

(Aus dem Physiologischen und Allgemeinen Pathologischen Institut der Universität Debrecen. — Direktor: Prof. Dr. *St. Went.*)

Über die Art- und Organspezifität des Globins, mit Rücksicht auf die Verwendbarkeit von Globin-Immunsera für forensische Zwecke.

Von

St. Went, B. Rex-Kiss und B. Zsadon.

Es ist erst in den letzten Jahren bekannt geworden, daß das Hämoglobin — ebenso wie die übrigen Eiweißkörper — ausgesprochene Antigeneigenschaften besitzt. *Landsteiner*¹ war der erste, der Antihämoglobinimmunsera hergestellt hat; die Artspezifität von diesen erwies sich aber als recht mäßig. *Landsteiner* immunisierte Kaninchen mit aus Pferdeblut zubereitetem Hämoglobin. Das auf diese Weise gewonnene Serum zeigte aber nicht nur mit dem Pferdehämoglobin eine Fällung, sondern auch mit dem Esel- und sogar mit dem Mäusehämoglobin. In beiden letzten Fällen war der Titer des Serums allerdings bedeutend niedriger als bei Verwendung des homologen Antigens. Auch *Hektoen*^{2, 3, 4} hat später Antihämoglobinimmunsera hergestellt; er fand die von *Landsteiner* beim Pferd und Esel beobachtete Verwandtschaftspräcipitation auch bei der Ziege und dem Yak. *Kehmosuke Jasui*⁵ immunisierte mit nach der Methode von *Heidelberger* und *Landsteiner* gewonnenen gereinigtem Hämoglobin; obzwar er keine hochwertigen Immunsera erhielt, war doch die Art- und Organspezifität der Sera ganz ausgeprägt. *Schmidt*⁶ und *Bruynoghe*⁷ behaupteten dagegen, daß das Hämoglobin weder als Vollantigen, noch als Hapten eine Antigenwirkung besitze, so daß gegenüber Hämoglobin kein Immunsorum gewonnen werden könne. Doch spricht die Mehrzahl der Beobachtungen für die Antigenatur des Hämoglobins; die Meinungen gehen sogar darin einig, daß die dem Hämoglobin gegenüber entstandenen Präcipitine artspezifisch sind, d. h. sie geben ausschließlich mit dem homologen Hämoglobin oder in geringerem Grade mit einem artverwandtem Hämoglobin eine Reaktion. Die extraspezifischen Verwandtschaftsreaktionen sind nach den Untersuchungen von *Hektoen* und *Boor*⁸ nie so stark, daß dadurch die praktische Verwendbarkeit solcher Sera beeinträchtigt wäre; *Sato Koichi*⁹ behauptet sogar, daß die Spezifität der Hämoglobin-Präcipitationsreaktionen so hoch ist, daß sie zur Identifizierung von verschiedenen Blutarten verwendet werden können. Auch die Untersuchungen von *Engelhardt*¹⁰ und *Ottensosser*

und *Strauss*¹¹ sprechen für die Möglichkeit der Herstellung von Anti-hämoglobin-Immunsera.

Wenn wir also annehmen, daß das Hämoglobin tatsächlich Antigeneigenschaften besitzt, so erheben sich die Fragen danach, 1. was der Träger der Antigenwirkung des Hämoglobins sei und 2. durch welchen Teil des Hämoglobinmoleküls die Artspezifizität determiniert wird.

