

Das, wie aus der Herstellungsweise sich ergiebt, gegen Hitze unempfindliche Präparat gehört offenbar in die Reihe der Albumosen; Alkaloidreaction zeigte es nicht. Obwohl in trockner Form aufbewahrt büsst das Präparat allmählich seine Wirksamkeit ein; nur stärkere Dosen vermochten noch Fieber hervorzubringen. Hierbei zeigte sich der Uebelstand, dass die locale Reizwirkung intensiver wurde. Die Patienten klagten bisweilen noch am nächsten Tage über starke Schmerzen an der Injectionsstelle. Im Uebrigen aber erwies sich auch jetzt das Präparat als ganz unschädlich: das Allgemeinbefinden wurde nicht gestört; der Harn war stets eiweissfrei. In Folge des genannten Uebelstandes stellten wir einstweilen die Versuche mit dieser Substanz ein. An eine Neubereitung war vorläufig nicht zu denken, da es inzwischen Spätherbst geworden war, und wie bereits früher erwähnt<sup>1)</sup> worden ist, die Herbst- und Winter-Heuinfuse sich als nicht brauchbar erweisen.

### III. Weiteres über hydrolytische Fermente, deren Schicksal und Wirkungen, sowie über Fermentfestigkeit und Hemmung der Fermentationen im Organismus.

Von Dr. med. H. Hildebrandt,  
bish. Privat-Assistenten des Prof. W. Filehne in Breslau,  
jetzt am physiologischen Laboratorium der Farbenfabriken (F. Bayer) in Elberfeld.

#### 1. Ueber die pyretische und chemotaktische Wirkung der Fermente.

Bei Untersuchungen, welche von uns im Winter 1889/90 im hiesigen Institute angestellt wurden, hatten sich die hydrolytischen Fermente als Fieber erregende Substanzen<sup>2)</sup> erwiesen.

<sup>1)</sup> Dieses Archiv Bd. 121. S. 1.

<sup>2)</sup> H. Hildebrandt, a. a. O.

Ihre gleichzeitig höchst toxischen Eigenschaften machten sie indess ungeeignet für etwaige Anwendung am Menschen (s. d. vorstehenden Mittheilungen); genügten doch selbst kleine Dosen, um Thiere, wenn auch mitunter erst nach Wochen, unter den Zeichen einer Degeneration lebenswichtiger Organe zu Grunde zu richten.

Am ehesten konnte für unsere Zwecke das Chymosin (Lab-ferment) in Betracht kommen, da seine Toxicität sich als eine relativ niedrige herausgestellt hatte. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Ferment auffallender Weise an Hunden nur in verhältnissmässig grossen Dosen fiebererregend wirkt. Mengen von weniger als 5 ccm einer 10 procentigen Lösung (in physiologischer ClNa) waren gänzlich wirkungslos, machten aber auch keine pathologischen Veränderungen, wie wir sie früher als charakteristisch für die Fermentintoxication beschrieben haben.

Mit Rücksicht auf die grosse Empfindlichkeit gerade dieses Fermentes gegen höhere Temperaturen (über 30°) einerseits und die relativ niedrige Eigenwärme des Menschen andererseits, entschlossen wir uns zu einer Prüfung dieses Fermentes am Menschen. Indess mahnte hier natürlich zu besonderer Vorsicht die Ueberlegung, dass in den Geweben eines so niedrig temperirten Organismus die Zerstörung des Fermentes eine weniger intensive sein konnte, als in dem höher temperirten Organismus des Hundes und so seine Gefährlichkeit für den Menschen grösser würde. Dazu kommt, dass das chemische Verhalten des Blutes verschiedener Species dem Fermente gegenüber ein verschiedenes ist, wie Hammarsten gezeigt hat. Dass jedenfalls für die Intensität der Wirkung unseres Fermentes im Organismus nicht ausschliesslich die Körperwärme maassgebend ist, geht daraus hervor, dass bisweilen die mit sehr hoher Eigenwärme begabten Kaninchen durch kleine Dosen Ferment (2 ccm 10 procentige Lösung in 0,6 pCt. ClNa) in Fieber zu versetzen waren.

Wir wandten am Menschen die Fermentlösungen zunächst subcutan an, und zwar am Oberschenkel, selbstverständlich unter Einhaltung der antiseptischen Cautelen. Es wurden zuerst sehr kleine Dosen genommen. Bei einem unserer Versuchspersonen (Gonorrhöiker) trat nach der subcutanen Injection von 1 ccm der 10 procentigen Lösung ziemlich hohes Fieber ein. Die Temperatur stieg innerhalb der nächsten 8 Stunden nach der

Injection von 37,3° bis 39°; bei Anderen war das Fieber ein nur mässiges. Bei einem Falle von Lupus traten ebenfalls Temperatursteigerungen auf, indess ohne wahrnehmbare Veränderung der lupösen Heerde. Das Ansteigen der Temperatur erfolgte ohne Schüttelfrost; auf der Höhe des Fiebers hatten die meisten der Versuchspersonen Hitzegefühl; bisweilen war bald deutliches Schwitzen erkennbar. Ihr Allgemeinbefinden blieb meistens ein gutes. Fast alle Patienten klagten über äusserste Schmerzhaf- tigkeit an der Injectionsstelle. Auch bei Anwendung geringerer Concentrationen blieb diese nicht aus. Die Schmerzen began- nen gewöhnlich einige Stunden nach der Injection, während die Injection selbst als ganz schmerzlos angegeben wurde. In der That sah man später die Umgebung der Injectionsstelle bisweilen recht stark geröthet, und die Hauttemperatur war für die zufühlende Hand merklich erhöht. Ofters hatte auch am näch- sten Tage die Entzündung noch nicht nachgelassen.

Da unser absolut steriles Fermentpulver, gelöst in sterili- sierter 0,6 procentiger Kochsalzlösung, welcher Sublimat 1:100000 zugesetzt war, in Anwendung kam, und ferner die Injection selbst unter streng antiseptischen Cautelen ausgeführt wurde, so war der Verdacht, dass es sich um Mitwirkung von Mikro- organismen handle, ausgeschlossen. Vielmehr erinnerte dieser Befund an die von H. Buchner<sup>1)</sup> eingehend beschriebene „ent- zündliche Reizung der fixen Gewebelemente“ bei subcutaner Injection von „Bakterienprotein“. Nach den Untersuchungen jenes Autors ist aber diese Eigenschaft untrennbar verbunden mit der Leukocytenanlockung durch „Chemotaxis“. Es war demnach zu entscheiden, ob auch diese Eigenschaft den hydro- lytischen Fermenten zukomme. Nach der Methode Buchner's geschah die Prüfung in folgender Weise: Je vier, an dem einen Ende später zugeschmolzene, frisch ausgezogene Capillarröhrchen wurden mit der zu prüfenden Fermentlösung gefüllt. Da unsere Fermentlösungen nicht sterilisiert werden durften, so wurde die in sterilen Gefässen bereitete und mit Sublimat versetzte Lö- sung benutzt, in derselben Weise, wie sie in den oben mitge- theilten Versuchen am Menschsn in Anwendung kam. Das Lö-

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschr., No. 47, 1890.

sungsmittel (0,6 pCt. ClNa mit Sublimat 1:100000) diente zur gleichzeitigen Controle. Die mittelst feinen Drahtes in ein Bündel vereinigten Capillaren wurden je in eine mit sterilen Instrumenten angelegte Hauttasche auf dem Rücken von Kaninchen eingeführt. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen herausgenommen und es fanden sich in den die Fermentlösungen enthaltenden oft mehrere Millimeter starke Pfröpfe von Eiter, der mikroskopisch aus zahllosen Rundzellen bestand. In den Contolen fanden sich, wenn überhaupt, nur mässige Mengen von Leukocyten vor. Diese Versuche habe ich mit Chymosin, Invertin und Emulsin ausgeführt. Es gehören demnach die hydrolytischen Fermente zu den „chemotaktischen“ Substanzen.

Wegen der ungemein starken localen Entzündung, welche der subcutanen Injection der Fermentlösung folgte, mussten wir von weiteren Versuchen am Menschen Abstand nehmen, wenn es nicht gelang, auf einem anderen Wege, das Ferment dem Organismus einzuverleiben. Die Anwendung per os konnte nicht in Betracht kommen, da nach früher von mir angestellten Versuchen am Thier festgestellt war, dass selbst grosse Dosen auch anderer Fermente (Invertin, Emulsin) innerlich verabreicht, völlig unwirksam sind. Wie neuere Untersuchungen<sup>1)</sup> ergeben haben, ist es nicht die saure Reaction des Magensaftes, sondern eine directe Einwirkung des Pepsins, welches die verschiedensten anderen Fermente zu „verdauen“ vermag. Die Anwendung per clysmata konnte in Betracht kommen, wenn sich erwiese, dass die Fermente von der Rectalschleimhaut aufgenommen werden. Zur Entscheidung dieser Frage wählte ich zunächst ein Ferment, welches erwiesenermaassen in kleinen Dosen Fieber und charakteristische Veränderungen bei subcutaner Injection hervorruft, das Myrosin.

Versuch. 2. März 1891. Ein mittelgrosses Kaninchen, Temp. im Rectum 39,0°.

12 Uhr 30 Min. Klyisma von 3 ccm 0,6prozentiger ClNa-Lösung; darin 0,2 g Myrosin gelöst. Nach der Injection Verschluss des Afters durch eine Klemme, welche eine Stunde lang liegen bleibt. (Ohne diese Maassregel wird in's Rectum von Kaninchen injicirte Flüssigkeit nicht zurück behalten.)

<sup>1)</sup> Catharine Schipiloff, Untersuchungen über die Verdauungsfermente. Archives des sciences physiques et naturelles. Genève. 22. p. 185—213.

2 Uhr 30 Min. Temp. 39,0°

4 - 15 - - 39,7°

5 - 30 - - 39,6°.

Am nächsten Morgen wird das Thier todt gefunden; es zeigen sich die für die Fermentintoxication charakteristischen Veränderungen in vollem Umfange: Circumsripte Blutungen in der Magenschleimhaut, mehr diffuse im Dünndarm, Schwellung der Peyer'schen Plaques u. s. w. Die Rectalschleimhaut ist ganz frei von Entzündung und Blutungen.

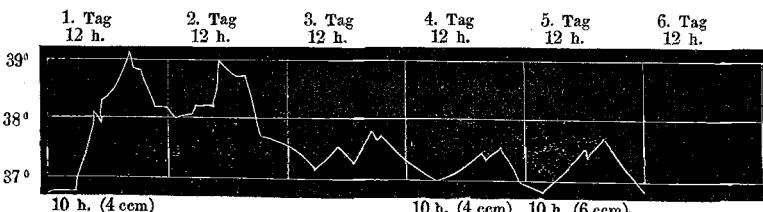
Hierdurch war erwiesen, dass eine Aufnahme des Fermentes vom Rectum aus stattfindet.

Bei einem Versuche, den ich in analoger Weise mit Chymosin anstellte, ergab sich, dass Dosen, die nach früheren Versuchen bei subcutaner Injection sich als tödtlich erwiesen hatten, per clysmata gegeben, keine Schädigung der Thiere zur Folge hatten. Jedenfalls also war die Resorption vom Rectum aus keine so günstige als vom subcutanen Zellgewebe, und somit auch die Toxicität gleicher Gaben eine geringere als dort.

