

# Über ermüdend wirkende Eiweißspaltprodukte und ihre Beeinflussung.

Von

**Wolfgang Weichardt und Erwin Schwenk.**

Mit sechs Kurvenzeichnungen und einer Abbildung im Text.

(Aus dem chemischen Laboratorium der K. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen.)

Der Redaktion zugegangen am 29. Dezember 1912.)

In letzter Zeit gewann das Studium parenteral entstehender Eiweißspaltprodukte nach verschiedenen Richtungen hin erneutes Interesse. Unter Hinweis auf die in der Monographie des einen von uns<sup>1)</sup> behandelten Fragestellungen soll hier über Versuche berichtet werden, die charakteristische Wirkung gewisser Eiweißspaltprodukte durch chemisch definierbare Substanzen aufzuheben. Diese Entgiftung von Eiweißabkömmlingen scheint uns auch im Hinblick auf die Frage der Toxin-Antitoxinbindung nicht ohne Interesse.

In der angeführten Monographie wurde der Abbau von Eiweiß in alkalischer oder saurer Lösung, durch Reduktion oder Oxydation, durch fermentative Spaltung und durch Elektrolyse beschrieben.

Man gelangt hierdurch zu höhermolekularen Spaltprodukten, die durch Dialyse von den niedermolekularen getrennt, bei subcutaner Injektion Temperaturerniedrigung, Atemverlangsamung und das reine Bild des Sopors, ohne Krämpfe, bei den Versuchstieren hervorrufen. Es wurde weiter auch über die bemerkenswerte Tatsache berichtet, daß gewisse Stoffe eine auffallend entgiftende Wirkung auf die Lösungen dieser Gifte ausüben, sodaß sie ihre Wirkung unter günstigen Umständen völlig verlieren können.

<sup>1)</sup> W. Weichardt, Über Ermüdungsstoffe, 1912, Stuttgart b. Ferd. Enke, 2. Aufl., wo die einschlägige Literatur angeführt ist.

Von chemisch definierbaren Körpern erwies sich das Succinimid als wirksam. Stärker waren aber Gemische vorläufig noch nicht identifizierter Substanzen, die durch Acetonextraktion aus abgebautem Eiweiß gewonnen waren. Sie wurden Retardine (Hemmungskörper) genannt. Möglichst viele und möglichst wirksame solcher Hemmungskörper kennen zu lernen, wurde als nächstes Ziel der Arbeiten in Aussicht genommen, da dies vom theoretischen und praktischen Standpunkt aus gleich wichtig erscheint.

Wir haben die vorerwähnten Versuche fortgesetzt und berichten im folgenden über die Darstellung der wegen ihrer charakteristischen Wirkung Ermüdungsstoffe (Kenotoxine) genannten hochmolekularen Eiweißspaltprodukte auf elektrischem Wege und über die Aufhebung ihrer eigenartigen Wirkung durch chemisch definierte Körper. Wir fanden, daß Guanidinderivate eine mindestens ebenso kräftige Wirkung ausüben, wie das Succinimid. Außer dem Guanidin haben wir noch eine Reihe von Derivaten desselben, sowie andere Körper mit der Atomgruppierung  $-C-NH-C-$  auf ihre Wirkung untersucht.<sup>1)</sup>

### I. Darstellung des Toxins.

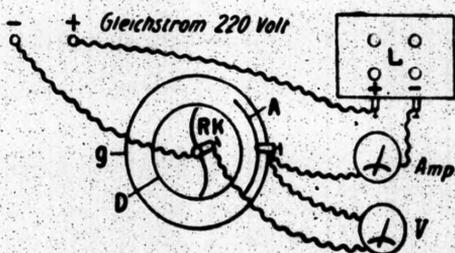
Ein Meerschweinchen oder Kaninchen wird möglichst vollständig entblutet und hierauf das Muskelfleisch sorgfältig abpräpariert. Dieses wird sehr fein gehackt und der so erhaltene Brei auf flachen Schalen bei möglichst niedriger Temperatur (Faust-Heimscher Trockenapparat, unter  $40^{\circ}$ ) rasch vollkommen eingetrocknet. Hierbei, sowie bei allen Arbeiten zur Toxindarstellung, ist peinlich darauf zu achten, daß die Temperatur womöglich nicht über  $35-37^{\circ}$  C. steigt. Stärker erhitze Substanzen liefern geringerwertige oder unwirksame Toxinlösungen. Nach dem Trocknen wird das Muskeleiweiß möglichst fein zerrieben. Von dem so erhaltenen Pulver werden

---

<sup>1)</sup> Für die Überlassung von Präparaten danken wir den Herren Proff. Busch (Erlangen), Schittenhelm (Königsberg), Suida (Wien), sowie H. Dr. Guggenheim (Grenzach) und H. Hofapotheker Dr. Limpach (Erlangen) verbindlichst.

10 g mit 80 ccm physiologischer Kochsalzlösung in einem Tondiaphragma gut benetzt und eine halbe Stunde lang mit der Röhrelektrode gerührt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Hierauf wird der elektrische Strom eingeschaltet und unter fortgesetztem Rühren eine halbe Stunde lang elektrolysiert. Die Röhrelektrode wird als Stromaustrittsstelle benutzt, sodaß der Abbau des Eiweißes an der Kathode stattfindet. Die von uns angewendete Anordnung ist aus der folgenden Übersichtsskizze zu ersehen.

D ist das Tondiaphragma, in dem sich das zu elektrolysierende Eiweiß befindet. In diesem wird die aus Nickel gefertigte Rührkathode RK durch eine kleine Turbine oder einen Elektromotor so gedreht, daß etwa 150 Umdrehungen in der Minute gemacht werden. Wir verwendeten zuerst eine Vollkathode von 10 qcm Fläche, die wir bei unseren letzten Versuchen durch ein S-förmig gekrümmtes Nickeldrahtnetz (5 : 5 cm) ersetzt haben. Elektrolysiert haben wir mit Gleichstrom von 220 Volt mit einem vorgelegten Widerstand L (4 Glühlampen zu 16 Amp.). A ist die Anode (Platin) und G ein Glasgefäß, das mit physiologischer Kochsalzlösung beschickt wurde. Die ganze Apparatur stand in einem großen Wasserbad, um die Temperatur möglichst niedrig und konstant halten zu können. Die Badspannung, gemessen zwischen RK und A, betrug bei Anwendung der Netzkathode etwa 14 Volt. Das Ampèremeter zeigte während der Elektrolyse konstant 1,3 Amp. Die Tonzelle wurde nach dem Gebrauch mit einer weichen Bürste sorgfältig gereinigt und, während sie nicht gebraucht wurde, unter Wasser aufbewahrt.