Auf Grund der diesbezüglichen Untersuchungen und unserer eigenen Versuche ist mit voller Sicherheit festzustellen, daß sowohl die Antigenwirkung, wie auch die Artspezifizität des Hämoglobins durch den Eiweißkomponenten des Hämoglobinmoleküls — durch das Globin — bedingt wird. Die hiermit auf die erste Frage gegebene Antwort bedarf keiner weiteren Motivierung, denn weil im Hämoglobinmolekül das Globin der alleinige Komponent von Eiweißnatur ist, kann das Hämoglobin nur dem Globin seine Antigeneigenschaften verdanken. — Bezüglich der Artspezifizität könnte man annehmen, daß die prosthetische Gruppe — das Häm — die nicht von Eiweißnatur ist und ein verhältnismäßig kleines Molekül darstellt, der Träger der Hämoglobinspezifizität sei, wobei diese Gruppe neben dem Eiweiß-„Schlepper“ als Hapten eine Rolle spiele. Nachdem aber bestätigt wurde, daß das Häm, bzw. das Protoporphyrin bei jeder Tierart ein und dasselbe ist, so ist von vornherein anzunehmen, daß der Eiweißkomponent des Hämoglobinmoleküls auch der Träger der Artspezifizität ist. Weitere Stütze finden wir für diese Annahme in den Untersuchungen von *Jean Roche*¹⁴ und seinen Mitarbeitern, wonach die von den verschiedenen Tierarten gewonnenen Globine in gewissen spektroskopischen und chemischen Eigenschaften voneinander abweichen.

Eine eingehende und auch praktisch verwendbare Prüfung und Klärung dieser Frage wäre auch vom gerichtlich-medizinischen Standpunkte von großer Bedeutung. Für forensische Zwecke ist es oft notwendig, serologisch festzustellen, ob ein eingetrockneter Blutfleck von menschlicher oder tierischer Herkunft ist. In solchen Fällen kann die Verwendung von Eiweiß präcipitierenden Immunsereen zu Irrtümern leiten. Es dürfte z. B. der Fall sein, daß sich auf dem untersuchten Kleidungsstück neben einem von irgend einem Tiere stammenden Blutfleck auch Eiweiß menschlicher Herkunft (Eiter, Speichel usw.) befindet, wobei die Präcipitationsreaktion Eiweiß von menschlicher Herkunft, die spektroskopische Untersuchung daneben die Anwesenheit von Hämoglobin zeigt, obwohl das Blut nicht von Mensch, sondern von irgend einem Tiere stammt.

Zur Identifizierung der von verschiedenen Tierarten stammenden Blutflecken wären auch Antihämoglobinimmunsere entsprechend, wie dies von *Sato Koichi*⁹ auch empfohlen wurde. Einige Autoren, so z. B.

*Kehnosuke Jasui*⁵, *Ottenssooser* und *Strauss*¹¹, *Browning* und *Wilson*¹⁵ und *Depla*¹⁶ behaupten aber, daß der Titer solcher Hämoglobininmunsera — die mit dem richtigen Verfahren und mit der größten Sorgfalt hergestellt worden sind — immer sehr niedrig ist. Ihre Herstellung ist wegen des Tierverlustes auch ziemlich schwierig und teuer. Die Globininmunsera sind dagegen nach *Ottenssooser* und *Strauss*¹¹ und nach beinahe jeder diesbezüglichen Mitteilung und auch nach unseren eigenen Untersuchungen artspezifisch und von sehr hohem Titer. Die Antiglobinsera sind außerdem nach *Ottenssooser* und *Strauss*¹¹, *Suzuki Kiyō*¹⁷, *Johnson* und *Bradley*²⁴ und auch nach unseren eigenen Untersuchungen stark organspezifisch, so daß sie auch mit dem entsprechenden Serum-eiweiß keine Präcipitation geben.

Es ist wichtig bei der Herstellung von Antiglobininmunseren, daß zur Immunisierung nicht denaturierte, von Serumeiweißkörpern völlig befreite Globinlösung verwendet werden soll; das gebrauchte Präparat soll ferner wasserlöslich und vollkommen frei von Hämoglobin sein. Das auf diese Weise hergestellte Globinmolekül besitzt alle Antigeneigenschaften des Hämoglobins.

