht darauf, daß bei der Behandlung des Zymogens mit Salzsäure das vorhandene Pepsin in Wirksamkeit treten muß, scheint es nicht ausgeschlossen, daß dabei albumosen- oder peptonartige Substanzen entstehen, welche nach Untersuchungen von Sawjalow die Labwirkung intensiv hemmen sollen.<sup>1)</sup> Wenn die Hemmung an proteolytischen Digestionsprodukten läge, so würde dieselbe erstens von der Pepsinmenge abhängig sein, dann auch von der vorhandenen Menge von Eiweiß und möglicherweise auch von der Zeit der Einwirkung des Enzyms.

Bekanntlich wird auch die Trypsinwirkung durch proteolytische Spaltungsprodukte gehemmt. Wie ich vorher gefunden habe, findet auch in diesem Falle keine Verfestigung des Enzyms an den Produkten statt.<sup>2)</sup>

### Hemmungskörper vom Schwein.

Eine neutrale Infusion des Schweinemagens wurde folgendermaßen bereitet: die Fundus- und Pylorusteile des Magens wurden zunächst entfernt; der restierende, gerötete und labführende Teil der Schleimhaut wurde mit Sand verrieben, 2 Tage im Eisschrank mit etwa 3 Teilen Wasser, etwas  $\text{CaCO}_3$  und Toluol behandelt und filtriert. Geringe Mengen von dem so bereiteten Zymogen wurden einerseits mit HCl aktiviert (10 ccm + 2 ccm 1% ige HCl 24 St. im Eisschrank) und mit titrierter Natronlauge neutralisiert, andererseits mit der entsprechenden

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 307, 1905.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 423, 1907.

Menge NaCl versetzt. Die Gerinnungszeiten mit 1 ccm der Lösungen waren:

Nach Behandlung mit HCl . . . . . 1 Min.  
Ohne . . . . . Keine Labung in 2 St.

Beim Herstellen von Hemmungskörpern aus dem Zymogen wurde dieses zunächst ein paar Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert; dann wurde mit  $\text{NH}_3$  behandelt, einerseits in Gegenwart von NaCl, andererseits ohne das Salz in folgender Weise:

20 ccm Zymogen + 5 ccm 3,6% NaCl + 5 ccm 0,1 norm.  $\text{NH}_3$  15 Min. bei  $37^\circ$  . . . . . A  
20 ccm Zymogen + 5 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 5 ccm 0,1 norm.  $\text{NH}_3$  15 Min. bei  $37^\circ$  . . . . . B

Nach Neutralisieren mit 5 ccm 0,1 norm.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurde A mit 5 ccm Wasser und B mit 5 ccm 3,6%igem NaCl versetzt. Die zwei Lösungen enthielten folglich am Ende die gleichen Mengen von Salz. Beim Prüfen des Hemmungsvermögens wurde dafür Sorge getragen, daß das Wasser, welches der Kontrollprobe ohne Hemmungskörper zugesetzt wurde, die gleiche Menge Salz wie die hemmenden Lösungen enthielt. Das Hemmungsvermögen von A und B wurde einerseits gegen Schweinelab, andererseits gegen Kalbslab geprüft:

|  | Schweinelab | Kalbslab    |
|--|-------------|-------------|
| 1 ccm Lab + 2 ccm Salzlösung . . . . . | 13 Min.     | 14 1/2 Min. |
| 1 „ „ + 2 „ von A . . . . .            | 59 „        | 13 „        |
| 1 „ „ + 2 „ „ B . . . . .              | 25 „        | 13 „        |

Aus den erhaltenen Gerinnungszeiten ist zunächst zu ersehen, daß die Wirkung des Schweinelabs gehemmt wurde, nicht aber die des Kalbslabs. Ferner wirkt die bei Gegenwart von NaCl bereitete Lösung (A) kräftiger hemmend als die ohne Salz hergestellte (B). In dieser Hinsicht verhält sich folglich das Zymogen vom Schwein wie das vom Kalb. Der Hemmungskörper ergibt das Reihenfolgephänomen, wie aus folgenden Gerinnungszeiten ersichtlich:

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| Milch + 2 ccm H <sub>2</sub> O + 1 ccm Schweinelab                  | 13 Min.                          |
| "  + 2  "  H. K. + 1  "  Lab  | 22 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> " |
| (1 ccm Lab + 2 ccm H. K.) 10 Min. bei Zimmer-<br>temperatur + Milch | 59                               |

Folgender Versuch wurde mit einer hemmenden Lösung angestellt, die mit Ammoniak in Gegenwart von NaCl in eben beschriebener Weise erhalten war. Ein Teil von der Lösung wurde 15 Minuten in dem Wasserbade gekocht und zur selben Zeit geprüft.