Nach dem Abstellen des Stromes wird der Inhalt der Tonzelle, der zu einer steifen, gelatineartigen Masse von stark alkalischer Reaktion geworden ist, in ein Becherglas entleert und nun mit verdünnter Salzsäure tropfenweise vorsichtig gegen Lackmus gerade neutral gemacht. Man muß jedesmal nach dem Zusatz einiger Tropfen Salzsäure mit einem Glasstab gut rühren, da sonst durch das, durch den Säurezusatz gerinnende Eiweiß eine ungleichmäßige Verteilung verursacht würde. Hat man den Neutralpunkt erreicht, so ist die Masse zwar breiig, aber nicht mehr gelatinös und läßt sich durch starkes Zentrifugieren in

eine klare Flüssigkeit und die nicht in Lösung gegangenen Muskelreste trennen. Die helle Lösung wird, wenn nötig, nochmals neutralisiert, da das Muskelfleisch manchmal Säure zurückhält, und hierauf in einer Petri-Schale im Faust-Heim eingedampft.<sup>1)</sup> Hat man die Darstellung um 8 Uhr früh begonnen, so kann bis 12 Uhr die Eiweißlösung so weit eingedampft sein, daß man sie in einem Dialysator von etwa 8 cm Durchmesser in möglichst dünner Schicht gegen fließendes, kaltes Wasser dialysieren kann. Dies geschieht mindestens 4 Stunden; nach dieser Zeit sind gewöhnlich die niedermolekularen Spaltprodukte, die beim Tierversuch die Wirkung der Ermüdungsstoffe stören, bis auf unschädliche Reste entfernt. Man dampft nun, wenn es die durch die Dialyse verursachte Flüssigkeitsvermehrung nötig erscheinen läßt, nochmals im Faust-Heim auf etwa 3—4 ccm ein. Sollten sich noch Flocken von Eiweiß abgeschieden haben, so wird nochmals zentrifugiert.

Die so erhaltene Lösung ist eine klare gelbliche Flüssigkeit. Rotfärbung tritt nur bei nicht genügendem Entbluten des verwendeten Tieres ein. Das Kenotoxin läßt sich im Eisschrank (besser im Frigo) einige Zeit aufbewahren, doch wird es nach und nach weniger wirksam.<sup>2)</sup> Besonders scheint ihm das wiederholte Auftauen zu schaden. Es gehen offenbar in der sich selbst überlassenen Lösung schon bei Zimmertemperatur rasch weitere Zersetzungen vor sich, sodaß sich niedrig molekulare Spaltprodukte anhäufen, die die reine Ermüdungswirkung trüben.

Es ist deshalb ratsam, das Toxin möglichst jedesmal frisch herzustellen.

## II. Entgiftungsversuche.

Zu den Entgiftungsversuchen wurde je 1 ccm der Toxinflüssigkeit mit einer sterilen Pipette abgemessen und in ein

<sup>1)</sup> Ursprünglich versuchten wir hier eine Behandlung mit  $\text{CdCl}_2$  und Ausfällung desselben mit Schwefelwasserstoffgas zur Reinigung des Toxins durchzuführen, doch zeigten sich die so gewonnenen Lösungen für unsere Zwecke als ungeeignet, da sie Komponenten enthielten, die dem reinen Kenotoxin nicht zuzurechnen sind.

<sup>2)</sup> Das bei niedriger Temperatur zur Trockene gebrachte Toxin ist nach der Auflösung noch relativ gut wirksam.

kleines Schälchen getan. Zu je 1 ccm Toxin wurde dann 0,1 ccm der Lösung des zu untersuchenden Präparates in frisch destilliertem Wasser gegeben. In ein gleiches Schälchen kam ebenfalls 1 ccm Toxin, das mit 0,1 ccm destillierten Wassers auf dasselbe Volumen gebracht wurde (Kontrollschälchen). Von den zu untersuchenden entgiftenden Präparaten wurden Lösungen 1 : 100 bis 1 : 1000000 verwendet, wobei bei Salzen nur die wirksame Substanz berechnet wurde, sodaß z. B. bei Guanidinhydrochlorid die Berechnung nur auf das Guanidin zu beziehen ist. Die mit Uhrgläsern zugedeckten Schälchen standen, um die Entgiftung zu begünstigen, etwa 1 Stunde bei 37° C. im Brutschrank. Nach dieser Zeit wurde je eine Maus mit dem Toxin allein und eine andere mit der gleichen Menge entgifteten Toxins subcutan injiziert. Die jeweils injizierten Mengen sind aus den bezüglichen Angaben der einzelnen folgenden Versuchsreihen zu ersehen.

Die Tiere waren vor der Injektion gewogen und aus einer größeren Anzahl die zu einem Versuche verwendeten so ausgewählt worden, daß sie womöglich gleiches Gewicht hatten oder nur wenig (0,5—1 g) voneinander abwichen. Ferner wurde besonders darauf gesehen, daß die Körpertemperatur gleich war und etwa 37,5° C. betrug. Bei nicht ganz gleichen Tieren wurde das schwerere und höher temperierte als Toxintier genommen, um nicht günstige Bedingungen für unsere Versuche zu erhalten.<sup>1)</sup> Injiziert wurde mit langer stumpfer Kanüle, die weit unter die Rückenhaut nach vorn geschoben wurde. Die Injektionsstelle wurde mit einer schon die Injektionsnadel umfassenden kleinen Klemme abgeschlossen, die nach dem Herausziehen der Injektionsnadel noch bis zur Resorption der Flüssigkeit liegen blieb, sodaß die injizierte Flüssigkeit quantitativ genau resorbiert wurde. Die Temperatur der Mäuse wurde anfangs alle Viertelstunden, später in größeren Zeiträumen gemessen und zwar im After. (Mäuse thermometer v. C. Richter, Berlin.) Fällt die Temperatur der Toxinmaus nach einer halben Stunde nicht unter 34°, so empfiehlt es sich, beiden Mäusen nochmals gleiche geringe Dosen zu injizieren. Eine geringe Temperatursenkung bis etwa 2°, die auch bei vollkommen entgifteten Toxinen eintritt, muß auf Rechnung der Injektion

