

41. K. H. Slotta und Gerhard Szyszka: Schlangengifte, I. Mitteil.: Bestimmung von Gift-, Koagulase- und Lecithinase-Wert und Beeinflussung der Gifte durch physikalische und chemische Mittel.

[Aus d. Chem. Abteil. d. Instituto Butantan, São Paulo, Brasilien.]
(Eingegangen am 17. Dezember 1937.)

Nachdem sich viele der älteren chemischen Angaben über die Chemie der Schlangengifte als mehr oder weniger grobe Irrtümer erwiesen haben, wurden von Micheel¹⁾2), Wieland³⁾ und deren Mitarbeitern neue und erfolgreiche Untersuchungen ausgeführt, diese Gifte zu reinigen und ihre Konstitution zu ergründen. Diese Arbeiten führten zwar bisher nur bei einigen Giften der Naja-Arten aus Südafrika und Indien zu einem gewissen Erfolge, da diese, wie wahrscheinlich alle Elapiden-Gifte⁴⁾, niedrigermolekular und einfacher zu reinigen sind. Es ist uns hier aber auch schon möglich gewesen, die Gifte von Crotaliden-Arten⁴⁾ in sehr guter Ausbeute wesentlich anzureichern. Nun bestehen zwischen den Giften der Elapiden und Crotaliden große graduelle Unterschiede im relativen Gehalt an den einzelnen giftigen Prinzipien (neurotoxisches, proteolytisches, cytolytisches, hämolytisches, koagulationsförderndes usw. Prinzip). Auch wird die chemische Aufklärung der Crotaliden-Gifte viel größerer Anstrengungen bedürfen als die schon begonnene der Elapiden-Gifte. Ist es uns doch beispielsweise ebensowenig wie anderen¹⁾ geglückt, Crotaliden-Gift zu dialysieren, was mit Elapiden-Giften ohne weiteres möglich ist.

Aber trotz der chemischen und physiologischen Unterschiede dieser beiden großen Gruppen von Schlangengiften und der vielen weiteren Verschiedenheiten, die die einzelnen Gifte der zahlreichen Untergruppen aufweisen, besteht schon heute kaum noch ein Zweifel, daß das Bauprinzip aller Schlangengifte das gleiche ist: wirksam scheint in allen Fällen ein schwefelreicher Eiweißkomplex zu sein, der mit toxischen und fermentativen Eigenschaften ausgestattet ist, die das Nervengewebe, die Gerinnungsfähigkeit des Blutes, den Bestand der Blutkörperchen und den der Zellwände beeinflussen. Da es sich nach unseren Erfahrungen nicht um ein bloßes Gemenge verschiedener Stoffe handelt, sprechen wir mit Absicht von einem Komplex.

Um für unsere chemischen Studien über die brasilianischen Schlangen-Arten eine sichere experimentelle Grundlage zu schaffen, haben wir für die verschiedenen Wirkungen der Gifte Wirksamkeits-Werte ermittelt. Diese errechnen sich aus der Menge Einheiten, die in 1 mg des im Hochvakuum getrockneten, vollkommen wasserfreien Giftes vorhanden sind. Wir sprechen so von Gift-Wert (GW), Lecithinase-Wert (LW), Koagulations-Wert (KW) usw., durch deren Gesamtheit ein bestimmtes Schlangen-Rohgift und natürlich auch alle Präparate aus Anreicherungs-Versuchen sehr scharf zahlenmäßig zu charakterisieren sind. Wir müssen uns wahrscheinlich noch lange mit der Bestimmung verschiedener solcher Werte behelfen, da alle

¹⁾ F. Micheel u. J. Jung, Ztschr. physiol. Chem. **239**, 217 [1936].

²⁾ F. Micheel, H. Dietrich u. S. Bischoff, Ztschr. physiol. Chem. **249**, 157 [1937].

³⁾ H. Wieland u. W. Konz, Sitz.-Ber. math.-nat. Abt. bayr. Akad. Wiss. **1936**, S. 177.