Zur Herstellung des Globins sind mehrere Verfahren bekannt. Das Wesentliche dieser Methoden ist folgendes: Das Hämoglobin wird mittels einer schwachen Säure gespalten, der Farbstoff mittels Äther, Aceton oder Kohle entfernt, und dann die Reinigung und Konzentrierung des Globins vorgenommen. *Schulz*¹⁸ verwendet zur Spaltung stark verdünnte Salzsäure und Aceton, *Hoppe-Seyler* Essigsäure und sehr feine, hochaktive tierische Kohle, *Hamsik*²¹ oxalsaures Aceton und Äther, *Anson* und *Mirsky*^{22, 23} und *Johson* und *Bradley*²⁴ $\frac{n}{10}$ -Salzsäure und Aceton, *Wu Hsien* und *Yang*²⁰ Normalsäure und Äther-Alkohol. — Die gewonnene Globinlösung ist nach *Roche*¹² selbst bei sorgfältiger Aufbewahrung nicht konstant, es findet eine Umbildung in Paraglobin und denat. Globin statt, dessen isoelektrischer Punkt bei 8,3 p_H steht. Die Konzentration der Globinlösung ist aus dem mit der Mikro-Kjeldahl-Bestimmung erhaltenen N-Wert berechenbar: Globinkonzentration = $N \times 5,862$.

Wir haben in unseren Versuchen mit der von *Hamsik*²¹ angegebenen Methode hergestelltes Globin verwendet. Die Methodik ist folgende: Nach Zentrifugieren des frischen, defibrinierten Blutes wird das Blutplättchensediment mit 2proz. Na-Acetat so lange gewaschen, bis die Reaktion der Waschflüssigkeit mit Sulfosalicylsäure negativ ausfällt. Die Blutplättchen werden mit 2 Vol. dest. Wasser hämolysiert, das Stroma durch Zentrifugieren und Filtrieren entfernt, das Hämoglobin mit 1—1½ Vol. Aceton koaguliert, ½—1 Stunde über Leinwand filtriert, und das sanft herausgepreßte, noch feuchte Koagulum in Reibschale verrieben. Es wird zur Verarbeitung von 250 ccm Blut

18 g Oxalsäure in 600 ccm Aceton aufgelöst. Die Farbstoffkomponente wird nach ihrer Abspaltung durch wiederholte Aceton-Äther-Extraktion entfernt.

Das auf diese Weise gewonnene rohe Globulin ist ein grauweißgelbes Pulver, das beinahe vollständig wasserlöslich ist. Die Lösung reagiert stark sauer, sie gibt mit Ammoniak Niederschlag (denaturiertes Globin), der auf weitere Ammoniakzugabe wieder in Lösung übergeht. Das auf diese Weise gewonnene Globin wurde weiter gereinigt: das rohe Globin wurde in Wasser aufgelöst, filtriert und 1% Ammoniumhydroxydlösung so lange hinzugesetzt, bis eine Zunahme des Niederschlages nicht mehr verzeichnet wurde, d. h. bis die Probefiltrate auf Ammoniakzugabe keinen Niederschlag mehr gaben. Die niederschlagenthaltende Lösung wurde filtriert und das Filtrat solange dialysiert, bis im Dialysierwasser mit Nessler-Reagens kein Ammoniak mehr nachzuweisen war. Die von Ammoniak befreite, dialysierte Lösung wird nachher auf die erwünschte Konzentration auf Zimmertemperatur (20—24°) im Exsiccator oder im Vakuum eingedampft.

Wir haben in unseren ersten Versuchen zur Immunisierung rohes Globin verwendet; da aber der isoelektrische Punkt des in dieser Rohglobulinlösung enthaltenen denaturierten Globins bei 8,3 p_H liegt, wurde letzteres bei der Schichtung der schwach alkalischen Sera an der Berührungsfläche ausgefällt, so daß eine spezifische Reaktion nicht abgelesen werden konnte. Wir haben demnach bei unseren nachfolgenden Untersuchungen eine nach der obigen Methode gereinigte Globulinlösung gebraucht, die nur biologisch aktives Nativglobin enthielt und aus ihrer Lösung auch bei alkalischer Reaktion nicht ausgefällt wurde.

Wir haben für unsere Versuche Hunde-, Rinder-, Schweine-, Hühner- und Menschglobin hergestellt. Prozentuelle Konzentration der Globulinlösungen:

Hundeglobin	0,675 g%
Rinderglobin	0,676 g%
Schweineglobin	0,033 g%
Menschglobin	0,177 g%
Hühnerglobin	0,033 g%

Mit einer jeden Globinart wurden je 2 Kaninchen immunisiert; es wurde in 4tägigen Zeitabschnitten — insgesamt 5mal — 5 ccm in die Ohrvene eingespritzt. Die Blutentnahme (Herzpunktion) erfolgte nach 4 bzw. 5 Tagen nach der letzten Injektion. Gewicht der Versuchstiere: 2—3 kg; die Tiere haben die Injektionen gut vertragen; es wurde kein Tierverlust verzeichnet.