<sup>1)</sup> Für Reihenversuche, wie sie hier nötig sind, ist der Besitz eines größeren warm gehaltenen Tierstalles, mit vielen gut behandelten Mäusen unbedingtes Erfordernis. Tiere, welche in Mäusegläsern gehalten worden sind, zeigen meist erniedrigte Temperatur und sind für Vergleichsversuche nicht brauchbar.

gesetzt werden. Meist wird man, wenn die gegebene Vorschrift zur Toxin-darstellung befolgt wird und die Substanzen frisch verwendet werden, genügend stark wirkende Toxine bekommen, sodaß in der Regel eine einmalige Injektion genügt.

Als ausschlaggebende Beobachtungszeit kommen die ersten zehn Stunden in Betracht. Später werden die Versuche durch sekundäre Einflüsse wahrscheinlich bakterieller Natur oft sehr gestört. Auch sind injizierte, einzeln gehaltene Mäuse gegen Kälte besonders empfindlich. Vor allem gehen die injizierten Tiere kachektisch zugrunde. Diese Zustände sind von Schittenhelm<sup>1)</sup> und Weichardt als proteinogene Kachexie beschrieben worden.

Die reine Wirkung unserer auf die oben beschriebene Weise hergestellten Eiweißspaltprodukte äußert sich außer in fortschreitendem Temperaturabfall in Atemverlangsamung und Benommenheit. Hat man größere Dosen injiziert, so steht nach einer Latenzzeit von einigen Stunden die äußerst verlangsamte Atmung sogar still, während das Herz noch schlägt.

Bei geringeren Injektionsdosen steigt die Temperatur, bisweilen erst nach Stunden, allmählich wieder an und das Tier erholt sich. Letzteres ist vor allem zu beobachten, wenn das Gift in unserem Sinne besonders rein ist. Mit solchen Toxinlösungen sind die Entgiftungsergebnisse am günstigsten durchzuführen. Lösungen, die hochgradig deletäre, vor allem krampferregende Komponenten enthalten, sind zu vermeiden. Als gut wirkend möchten wir ein Toxin bezeichnen, das bei Injektion von 0,6 ccm in der ersten halben Stunde bei der Toxinmaus einen Temperaturabfall von etwa 15% der Anfangstemperatur hervorruft.

Im folgenden seien die Protokolle einiger unserer Versuche wiedergegeben. Die einzelnen Tabellen enthalten die Temperaturmessungen. Aus den Überschriften der einzelnen Spalten sind die jeweils verwendeten Präparate und ihre Verdünnungen zu ersehen.

Einige der von uns zur Beeinflussung unserer Eiweißspaltprodukte verwendeten Substanzen haben selbst in der starken Verdünnung, in der sie von uns benutzt wurden, noch

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 14, S. 609 (1912).

eigene Giftwirkung. Doch sind sehr oft die Wirkungszeiten dieser Gifte von denen unserer Eiweißspaltprodukte verschieden, sodaß auch da von einer entgiftenden Wirkung in bezug auf unser Kenotoxin gesprochen werden kann.

Es war unsere Absicht, vorerst durch Prüfung einer Anzahl verschiedener Substanzen möglichst eine Umgrenzung der Wirksamkeit zu finden. Systematische Versuche in den homologen Reihen sollen dann die Abhängigkeit der Wirkung von der Konstitution zeigen.

Versuch Nr. 1 am 7. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 26. XI.—2. XII. 1912.

Antikörper: Succinimid,  $C_4H_5O_2N + H_2O$  1 : 100.

Retardin, 1 : 100.

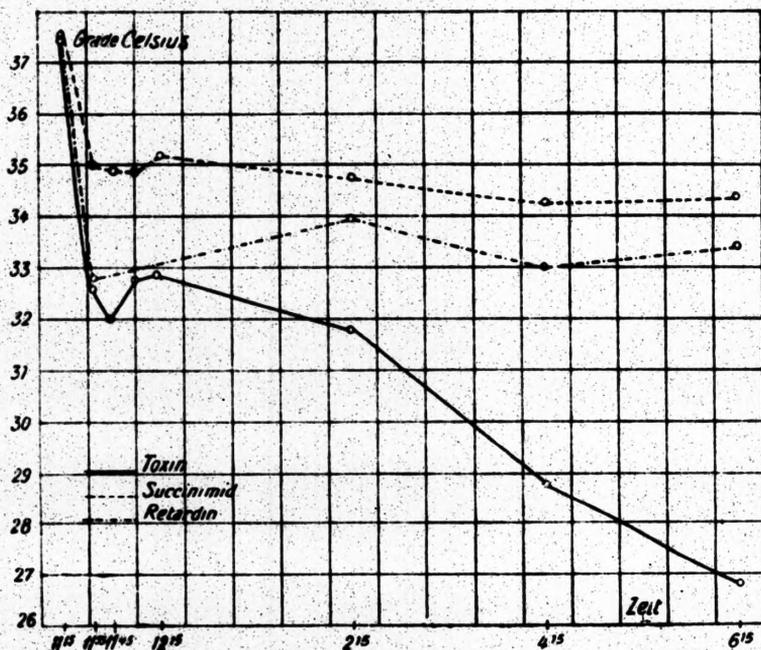
	Toxin	Toxin + Succinimid	Toxin + Retardin
Gewicht der Mäuse in g	13,8	13,0	13,6
Anfangstemperatur	37,4	37,5	37,4
11 <sup>15</sup>	Injiziert 0,8 ccm		
11 <sup>33</sup>	32,6	35,0	32,8
11 <sup>45</sup>	32,0	34,9	— <sup>2)</sup>
12 <sup>00</sup>	32,8	34,9	—
12 <sup>15</sup>	32,9	35,2	—
2 <sup>15</sup>	31,8	34,8	34,0
4 <sup>15</sup>	28,8	34,3	33,0
6 <sup>15</sup>	26,8	34,4	33,4
10 <sup>00</sup> 1)	27,0	38,4	37,6
12 <sup>00</sup>	tot	erholt	erholt

Es zeigt sich hier an dem Gang der Temperatur der Toxinmaus deutlich eine kleine Erholung, eine Erscheinung, die bei mittelstarken Toxinen häufig bemerkbar wird und die in kurvenmäßiger Darstellung noch besser zum Vorschein kommt. Bei den Antikörpermäusen ist die entgiftende Wirkung der angewandten Präparate, die selbst nur wenig giftig sind, deutlich erkennbar.