Unsere Versuche am Menschen mit dieser Applicationsform hatten sehr ungleiche Ergebnisse. Bei Anwendung von 1—2 ccm 10procentiger Lösung betrug die Allgemeinreaction 0,5—2° C., selten mehr. Weitere Dosen an demselben Patienten hatten oft gar keine oder nur geringe Wirkung mehr, selbst dann, wenn mit der Dosis gestiegen wurde.

Eine ungewöhnlich starke Reaction trat auf bei einem Mädchen mit Scrophuloderma und Lupus faciei.

Nach einem Klyisma von 4 ccm stieg die Temperatur von 36,8°—39,0° innerhalb 6 Stunden; hierauf folgte ein langsames Abfallen bis zum folgenden Morgen (8 Uhr Vorm. Temp. 38,0°); dann nochmaliges Ansteigen der Temperatur bis 39° (12 Uhr Mittags). Später an der Patientin vorgenommene



Injectionen auch grösserer Dosen brachten auch in diesem Falle keine nennenswerthe „Allgemeinreaction“ mehr hervor.

Während des Fiebers hatte Patientin starkes Hitzegefühl, etwas Kopfweh und Schmerzen an den lupösen Stellen. Objectiv war ziemlicher

Schweiss an der Stirn bemerkbar, vielleicht auch die Secretion an den lupsösen Stellen verstärkt. Bei keiner unserer Versuchspersonen war jemals Eiweiss im Urin nachweisbar.

Auf die Ursachen des Ausbleibens der Fermentwirkung nach wiederholter Application per clysmata gehe ich weiter unten näher ein.

Es schien sich zu lohnen, das Resorptionsvermögen und sonstige Verhalten auch anderer Schleimhäute u. s. w. Fermenten gegenüber zu prüfen. Durch Einstich mit der Pravaz'schen Spritze durch die Wandung der Trachea brachte ich die Fermentlösung (auch in concentrirterer Form) in einen Bronchus und seine Verästelungen. Es wurde äusserst schnell aufgenommen und wirkte schon in denselben Dosen tödtlich wie bei intravenöser Injection. An den Lungen liess es keine locale Wirkung zurück. Nur in der Conjunctiva des Kaninchenauges beobachtete ich nach mehrfachem Aufträufeln einer (concentrirteren) Fermentlösung eine mitunter recht intensive Schwellung und Injection, während die Cornea selbst nicht betroffen wurde. Die Intensität der Blutfüllung erwies sich als abhängig von der Höhe der Aussentemperatur: Bei Anstellung der Versuche im kalten Raume blieb die Entzündung fast ganz aus. Es erinnert dies an die Versuche Cohnheim's, welcher fand, dass Einreibung von Crotonöl auf die Flächen des Kaninchenohres bei höherer Aussen-temperatur viel intensivere Entzündung hervorruft als bei niedriger.

In einigen Versuchen hatte ich, um die Fermentlösung andauernd auf die Conjunctiva einwirken zu lassen, das Thier in einer solchen Haltung aufgespannt, dass das Auge für Einträufelung passend gestellt war. Durch Häkchen wurden die Lider in geeigneter Weise abgezogen, und in der hierbei entstehenden Vertiefung konnte die Fermentlösung andauernd einwirken. Nach ein- und mehrstündiger Einwirkung war die erzeugte Entzündung — wohl in Folge der durch die Häkchen in der Schleimhaut hervorgerufenen Epitheldefekte — eine ungemein intensive. Nach einigen Stunden zeigte sich in den Conjunctivalsäcken ein eitriges Secret; die Schwellung der Lider wurde intensiver. Am anderen Tage wurden Fetzen, aus Epithelien und Eiterkörperchen bestehend, abgestossen. Die Lider waren stark ödematos und

geröthet; auch machte sich später beträchtlicher Haarausfall an den Lidern bemerkbar. Nach einigen Tagen betheiligte sich auch die Cornea; es trat entweder nahe dem Centrum oder auch in der Peripherie eine Trübung auf (erstere besonders imponirte als „interstitielle diffuse Keratitis“), die allmählich an Intensität zunahm, so dass schliesslich die ganze Cornea in eine weisse undurchsichtige Membran verwandelt war. Weiter konnte ich den Prozess nicht verfolgen, da die Thiere gewöhnlich 10 bis 14 Tage nach der Application des Fermentes unter den für die Fermentintoxication charakteristischen Veränderungen zu Grunde gingen — offenbar hatte eine Resorption eines Theiles des Fermentes vom Conjunctivalsack aus stattgefunden. Bei der Section des Bulbus fand ich den erwähnten Prozess stets auf die vorderen Partien des Auges beschränkt; die hinteren, speciell die Linse, erwiesen sich unverändert. In einigen Fällen, übrigens auch hier abhängig von der (niedrigeren) Aussentemperatur, war der Verlauf ein viel milderer. Es kam wohl zu eitriger Conjunctivitis, und auf der Cornea zeigte sich eine der „Keratitis interstitialis diffusa“ analoge Veränderung; die Iris reagirte nicht auf Lichteinfall, und ihre Zeichnung war verwischt. Weiter aber entwickelte sich der Prozess nicht. Es machten sich vielmehr alsbald reparative Vorgänge geltend; von den der Corneatrübung benachbarten Abschnitten der Conjunctiva bulbi aus entwickelten sich feine, nach der Trübung zustrebende Gefässneubildungen. Mit der Loupe waren netzförmige Anordnungen deutlich zu erkennen. Bald war der getrübte Theil der Hornhaut erreicht, die nunmehr sich wieder aufzuhellen begann, worauf die Gefässer verschwanden. Wenn das Hundeauge in gleicher Weise behandelt wurde, kamen die erwähnten Veränderungen nicht zu Stande.

Das abweichende Verhalten der erwähnten Schleimhäute den Emulsinlösungen gegenüber muss natürlich in ihrer verschiedenenartigen histologischen Struktur bedingt sein. Die Befunde an der Conjunctiva des Kaninchenauges sind jedenfalls ein neuer Beweis dafür, dass die hydrolytischen Fermente in die Reihe der chemotaktischen Substanzen gehören. Von sterilisirten Bakterieniculturen (*Pyocyanus*, *Staphylococcus pyogenes aureus* u. s. w.), die ja intensiv chemotaktische Eigenschaften besitzen (Leber, Buchner), sah ich bei gleicher Versuchsanordnung wie

oben nichts Derartiges; sie verhalten sich der unverletzten Conjunctivalschleimhaut gegenüber ganz indifferent.

Mit Rücksicht auf die von H. Buchner<sup>1)</sup> und Römer kürzlich mitgetheilten Versuche, bei welchen die von R. Koch für Tüberculin angegebene Reaction (an tuberculösen Meerschweinchen) auch für andere Bakterienproteine gefunden wurde, wollte ich nicht unterlassen, auch die hydrolytischen Fermente in dieser Richtung zu untersuchen. Die tuberculösen Thiere erlagen etwa 24 Stunden nach der Fermentinjection (übrigens ebenso schnell wie die normalen Thiere), und bei der Section ergaben sich dieselben Veränderungen, wie sie jene Autoren für ihre Versuche beschrieben haben.

## 2. Die Schicksale der hydrolytischen Fermente im Organismus.

Die früher von uns bei der Fermentintoxication beobachteten Erscheinungen, das lang anhaltende Fieber, der chronische Verlauf des Krankheitsprozesses liessen uns bereits vermuthen, dass die Ausscheidung der Fermente aus dem Organismus eine sehr langsame sei.

Um eine sichere Entscheidung der Frage nach der Zeit und Grösse der Ausscheidung der Fermente zu bringen, konnten nur solche Fermente in Betracht kommen, welche einerseits im Organismus nicht vorkommen, andererseits eine typische, unverkennbare chemische Reaction geben. Ueber die Schicksale der normal im Organismus vorkommenden Fermente liegen bereits mehrfache Untersuchungen vor. Béchamp und Baltus<sup>2)</sup> haben schon angegeben, dass von intravenös injicirter Diastase immer nur ein Theil im Harn zu finden sei. Schnapauff<sup>3)</sup> fand, dass, wenn man Pepsin Thieren subcutan einspritzt, es auch dann nicht im Harn in grösseren Mengen auftritt. Was nun mit der Hauptmasse des Fermentes geschieht, darüber konnte man nur Vermuthungen haben. Der Nachweis einer Vermehrung eines normaliter vorkommenden, z. B. des diastatischen Fermentes in

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschr. No. 50. 1891 u. Münchener med. Wochenschr. 1891.

<sup>2)</sup> Comptes rendus. 90. p. 373 et 539.

<sup>3)</sup> Dissert. inaug. Rostock 1888.

irgend einem Organe würde aber auf erhebliche Schwierigkeiten stossen, da es normaler Weise äusserst verbreitet im Organismus ist und in allen möglichen Organen sich vorfindet, wie Brücke, Munk, Lépine u. A. gezeigt haben. Hierzu kommt, dass der Gehalt irgend eines Organs an Diastase oder Pepsin doch wohl beträchtlichen zeitlichen Schwankungen unterliegen dürfte, ganz so wie es für den Gehalt des Harns an Fermenten von Leo, Hoffmann, Schnapauff u. A. erwiesen ist. Aus diesen Gründen stellte ich meine Untersuchungen bezüglich der Schicksale der Fermente nur mit den im Organismus nicht nachgewiesenen Emulsin und Myrosin an. Von diesen hatte das Emulsin den Vorzug, dass es leichter zu beschaffen, und das zur Reaction erforderliche Amygdalin ein billiger Stoff ist; außerdem aber ist die Reaction auf Blausäure eine sowohl physiologisch als chemisch sehr charakteristische. Mit diesem Fermente stellte ich die meisten der Versuche an. Zur Anwendung kam ein von F. Merck bezogenes Fermentpulver, welches intensiv wirksam sich erwies und in 0,6 prozentiger  $\text{ClNa}$ -Lösung verheilt ein klares Filtrat lieferte. Zu den Thierversuchen wurden gewöhnlich 5—10prozentige Lösungen des Fermentes mit 0,6 pCt.  $\text{ClNa}$  benutzt. Zu den Versuchen dienten meist Kaninchen.

Bei subcutaner Injection mittelgrosser, innerhalb weniger Tage tödtlicher Dosen, d. h. 0,1—0,5 g, wurde der Harn der Kaninchen andauernd auf Ferment untersucht; niemals jedoch fand sich eine Spur von Reaction, wenn er nach Zusatz einer Amygdalinlösung digerirt wurde. Obwohl auch kleine Mengen CNH durch den Geruch wahrnehmbar sind, unterliess ich es doch nicht, mehrfach den chemischen Nachweis ihrer Abwesenheit zu erbringen. Der mit Amygdalinlösung versetzte und digerirte Harn wurde unter Zusatz von wenig Schwefelammonium auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, filtrirt, mit  $\text{HCl}$  angesäuert; auf Zusatz von  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$  tritt bei Anwesenheit von Blausäure bekanntlich intensive Rothfärbung ein. Diese Methode wandte ich auch zum Nachweise der CNH im Blute an; nur wurde hier vor dem Zusatte von  $\text{S}(\text{NH}_4)_2$  mit Alkohol gefällt, filtrirt, der Niederschlag gewaschen, und das Filtrat, wie oben angegeben, behandelt.