⁴⁾ Nach der neueren Einteilung der Schlangen sind die Naja-Arten nicht als „Colubriden“, sondern als Elapiden, und die in unseren Arbeiten behandelten Crotalus- und Bothrops-Arten nicht als „Viperiden“, sondern als Crotaliden zu bezeichnen.

anderen Kriterien auf diesem Gebiete nur sehr zweifelhafte Bedeutung haben. Selbst wenn wir nämlich krystallisierte Präparate fassen, bedeutet das bekanntlich bei Proteinen in keiner Weise eine Gewähr für Einheitlichkeit. Der Schmelzpunkt kommt als Charakteristikum überhaupt nicht in Frage, selbst die Bestimmung der optischen Drehung hilft nicht viel. Am besten charakterisiert man ein Schlangengift durch die Angabe möglichst vieler der obengenannten „Werte“, und es lassen sich aus dem Steigen und Fallen dieser Werte in einem Anreicherungs-Gange Schlüsse auf den Gehalt an den einzelnen aktiven Komponenten ziehen.

Den Gift-Wert (GW) eines Schlangengiftes, den wir wie andere^{1) 2) 3)} in erster Annäherung als ein Maß für den Gehalt an neurotoxischer Komponente auffassen, ermitteln wir durch die Bestimmung der minimal tödlichen Dosis an der weißen Maus der Gewichtsklasse 15 bis 18 g. Diese Methode ist hinreichend genau, billig und schnell durchzuführen. Man kann männliche und weibliche Tiere benutzen; letztere dürfen nur nicht schon geworfen haben, weil sie dann erheblich widerstandsfähiger gegen Schlangengift sind. Man hält sie am besten in einem durch Thermoregulation auf 24° eingestellten Raum. Die Tiere werden gewogen und erhalten die entsprechende Menge Gift in meist 0.1 bis höchstens 0.5 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung in zwei gleichen Teilen rechts und links über den Schulterblättern subcutan injiziert. Erfahrungsgemäß darf man nicht in zu kurzer Zeit auswerten, also verhältnismäßig zu große Giftmengen spritzen, da dabei die Werte ungenauer werden. Wir nennen eine Gift-Einheit (GE) diejenige Menge wasserfreies Gift in γ , die 1 g Maus innerhalb von 8 bis 22 Std. tötet; wir verlangen, daß mit dieser dosis minima letalis mindestens 2 von 3 Mäusen nach 22 Std. tot sein müssen. Der Gift-Wert (GW) ist dann die Zahl der in 1 mg vollkommen trocknen Giftes enthaltenen Gift-Einheiten (GE).

Als wir sicher waren, daß wir bei fünf verschiedenen Schlangengiften immer wieder innerhalb von 10 bis 15% Fehlergrenze denselben GW erhielten, haben wir den Einfluß von Temperatur und Säurestufe auf 0.02-proz. Lösungen vom Gift der Klapperschlange, *Crotalus t. terrificus*, über einige Monate hin verfolgt. Um diese Lösungen so lange Zeit gegen bakterielle Infektion zu schützen, wurden sie mit physiologischer Kochsalz-Lösung bereitet, die 0.03% *p*-Oxy-benzoesäure-methylester enthielt. Eine solche Lösung bei ungefähr + 3° aufgehoben, behält ihren GW von 1920 vier Monate konstant. Auch bleibt das durch den Zusatz von *p*-Oxy-benzoesäure-methylester bedingte p_H von 4 bis 4.5 stets unverändert. Dieselbe Lösung bei 37° aufgehoben, verliert in dem Maße, wie die Kurve zeigt, viel schneller an Giftigkeit.