1) Am nächsten Tag.

2) Blutet, daher weniger oft gemessen.

## Versuch Nr. 1.



Kurve 1.

Von anderen Säureimiden prüften wir noch das Glutarsäureimid und das Phthalimid.

## Versuch Nr. 2 am 18. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 16. u. 17. XII. 1912.

Antikörper: Phthalimid,  $C_8H_5O_2N$ , 1 : 100.

Dicyandiamid,  $C_2H_4N_4$ , 1 : 1000.

Glutarsäureimid,  $C_5H_7O_2N$ , 1 : 100.

	Toxin	Toxin + Phthal- imid	Toxin + Dicyan- diamid	Toxin + Glutarsäure- imid
Gewicht der Mäuse in g	14,8	14,8	14,3	17,3
Anfangstemperatur	38,0	37,4	37,0	38,0
10 <sup>30</sup>	Injiziert 0,8 ccm			—
10 <sup>45</sup>	32,1	37,0	34,0	—
11 <sup>00</sup>	28,8	33,0	32,2	Injiziert 0,8 ccm
11 <sup>15</sup>	27,4	31,0	31,0	35,6
11 <sup>30</sup>	26,8	30,0	29,2	35,0
11 <sup>45</sup>	—	—	—	32,8
12 <sup>00</sup>	24,8	28,0	27,8	30,4
2 <sup>00</sup>	20,8	24,8	21,0	21,6
4 <sup>15</sup>	21,2	27,6	21,2	21,0 <sup>1)</sup>
7 <sup>00</sup>	23,8	31,0	23,6	23,2

<sup>1)</sup> Zeigt Krämpfe.

Phthalimid und Glutarsäureimid zeigen deutlich entgiftende Wirkung, die aber bedeutend schwächer ist, als die des Succinimids. Ob dies auf die auch sonst beobachtete Schwankung der Wirkung innerhalb homologer Reihen zurückzuführen ist, sollen weitere Versuche mit Säureimiden lehren.

Daß die Reduktion der im Ring der Säureimide enthaltenen CO-Gruppen zu CH<sub>2</sub>-Gruppen keine Aufhebung der Wirkung gegenüber unserem Kenotoxin verursacht, zeigt der folgende Versuch mit Piperidin.

### Versuch Nr. 3 am 28. XI. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 26. u. 27. XI. 1912

Antikörper: Piperidin, C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N, 1 : 1 000 000.

	Toxin	Toxin + Piperidin
	Mittlere Mäuse	
Anfangstemperatur	37,0	37,0
4 <sup>55</sup>		Injiziert 0,6 ccm
5 <sup>10</sup>	32,0	33,8
5 <sup>25</sup>	33,0	32,0
5 <sup>40</sup>	30,9	30,8
5 <sup>55</sup>	31,8	30,0
6 <sup>55</sup>	32,4	32,8
8 <sup>00 1)</sup>	20,0	37,2
10 <sup>40 2)</sup>	20,6	33,6
12 <sup>00</sup>	25,0	36,4

Man sieht hier eine deutlich entgiftende Wirkung bei dem Piperidin. Daß dies keine zufällige Erscheinung, sondern reproduzierbar ist, zeigt noch der folgende Versuch.

<sup>1)</sup> Am nächsten Tag.

<sup>2)</sup> Die Tiere wurden in die Nähe des Ofens gebracht.

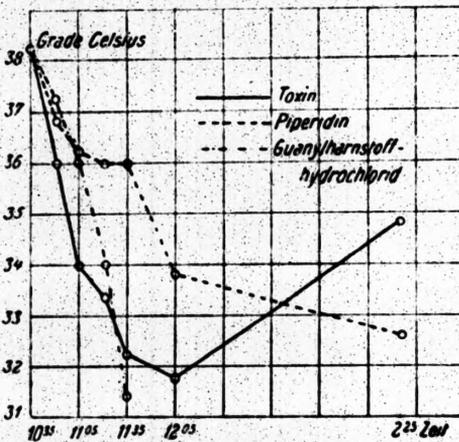
## Versuch Nr. 4 am 20. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 16.—18. XII. 1912.

Antikörper: Piperidin,  $C_5H_{11}N$ , 1 : 1000000.Guanylharnstoffhydrochlorid,  $C_2H_6ON_4HCl$  1 : 1000.

	Toxin	Toxin + Piperidin	Toxin + Guanylharnstoff- hydrochlorid
Gewicht der Mäuse in g	17,4	16,5	16,8
Anfangstemperatur	38,2	38,2	38,2
10 <sup>55</sup>	Injiziert 0,6 ccm		
10 <sup>56</sup>	36,0	36,8	37,2
11 <sup>05</sup>	34,0	36,2	36,0
11 <sup>20</sup>	33,4	36,0	34,0
11 <sup>55</sup>	32,2	36,0	31,4
12 <sup>05</sup>	31,8	33,8	28,4
2 <sup>25</sup>	34,8	32,6	27,4
7 <sup>15</sup>	37,4	36,8	37,4

## Versuch Nr. 4.



Kurve 2.

Bemerkenswert erscheint uns die entgiftende Wirkung des Piperidins in der angewandten Verdünnung bei der bekannten Giftigkeit dieser Substanz.

Das Verhalten des Piperidins veranlaßte uns auch, das Kairin ( $\alpha$ -Oxy-N-Methyltetrahydrochinolinhydrochlorid) zu prüfen, da auch in diesem ein, wenn auch nicht so weit reduzierter Pyridin-

ring vorhanden ist, wie im Piperidin. Im folgenden Versuche werden neben den Zahlen für Kairin noch die für Pyramidon (Dimethylamidoantipyrin) gegeben.