Somit tritt also eine Ausscheidung des Emulsins durch den

Harn nach subcutaner Injection überhaupt nicht ein. Es galt nun festzustellen, wie lange und an welchen Stellen im Organismus das Ferment nachweisbar sei.

Um diese Frage zu entscheiden, benutzte ich die von Claude Bernard gefundene Thatsache, dass man Blausäurevergiftung hervorbringen kann, wenn man kurz hinter einander Emulsin- und Amygdalinlösung injicirt. Es stellte sich bei meinen Versuchen heraus, dass man 6 Stunden nach der subcutanen Injection des Fermentes (0,2—0,5 g) durch Amygdalininjection noch typische CNH-Vergiftung hervorbringen kann; nach grösseren Zwischenräumen trat bei vollkommen normalen Thieren eine Vergiftung nicht mehr ein; waren die Thiere aber schon vorher einer Fermentvergiftung unterzogen worden, so liess sich bisweilen noch 9 und mehr Stunden nach einer neuen Injection durch Amygdalin die acute CNH-Vergiftung erzielen. Die Erklärung hierfür siehe weiter unten. Zunächst war die Frage zu entscheiden, ob subcutan injicirtes Emulsin in's Blut tritt, und weiterhin, von wann an und bis wann es darin nachweisbar ist. Die Aufgabe war also festzustellen, wo treffen beide Stoffe, Ferment und Glykosid, zusammen, im Blute oder in den eigentlichen Geweben?

Dass subcutan injicirte Fermentlösung in's Blut übertritt, konnte ich dadurch nachweisen, dass nach der Injection entnommene Blutproben mit körperwarmer Amygdalinlösung vermischt wurden; ich fand, dass in der That einige Zeit (5 bis 10 Minuten) nach der subcutanen Injection das Ferment in entnommenen Blutproben nachweisbar ist. Ferner: Injicirt man, während intravenös injicirte Amygdalinlösung im Gefässsystem kreist, subcutan die Fermentlösung, so bietet das frei sich bewegende Thier nach etwa 10 Minuten die charakteristischen Zeichen der CNH-Vergiftung dar. Bei gleichzeitiger Injection von Emulsin- und Amygdalinlösung in zwei peripherische Venen (es gehört dazu nach weiter unten näher beschriebenen Versuchen eine gewisse Menge Ferment, über 0,02 g) treten die Zeichen der CNH-Vergiftung fast sofort ein. Hieraus folgt, dass bei subcutaner Injection des Fermentes dieses nach 10 Minuten entweder bereits in grösserer Menge in's Blut getreten ist, oder, was auch möglich wäre, dass das intravasal kreisende Amygdalin es im subcutanen Gewebe alsdann aufgefunden hat.

Die zweite Frage, wann das subcutan injicirte Ferment wieder aus dem Blute verschwinde, wurde dahin entschieden, dass 3 Stunden nach der subcutanen Injection in der Blutprobe kein Ferment mehr nachweisbar ist. Nun ist aber bereits oben mitgetheilt worden, dass selbst 6 Stunden nach der subcutanen Injection des Fermentes durch Injection des Glykosides CNH-Vergiftung eintritt.

Versuch. Mittelgrosses Kaninchen erhält Vorm.  $6\frac{1}{2}$  Uhr 2 ccm 10prozentiger Emulsinlösung.

10 Uhr: Blutentnahme; fermentfrei.

$10\frac{1}{2}$  Uhr: Intravenöse Amygdalininjection.

Nach 10 Minuten typische Symptome der CNH-Vergiftung.

In anderen derartigen Versuchen wurde das Glykosid subcutan injicirt, und das Ergebniss war das gleiche. Es kann also trotz Fehlen des Fermentes im Blute durch Injection des Glykosides CNH-Vergiftung erzeugt werden. Die etwaige Unterstellung, dass trotz Misslingens der CNH-Reaction in der entnommenen Blutprobe nicht mit Sicherheit ein Fehlen im circulirenden Gesamtblut auszuschliessen sei, bedurfte immerhin einer Prüfung. Es konnte nehmlich in der Art des Nachweises des Fermentes in der entnommenen Blutprobe ein Fehler vermutet werden. Um das Blut flüssig zu erhalten und bald die Reaction des etwaigen, darin enthaltenen Fermentes vor sich gehen zu lassen, hatte ich das Blut direct in eine Schale mit einigen Cubikcentimetern 20prozentiger Magnesiumsulfatlösung (der die Amygdalinlösung zugesetzt wurde) fliessen lassen; einige Male benutzte ich statt Magnesiumsulfat das von Arthus<sup>1)</sup> angewandte Ammoniumoxalat (0,2 pCt.). In Controlen hatte ich mich indess überzeugt, dass tatsächlich diese Zusätze die Reaction nicht hindern, wenn auch etwas erschweren. Nun war es aber denkbar, dass von der Stelle der subcutanen Injection nur ganz allmählich auch nach Stunden noch kleine Mengen Ferment in's Blut treten, die sich in einer Probe zwar nicht nachweisen lassen, wohl aber im Organismus auf injicirtes Amygdalin wirken. In Versuchen, auf die ich weiter unten näher zurückkomme, habe ich festgestellt, dass kleine, intravenös injicirte Mengen Fermentes (bis 0,02 g) auf intravasal kreisendes Amygdalin nicht erkennbar wirken; es

<sup>1)</sup> Archiv f. Physiologie. 1891. Hft. 5. S. 505.

war zu entscheiden, ob das Ferment nach intravenöser Injection einer solchen zur CNH-Vergiftung nicht mehr ausreichenden Menge in einer Blutprobe nachweisbar sei.

Versuch. 29. October 1891. Kaninchen 1900 g.

12 Uhr 10 Min. Durch V. femoralis Injection von 0,01 Emulsion (in 1 ccm 0,6 pCt. ClNa).

Unmittelbar darauf Blutentnahme aus Carotis aufgefangen in körpermärker Amygdalinlösung mit  $MgSO_4$ -Zusatz; nach 15 Minuten deutlicher CNH-Geruch.

Also auch wenn im Organismus das Ferment als solches auf sein specifisches Substrat nicht mehr in vergiftender Weise wirkt, ist seine Wirkung noch in einer Blutprobe deutlich erkennbar. Um so mehr ist bei so nachgewiesenem Fehlen des Fermentes in einer Blutprobe ein Fehlen im kreisenden Blute anzunehmen. Höchstens könnte jemand daran denken, dass das Ferment gewisse Zeit nach der Injection im Blute in einer so veränderten Form kreise, dass es zwar ausserhalb in einer Blutprobe nicht die Reaction gebe, dagegen noch im Organismus. Hierauf komme ich weiter unten zurück.

Die Erklärung, wieso trotz Fehlen des Fermentes im Blute noch 6 Stunden nach der subcutanen Fermentinjection im Organismus aus Amygdalin Blausäure abgespalten werden kann, brachten Versuche, welche ich gleichzeitig und ursprünglich in folgendem gedanklichen Zusammenhange angestellt hatte. Es lagen nehmlich auch Thatsachen vor, die dafür zu sprechen scheinen konnten, dass die Fermente durch den Darmkanal den Organismus verliessen: Im Magen-Darmkanale hatten wir stets pathologische Veränderungen hohen Grades nach Fermentintoxication gefunden. Versuche in dieser Richtung stellte ich an Hunden an, weil bei diesen durch einige Hungertage der Magen-Darmkanal von Speisen und Fäces zu befreien war, deren Anwesenheit die beabsichtigte Untersuchung des Magen-Darmsaftes entschieden erschwert haben würde.

Zur Anwendung kam Emulsin und Myrosin; das Versuchstier erhielt nach mehrätigem Hungern intravenös 20—40 ccm 10 prozentiger Emulsin- bzw. Myrosinlösung langsam injicirt. Die Injection in die V. jugularis hatte einige Male sofortigen Tod zur Folge; daher stets die V. femoralis gewählt wurde. Auf

die Ursache des Todes und weitere sich hieran knüpfende Beobachtungen komme ich weiter unten ausführlich zu sprechen. Nach der Operation wurde der Hund frei gelassen. Der gelassene Harn enthielt unter 3 Fällen nur einmal Ferment, jedoch nur in Spuren. 9—12 Stunden nach der Fermentinjection wurde das Versuchsthier aufgespannt, und von der V. jugularis aus unter geringem Drucke eine körperwarme physiologische ClNa-Lösung in das Gefäßsystem einlaufen gelassen. Gleichzeitig floss aus der Carotis das Blut in ein Gefäß mit Magnesiumsulfat- oder Ammoniumoxalat- und Amygdalinlösung (körperwarm). Das Verfahren wurde so lange fortgesetzt, bis aus der Carotis ziemlich klare Flüssigkeit abfloss. Im Blute, sowie auch in der Spülflüssigkeit war keine Spur von Ferment jemals nachweisbar. Auch die Secrete des Magens und Darms, und selbst die Wandungen des (später zerkleinerten) Magendarmkanals erwiesen sich frei von Ferment. Hingegen fand sich regelmässig in bestimmten Organen: Leber, Pankreas, Milz wirksames Ferment; am intensivsten war die Reaction des wässrigen Leberextractes. In den Muskeln, Galle, (Fruchtwasser bei einem Kaninchen) liess sich kein Ferment nachweisen. Ich verfuhr dabei stets so, dass die zerkleinerten Organe in physiologischer ClNa-Lösung mit Amygdalinlösung digerirt und weiter, wie oben beschrieben, auf CNH geprüft wurde. Somit war erwiesen, dass unser Ferment von bestimmten Organen in Beschlag genommen wird, und es schien die oben ausführlich erörterte Thatsache, dass noch mehrere Stunden nach der subcutanen Fermentinjection durch Amygdalinjection CNH-Vergiftung erzeugt wird, dadurch ihre Erklärung zu finden, dass, wenn auch im Blute kein Ferment mehr nachweisbar sei, doch das in den genannten Organen befindliche Ferment bei der Injection des Glykosides in Wirksamkeit trete und so den Blausäuretod bewirke. Und dennoch ist dem nicht so; es stellte sich nehmlich heraus, dass schon  $\frac{1}{2}$  Stunde<sup>1)</sup> nach der intravenösen Injection von Fermentmengen, wie sie in obigen Versuchen subcutan verabfolgt waren, durch intravenöse Amygdalinjection keine Blausäurevergiftung mehr zu erzielen ist.

<sup>1)</sup> Kürzere Zeit (15—20 Min.) nach der intravenösen Fermentinjection erzeugte regelmässig intravenöse Amygdalineinbringung CNH - Vergiftung.

Das Ferment ist zu dieser Zeit auch bereits aus dem Blute verschwunden, wie ich in entnommenen Blutproben nachweisen konnte; gleichwohl ist in den genannten Geweben noch mehrere Stunden später wirksames Ferment nachweisbar.