|                                | Lab von                            |                                     |                                  |                                  |
|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                | Schwein                            | Kalb                                | Pferd                            | Schaf                            |
| 1 ccm Lab + 2 ccm Salzlösung . | 9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min. | 12 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min. | 11 Min.                          | 10 Min.                          |
| 1  "  "  + 2  "  H. K. . . .   | 70  "                              | 14  "                               | 10 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> " | 10 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> " |
| 1  "  "  + 2  gekocht. H. K.   | 33  "                              | 12 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "    | 10 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> " | 10  "                            |

Aus dem Versuch ist zu ersehen: daß die Hemmung artspezifisch wirkt und daß die artspezifische Hemmung auch nach 15 Minuten Aufkochen mindestens zum Teil bestehen bleibt.

Nach einigen Stunden Behandlung mit HCl in vorher beschriebener Weise und Neutralisieren wirkte die vorher hemmende Lösung labungserregend. 1 ccm derselben rief mit 10 ccm Milch in 4 Minuten Gerinnung hervor. Auch in dieser Hinsicht verhält sich also der Hemmungskörper wie die vorher untersuchten.

Schweinelab wurde durch zweitägige Behandlung des Zymogens mit HCl (10 ccm + 2 ccm 1% HCl) und Neutralisieren erhalten. Aus demselben ging beim Dialysieren gegen wenig Wasser keine hemmende Substanz in dieses über.

Nach Behandeln des Labs mit Ammoniak und Neutralisieren zeigte die Lösung schwach hemmende Eigenschaften. Diese Hemmung war nicht artspezifisch:

|  | Schweinelab | Kalbslab |
|--|-------------|----------|
| 1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O . . . . . | 12 Min.     | 8 Min.   |
| 1  "  "  + 2  "  Lösung . . . . .            | 21  "       | 18  "    |

Mit der fraglichen Lösung wurde kein Reihenfolgephänomen erhalten:

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| Milch + 2 ccm H <sub>2</sub> O + 1 ccm Schweinelab | 9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min. |
| + 2    »   Lösung + 1 ccm Lab                      | 17 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>     |
| (1 ccm Lab + 2 ccm Lösung) 10 Min. bei Zimmer-     |                                    |
| temperatur + Milch                                 | 17 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>     |

Auch nach Aufkochen der Lösung blieb das Hemmungsvermögen erhalten:

|                                      |                                    |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Schweinelab + 2 ccm H <sub>2</sub> O | 9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min. |
| + 2    »   gekochte Lösung           | 19                                 |

Das Hemmungsvermögen blieb auch nach Behandlung der Lösung mit Salzsäure erhalten.

Auch beim Schweine ist folglich die im fertigen Lab vorhandene hemmende Substanz von der durch Ammoniakbehandlung des Zymogens erhaltenen verschieden und zwar in folgenden Beziehungen.

1. Die Hemmung ist nicht artspezifisch.
2. Das Reihenfolgephänomen ist nicht vorhanden.

Meine bisherigen Untersuchungen über die aus neutralen Infusionen von Tiermägen (Zymogen) und aus dem fertigen Lab erhältlichen hemmenden Substanzen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Frisch bereitete, neutrale Infusionen der Magenschleimhäute von Kalb, Schwein, Meerschweinchen und Hecht erzeugen beim Behandeln mit sehr schwachem Ammoniak und Neutralisieren Substanzen, welche in spezifischer Weise nur oder vorzugsweise die Wirkung des arteigenen Labs hemmen und dabei das Reihenfolgephänomen ergeben.

Diese Hemmungsfähigkeit bleibt auch beim Aufkochen der Lösung mindestens zum Teil erhalten.

Wird die durch Ammoniakbehandlung des Zymogens erhaltene hemmende Lösung mit schwacher Salzsäure behandelt und neutralisiert, so enthält die Lösung nunmehr freies, wirksames Lab. Findet die Behandlung mit Salzsäure nach Aufkochen der hemmenden Lösung statt, so schwindet das Hemmungsvermögen nicht.

Wird das ursprüngliche Zymogen zunächst mit Salzsäure behandelt und neutralisiert, wodurch das Lab aktiviert wird, und erst dann mit Ammoniak behandelt und neutralisiert, so wird der erwähnte Hemmungskörper nicht erhalten. Das Kalbslab ergibt beim Aufkochen eine hemmende Lösung, welche aber nicht spezifisch wirkt und das Reihenfolgephänomen nicht ergibt. Das Schweinelab ergab nach Behandlung mit Ammoniak und darauffolgendem Neutralisieren eine nicht spezifische Hemmung ohne das Reihenfolgephänomen. Labenzyme von Meer-schweinchen und von Hecht zeigten in den untersuchten Konzentrationen nach Aufkochen keine Hemmung.