Der GW einer ebensolchen Lösung von *Crotalus*-Gift, die ohne Puffer-Substanzen mit Säure bzw. Lauge auf p_H 1 bzw. 8, bzw. 12, eingestellt und bei + 3° aufgehoben wurde, sank im alkalischen Gebiet außerordentlich viel schneller als im sauren ab, wie aus den entsprechenden Kurven hervorgeht. Ähnliche Versuche Micheels²⁾ mit Naja-Gift, also dem einer Elapiden-Art⁴⁾, zeigten Ähnliches: Der Giftwert einer rund 0.6-proz. und bei 50° aufbewahrten Lösung fiel bei p_H 1 innerhalb von 24 Std. nur auf 57% des Anfangswertes ab, während die Lösung bei p_H 12 schon nach 22 Std. vollständig entgiftet war. Auch dies ist wieder ein Hinweis auf die erwähnte Ähnlichkeit des Bauprinzipes der Schlangengifte.

Der Abfall der Giftwerte beruht unserer Ansicht nach auf folgenden Einflüssen: Im sauren Gebiete werden die Peptid-Bindungen des Neurotoxins hydrolysiert und seine -S-S-Brücken durch Oxydation angegriffen. Beide Reaktionen erfordern höhere Temperatur und stärkere Einwirkungen, als wir sie anwandten, und deshalb leidet das Neurotoxin im sauren Gebiete nur verhältnismäßig wenig. Viel leichter werden seine -S-S-Brücken durch Alkalien — besonders in Gegenwart von Sauerstoff — hydrolytisch gespalten,

und wir führen die Empfindlichkeit des Giftes gegen Alkalien im wesentlichen auf diese Reaktion zurück. Der Nachweis der -S-S-Brücken im Schlangengift und ihre Aufspaltbarkeit ist Gegenstand der folgenden Mitteilung in diesem Hefte.

Über die Koagulation des Blutes unter dem Einflusse von Schlangengiften ist vor kurzem eine ausgezeichnete Arbeit veröffentlicht worden⁵⁾. Manche Gifte enthalten Enzyme, anscheinend proteolytischen Charakters, die im Koagulations-Mechanismus die Rolle des Calcium-Plättchen-

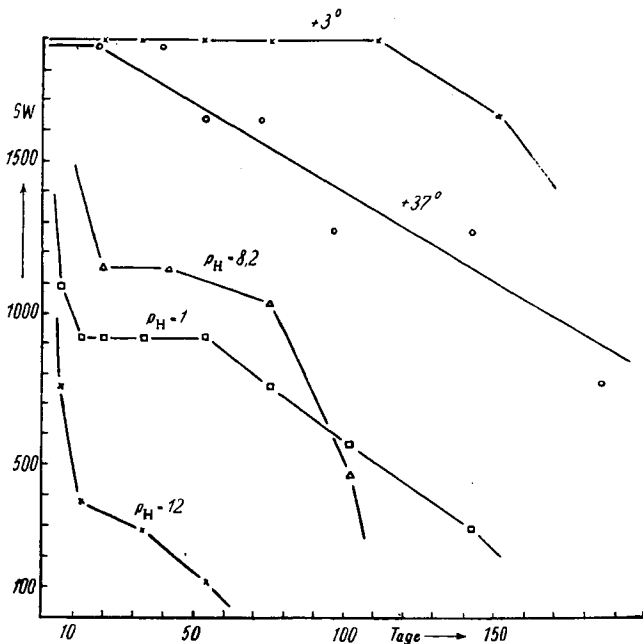


Fig. 1. Einfluß von Temperatur und Säurestufe auf den Giftwert von *Crotalus-t.-terrificus*-Gift.

Systems (Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin) und die Rolle des Thrombins (Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin) übernehmen; manche beeinflussen nur einen dieser beiden Vorgänge. Diese beiden Wirkungen entsprechen der des Trypsins bzw. Papains auf den Koagulations-Mechanismus. Die Gifte, die die Koagulation nicht beeinflussen, enthalten Proteasen, die das Prothrombin, manche auch das Fibrinogen zerstören. Wir hielten es vorerst für unsere Zwecke für unnötig, zwischen den Wirkungen der Gifte auf die einzelnen Phasen des Koagulations-Mechanismus zu unterscheiden, sondern benutzten als Test das Resultat aller dieser Vorgänge, d. h. die Koagulation von frischem Oxalatblut.