Versuch. 8. Juni 1891. Hund,  $3\frac{1}{2}$  kg, erhält 10 Uhr 50 Min. 5 ccm 10procentiges Emulsin intravenös.

11 Uhr 20 Min. Im entnommenen Blute kein Ferment.

11 - 30 - 1 g Amygdalin in Lösung intravenös. Keine CNH-Vergiftung.

3 - 10 - Durchspülung des lebenden Thieres.

In der blutleeren Leber Ferment nachweisbar, schwach in Pankreas und Milz.

Die Thatsache also, dass nach subcutaner Injection des Fermentes (im Gegensatz zu den Versuchen mit intravenöser Einbringung) das Amygdalin so sehr lange noch CNH-Vergiftung hervorbringt, hängt nicht ab von den in Leber u. s. w. enthaltenen Fermentmengen. Im Blute ist kein Ferment (s. oben); folglich kann es nur noch um die Fermentmengen sich handeln, welche in dem durch die subcutane Injection geschaffenen Depot und seiner Nachbarschaft (einschliesslich der Lymphwege) sich befinden. Diese Deutung wird übrigens durch einen Versuch direct als richtig bewiesen, bei welchem die Fermentinjection in's subcutane Bindegewebe eines Hinterbeines des Kaninchens stattfand. Wurde das Bein oberhalb der Injectionsstelle abgeschnürt, so brachte 2 Stunden nach der Fermentinjection unter die Rückenhaut injicirtes Amygdalin keine CNH-Vergiftung her vor; diese trat vielmehr erst nach Lösung der Umschnürung ein.

Ferner: Injicirt man zwei gleichen Thieren gleiche Mengen derselben Fermentlösung, aber mit dem Unterschiede, dass das eine die Lösung an mehreren Stellen, das andere nur an einer Stelle (das Ganze) erhält, so ist die Toxicität im letzteren Falle eine weit geringere — es ist hier weniger Ferment in's Blut gelangt, bleibt also länger liegen.

Über die späteren Veränderungen des Depots geben folgende Versuche noch eine besondere Beleuchtung: Injicirt man an einer Stelle eine kleine Menge Ferment subcutan (0,02 g), nach einiger Zeit (bis 6 Tage) an derselben Stelle eine grössere Dose, so erweisen sich Dosen als ungiftig, die sonst sicher tödtlich sind.

Bei solchen Thieren bringen subcutane Injectionen von Amygdalinlösungen noch nach viel längerer Zeit, als oben angegeben, CNH-Vergiftung hervor, besonders wenn sie gleichfalls an dieselbe Stelle gebracht werden, wohin vorher das Ferment injicirt wurde.

Versuch. 27. November 1891. Kaninchen erhält Nachmittags 5 Uhr 0,01 Emulsin (rechts hinten).

28. Nov. Abends 7 Uhr. 0,2 Emulsin ebendaselbst.

29. - Vorm. 11 - 1 g Amygdalin links vorn; keine CNH-Vergiftung.

Nachm. 1 - Amygdalinlösung rechts hinten; typische CNH-Vergiftung; am Orte der Injection nach dem Einschneiden starker CNH-Geruch.

Section. Keine Blutungen, überhaupt nicht das Bild der Fermentintoxication; Tod in Folge sich entwickelnder CNH.

Also 17 Stunden nach der Injection erweist sich das Ferment noch als wirksam auf sein specifisches Substrat. Wenn also auch der Organismus durch die locale Entzündung vor dem Eindringen des Giftes in seine Säfte sich schützt, so ist dies doch kein Vorgang, der zu einer schnelleren Zerstörung des injicirten Fermentes an Ort und Stelle führt.

Ganz anders liegt die Sache bezüglich der in den inneren Organen festgehaltenen, aus dem circulirenden Blute entnommenen Fermentmengen; diese wirken nicht auf Amygdalin, welches im Capillarblute durch diese Organe fliesst. Trotz der scheinbaren Nähe kommen die beiden Stoffe nicht in unmittelbare Be-rührung mit einander; die Fermentmengen dürften innerhalb der Zellen fixirt sein. Ob es nun als Ferment oder als veränderte Modification (unwirksames Zymogen?) sich darin befindet, lasse ich dahingestellt.

Woher kommt es nun, dass das in den Lebercapillaren enthaltene Amygdalin und das in den Leberzellen fixirte Emulsin auf einander nicht reagiren? Offenbar liegen hier mehrere logische Möglichkeiten vor: Entweder kann das Emulsin aus den Leberzellen nicht in's Blut treten, oder das Amygdalin aus dem Blute nicht in die Leber, oder beides ist verhindert. Dass das Ferment nicht aus der Leber in's Blut treten kann, haben wir bereits gesehen; offenbar kann also das Amygdalin aus dem Blute nicht in die Leberzellen eintreten. Es entsteht also die

Frage: Welches Schicksal erleidet injicirtes Amygdalin im Organismus?

Nach Gréhant's<sup>1)</sup>) Untersuchungen wird das Glykosid Amygdalin, intravenös injicirt, ziemlich schnell durch die Nieren unverändert wieder ausgeschieden: 3 Stunden nach der intravenösen Injection des Glykosides bringt nachfolgende Emulsinjection keine CNH-Vergiftung mehr hervor. Ich fand dass zu dieser Zeit weder im Blut noch in den entbluteten Organen eine Spur Amygdalin nachweisbar ist (Ausbleiben der Blausäure-reaction); einmal fand es sich noch in Spuren in den Nieren und im Harn. Untersucht man aber die Organe (Leber) kürzere Zeit nach der intravenösen Amygdalinjection, so findet man es in ihnen, dagegen nicht mehr, wenn sie entblutet sind.

In einigen besonderen Versuchen war ich bemüht, die Grösse der von der Leber zurückgehaltenen Fermentmenge zu ermitteln; wenn das Ferment durch eine Mesenterialvene injicirt wurde, so war es bald auch im arteriellen System nachweisbar, auch war die Toxicität bei dieser Versuchsanordnung die gleiche wie bei Injection in eine beliebige andere Vene. Nur wenn nach intravenöser Injection des Amygdalins das Ferment durch eine Mesenterialvene injicirt wurde, trat die CNH-Reaction später ein als bei Injection des Fermentes in eine beliebige Körpervene. Ein Theil des Fermentes dürfte demnach wohl beim ersten Passiren der Leber zurückgehalten werden; der grössere Theil hingegen erst allmählich hier und in einigen anderen Organen zur Ablagerung kommen. Es erinnern die hier mitgetheilten Thatsachen an die schon bekannte Fähigkeit der lebendigen Leber auch andere Gifte, anorganische wie organisierte (Wyssokowitsch u. A.) zurückzuhalten. Nur die lebende Leber, nicht mehr die todte, besitzt diese Retentionskraft, und zwar nur dem Emulsin, nicht aber dem Amygdalin gegenüber. Es scheint aber, als ob ausser der räumlichen Entfernung des Emulsins und Amygdalins in der Leber und den anderen Organen noch ein anderer Einfluss sich geltend mache, das Zustandekommen der CNH-Reaktion zu verhindern. Es erweisen sich nehmlich mit 0,6 pCt. ClNa hergestellte Extracte der frischen

<sup>1)</sup> Arch. de physiologie norm. et pathol. XXII. p. 133.

Leber als wirksam im Sinne einer Verhinderung der CNH-Entwickelung. Bringt man Emulsin- und Amygdalinlösungen in wässrigen Extracten von lebendiger Leber zusammen, so wird die Reaction gestört. Dagegen machen Extracte aus todter Leber keine Störung oder vielmehr keine grössere als bei Anwendung von Salzlösungen, welche dem Salzgehalt der thierischen Gewebe entsprechen. Nicht energischer wirken übrigens dem Thiere entnommene Blutproben auf den in Rede stehenden Fermentvorgang. Ein Gleichtes fand Schnapauff<sup>1)</sup> für das Pepsin. Sonach scheint in den Leberzellen ein die Fermentwirkung behindernder Stoff enthalten zu sein. Wenn ich oben gesagt habe, dass das Blut nur wie eine entsprechende Salzlösung dem Fermentvorgange gegenüber wirkt, so gilt dies nur für das dem Körper entnommene Blut, auf welche Weise es auch ungerinnbar gemacht worden sei (defibrinirtes Blut, Peptonblut, durch Magnesiumsulfat oder Ammoniumoxalat). Wichtig erschien es mir auch hier, den Einfluss des lebendigen Blutes im Organismus zu untersuchen. Wie ich schon oben angedeutet habe, fand ich, dass, um bei einem Thiere durch Emulsin- und Amygdalinjection CNH-Vergiftung herbeizuführen, das Ferment in einem gewissen Mindestbetrage einzuführen ist. Emulsindosen bis 0,02 g brachten bei gleichzeitig injicirtem Amygdalin bei Kaninchen von etwa 1500 g Körpergewicht keine CNH-Vergiftung hervor. Die Injectionen fanden von zwei verschiedenen peripherischen Venen aus statt, entweder gleichzeitig oder unmittelbar nach einander. Von Amygdalin wurden in diesen Versuchen 1 g<sup>2)</sup> in ClNa gelöst injicirt. Es fand in der That keine Bildung von CNH statt; denn aus der Ader gelassene Blutproben enthielten keine CNH; setzt man dagegen zu derartigen Blutproben Amygdalinlösung und digerirt, so entwickelt sich sofort CNH, während man dem Organismus noch so viel Amygdalin einverleiben kann, ohne dass es zur CNH-Entwickelung kommt. Die ausserhalb in der Blutprobe gebildete CNH reicht auch aus, um dasselbe Versuchsthier zu tödten. Selbst nach kleineren Fermentmengen, 0,01 g, intravenös injicirt, geht in

<sup>1)</sup> Schnapauff, Zur Physiologie des Pepsins. Inaug.-Diss. Rostock 1889.

<sup>2)</sup> Uebrigens ist eine kleinere Menge schon genügend; auch noch mehr Amygdalin macht dann keine CNH-Vergiftung.

entnommenen Blutproben ausserhalb des Organismus die Reaction mit zugesetztem Amygdalin vor sich. Es kann sich demnach nur um eine Hemmung bezw. Verhinderung des Fermentvorganges im circulirenden Blute handeln. So dürfte auch die von Gréhant<sup>1)</sup> beobachtete Thatsache zu deuten sein, dass nehmlich, um ein Thier durch CNH zu tödten, eine geringere Menge Amygdalin nöthig ist, wenn man die Reaction ausserhalb des Körpers vor sich gehen lässt und das Gemisch injicirt, als wenn man ohne vorherige Einwirkung auf einander die Stoffe dem Organismus einverleibt.

Diese Erfahrungen brachten mich auf den Gedanken, die antifermentative Wirkung des circulirenden Blutes bei einem Fermente zu untersuchen, auf welches schon ausserhalb des Körpers das Blutserum in specifischer Weise hemmend wirkt. Wie Hammarsten gefunden hat, besitzt gerade dem Labferment gegenüber das Blutserum eine intensiv hemmende Wirkung. Am schwächsten wirksam von allen Blutarten erweist sich das Kaninchenserum. Es lag nun nahe, die Grösse dieser Fähigkeit auch beim lebenden Blute festzustellen. Durch die CaseingerinnSEL, die unter der Labwirkung auf Milch im Organismus sich bilden konnten, mussten offenbar Symptome hervorgerufen werden, die die eingetretene Wirkung des Labfermentes bekunden. Es wurden einem Kaninchen gleichzeitig Labfermentlösung und Milch (körperwarm) injicirt.