Wir haben mit den derart gewonnenen Immunsera die folgenden Reaktionen angestellt (Tab. 1).

Tabelle 1. Präcipitation mit Globin.

Antigene	Immunsera									
	Hundeglobin		Rinderglobin		Schweineglobin		Menschenglobin		Hühnerglobin	
	850	851	852	853	854	855	858	859	862	863
Hundeglobin . . .	1:40000	1:12000	0	0	1:300	1:150	0	0	0	0
Rinderglobin . . .	0	0	1:80000	1:80000	1:300	1:300	0	0	0	0
Schweineglobin . . .	1:3000	0	0	0	1:10000	1:50000	0	0	0	0
Menschenglobin . . .	0	0	0	0	0	0	1:70000	1:40000	0	0
Hühnerglobin . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	1:50000	1:100000

Tabelle 2. Präcipitation mit Hämogloblin.

Antigene	Immunsera									
	Hundeglobin		Rinderglobin		Schweineglobin		Menschenglobin		Hühnerglobin	
	850	851	852	853	854	855	858	859	862	863
Hundehämogloblin .	1:30000	1:10000	0	0	0	0	0	0	0	0
Rinderhämogloblin .	0	0	1:50000	1:10000	0	0	0	0	0	0
Schweinehämogloblin .	0	0	0	0	1:10000	1:40000	0	0	0	0
Menschenhämogloblin .	0	0	0	0	0	0	1:40000	1:40000	0	0
Hühnerhämogloblin .	0	0	0	0	0	0	0	0	1:15000	1:15000

Präcipitation mit den zur Immunisierung gebrauchten 5 verschiedenen Globinarten.

Präcipitation mit den entsprechenden 5 verschiedenen Hämoglobinarten.

Komplementbindungsreaktion mit den gebrauchten Globinarten.

Identifizierung von an verschiedenen Gegenständen eingetrockneten Blutflecken mit Globinimmunsera.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt:

Aus der Tab. 1 geht hervor, daß die Immunisierung mit Globin jedesmal erfolgreich war. Der Titer der gewonnenen Sera war bedeutend hoch; eine nichtspezifische Reaktion in höheren Verdünnungen erhielten wir nur in einem einzelnen Falle (Serum 850). Auch Schweineglobin-Immunsera zeigten in kleineren Verdünnungen mit dem Hunde- und Rinderglobin eine nichtspezifische Reaktion.

Tab. 2 weist darauf hin, daß die Globinimmunsera auch mit dem homologen Hämoglobin bis in hohe Verdünnungen spezifisch reagieren. Eine nichtspezifische Reaktion wurde keinmal verzeichnet. Die zur Reaktion gebrauchten Hämoglobinlösungen wurden auf folgende Weise gewonnen: Gewaschenes, defibriniertes Blut wurde mit der doppelten Menge dest. Wasser hämolisiert. Nach Zentrifugieren und Filtrieren wurde zur reinen, von Blutserum- und Stroma befreiten Hämoglobinlösung die doppelte Menge phys. NaCl-Lösung zugesetzt. Der Hämoglobingehalt wurde in den auf diese Weise hergestellten Hämoglobinlösungen mit dem Hämoglobinometer von *Sahli* bestimmt: Die prozentuellen Werte des Hämoglobins waren in den Ausgangsverdünnungen die folgenden:

Hundehämoglobin	7,7%
Rinderhämoglobin	4,4%
Schweinehämoglobin	4,0%
Menschenhämoglobin	4,4%
Hühnerhämoglobin	1,9%

Die in der Tab. 2 angeführten Verdünnungen wurden mit der oben gegebenen Hämoglobinkonzentration verglichen.

Tabelle 3. Komplementbindungsreaktionen mit Globin.