Wir messen die Koagulationskraft der Gifte in Koagulase-Werten (KW) an frischem Pferdeblut, das auf 100 ccm 6 ccm 3-proz. Natriumoxalat-Lösung enthält. Durch Zusatz von je 1 ccm verschieden konzentrierter Giftlösung in physiologischer Kochsalz-Lösung zu 5 ccm dieses Blutes wird

⁵⁾ H. Eagle, Journ. exp. Medicine 65, 613 [1937].

die minimal nötige Gift-Menge ermittelt, die die 6 ccm Flüssigkeit in genau 10 Minuten soweit koaguliert, daß sich die gesamte Masse beim Neigen des Röhrchens als Klumpen verschieben läßt. Die Giftmenge in γ , die in 1 ccm dieses Gemisches enthalten ist — also $\frac{1}{6}$ der minimal einzusetzenden Giftmenge für ein Röhrchen —, ist die Koagulase-Einheit (KE). Der Koagulase-Wert (KW) ist die Zahl, die angibt, wieviel dieser so ermittelten KE in 1 mg vollkommen trocknen Giftes enthalten sind.

Bei den Bothrops-Arten sind die KW außerordentlich hoch: Sie schwanken von 1400 (Bothrops jararaca) bis zu 2000 (Bothrops neuwiedii) und 3300 (Bothrops atrox), während der KW von Crotalus t. terrificus nur 30 ist. Für dieselben Bothrops-Arten wurde von Eagle⁵⁾ nachgewiesen, daß sie Prothrombin schon in unwahrscheinlich geringen Konzentrationen in Thrombin verwandeln, und so den Gerinnungsmechanismus auslösen. Crotalus-t.-terrificus-Gift besitzt dagegen nur ein Ferment, das in wesentlich höheren Konzentrationen Fibrinogen in Fibrin umwandelt.

Dies bestätigte sich noch viel besser, als wir die Abhängigkeit des KW von Bothrops-jararaca- und Crotalus-t.-terrificus-Gift von verschiedenen Einflüssen untersuchten. Wir ließen Giftlösungen bei verschiedenen Temperaturen und unter verschiedenem p_H stehen, wobei sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Giftarten zeigte: Während bei Bothrops-jararaca-Gift das neurotoxische und das Koagulationsprinzip gegen erhöhte Temperatur selbst beim optimalen p_H außerordentlich unbeständig ist, so daß schon nach 24-stdg. Stehenlassen bei 50° sowohl GW als auch KW auf etwa 4% abgefallen sind (s. Vers. 1a), ist Crotalus-t.-terrificus-Gift in jeder Hinsicht viel beständiger. Bei p_H 5 bleibt der KW dieses Giftes 2 Tage beim Aufbewahren der Lösung im Wärmeschrank von 50° unverändert, und der GW fällt nur auf etwa 70% des Anfangswertes (s. Vers. 2). Das Koagulationsferment des Crotalus-t.-terrificus-Giftes, das nach Eagle⁵⁾ in seiner Wirkung dem Papain entspricht, scheint also wirklich ebenso wie Papain im Gegensatz zu dem trypsin-ähnlichen Koagulase-Ferment des Bothrops-Giftes recht hitzebeständig zu sein.