5 ccm 10 procentige Labfermentlösung durch V. femoralis.

10 ccm rohe Milch durch V. jugularis.

Innerhalb weniger Minuten musste sich die Wirkung des Labfermentes auf die Milch äussern können; indess auch nach längerer Zeit traten keine Symptome von etwaigen CaseingerinnSELN auf.  $\frac{1}{2}$  Stunde darauf wurde der Versuch wiederholt: 1 Minute nach der Injection traten Krämpfe auf, der Herzschlag wurde unregelmässig und das Thier ging zu Grunde. Die sofort vorgenommene Section zeigte, dass Herz und Gefässstämme derbe CaseingerinnSEL enthielten. Es lässt sich also auch hier die antifermentative Wirkung zeigen; doch ist eine absolute Verhinderung, ebenso wenig wie bei Emulsin-Amygdalin zu beob-

<sup>1)</sup> Gréhant, l. c.

achten. Es scheint also im Blute etwas Aehnliches sich geltend zu machen, wie in der Leber, vielleicht eine Umwandlung des Fermentes in eine auf sein Substrat unwirksame Modification. Gleichviel aber, ob eine Ablenkung (durch andere Stoffe) der Wirkung der Fermente, des Emulsins (und Labs) auf ihre spezifischen Substrate (Amygdalin, Milch) vorliegt oder eine Umwandlung in eine unwirksame Modification, so bleibt doch ihre Schädlichkeit dem Organismus gegenüber unverändert. Die kleinen Fermentmengen (0,02 Emulsin bezw. 0,5 Lab) intravenös injicirt reichen bereits hin, um innerhalb 24—48 Stunden den Tod des Thieres herbeizuführen. Es ist dementsprechend hier wohl der Ort, das Resultat von Experimenten zu erwähnen, in welchen ich versuchte, die schädliche Wirkung der genannten kleinen Fermentdosen dadurch zu vermindern, dass ich sie gewissermaassen durch Darreichung ihrer sonstigen spezifischen Substrate von der Einwirkung auf den Organismus abzulenken versuchte. Ich fand, dass gleichzeitige Injectionen von Rohrzuckerlösungen den Ablauf der Vergiftung mit Invertin nicht hindern — sie übrigens aber auch nicht vergrössern.

Besonders beachtenswerth erscheint mir, dass gerade diejenigen Organe, Leber u. s. w., in welchen das Ferment schliesslich fest gelegt und in seiner Wirkung auf sein specifisches Substrat hindert wird, schwereren schon früher von mir geschilderten Veränderungen entgegen gehen; es gelang mir nicht zu entscheiden, ob die Festlegung als solche das schädigende Moment ist, oder ob das festgelegte Ferment an Ort und Stelle eine schädliche Einwirkung weiter entfaltet. An den früher von uns geschilderten Degenerationen wichtiger Organe nimmt auch die Leber in besonderem Maasse Theil<sup>1)</sup>. Die Blutungen und Gefässverlegungen in verschiedenen Körpergebieten sind sicher nicht unwesentlich; indess wird nunmehr immer wahrscheinlicher, dass der von uns früher beobachtete „Abzehrungsprozess“ im Wesentlichen bedingt ist durch degenerative Vorgänge in den parenchymatösen Organen. Die Zellen, welche im Kampfe das fremde Ferment aufgenommen haben, sind schliesslich doch der unterliegende Theil, das ganze Organ verfällt der Atrophie.

<sup>1)</sup> H. Hildebrandt, Zur Kenntniss der physiologischen Wirkung der hydrolytischen Fermente. Dieses Archiv Bd. 121.

Schon früher haben wir die Fermente als Blutkörperchen-gifte kennen gelernt; in neuen von mir angestellten Untersuchungen stellte es sich heraus, dass man sie mehr oder weniger als Protoplasmagifte bezeichnen muss.

Bringt man Flimmerzellen in eine Emulsin-ClNa-Lösung, so kann man beobachten, dass allmählich die Bewegung der Flimmerhaare immer schwächer wird und schliesslich nach 20 bis 30 Minuten gänzlich aufgehört hat, während in ClNa-Controllen (ohne Emulsin), die Bewegung noch lange anhält. In gleicher Weise erfahren die Spermatozoïden eine Lähmung. Auch andere Gewebe werden unter der Fermentwirkung functionsunfähig. Schon oben erwähnte ich, dass einige Male bei Injection des Fermentes (Emulsin) in die V. jugularis bei Hunden der Tod sofort eintrat. Bei der alsbald vorgenommenen Section fand sich nirgends eine Gerinnselbildung: — hieran konnte man zunächst denken, da ein anderes Ferment, das Myrosin, in der That durch Thrombose den Tod von Kaninchen in früheren Versuchen sofort hervorgebracht hatte. In den erwähnten Emulsin-versuchen war aber das Blut überall flüssig; das Herz stand diastolisch still. Dieser Befund veranlasste mich, diese That-sachen am Froschherzen näher zu prüfen.

Injicirt man  $\frac{1}{2}$  ccm 10procentige Emulsin-ClNa-Lösung peripher in eine grössere Arterie des Frosches, so tritt sofort diastolischer Herzstillstand ein. Weder durch elektrische noch durch mechanische Reize wird eine Contraction ausgelöst. Erst nach mehreren Minuten beginnen wieder unvollkommene Contractio-nen; durch Injection einer 0,6 procentigen ClNa-Lösung werden die Herzschläge sofort wieder sichtbar gemacht. Wurde die Fermentlösung geraume Zeit bei  $40^{\circ}$  digerirt und dann injicirt, so trat jene Wirkung nicht ein, ebenso wie die Wirkung des Fermentes auf Amygdalin hierdurch wesentlich geschwächt wurde. Es dürfte demnach das Ferment selbst sein und nicht etwaige toxische Beimengungen, welches jene Wirkung entfaltet. Bei der Injection in die Bauchvene (herzwärts) genügte übrigens be-reits eine kleine Menge des Fermentes, um jene Wirkung her-vorzubringen. Ich prüfte in dieser Beziehung noch einige andere Fermente. Nach Injection einer Lösung Diastase schloss sich die Zusammenziehung des Ventrikels erst viel später der Vor-

hofssystole an als in der Norm. Bei der Contraction trat ein peristaltisch von der Basis nach der Spitze des Ventrikels fortschreitender Contractionsring auf. Aehnliches Verhalten zeigten Invertin, Chymosin, Myrosin. Uebrigens trat dieses Phänomen nach Emulsin bei Anwendung ganz verdünnter Lösungen ebenfalls ein; die Erscheinung stellt somit den Beginn der eigenartigen Lähmung dar.

Bringt man ein kräftig schlagendes Froschherz in eine concentrirtere Ferment-ClNa-Lösung, so hört es nach wenigen Seunden auf zu schlagen. Bringt man es nun wieder in eine 0,6prozentige Lösung, so beginnt bald wieder der Rhythmus der Contractionen. Auch ausgeschnittene Froschmuskeln verlieren nach wenigen Minuten in einer Emulsinlösung ihre Erregbarkeit (im lebenden Thiere verfallen fermentbehandelte Muskeln keiner Degeneration). Auch der Nerv verliert in einer Emulsin-ClNa-Lösung seine Erregbarkeit. Legt man den freipräparirten, aber noch mit dem Rückenmark in Verbindung stehenden Ischiadicus eines Froschpräparates in die Emulsinlösung, den anderen zur Controle in eine Kochsalzlösung, während die zugehörigen Muskeln des Unterschenkels von den Lösungen nicht benetzt werden<sup>1)</sup>), so lässt sich bereits nach 20 Minuten eine erhebliche Herabsetzung der Erregbarkeit auf der Fermentseite bei Reizung des Nerven oberhalb der benetzten Stelle wahrnehmen, die allmählich zunimmt. Nach 50 Minuten trat Tetanus erst bei einem Rollenabstande von 260 mm auf, in der Controle schon bei 520 mm (wie auch am Anfange des Versuches). Durch Abspülen mit physiologischer ClNa-Lösung trat nach einigem Liegen in derselben Flüssigkeit wieder annähernd normale Erregbarkeit ein. Liess ich den Querschnitt des Nerven in die Fermentlösung eintauchen, so trat die geschilderte Herabsetzung der Erregbarkeit noch erheblich schneller ein. Diese Thatsachen liessen erwarten, dass das Ferment Aehnliches könnte, wenn es resorptiv zur Wirkung kommt. Bei subcutaner Injection (in die Lymphsäcke des Frosches) zeigte sich in der That stets Herz-lähmung; die Wirkung auf die Körpermuskeln (und Nerven) kommen auf diese Weise nicht zur Beobachtung, offenbar weil

<sup>1)</sup> Der Versuch ist natürlich in der „feuchten Kammer“ vorzunehmen.

die Herzlähmung eine genügend starke Vergiftung der Muskeln nicht zu Stande kommen lässt. Wurde dagegen beim entbluteten Thiere in die Iliaca des einen Beines die Fermentlösung, in die andere eine ClNa-Lösung injicirt, so liess sich nach 10 bis 20 Minuten zeigen, dass die durch elektrische Reizung des Plexus erzeugte Zuckung auf der Fermentseite schwächer ist als auf der mit ClNa injicirten Seite. Ferner habe ich an einem sonst normalen Frosche beide Extremitäten von der Circulation ausgeschaltet; alsdann wurde in die eine Iliaca die Fermentlösung, in die andere die ClNa-Lösung injicirt, wobei aus der geöffneten Knievene ein grösserer Theil der Flüssigkeit abfloss. Nach 1—2 Stunden war die Lähmung auf der Fermentseite eine vollständige; auch die Muskeln dieser Seite reagirten nur bei Anwendung stärkster Ströme. Allmählich erlosch auch die Sensibilität, so dass keine Reflexe mehr von der Haut und den Nervenstämmen aus zu erzielen waren. Aehnliche Wirkungen erhielt ich auch bei Warmblütern, wenn ich die Fermentlösung dem Blute der Femoralarterie durch einen Collateralast bemischte und (zur Verhütung der Allgemeinintoxication) aus der Femoralvene abfliessen liess; das Bein wurde nach einiger Zeit nachgeschleppt. Doch war die Wirkung keine lang anhaltende; die normale Leistungsfähigkeit trat bald wieder ein.

### 3. Ueber den Einfluss des Syzygium Jambolanum auf die Saccharification in den Geweben.

In einer früheren Mittheilung<sup>1)</sup> habe ich nachgewiesen, dass das wässrige Extract von *Fructus Syzygii Jambolani* auf die Thätigkeit der saccharificirenden Fermente hemmend einwirkt. Obwohl der Mechanismus der Zuckerbildung in den Geweben (ausserhalb des Digestionstractus) noch eine offene Frage ist — die Fähigkeit des Blutes zur Saccharification ist ja allerdings schon lange bekannt — so dürfte doch manche pathologische Thatsache für die Ansicht verwerthet werden können, dass bei der normalen Zuckerbildung in den Geweben fermentative Vorgänge eine Rolle spielen. Das nächstliegende wäre anzunehmen die Umwandlung von Kohlehydraten bezw. Glykogen in Zucker unter Mitwirkung eines saccharificirenden Fermentes.