		Immunsera												
		Hundeglobin		Rinderglobin		Schweineglobin		Menschenglobin		Hühnerglobin				
		850	851	852	853	854	855	858	859	862	863			
{	Antigene	Hundeglobin	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rinderglobin	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Schweineglobin	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	0	0	0	0
	Menschenglobin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hühnerglobin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+

Im Falle wir Blutsera bzw. Serumeiweißkörper als Antigen verwendet haben, erhielten wir kein einziges Mal eine Präzipitation; die Globinimmunsera erwiesen sich demnach als absolut organspezifisch.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse von mit Globinimmunsera und mit verschiedenen Globinantigenen angestellten Komplementbindungsreaktionen dargestellt. Eine starke und zugleich spezifische positive Reaktion zeigten die beiden Hundeglobinimmunsera (850, 851) und ein Schweineglobinimmunserum (855); schwächer reagierten die Rinder- und Hühnerglobinimmunseren. Dem menschlichen Globin gegenüber konnten wir keine komplementbindenden Antikörper nachweisen.

Nachdem die Globinimmunsera in den Präzipitationsreaktionen nicht nur dem Globin, sondern auch dem Hämoglobin gegenüber eine strenge Spezifizität zeigten, tauchte die Frage auf, ob und inwieweit diese Immunsera in der gerichtlichen Medizin zur Identifizierung von Blutflecken Verwendung finden könnten. Es bedarf nach dem Gesagten

Tabelle 4.

Nr.	Untersuchungsobjekte		Alter	Immunsera										
				Hunde- globin		Rinder- globin			Schweine- globin		Menschen- globin		Hühner- globin	
				850	852	853	854	855	859	862	863			
1	Hunde- blut	Scharricht von Aluminiumgeschirr	1 Wo.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2		Scharricht von Glas	2 Wo.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	Rinder- blut	Leinwand Extr.	3 Wo.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
4		Scharricht von Messerklinge . .	1 Wo.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
5		Scharricht von Schuhleder . . .	2 Wo.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	Schweine- blut	Leinwand Extr.	1 Wo.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
7		Scharricht v. Gummigegegenständen	2 Wo.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
8		Holzsplitter Extr.	5 Tage	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
9	Menschen- blut	Leinwand Extr.	3 Mon.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
10		Leinwand Extr.	2 Tage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
11		Papier Extr.	2 Tage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
12		Scharricht v. Gummigegegenständen	1 Wo.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
13	Hühner- blut	Erde Extr.	3 Tage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
14		Scharricht von Glas	4 Tage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
15		Scharricht von Messerklinge . .	5 Tage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
16		Scharricht von Giletteklinge . .	5 Tage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
17		Holzsplitter Extr.	5 Tage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
18	Hammel- blut	Papier Extr.	1 Wo.	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
19		Scharricht von Glas	1 Wo.	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
20	Pferde- blut	Papier Extr.	2 Wo.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21		Holzsplitter Extr.	2 Wo.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22		Leinwand Extr.	2 Wo.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ = manifeste Präzipitation; - = keine Präzipitation.

keiner weiteren Erklärung, wie stark die Zuverlässigkeit und Beweiskraft dieser Proben durch Nachweis und Identifikation von artspezifischem Hämoglobin erhöht würde. Zur Klärung der Frage der praktischen Verwendbarkeit der Hämoglobinpräzipitation haben wir das Verhalten unserer Globinimmunsera einigen solchen Kochsalz- und Wasserextrakten gegenüber untersucht, die wir aus seit einiger Zeit (2 Tage bis 3 Monate) an verschiedenen Gegenständen eingetrockneten Blutflecken gewonnen haben.

Das blutige Material oder die eingetrockneten abgescharrten Blut-schollen wurden im Eisschrank mit phys. NaCl-Lösung einige Stunden lang extrahiert und der Extrakt filtriert. Das Filtrat wurde mit phys. NaCl-Lösung solange verdünnt, bis es völlig farblos wurde und auf Sulfosalicylsäure negativ reagierte.