Versuch Nr. 5 am 21. XII. 1912.

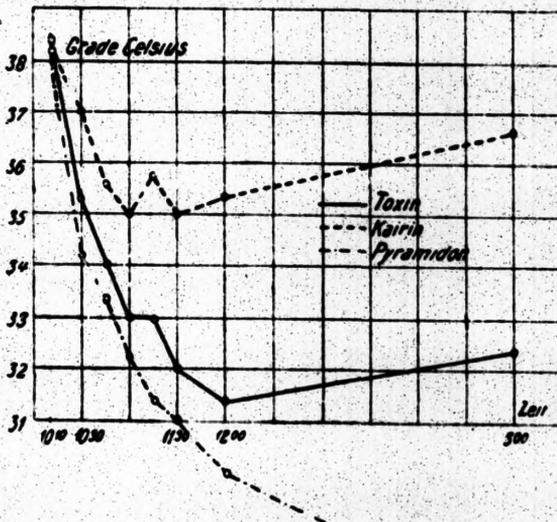
Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 16.—20. XII. 1912.

Antikörper: Kairin,  $C_{10}H_{13}ON \cdot HCl$ , 1 : 1000.

Pyramidon,  $C_{13}H_{17}ON_3$ , 1 : 1000.

	Toxin	Toxin + Kairin	Toxin + Pyramidon
Gewicht der Mäuse in g	17,7	16,5	17,0
Anfangstemperatur	38,4	38,2	38,0
10 <sup>10</sup>	Injiziert 0,6 ccm		
10 <sup>30</sup>	35,4	37,0	34,2
10 <sup>45</sup>	34,0	35,6	33,4
11 <sup>00</sup>	33,0	35,0	32,2
11 <sup>15</sup>	33,0	35,8	31,4
11 <sup>30</sup>	32,0	35,0	31,0
12 <sup>00</sup>	31,4	35,4	30,0
3 <sup>00</sup>	32,4	36,6	28,8
7 <sup>00</sup>	34,8	38,0	33,0

Versuch Nr. 5.



Kurve 3.

Von anderen Präparaten, die wie das Succinimid die Gruppierung — C-NH-C — in einem Ringe enthalten, wurde noch das Tetracarbonimid, Harnsäure und Guanin geprüft, von denen die beiden letzten, wie die Versuche Nr. 14 und Nr. 16 zeigen, wirksam waren, während das Tetracarbonimid, ebenso wie das ebenfalls zyklische Imid Saccharin sich als nicht wirksam erwies. Wir sehen daher von der Wiedergabe der bezüglichen Zahlen ab.

Während die bisher vorgeführten Verbindungen die Imido-gruppe an zwei Kohlenstoffatome gebunden zeigen, sind die zu den folgenden Versuchen verwendeten Substanzen solche, bei denen diese Gruppe doppelt an ein Kohlenstoffatom gebunden ist. Im Gegensatz zu den schwach sauren Säureimiden sind die hier verwendeten Verbindungen verhältnismäßig starke Basen.

### Versuch Nr. 6 am 19. XI. 1912.

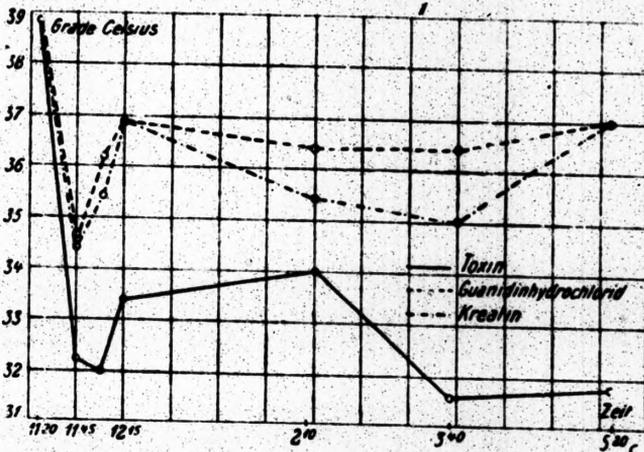
Toxin aus Meerschweinchenmuskel. — Hergestellt am: 1.—9. XI. 1912.

Antikörper: Guanidinhydrochlorid,  $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ , 1 : 100.

Kreatin,  $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3$ , 1 : 100.

	Toxin	Toxin + Guanidin- hydrochlorid	Toxin + Kreatin
	Mittlere Mäuse		
Anfangstemperatur	38,8	38,8	38,8
11 <sup>30</sup>	Injiziert 0,5 ccm		
11 <sup>45</sup>	32,2	34,6	34,4
12 <sup>00</sup>	32,0	36,2	35,4
12 <sup>15</sup>	33,4	36,9	36,9
2 <sup>10</sup>	34,0	36,4	35,4
3 <sup>40</sup>	31,6	36,4	35,0
5 <sup>30</sup>	31,8	37,0	37,0
6 <sup>35</sup>	34,4	37,0	37,6

Versuch Nr. 6.



Kurve 4.

Versuch Nr. 7 am 5. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 26. XI.—2. XII. 1912.

Antikörper: Guanidinhydrochlorid,  $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ , 1 : 1000.

Kreatin,  $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3$ , 1 : 1000.

	Toxin	Toxin + Guanidin- hydrochlorid	Toxin + Kreatin
Gewicht der Mäuse in g	12,65	12,30	12,40
Anfangstemperatur	38,0	38,0	38,0
$10^{25}$	Injiziert 0,6 ccm		
$10^{40}$	32,0	34,8	34,8
$10^{55}$	31,0	34,6	34,6
$11^{10}$	30,0	35,0	34,9
$11^{40}$	28,2	35,2	34,4
$12^{10}$	27,6	37,0	35,4
$2^{15}$	33,6	33,8	30,6
$4^{25} 1)$	32,6	37,0	31,0
$7^{25}$	34,6	36,0	36,0

Hier sei noch ein Kreatinversuch angeführt und zugleich ein solcher, bei dem durch die Amidogruppe substituiertes Guanidin verwendet wurde.

<sup>1)</sup> Besonders die Guanidinmaus ist um 4 Uhr 25' völlig munter, während die Toxinmaus noch stark benommen erscheint.