Nach diesem Befunde erschien es uns nun natürlich wichtig festzustellen, ob sich das Koagulase-Ferment des Crotalus-Giftes auch ebenso wie Papain durch —SH-Verbindungen aktivieren läßt. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß, wie in der nächsten Arbeit gezeigt werden wird, alle von uns untersuchten Schlangengifte gegen solche —SH-Verbindungen, wie z. B. Cystein(—SH), außerordentlich empfindlich sind. Wie wir schon ausführten, hängen weiterhin alle aktiven Komponenten der Schlangengifte nach unseren Erfahrungen sehr eng zusammen, so daß man wohl einzelne durch gewisse Eingriffe zerstören, aber nicht alle voneinander unter Erhaltung ihrer Wirksamkeit trennen kann. Danach war bei der Einwirkung von Cystein(—SH) auf Crotalus-t.-terrificus-Gift von vornherein eine Schädigung des Giftkomplexes in seiner Gesamtheit zu erwarten, die besonders als Absinken des GW zum Ausdruck kommen müßte. Immerhin konnte es gut möglich sein, daß die papainartige Komponente des Crotalus-t.-terrificus-Giftes durch Cystein(—SH) so stark aktiviert würde, daß der KW dieses Giftes unter diesem Einflusse von Cystein(—SH) gerade anfangs wesentlich weniger als der GW abfiel. Wie die Versuche unter Nr. 4 der Tabelle zeigen, sank wirklich der KW nach 4 Stdn. nur auf 25% des Anfangswertes ab, während der GW unter denselben Bedingungen schon auf 0.5% abgefallen war. Beim Bothrops-Gift, dessen hoher KW vor allem auf seiner trypsin-artigen Kom-

ponente beruht, liegt das im Gegensatz dazu ganz anders: Schon nach 4 Stdn. waren nur noch 4% des KW erhalten, während der GW immerhin noch rund 23% des Anfangswertes betrug (s. Vers. 3 d. Tab.).

In ausgezeichneten, älteren Arbeiten aus dem ersten Jahrzehnt dieses Jahrhunderts ist das Ferment untersucht worden, das in vielen Schlangengiften vorhanden ist, und als Lecithinase bezeichnet wird. Es spaltet das Lecithin in der Weise, daß die mittelständige Fettsäure herauhydrolysiert wird. Das aus dem Lecithin so gebildete Lysolecithin hämolysiert im Gegensatz zum unwirksamen Lecithin die Blutkörperchen sofort. Wir stellten fest, daß 60 γ selbst hergestellten, reinen Lysolecithins in 0.8 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung nötig sind, aber auch genügen, um 1 ccm einer 4-proz. Aufschwemmung von Pferdeblutkörperchen, die noch mit 0.2 ccm $n/16$ -Phosphat-Puffer vom p_H 7.4 versetzt ist, fast momentan zu hämolysieren.

Wir führen infolgedessen unsere Versuche zur Bestimmung des Lecithinase-Gehaltes der Gifte folgendermaßen aus: Zu 0.2 ccm Phosphat-Puffer (p_H 7.4) werden 100 γ bestes Eierlecithin in 0.2 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung (Emulsion aus 50 mg Lecithin in 100 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung durch Schütteln auf der Maschine frisch bereiten!) und die zu prüfende Giftmenge in 0.6 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung gefügt. Nach Zusetzen von 1 ccm der 4-proz. Aufschwemmung von frisch entnommenen und gut gewaschenen Pferdeblutkörperchen bleibt die Mischung 2 Stdn. bei 37° stehen, da ja die Hämolysen nur langsam, im Maße der enzymatischen Bildung des Lysolecithins, einsetzt. Nach Aufschütteln aller Proben ergibt sich die zur völligen Hämolysen von 1 ccm dieser Mischung minimal nötige Menge Gift in γ als Lecithinase-Einheit (LE); da das Gesamtvolumen 2 ccm beträgt, ist die LE also gleich der Hälfte der eingesetzten Giftmenge. Die Anzahl der in 1 mg Gift enthaltenen LE bezeichnen wir als Lecithinase-Wert (LW).