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1892. No. 1.

Für eine Untersuchung ob ein Mittel in den Geweben auf derartige Vorgänge einen Einfluss habe, bieten sich im Wesentlichen zwei Wege: entweder bestimmt man die Menge des (unter seinem Einfluss) der Fermentation entgangenen Materials (Kohlehydrate, Glykogen) oder das entstandene Deficit an Fermentationsproducten. Die erste Methode liesse sich in der Weise ausführen, dass man Thiere hungern lässt und untersucht, ob bei gleichzeitiger Anwendung unseres Mittels der Glykogen- (bezw. Kohlehydrat-) Schwund verzögert wird. Dieser Weg schien mir indess wegen der schon in der Norm vorhandenen grossen Schwankungen des Glykogengehaltes der Gewebe nicht zweckentsprechend. Zur Anwendung der zweiten Methode schienen besonders zwei Arten von experimentell erzeugtem Diabetes geeignet, die sogenannte nervöse Melliturie und der Phloridzin-Diabetes. Für beide liegen bereits Thatsachen vor, welche dafür zu sprechen scheinen, dass es sich um einen abnorm gesteigerten Fermentationsvorgang handle. Saikowski wies nach, dass die Melliturie (erzeugt durch Claude Bernard's piqûre) nach Verabreichung von Arsen ausbleibt. Ich fand, dass gerade Arsen schon in starker Verdünnung fermentative Saccharificationsvorgänge hemmt; freilich wird durch Arsendarreichung auch das Material der Zuckerbildung (das Glykogen, Saikowski) vermindert. Im Phloridzin-Diabetes wollen Lépine und Barral<sup>1)</sup> eine Vermehrung des saccharificirenden Fermentes des Blutes nachgewiesen haben, und gerade hier ist ja [ebenso wie neuerdings beim Diabetes nach oxalursaurem Ammonium<sup>2)</sup>: Kobert] die günstige Wirkung des Syzygium Jambolanum evident nachgewiesen. Freilich ist nicht nachgewiesen, dass auf dem vermehrten Saccharificationsvermögen des Blutes die beobachtete Melliturie beruht. Zunächst zog ich indess eine andere Form von experimentell erzeugter Glykosurie in's Bereich der Untersuchung, nehmlich die von Filehne<sup>3)</sup> durch Reizung des N. depressor beim Kaninchen erzeugte Melliturie. Sie hat vor der durch die

<sup>1)</sup> R. Lépine et Barral, Sur les variations du pouvoir glycolytique et saccharifiant du sang dans le diabète phloridzique et dans le diabète de l'homme. Compt. rend. CXIII. 1891. p. 1014.

<sup>2)</sup> Arbeiten des Dorpater pharmakologischen Instituts. 1891.

<sup>3)</sup> W. Filehne, Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1878.

piqûre hervorgerufenen methodologisch den grossen Vorzug, dass man den Grad der Zuckerausscheidung beherrschen kann, und der Eingriff geringfügiger ist als bei der piqûre. Ich fand zwar, dass die Grösse der Zuckerausscheidung bei Thieren gleichen Körpergewichtes u. s. w. ceteris paribus innerhalb gewisser Grenzen verschieden ausfällt, überzeugte mich aber hinlänglich, dass sie regelmässig eintritt. Die erwähnte Ungleichartigkeit musste durch die Zahl der Versuche ausgeglichen werden.

Die Versuchsanordnung war derartig, dass bei zwei gleichen Thieren (Kaninchen) der N. depressor (der linken Seite) freigelegt wurde; vorher erhielt das eine das Extract von Syzygium in wässriger Lösung, das andere eine gleiche Menge indifferenter Flüssigkeit per Schlundsonde. Die Reizung des Nerven geschah innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten alle 5 Minuten 20 Sekunden hindurch mittelst mittelstarker Ströme (R.-A. 300 mm) Die Thiere befanden sich in Rückenlage gefesselt. Unmittelbar vor der Reizung und dann zum ersten Male wieder 2—3 Stunden nachher wurde den Thieren der Harn entnommen und der Zuckergehalt<sup>1)</sup> bestimmt. In den ersten Versuchen erhielt ich unerwartete Resultate: Das Thier, welches Syzygiumextract erhalten hatte, entleerte einen zuckerreicheren Harn als das Controlthier. Es konnte dies durch verschiedene Momente bedingt sein. Kobert<sup>2)</sup> neigt der Ansicht zu, dass jede Herabsetzung der Alkalescenz Diabetes bewirken könne. Nun reagirte allerdings das Syzygiumextract ziemlich stark sauer, und es ist ja bekannt, dass bei Herbivoren die Alkalescenz leichter herabsetzbar ist als bei Carnivoren. Auch konnte die Menge des in den Magen gegebenen Extractes in Betracht kommen; sie durfte nicht zu gross sein. Endlich aber konnte der im Syzygiumextract selbst enthaltene Zucker<sup>3)</sup> zur theilweisen Ausscheidung gekommen sein. Nach Dujardin-Beaumez's<sup>4)</sup> Versuchen vermag ein normales Kaninchen in den Magen gegebenen Traubenzucker

<sup>1)</sup> Der Harn wurde nach der von Hofmeister angegebenen Methode mit essigsaurem Natrium und Eisenchlorid behandelt, und im klaren Filtrate der Zuckergehalt durch Titiren mittelst Fehling'scher Lösung bestimmt.

<sup>2)</sup> a. a. O.

<sup>3)</sup> Berliner klin. Wochenschr. 1892. No. 1. S. 5.

<sup>4)</sup> Dujardin-Beaumez, Bull. gén. de Thér.

bis zu einer Menge von etwa 30 g per Kilo vollständig zu bergen, so dass nichts davon im Harn erscheint. In vorläufigen Versuchen habe ich festgestellt, dass dieses Verhältniss durch Darreichung grösserer Flüssigkeitsmengen (500 ccm und mehr) in der Weise gestört wird, dass schon von 30 g injicirter Glykose quantitativ nachweisbare Mengen in den Harn übergehen. Ferner: injicirt man unmittelbar vor der Depressorreizung 30 g Glykose in den Magen, so nimmt die Menge des ausgeschiedenen Zuckers im Harn beträchtlich zu.

Um alle durch die genannten Umstände bedingten Fehlerquellen auszuschliessen, bin ich in allen weiteren Versuchen derart verfahren, dass ich das Syzygiumextract entzuckerte, neutralisierte und in Mengen nicht über 50 ccm anwandte. Den Zucker schaffte ich theils durch Vergären fort, theils behandelte ich die Extractlösung mit neutralem Bleiacetat, wodurch das wirksame Princip gefällt wird; der Niederschlag wird in Wasser suspendirt und durch  $H_2S$  entbleitet, wobei das wirksame Princip in Lösung geht.

Das Resultat der Thierversuche bei Anwendung des in der angegebenen Weise behandelten Präparates war Folgendes: Während in den Controllen der Zuckergehalt des Harns in der Regel 0,1 pCt. überstieg, erreichte er in den Syzygiumproben nur ausnahmsweise die gleiche Höhe; in einigen, fast der Hälfte der Versuche war gar kein Zucker nachweisbar. In solchen Fällen war auch in dem später (9—10 Stunden nach der Reizung) entnommenen Harne kein Zucker nachweisbar, während in den Controllen die Glykosurie noch mehrere Stunden nach beendeter Reizung anzuhalten pflegt (Filehne, a. a. O.).

Für denjenigen, welcher die von uns erzeugte Melliturie mit der Annahme einer verminderten Zuckerumsetzung erklären will, werden allerdings unsere Versuche nicht für eine Hemmung des Saccharificationsvorganges zu sprechen scheinen. Ist doch auch, wie ich bereits oben angab, die Assimilationsgrenze für Traubenzucker herabgesetzt — in einem Falle schied ein Kaninchen von 30 g vor der Depressorreizung in den Magen gegebenen Traubenzuckers über 2 g wieder aus. Es empfahl sich daher einerseits nachzusehen, welchen Einfluss Syzygium auf die Zerstörung eingeführten Zuckers ausübt und andererseits, ob unter dem Einflusse der Depressorreizung der Gehalt des Blutes an saccharifi-

cirendem Ferment zunimmt. In Bezug auf letzteres ist zu erwähnen, dass die Thiere nach Depressorreizung einer allmählich sich steigernden Abmagerung anheimfallen; einige Male waren bei der Section auch Blutungen im Magen und Schwellung der Plaques nachweisbar, kurz die Symptome der Fermentintoxication. Dies brachte mich auf den Gedanken, nachzusehen ob etwa das diastatische Ferment im Blute vermehrt sei. Diese Vermuthung fand ich in mehreren hierauf gerichteten Versuchen bestätigt.

Versuch. 14. Februar 1891. Kaninchen 1500 g.

10 Uhr I.	Blutentnahme.	Je 20 Tropfen Blut	Umgewandelte
10 - 15 Min. (nach 3mal. Reizung)		werden mit 20 ccm	Stärke in pCt.
	II. Blutentnahme.	1proc. Stärkekleister	Probe I 12 pCt.
10 - 30 - (nach 6mal. Reizung)		gemischt 5 Stunden	- II 18 -
	III. Blutentnahme.	bei 35° belassen.	- III 20 -

Zweifellos ist jetzt also eine Zunahme der Fermentkraft des Blutes nachgewiesen; es liegt nun nahe, hierauf den Eintritt der Melliturie zu beziehen. Doch ist auch der oben genannte Factor, verminderte Zuckerbergung in Betracht zu ziehen, und es wäre sogar denkbar, dass unter dem blossen Einflusse der gesteigerten Fermentationskraft des Blutes eine Störung der Zuckerbergung eintrete. Auch bei einer acuten Intoxication durch pflanzliche Diastase ist, wie ich gefunden habe, die Fähigkeit, vom Magen aus eingeführten Zucker davor zu schützen, durch die Nieren ausgeschieden zu werden, erheblich vermindert. Nach subcutaner Injection von 0,3 g Diastase fand ich von 30 g in den Magen gegebener Glykose 0,85 g wieder, während normale Kaninchen nach diesem Quantum noch keine Glykosurie zeigen. Diese Erfahrung gab mir eine Methode an die Hand nachzusehen, ob Syzygium (gegenüber der schädlichen Einwirkung des diastatischen Fermentes) die Fähigkeit des Organismus, den Zucker zurückzuhalten, steigert.

Versuch 21. Februar 1892.

Von zwei gleichen Thieren erhält „A“ 30 g *Fructus Syzygii* (entzuckert!) ausserdem, ebenso wie „B“ innerlich 30 g Traubenzucker und subcutan je 0,3 g Diastase.

Die verabreichten Flüssigkeitsquanta betrugen bei beiden Thieren je 120 ccm; vorher wird den Thieren die Harnblase entleert. Nach 9 Stunden beträgt der entleerte Harn 200 ccm.