## Versuch Nr. 8 am 22. XI. 1912.

Toxin aus Meerschweinchenmuskel. — Hergestellt am: 16. XI. 1912.

Antikörper: Kreatin,  $C_4H_9O_2N_3$ , 1 : 100.Amidoguanidin,  $CH_6N_4$ , 1 : 100.

	Toxin	Toxin + Kreatin	Toxin + Amido- guanidin
<b>Gewicht der Mäuse in g</b>	<b>Mittlere Mäuse</b>		
<b>Anfangstemperatur</b>	37,4	36,0	35,4
3 <sup>35</sup>	Injiziert 0,8 ccm		
3 <sup>45</sup>	34,4	35,2	32,2
4 <sup>00</sup>	30,6	32,8	29,0
4 <sup>15</sup>	30,8	32,4	28,4
4 <sup>30</sup>	30,0	32,0	26,8
5 <sup>00</sup>	29,8	31,4	25,0
9 <sup>00</sup>	22,2	37,0	22,0

Das Amidoguanidin dürfte seine im Temperaturabfall zum Vorschein kommende schädigende Wirkung dem Hydrazinrest verdanken. Wie leicht eine Verstärkung der Wirkung des Kreatins herbeigeführt werden kann, zeigt der folgende Versuch Nr. 9, in welchem nach der Jafféschen Methode<sup>1)</sup> hergestelltes Dioxymethylenkreatinin zur Verwendung kam.

## Versuch Nr. 9 am 4. XII. 1912.

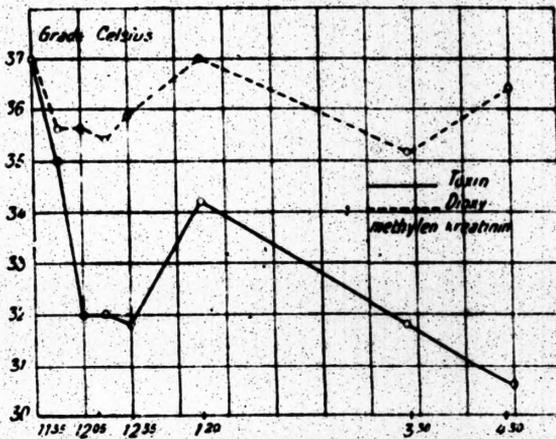
Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 26. XI.—2. XII. 1912.

Antikörper: Dioxymethylenkreatinin,  $C_6H_{11}O_2N_3 + 2 H_2O$ , 1 : 125.

	Toxin	Toxin + Dioxy- methylenkreatinin
<b>Anfangstemperatur</b>	<b>Mittlere Mäuse</b>	
	37,0	37,0
11 <sup>35</sup>	Injiziert 0,6 ccm	
11 <sup>50</sup>	35,0	35,6
12 <sup>05</sup>	32,0	35,6
12 <sup>20</sup>	32,0	35,4
12 <sup>35</sup>	31,8	35,9
1 <sup>30</sup>	34,2	37,0
3 <sup>30</sup>	31,8	35,2
4 <sup>30</sup>	30,6	36,4
7 <sup>15</sup>	26,0	36,8

<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 35, S. 2896 (1902).

Versuch Nr. 9.



Kurve 5.

Die Tiere erholen sich völlig. Ob die Wirkung der Einführung des Formaldehydrestes oder der Anhydridringbildung zuzuschreiben ist, kann vorläufig nicht entschieden werden.

Für das Methylguanidin ist, da es neben der = C = N H-Gruppe noch die für die Säureimide charakteristische Gruppe — C-NH-C — enthält, eine verstärkte Wirkung gegenüber dem Kreatin zu erwarten.

Versuch Nr. 10 am 9. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 3.—7. XII. 1912.

Antikörper: Methylguanidinhydrochlorid,  $C_2H_7N_3 \cdot HCl$ , 1 : 1000.

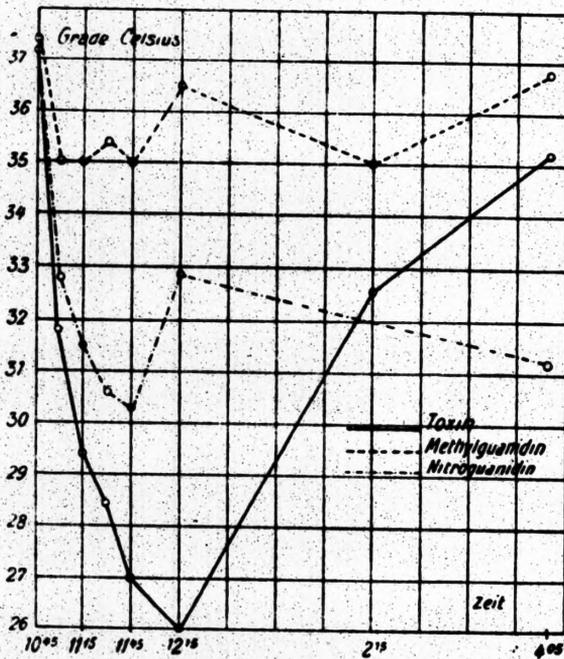
Nitroguanidin,  $CH_4O_3N_4$ , 1 : 1000.

	Toxin	Toxin + Methylguanidin	Toxin + Nitroguanidin
Gewicht der Mäuse in g	13,1	12,7	13,0
Anfangstemperatur	37,4	37,4	37,2
$10^{45}$	Injiziert 0,6 ccm		
$11^{00}$	31,8	35,0	32,8
$11^{15}$	29,4	35,0	31,5
$11^{30}$	28,4	35,4	30,6
$11^{45}$	27,0	35,0	30,3

## Versuch Nr. 10. — Fortsetzung.

	Toxin	Toxin + Methylguanidin	Toxin + Nitroguanidin
12 <sup>15</sup>	26,0	36,5	32,9
2 <sup>15</sup>	32,6	35,0	32,6
4 <sup>05</sup>	35,2	36,8	31,2
8 <sup>05 1)</sup>	37,8	37,8	35,8

## Versuch Nr. 10.



Kurve 6.