Die Bothrops-Gifte enthalten sehr geringe Lecithinase-Mengen: Bothrops jararacussu besitzt z. B. nur $LW = 32$ und selbst ganz frisches Jararaca-Gift hat einen unterhalb von 0.7 liegenden LW, hämolysiert also bei unserer Versuchsanordnung überhaupt praktisch kaum. Im Gegensatz dazu ist der LW von Crotalus-t.-terrificus-Gift 133. Während wir aber sahen, daß das Crotalus-Gift beim Stehenlassen der Lösung bei 50° seinen KW in ähnlicher Weise wie seinen GW verliert, geht der Abfall des LW damit nicht parallel, sondern die Lecithinase wird viel schneller zerstört. Bei allen untersuchten vier p_H -Stufen fiel der LW nämlich schon innerhalb von 24 Stdn. von 133 auf weniger als 8 ab.

Beschreibung der Versuche ⁶⁾.

A) Die charakteristischen Werte der uns hier am meisten interessierenden Gifte wurden an frischen und sehr sorgfältig im Hochvakuum getrockneten Präparaten ermittelt. Sie sind folgende:

	GW	KW	LW
Crotalus t. terrificus	2220	30	133
Bothrops jararaca	263	1670	0.7
Bothrops jararacussu	44	1670	32

B) Der Abfall von GW und KW unter dem Einfluß von p_H , Temperatur und Cystein(—SH)-Einwirkung geht aus folgender Tabelle hervor:

⁶⁾ Um Raum zu sparen, geben wir nur in Tabellenform die wesentlichen Versuche. Die gesamten Unterlagen der Versuche werden in Bd. XI der „Memorias do Instituto Butantan“ veröffentlicht werden.

Nr.	Giftart	vom		Temp. °	Lösungen standen bei		Zeit	erhalten				
		GW	KW		pH	Zusatz		GW	% des urspr. GW	KW	% des urspr. KW	
1 a	Bothrops jararaca (Sammelpräparat des Institutes)	220	1670	50	1		24Std.	<33	<15	33	2.0	
							24 „	<33	<15	66	4.0	
							24 „	<33	<15	<6	<0.4	
							24 „	<33	<15	<6	<0.4	
1 b	Bothrops jararaca	220	1670	37	5		24Std.			67	4.0	
							96 „			67	4.0	
							192 „			67	4.0	
							24 „			125	7.5	
					6.15			96 „			100	6.0
								192 „			67	4.0
								24 „			670	40.0
								96 „			500	30.0
7			192 „			200	12.0					
			24 „									
			96 „									
			192 „									
1 c	Bothrops jararaca	220	1670	25	5		24Std.			400	24.0	
							96 „			200	12.0	
							120 „			110	6.6	
							192 „			50	3.0	
					6.25			24 „			1000	60.0
								96 „			670	40.0
								120 „			400	24.0
								192 „			330	19.8
					7			24 „			1250	75.0
								96 „			670	40.0
								120 „			670	40.0
								192 „			450	27.0
7.4			20 „		200	91.0	1500	90.0				
			44 „			1250	75.0					
			68 „			1110	66.5					
2	Crotalus t. terr.	2200	30	50	1		24Std.	670	30.4	10	33.3	
							48 „			3	10.0	
							72 „	<125	<5.7	<3	10.0	
							24 „	1670	76.0	30	100.0	
					5			48 „			30	100.0
								72 „	1250	57.0	10	33.3
								24 „	1000	45.5	20	67.0
								48 „			10	33.3
					8.7			72 „	<125	<5.7	5	16.6
								24 „	<125	<5.7	<3	<10.0
13			24 „									
3	Bothrops jararaca	220	1670	25	7.6		4Std.	50	22.7	67	4.0	
							8 „	30	13.6	30	1.8	
							20 „	<15	<6.8	85	5.1	
							44 „			60	3.6	
4	Crotalus t. terr.	2200	30	25	7.4	mit 20facher Menge Cystein	68 „			40	2.4	
							30 Min.	358	16.3			
							55 „			10	33.3	
							120 „	145	6.6			
							160 „			9	30.0	
							240 „			7.5	25.0	
							270 „	10	0.5			