Zuckergehalt in pCt. { „A“ 0,9 pCt. Traubenzucker.  
„B“ 0,8 - -

Sonach scheint also Syzygium das Zurückhaltungsvermögen für Zucker nicht zu steigern, und dieses spricht wieder dafür, dass der durch Syzygium bewirkten Herabsetzung der Zuckerausscheidung nach Depressorreizung ausschliesslich eine Verminderung der Zuckerproduction zu Grunde liege, eine directe Hemmung vielleicht des saccharificirenden Fermentationsprozesses. Auf diese Weise ist wohl auch der günstige Einfluss des Syzygium beim Phloridzin-Diabetes zu erklären, zumal es sich hier, wie schon v. Mering<sup>1)</sup> angegeben hat, gar nicht um eine Verminderung der Zuckeraumsetzung handelt. Ich fand, dass innerliche Verabreichung von Syzygium das saccharificirende Vermögen des Blutes im Phloridzin-Diabetes (ebenso wie am normalen Thiere) herabsetzt. Verabreichung einer gleichen Menge indifferenter Flüssigkeit hatte diesen Einfluss nicht. Dass übrigens die mehrfache Entnahme von derartig kleinen Blutproben keine Fehlerquelle in dieser Beobachtung bedeutet, geht daraus hervor, dass in besonders angestellten Controlversuchen eine Aenderung des Fermentvermögens nicht statt hat, im Gegensatz zu dem Verhalten bei grösseren Aderlässen.

Versuch. 16. Januar 1891.

Hund im Phloridzin-Diabetes (12 Stunden nach der Verabreichung).

Vorm.	10 Uhr 15 Min.	Blutentn. I.	Gebildeter Zucker
-	10 - 30 -	Innerlich 40 g Syzygium.	20 Tropfen in 20 ccm 1pro-centigem Stärkekleister.
-	11 - 10 -	Blutentn. II.	Probe I 27,75 pCt. - II 18,75 -
-	12 - 10 -	- III.	- III 16,5 -
Nachm.	6 - -- -	IV.	- IV 24,0 -

Die hier mitgetheilten Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, dass Syzygium, wo es bei menschlichem Diabetes mellitus sich wirksam erweist, die Saccharificationsvorgänge in den Geweben vermindert. Clacius<sup>2)</sup> fand das Mittel auch wirksam bei einem Diabetiker, der stärkereiche Kost genossen hatte; indess könnte hier ein wesentlicher Antheil auf die verminderte Umsetzung schon im Magendarmkanal kommen.

<sup>1)</sup> Verhandlungen des 5. und 6. Congresses für innere Medicin.

<sup>2)</sup> Chicago Med. Journ. 1885. Aug.

#### 4. Untersuchungen über Immunität gegen hydrolytische Fermente.

Die oben mitgetheilten Versuchsergebnisse am Menschen, das Ausbleiben der Fermentwirkung auf den Organismus nach öfterer Application per clysmo bedurfte einer eingehenderen Untersuchung. Zunächst konnte daran gedacht werden, dass das in's Rectum injicirte Ferment local-entzündungserregend gewirkt habe, ähnlich wie im subcutanen Gewebe und an der Conunctiva (s. oben); indess klagten die Versuchspersonen niemals über Schmerhaftigkeit im Rectum, noch war in den Thierexperimenten jemals etwas von Entzündung zu sehen. Ich konnte vielmehr experimentell feststellen, dass von der Rectalschleimhaut aus das Ferment ziemlich schnell in die Säfte des Organismus aufgenommen wird. Blutproben etwa 20 Minuten nach der Fermentinjection in's Rectum entnommen, erwiesen sich als fermenthaltig, indem auf Amygdalinzusatz CNH sich bildete. Zu dieser Zeit wird durch Amygdalininjection CNH-Vergiftung hervorgerufen; 1 Stunde nach dem Klysma macht Amygdalin keine CNH-Vergiftung mehr, das Ferment ist dann aus Blut und Rectum verschwunden. Von einem local im Rectum entstandenen Entzündungsprozess (ähnlich wie im subcutanen Bindegewebe, s. oben) konnte somit wohl nicht die Rede sein; das im Entzündungsheerde zurückgehaltene Ferment hätte alsdann nach viel längerer Zeit noch aus injicirtem Amygdalin CNH bilden müssen. Es konnte indessen das Verhalten der Rectalschleimhaut dem öfters einwirkenden Fermente gegenüber auf einer allmählich sich entwickelnden Beeinträchtigung der Resorption beruht haben, vielleicht auf einer sich ausbildenden localen Immunität, ähnlich etwa, wie es Samuel<sup>1)</sup> nach öfterer Application von Crotonöl am Kaninchenohre angiebt. Ich komme auf diese Möglichkeit weiter unten noch zurück.

Näher lag die Vermuthung, dass es sich um eine Anpassung des ganzen Organismus handle, um eine wirkliche, allgemeine Immunität.

Es galt also die Frage zu entscheiden, ob sich einem hydrolytischen Fermente gegenüber richtige Immunität erzeugen

<sup>1)</sup> Dieses Archiv Bd. 127.

lasse. Durch tägliche subcutane Injectionen kleinster, an sich unschädlicher Dosen Emulsin und Invertin versuchte ich die Thiere (Kaninchen) gegen grössere Dosen resistent zu machen. Indess schien eher eine cumulirende Giftwirkung des Fermentes einzutreten. Die mit den kleinen Dosen behandelten Thiere magerten mehr und mehr ab und gingen zu Grunde; der Sectionsbefund entsprach dem bei der Fermentintoxication gewöhnlich sich darbietenden charakteristischen Bilde.

Versuch am 20. Februar 1891 begonnen.

Kaninchen, 1500 g, erhält täglich 0,005 g Emulsin, 14 Tage hindurch (einmalige Application von 0,005 Emulsin erweist sich als unschädlich).

7. März 1891 Gewicht 1325 g; Thier äusserst mager.

10. März Tod; Sectionsbefund ergiebt die charakteristischen Veränderungen.

Gegen eine grössere Dose des Fermentes (0,3) erwiesen sich solche Thiere weniger resistent, als völlig normale, vorausgesetzt, dass die Injection nicht an einer durch eine frühere Injection in Entzündung versetzte Stelle geschah. Es ist auch nicht unwahrscheinlich, dass die entzündungserregende Wirkung der Fermente, wie sie oben ausführlich nachgewiesen ist, die Thiere schwer schädigt, zumal wenn die Injectionen, wie in den angeführten Versuchen jedesmal an einer anderen Stelle stattfinden mussten (um sie überhaupt zur Resorption zu bringen). Mit Rücksicht hierauf nahm ich die Versuche später wieder auf unter Anwendung einer anderen, weniger schädigenden Applicationsform, der rectalen Injection.

Eine Woche hindurch injicirte ich in's Rectum (von Kaninchen) täglich 0,1—0,3 g Emulsin unter ganz allmählicher Vergrösserung der Dosis; in der zweiten Woche wurde weiter gestiegen, bis 1 g erreicht war. Die so behandelten Thiere nahmen an Körpergewicht nicht ab, zeigten überhaupt ganz normales Verhalten. In Controlversuchen überzeugte ich mich, dass 1 g Emulsin in's Rectum injicirt innerhalb 24—48 Stunden normale Thiere sicher tödtet. Obwohl die genannten kleinen Dosen kein Fieber machen, so schützen sie die Thiere doch gegen die sonst Fieber erzeugende Wirkung grosser Dosen, ganz so wie vorher applicirte Fieber erregende Gaben. Diese Thatsachen konnten noch erklärt werden durch Annahme einer Art localer Immuni-

sirung der Rectalschleimhaut, welche vielleicht nach mehrfacher Application der Fermentlösung an Resorptionsvermögen eine Einbusse hätte erfahren haben können. Indessen wird diese Annahme dadurch überflüssig, dass sich eine allgemeine Immunität des Thieres herausstellte. Wie ich schon oben mittheilte, reagirt die Conjunctiva des Kaninchenauges auf öfteres Einträufeln der Emulsin-ClNa-Lösung mit einer allmählich stärker werdenden Entzündung. Bei den mit den rectalen Injectionen behandelten Thieren bleibt dagegen die Entzündung aus; und wo conjunctivale Gefässinjection bei solchen Thieren auftrat, war ihre Intensität wesentlich geringer als bei normalen Thieren; offenbar war also die Immunität noch keine vollkommene. Ich versuchte hier sie zu vervollständigen und verfuhr zu diesem Zwecke in derselben Weise, wie in meinen ersten Immunisirungsversuchen, nehmlich mit allmählich gesteigerten subcutan injizirten Fermentdosen. Ich begann mit 0,01 g. Hier war der Erfolg ein ganz auffallend anderer: Thiere, die vorher Injectionen (bis 1 g) in's Rectum erhalten hatten, vertrugen diese subcutanen Injectionen sehr gut. Durch allmähliche Steigerung der Gabe erreichte ich, dass die Versuchsthiere 1 g Emulsin (gelöst in 20 ccm 0,6 pCt. ClNa) ohne Schaden vertrugen, während doch nicht behandelte Thiere schon auf 0,1 g Emulsin (bei subcutaner Application) sicher spätestens nach Ablauf einer Woche, nach 0,5 g spätestens nach 2 Tagen starben. Weitere Steigerungen waren nicht nothwendig, weil sich bereits solche Thiere als vollständig immun gegenüber der Fermentwirkung an der Conjunctiva erwiesen.

Von grosser Wichtigkeit schien mir zu ermitteln, ob nichts weiter vorliegt, als dass die Thiere gegen die Giftwirkung des Fermentes geschützt sind, oder ob auch die chemische Wirkung des Fermentes, die Actionsfähigkeit gegenüber Amygdalin beeinträchtigt sei, oder mit anderen Worten: Beruht die Immunität gegen Emulsin darauf, dass die Zellen des Organismus unempfindlich gegen seine Giftwirkung geworden sind, oder darauf, dass das Emulsin schneller unschädlich gemacht, zerstört wird. — Zur Beantwortung dieser Frage musste ein Versuch derart gemacht werden, dass man das Ferment mit seinem spezifischen Substrat (Amygdalin) in einem „immunisirten“ Orga-