Den vorliegenden Versuch möchten wir als besonders gelungen hervorheben. Während die Toxinmaus schon 15 Minuten nach der Injektion völlig soporös ist, bleibt die Methylguanidinmaus, wenn man von der Wirkung des Injektions-shocks absieht, ziemlich unangegriffen. Daß sich die Toxinmaus, trotzdem ihre Temperatur bis auf 26° sank, in verhältnismäßig kurzer Zeit wieder erholte, beweist, daß wir hier ein sehr reines Kenotoxin hatten. Schädigende Komponenten waren darin nicht vorhanden.

<sup>1)</sup> Am nächsten Tag.

Versuch Nr. 11 am 16. XI. 1912.<sup>1)</sup>

Toxin aus Meerschweinchenmuskel. — Hergestellt am: 11. XI. 1912.

Antikörper: Methylguanidinchlorhydrat,  $C_2H_7N_3 \cdot HCl$ , 1 : 100.

	Toxin	Toxin + Methylguanidin- chlorhydrat
Kleine Mäuse		
Anfangstemperatur	37,0	37,0
10 <sup>30</sup>	Injiziert 1,0 ccm	
10 <sup>45</sup>	31,0	33,2
11 <sup>15</sup>	31,0	33,0
11 <sup>45</sup>	27,8	32,0
12 <sup>15</sup>	25,0	31,2

Man sieht auch hier die entgiftende Wirkung des Präparats.

Da nach A. Kossel und A. T. Cameron<sup>2)</sup> das Clupein den Guanidinrest einseitig gebunden enthält, haben wir auch dieses geprüft. Wir mußten das schwefelsaure Salz verwenden und führen hauptsächlich hierauf die geringe Wirkung des Präparates zurück.

## Versuch Nr. 12 am 25. XI. 1912.

Toxin aus Meerschweinchenmuskel. — Hergestellt am: 1.—9. XI. 1912.

Antikörper: Clupeinsulfat, 1 : 5000.

	Toxin	Toxin + Clupeinsulfat
Mittlere Mäuse		
Anfangstemperatur	38,0	37,4
4 <sup>15</sup>	Injiziert 0,8 ccm	
4 <sup>30</sup>	34,0	33,8
4 <sup>45</sup>	33,1	33,9
5 <sup>00</sup>	32,4	34,6
5 <sup>10</sup>	32,1	34,6
6 <sup>00</sup>	32,8	34,4
7 <sup>00</sup>	33,0	34,0

<sup>1)</sup> Zur Entgiftung wurde 24 Stunden im Brutschrank stehen gelassen; das Toxin war daher etwas zersetzt. Zum Schluß des Versuches traten deshalb schwache Krämpfe auf, die wohl auf niedrigmolekulare Abbauprodukte der Kenotoxinlösung zurückgeführt werden müssen.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 457 (1912).

## Versuch Nr. 13 am 13. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenfleisch. — Hergestellt am: 12. XII. 1912.

Antikörper: Clupeinsulfat, 1 : 5000.

	Toxin	Toxin + Clupeinsulfat
Gewicht der Mäuse in g	13,3	13,3
Anfangstemperatur	37,6	37,6
10 <sup>45</sup>	Injiziert 1,0 ccm	
11 <sup>00</sup>	33,4	33,9
11 <sup>15</sup>	31,2	32,4
11 <sup>30</sup>	30,0	31,4
11 <sup>45</sup>	30,4	32,0
12 <sup>00</sup>	30,4	32,2
2 <sup>00</sup>	32,2	33,4
4 <sup>00</sup>	33,2	33,6

Es wurden noch die durch Kondensation von Guanidin mit Guanidin sowie mit Harnstoff entstehenden Produkte, das Biguanid und der Guanylharnstoff, geprüft. Bezüglich des letzteren sei auf Versuch Nr. 4 verwiesen. Das Biguanid konnten wir nur als Sulfat in Anwendung bringen. Der Versuch zeigt, daß auch hier das Guanidin entgiftende Fähigkeit besitzt.

## Versuch Nr. 14 am 3. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 26. XI.—2. XII. 1912.

Antikörper: Biguanidsulfat,  $C_2H_7N_5 \cdot H_2SO_4$ , 1 : 1000.Harnsäure, <sup>1)</sup>  $C_5H_4O_3N_4$ , 1 : 1000.

	Toxin	Toxin + Biguanidsulfat	Toxin + Harnsäure
Mittlere Mäuse			
Anfangstemperatur	37,0	37,0	37,0
11 <sup>25</sup>	Injiziert 0,8 ccm		
11 <sup>40</sup>	30,0	32,8	32,8
11 <sup>55</sup>	28,0	30,4	31,4
12 <sup>10</sup>	25,6	30,0	30,8
2 <sup>00</sup>	20,8	30,8	28,4
5 <sup>00</sup>	24,0	31,6	30,0
6 <sup>40</sup>	25,0	29,0	28,0

<sup>1)</sup> Die Harnsäure wurde durch einige Tropfen Alkali in Lösung gebracht.

Die Wirkung der Harnsäure scheint bemerkenswert, da diese ja sonst als Körpergift gelten kann.

Versuch Nr. 15 am 10. XII. 1912.

Toxin aus Kaninchenmuskel. — Hergestellt am: 3.—7. XII. 1912.

Antikörper: Biguanidsulfat,  $C_2H_7N_5 \cdot H_2SO_4$ , 1 : 1000.

Biuret,  $C_2H_5O_2N_2$ , 1 : 1000.

	Toxin	Toxin + Biguanidsulfat	Toxin + Biuret
Gewicht der Mäuse in g	13,6	13,3	13,1
Anfangstemperatur	37,2	37,2	37,2
11 <sup>25</sup>	Injiziert 0,8 ccm		
11 <sup>40</sup>	32,4	34,0	33,2
11 <sup>55</sup>	30,4	33,0	29,0
12 <sup>10</sup>	30,0	34,0	27,4
2 <sup>25</sup>	34,2	34,7	23,8
8 <sup>00 1)</sup>	37,0	33,0	20,0

Daß das Biuret giftig wirken würde, durfte aus der Giftigkeit des Harnstoffs geschlossen werden. Auch ein zweiter Versuch bestätigt dies.

Versuch Nr. 16 am 30. XI. 1912.

Toxin aus Kaninchenfleisch. — Hergestellt am: 26. XI.—2. XII. 1912.