Die in Tab. 4 angeführten Ergebnisse weisen darauf hin, daß Globinimmunsera zur Identifizierung von eingetrockneten Blutflecken sehr gut geeignet sind. Mit Rücksicht darauf, daß man bei der Herstellung von Globinimmunsera von hohem Titer auf keinerlei Schwierigkeiten stößt, halten wir es für zweckmäßig, daß dieses Verfahren bei den zu gerichtlichen Zwecken unternommenen Blutproben allgemeine Verwendung findet. Durch den Umstand, daß es hiermit ermöglicht wird, festzustellen, ob das art- und organspezifische Hämoglobin von tierischer oder menschlicher Herkunft sei, wird die Verwendungsmöglichkeit und die Verlässlichkeit der serologischen Blutproben erheblich gesteigert und ein Irrtum bei den Begutachtungen vollkommen ausgeschlossen.

Zusammenfassung.

1. Es sind gegen Globin hochwertige, art- und organspezifische präzipitierende Immunsera herstellbar.
2. Die auf diese Weise gewonnenen Immunsera reagieren nicht nur Globin, sondern auch dem homologen Hämoglobin gegenüber in hohen Verdünnungen.
3. Durch Globin-Immunsera werden arteigene Serumeiweißkörper überhaupt nicht präzipitiert.
4. In einigen Versuchen war es auch gelungen, komplementbindende Antikörper nachzuweisen.
5. Die Globinimmunsera sind zu forensischen Zwecken, d. h. zur Identifizierung von an Gegenständen angetrockneten Blutflecken außerordentlich gut geeignet.

Literatur.

- ¹ Landsteiner, K., Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **29**, 1029 (1921). —
² Hektoen, L., J. of Immun. **14**, 1 (1927). — ³ Hektoen, L., u. K. Schulhof, J. inf. Dis. **31**, 32 (1922). — ⁴ Hektoen, L., u. K. Schulhof, J. inf. Dis. **33**, 224 (1923). —

- ⁵ *Kehnosuke Jasui*, Z. Immun.forsch. **63**, 215 (1929). — ⁶ *Schmidt, C. L. A.*, J. of Immun. **5**, 259 (1920). — ⁷ *Bruynoghe, G.*, Arch. internat. Méd. exper. **10**, 117 (1935). — ⁸ *Hektoen, L.*, u. *A. K. Boor*, J. inf. Dis. **49**, 29 (1931). — ⁹ *Sato Koichi*, Jap. J. med. Sci., Trans., Soc. med. **1**, 175 (1932). — ¹⁰ *Engelhardt, W.*, Biochem. Z. **163**, 187 (1925). — ¹¹ *Ottenssooser, F.*, u. *E. Strauss*, Biochem. Z. **193**, 426 (1928). — ¹² *Roche, J.*, *A. Roche*, *G. S. Adair* u. *M. E. Adair*, Biochemic. J. **26**, 1811 (1932). — ¹³ *Roche, J.*, Bull. Soc. Chim. biol. Paris **15**, 110 (1933). — ¹⁴ *Roche, J.*, *P. Dubouloz* u. *G. Jean*, Bull. Soc. Chim. biol. Paris **16**, 757 (1934). — ¹⁵ *Browning, C. H.*, u. *G. H. Wilson*, J. of Immun. **5**, 417 (1920). — ¹⁶ *Depla, H.*, C. r. Soc. Biol. Paris **87**, 383 (1922). — ¹⁷ *Suzuki Kiyō*, Tohoku J. exper. Med. **25**, 34 (1935). — ¹⁸ *Schulz, Fr. N.*, Z. physiol. Chem. **24**, 449 (1898). — ¹⁹ *Wu Hsien*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **26**, 741 (1929). — ²⁰ *Wu Hsien* u. *En-Fu Yang*, Chin. J. Physiol. **6**, 51 (1932). — ²¹ *Hamsik, A.*, Z. physiol. Chem. **187**, 229 (1930). — ²² *Anson, A. E.*, u. *M. L. Mirsky*, J. gen. Physiol. **13**, 469 (1930). — ²³ *Mirsky, M. L.*, u. *A. E. Anson*, J. gen. Physiol. **13**, 477 (1930). — ²⁴ *Johnson, C. A.*, u. *W. B. Bradley*, J. inf. Dis. **57**, 70 (1935).
-