nismus zusammentreffen lässt. Injicirt man einem normalen Kaninchen 0,03 g Emulsin intravenös und gleichzeitig eine Lösung von Amygdalin (0,5—1 g) ebenfalls intravenös, so treten die Symptome der CNH-Vergiftung alsbald auf; es vergeht kaum 1 Minute. Bei dem „emulsinfesten“ Thiere trat diese Reaction ceteris paribus ungemein verspätet — nach 5—7 Minuten auf. (Die Thiere waren nach beendeten Injectionen ungefesselt gelassen worden.) Diese Thatsache spricht zweifellos dafür, dass es sich bei der Emulsinfestigkeit nicht blos um eine Immunität der Zellen des Organismus gegen die Giftwirkung des Fermentes handelt, sondern dass eine Art Gegengift in den Säften des Körpers erzeugt sei, welches das Ferment unwirksam und daher wohl auch sonst unschädlich für das Thier macht. Dass dies wirklich der Fall ist, konnte ich noch auf andere Weise constatiren. Es ist ja bekannt, dass dem Emulsin ausser seinem spaltenden Einflusse gegenüber verschiedenen Glykosiden (Amygdalin, Salicin, Phloridzin, Arbutin, Coniferin) noch eine nicht unerhebliche diastatische, Stärke in Zucker umwandelnde Fähigkeit innewohnt; es ist aber wohl kein Grund, deswegen Emulsin als ein Gemisch verschiedener Fermente anzusprechen. Es war nicht ausgeschlossen, dass die Behinderung des Fermentes auch darin sich äussern konnte, dass seine diastatische Fähigkeit leide. Nun musste nothwendig aber zunächst auch das eigene diastatische Ferment des Blutes bei emulsinfesten Thieren berücksichtigt werden. Ich musste entscheiden, ob etwa auch das diastatische Vermögen des Blutes durch die Immunität geändert sei. In mehrfachen Versuchsreihen habe ich festgestellt, dass 20 Tropfen Kaninchenblut in 24 Stunden bei 30—36° von 0,2 g Stärke (in 1 pCt. ClNa-Lösung) etwa 60 bis 80 pCt. in Zucker verwandeln. Das Blut von emulsinfesten Thieren hatte in dieser Fähigkeit eine ganz wesentliche Einbusse erlitten. Ich fand ceteris paribus von 0,2 g Stärke nur 20 bis 30 pCt. in Zucker umgewandelt. Diese Eigenschaft des Blutes unserer immunen Thiere kommt auch zur Geltung, wenn man zu Blutproben des immunen Thieres wirksame pflanzliche Diastase (in 0,6 pCt. ClNa gelöst) zusetzt und beides auf das Substrat (Stärke, Glykogen) einwirken lässt; es wird dann von der pflanzlichen Diastase weniger Zucker gebildet als bei Zusatz von nor-

malem Blute. Vergleicht man nehmlich das diastatische Vermögen einer Blutprobe (30—40 Tropfen) vom normalen Thiere und gesondert davon das von pflanzlicher Diastase gegenüber einer bestimmten Menge Substrates (Stärke) mit dem Umwandlungsvermögen beider Diastasen gemeinschaftlich, so zeigt sich, dass der gebildete Zucker im letzteren Falle ungefähr gleich der Summe des in den gesonderten Proben gebildeten Zuckers ist; nimmt man aber zu dem Versuche Blut eines emulsinfesten Thieres, so wird bei gemeinschaftlicher Einwirkung beider Diastasen, kaum mehr Zucker gebildet als durch die Blutprobe allein. Demnach muss die Hemmung auch auf die saccharifizirende Wirkung der pflanzlichen Diastase von Einfluss gewesen sein.

Versuch. 20. Juni 1892.

5 Proben. Jede Probe enthält 25 ccm 2prozentigen Stärkekleister.

1.	Probe ausserdem: 40 Tropfen normales Blut.	Nach 20 Stunden
2.	- - ebenso + 5 Tropfen pflanzlicher Diastase (5 pCt.).	1.: 52 pCt.
3.	- - 40 Tropfen emulsinfestes Blut.	2.: 86,5 -
4.	- - ebenso + 5 Tropfen pflanzlicher Diastase (5 pCt.).	3.: 38,5 -
5.	- - 40 Tropfen 0,6 pCt. $\text{ClNa}$ + 5 Tropfen pflanzlicher Diastase (5 pCt.).	4.: 39,5 -
		5.: 35,0 -

In der Probe, in welcher Blut des immunen Thieres und pflanzliche Diastase gemeinschaftlich zur Reaction gelangten, ist mithin zu wenig Zucker gebildet: 35,0 pCt.

$$\begin{array}{r}
 +38,5 \\
 -39 \\
 \hline
 =34,5 \text{ pCt.}
 \end{array}
 \text{ Dieses Deficit ist auf die Hemmung der Diastasewirkung zu setzen.}$$

Aus dieser Erfahrung nahm ich Veranlassung nachzusehen, ob die emulsinfesten Thiere auch gegen die Giftwirkung der pflanzlichen Diastase geschützt seien; das ist in der That der Fall.

Nach Tammann<sup>1)</sup> wirkt Diastase auch umsetzend auf Rohrzucker; das Gleiche fand ich bei Emulsin: daher prüfte ich auch Invertin an den gegen Emulsin immunen Thieren, und fand, dass auch diesem Fermente gegenüber Immunität besteht. Von

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. physiolog. Chemie. 1892.

Kobert<sup>1)</sup>) wurde auch das Ricin zu den umgeformten Fermenten gerechnet, da es gewisse chemische Eigenschaften mit ihnen gemein hat. Fällbarkeit durch Alkohol, Empfindlichkeit gegen Wärme u. s. w. Die eben tödtliche Dosis beträgt für ein Kaninchen 0,02 g pro kg, wenn es vom Magen aus zur Resorption gelangt. Diese Dosis wirkte indess bei den fermentfesten Thieren bereits toxisch. Der Sectionsbefund bot die charakteristischen Veränderungen dar. Es geht wohl hieraus hervor, dass Ricin jedenfalls nicht in die Gruppe unserer hydrolytischen Fermente zu zählen ist. Hierzu stimmt auch, dass ihm keinerlei Substrate umsetzende Eigenschaften zukommen (Kobert).

Die hier mitgetheilten Thatsachen veranlassten mich, einige Fragen bezüglich der experimentell erzeugten Glykosurien, sowie bezüglich des menschlichen Diabetes mellitus näher in's Auge zu fassen. Das fermentfeste Thier besitzt bereits, wie ich oben nachwies, einen die Wirkung des diastatischen Blutfermentes (so wie auch anderer Fermente) intensiv hemmenden Stoff. Es fragte sich, ob hier doch Melliturie sich erzeugen lasse bei einem Eingriff, der bei normalen Thieren Glykosurie macht: nehmlich bei Reizung des N. depressor (s. oben). In den hierauf gerichteten Versuchen an fermentfesten Thieren zeigte sich einmal gar kein Zucker im Harn, im anderen Falle war seine Menge so geringfügig, dass sie quantitativ nicht bestimmbar war.

Ein emulsinfester Hund (5 kg) hatte bereits mehrmals 1 g Emulsin (gelöst in 20 ccm 0,6 pCt. ClNa) subcutan erhalten; eine Gewichtsabnahme war nicht eingetreten. Dieses Thier erhielt nunmehr 5 g Phloridzin in den Magen; seine Nahrung bildeten Fleisch und Amylaceen. Abnorm gesteigerter Durst wurde nicht beobachtet; die Menge des innerhalb zweier Tage gelassenen Harns betrug nur 450 ccm. Diese Mengen waren in drei Portionen entleert worden; die erste enthielt 7 pCt., die zweite 4 pCt., die dritte (nur 200 ccm) 1,25 pCt. Zucker. Im Ganzen enthielt der Harn 15 g Zucker. Ein Hund von gleicher Grösse entleerte nach Eingabe des gleichen Präparates (Phloridzin) in 48 Stunden 1600 ccm bei gleicher Ernährung; diese enthielten in toto 28 g Zucker, was mit den Angaben der anderen Autoren

<sup>1)</sup> Arbeiten des Dorpater pharmakol. Instituts.

stimmt. Vielleicht würde eine noch weitere Steigerung des Immunitätsgrades die Intensität der Zuckerausscheidung (offenbar also der Zuckerbildung) noch mehr herabgesetzt haben<sup>1)</sup>. Weniger Erfolg hatte bei schon bestehendem Phloridzin-Diabetes die subcutane Injection des Serums eines fermentfesten Thieres (Kaninchen). In einem Falle erreichte ich durch Injection von 40 ccm defibrinirten Blutes eines immunen Kaninchens, dass die Zuckerausscheidung (im Phloridzin-Diabetes) von 12 g pro Tag auf 8 g pro Tag sank, während Injection von Blut eines normalen Kaninchens keine wesentliche Herabsetzung zur Folge hatte. Doch ist die Zahl der Versuche zu klein, um ein abschliessendes Urtheil in dieser Frage fällen zu können.

Kussmaul<sup>2)</sup> war der Erste, welcher Versuche über den Einfluss von (pflanzlicher) Diastase auf die Zuckerausscheidung im Harn von Diabetikern anstellte. Bei intravenöser Injection des diastatischen Fermentes trat eine Verminderung der Zuckerausscheidung ein; kein Erfolg trat ein bei Injection in's Unterhautzellgewebe. Neuerdings will Lépine<sup>3)</sup> bei diabetischen Hunden und Menschen durch Injection pflanzlicher Diastase die Ausscheidung des Zuckers herabgesetzt haben. Eine befriedigende Deutung dieser Beobachtungen liegt bislang nicht vor. Vielleicht dürften die oben mitgetheilten Thatsachen geeignet sein, den Mechanismus der Wirkung zu erklären. Die Injection der Diastase ruft die Bildung des Antifermentes hervor, und dieses hindert nicht blos die eingeführte Diastase in ihrer Wirkung auf ihr Substrat, sondern auch die des Blutfermentes. Durch besondere, speciell auf diesen Punkt gerichtete Versuche habe ich übrigens festgestellt, dass sich die Bildung des GegenGiftes relativ schnell vollzieht. Injicirt man einem normalen Kaninchen eine Lösung von diastatischem Fermente (0,3 g), so zeigen die einige Zeit (10—20 Minuten) nach der Fermentinjection entnommenen Blutproben ein wesentlich geringeres

<sup>1)</sup> Das Versuchsthier nahm auch während zweiwöchentlicher Beobachtung an Körpergewicht nicht ab.

<sup>2)</sup> Kussmaul, Zur Lehre vom Diabetes mellitus; 3. Anh.: Einspritzung von Diastase in die Venen eines Diabetikers. Arch. f. klin. Med. XIV. 1874.

<sup>3)</sup> Lépine, a. a. O.

Zuckerbildungsvermögen als die vor der Injection entnommene Probe.

Versuch. 10. Juni 1892.

Normales Kaninchen, 1900 g, erhält subcutan 0,3 g Diastase in 3 ClNa.

1. Probe vom normalen Thiere	50	pCt. Zucker	aus 0,2 g Stärke in je 20 ccm 0,6 pCt. ClNa.
2. - 10 Min. nach der Injection	27,5	-	
3. - 20 - - - -	28	-	

Nun ist freilich das gebildete Antitoxin noch nicht fähig, die Giftwirkung des injicirten Fermentes vollständig zu paralysiren. Uebrigens bildet sich dieses „specifische“ Antifермент im Organismus keineswegs, wenn man einen ähnlichen pathologisch-anatomische Veränderungen machenden Stoff, das Ricin, injicirt; ebenso wenig tritt aber hiernach eine Steigerung der Fermentationskraft des Blutes ein.

Arthaud und Butte<sup>1)</sup> fanden, dass Injection von vegetabilischer Diastase keinen Diabetes macht und schliessen daraus, dass der nach Pankreas-exstirpation auftretende Diabetes nicht bedingt sein könne durch Anhäufung von diastatischem Fermente im Blute. Die Hinfälligkeit dieses Schlusses geht zur Genüge aus obigen Thatsachen hervor.

<sup>1)</sup> Compt. rend. de la soc. biolog. 42.