Antikörper: Biuret,  $C_2H_5O_2N_2$ , 1 : 1000.

Guanin,  $C_5H_5ON_5$ , 1 : 1000.

	Toxin	Toxin + Biuret	Toxin + Guanin
	Mittlere Mäuse		
Anfangstemperatur	38,8	36,8	36,8
4 <sup>15</sup>	Injiziert 0,6 ccm		
4 <sup>30</sup>	32,4	32,4	33,4
4 <sup>50</sup>	32,4	31,4	33,0
5 <sup>00</sup>	32,0	31,2	33,8
5 <sup>30</sup>	34,4	31,8	33,8

1) Am nächsten Tag.

Ob die Wirkung des Guanins in diesem Versuch auf die Wirkung des zur Lösung nötigen Alkalizusatzes zurückzuführen ist, muß dahingestellt bleiben. Es sei schließlich noch ein Versuch mit zwei deutlich giftig wirkenden Körpern angeführt.

### Versuch Nr. 17 am 21. XI. 1912.

Toxin aus Meerschweinchenmuskel. — Hergestellt am: 16. XI. 1912.

Antikörper: Nitron-sulfat,  $C_{20}H_{16}N_3 \cdot H_2SO_4$ , 1 : 100.

Triphenylaminoguanidinhydrochlorid,  $C_{19}H_{16}N_4 \cdot HCl$ , 1 : 100.

	Toxin	Toxin + Nitron- sulfat	Toxin + Triphenyl- aminoguanidin- hydrochlorid
	Mittlere Mäuse		
Anfangstemperatur	37,0	37,0	37,0
• 3 <sup>00</sup>	Injiziert 0,8 ccm		
3 <sup>15</sup>	30,4	31,7	30,4
3 <sup>30</sup>	29,0	30,6	28,0
3 <sup>45</sup>	29,0	29,0	—
4 <sup>30</sup>	31,0	27,0	25,0
6 <sup>30</sup>	29,0	22,4	23,4

Bei dem Triphenylaminoguanidin macht sich der giftige Hydrazinrest in gleich anfangs auftretenden Krämpfen geltend.

Anlässlich der Besprechung des Succinimids in der oben angeführten Monographie war auf die interessante Tatsache hingewiesen worden, daß gerade dieser Körper, der ja mit dem für die Zusammensetzung des roten Blutfarbstoffes so wichtigen Pyrrol zusammenhängt, auf Eiweißspaltprodukte entgiftend wirkt. Es erscheint uns von Bedeutung, daß auch die Guanidinderivate, die im tierischen Körper eine so große Rolle spielen, nach unseren Versuchen zweifellos entgiftend auf unsere Eiweißspaltprodukte von Ermüdungstoxincharakter wirken.

Gemeinsam ist allen den wirksamen Verbindungen ein doppelt an Kohlenstoff gebundenes Stickstoffatom, wobei nur ein quantitativer Unterschied darin bemerkbar ist, ob diese doppelte Bindung durch ein und dasselbe Atom erfolgt, oder aber ob dies durch zwei verschiedene Kohlenstoffatome geschieht.

Damit stimmt es überein, daß, wie die Säureimide, auch diejenigen Guanidinderivate eine Verstärkung ihrer Wirkung gegen die des reinen Guanidins zeigen, bei denen eine Amidogruppe durch Methyl substituiert ist, sodaß hier wieder Stickstoff doppelt an Kohlenstoff gebunden erscheint. Das Saccharin, in welchem die Amidogruppe nur einfach an Kohlenstoff gebunden ist, während die andere Valenz durch Schwefel gesättigt wird, war unwirksam. Ebenso zeigt die Substitution der Amidogruppe des Guanidins durch eine weitere Amidogruppe im Aminoguanidin die Gültigkeit dieser Regel, da sich dieses Präparat als unwirksam erwies. (Vgl. auch Versuch Nr. 5 mit Pyramidon!) Hier wollen wir noch auf die schon weiter oben hervorgehobene Verstärkung der Wirkung des Kreatins durch den Übergang in das Dioxymethylenkreatinin hinweisen. Daß das Tetracarbonimid sich als nicht wirksam erwies, scheint an seiner Eigengiftigkeit zu liegen, die eine Beeinflussung bei unserem Versuche verdeckt.

Durch konsequentes Verfolgen der sich aus der Konstitution der antikörperartig wirkenden Stoffe ergebenden Gesichtspunkte wird man allmählich Einblick gewinnen in die Wirkungsweise dieser Substanzen. Vor allem wird man dann entscheiden können, ob eine wirkliche chemische Bindung gewisser labiler toxisch wirkender Komplexe in unseren Ermüdungstoxinen stattfindet.

Den Inhalt der vorliegenden Mitteilung möchten wir in folgende Schlußsätze zusammenfassen:

1. Es wird die Darstellung charakteristisch ermüdend wirkender hochmolekularer Eiweißspaltprodukte (Kenotoxine) aus Muskeleiweiß mittels der Elektrolyse beschrieben.

2. Die Wirkung der so gewonnenen Präparate wird durch eine Reihe chemisch definierbarer Körper aufgehoben.

3. Die Beziehung der Konstitution dieser Körper zu ihrer Wirkung wird erörtert.

Anmerkung bei der Korrektur. Um falschen Auffassungen vorzubeugen, soll hervorgehoben werden, daß wir uns wohl bewußt sind,

daß es zurzeit noch nicht möglich ist, über die Art der entgiftenden Wirkung der von uns verwendeten Präparate eine endgültige Entscheidung zu treffen. Wir sind geneigt, auch hier im wesentlichen direkte Kuppelungen anzunehmen. Aber auch, wenn man bei unseren Präparaten nur eine der Toxinbeeinflussung entgegengesetzte annehmen will, so bietet unsere Versuchsanordnung dennoch eine ausgezeichnete Handhabe, die antikörperartige Wirkung dieser Substanzen in derartigen Verdünnungen überhaupt zur Anschauung zu bringen.

Es sind Versuche im Gange, hier genauer zu differenzieren. Ebenso sollen auch andere Energiearten zur Toxindarstellung verwendet und die Versuche mit größeren Tieren durchgeführt werden.

---