ARBEITEN

AUS DEM

KÖNIGLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

GEH. MED.-RAT PROF. DR. P. EHRLICH

Heft 3.

AUS DER EXPERIMENTELL-BIOLOGISCHEN ABTEILUNG:
Dr. H. Sachs.

I. H. Sachs und J. Bauer: Ueber das Zusammenwirken mehrerer Amboceptoren bei der Hämolyse und ihre Beziehungen zu den Komplementen.

II. R. Hecker: Beiträge zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente.

III. W. Rickmann: Beitrag zur biologischen Eiweißdifferenzierung.

IV. J. Bauer: Ueber die Spezifität der biologischen Eiweißdifferenzierung.

V. H. Sachs und J. Bauer: Ueber die Differenzierung des Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten.

Mit 1 lithogr. Tafel und 4 Abbildungen.

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1907

Uebersetzungsrecht vorbehalten.

Ueber das Zusammenwirken mehrerer Amboceptoren bei der Hämolyse und ihre Beziehungen zu den Komplementen.

Von

H. Sachs und J. Bauer.

Mit 1 lithogr. Tafel.

Noch immer ist in der Auffassung der cytotoxischen Wirkungen des Blutserums keine vollständige Einigung erzielt. Während wohl die meisten Autoren mit Ehrlich und Morgenroth die sogenannte Amboceptortheorie acceptiert haben, nach welcher die thermostabile Serumkomponente mit zwei haptophoren Gruppen ausgestattet ist, von denen die eine mit der Zelle, die andere mit dem labilen Bestandteil, dem Komplement, reagiert, sucht Bordet fortgesetzt mit viel Scharfsinn seine gegenteilige Hypothese zu verteidigen. Bekanntlich besteht die von Bordet vertretene Sensibilisierungstheorie darin, daß direkte Beziehungen zwischen Amboceptor und Komplement geleugnet werden und an deren Stelle die auf der Annahme molekularer Adhäsion basierende Vorstellung tritt, daß die Zelle durch den Amboceptor sensibilisiert, empfindlich wird gegenüber der Wirkung des Komplements. Da aber die Blutzellen, welche ja das gebräuchliche Testobjekt für Studien über den Mechanismus der Amboceptorwirkung darstellen, an und für sich nachweislich nicht mit dem Komplement reagieren, so fehlt die Möglichkeit, der Sensibilisierungstheorie eine experimentelle Stütze zu geben. Will man sie verteidigen, so kann dies nur auf indirektem Wege geschehen, indem man nachweist, daß Beziehungen zwischen Amboceptor und Komplement nicht existieren, und Bordets Beweisführung hat sich daher stets nur auf Einwände gegen solche Versuche, welche für die Amboceptortheorie sprechen, erstreckt. Es liegt nicht in unserer Absicht, hier das gesamte Tatsachenmaterial anzuführen, zumal der eine von uns erst kürzlich über den gegenwärtigen Stand der Frage an anderer Stelle berichtet hat[1]). Es genügt, darauf hinzuweisen, daß die Widerlegung von Deutungsversuchen, welche sinnfällig für die direkte Vereinigung von Amboceptor und Komplement zu

1) Sachs, H., Die Hämolysine und die cytotoxischen Sera. Lubarsch-Ostertags Ergebnisse d. Path., Bd. 11, 1907.

sprechen schienen, durchaus nicht hinreicht, um die Amboceptortheorie als eine irrige Konzeption hinzustellen. Wenn daher Bordet und Gay[1]) in einem letzthin unternommenen Versuch daraus, daß sie die Deutung eines Phänomens widerlegt zu haben glauben, das allerdings unter den positiven Beweisen für das Bestehen direkter Beziehungen zwischen Amboceptor und Komplement eine wichtige Rolle spielt, den Schluß ziehen, daß die Amboceptortheorie als irrig aufgegeben werden muß, so dürfte es schwer sein, eine derartige Folgerung als zwingend zu betrachten. Denn selbst wenn die von Bordet und Gay in dem einen Falle entgegengehaltenen Beweismomente als unwiderleglich acceptiert werden müßten, so hätten die Autoren doch nur erreicht, daß man auf einen direkten Beweis der Amboceptortheorie verzichten müßte, ohne daß es ihnen gelungen wäre, irgend welche Tatsachen anzuführen, die der Amboceptortheorie widersprächen. Wenn wir uns daher in den folgenden Ausführungen mit den von Bordet und Gay erhobenen Befunden eingehend beschäftigen, so geschieht dies nicht sowohl aus dem Grunde, weil wir es für nötig halten, zu der alten Streitfrage „Amboceptor oder substance sensibilisatrice"? noch einmal Stellung zu nehmen, als vielmehr deshalb, weil die von Bordet und Gay mitgeteilten Befunde, wenn auch ein Teil von ihnen nicht neu ist, so doch von großem Interesse erscheinen und besonders die von ihnen gegebene Deutung eigenartig genug ist, um eine weitere Analyse zu rechtfertigen.

I.

Der von Bordet und Gay behandelte Fall betrifft eine bereits von Ehrlich und Sachs[2]) beschriebene Kombination, nämlich die Hämolyse von Meerschweinchenblut durch die vereinte Wirkung von inaktiviertem Rinderserum und aktivem Pferdeserum. Ehrlich und Sachs hatten festgestellt, daß Meerschweinchenblutkörperchen, die durch das Gemisch von inaktivem Rinderserum und Pferdeserum gelöst werden, intakt bleiben, wenn sie zuerst mit inaktivem Rinderserum vorbehandelt und nach Entfernen des Rinderserums mit Pferdeserum digeriert werden. Die Komponente des Rinderserums war also von den Blutzellen nicht gebunden worden, und da anzunehmen war, daß diese Komponente den Amboceptor darstellt, so folgerten Ehrlich und Sachs mit Recht, daß in diesem Falle der Amboceptor von den roten Blutkörperchen nicht gebunden wird und erst nach der Vereinigung mit dem Komplement mit der Zelle reagiert. Mit der

1) Bordet, J. et Gay, F. P., Sur les relations des sensibilisatrices avec l'alexine. Annales de l'Institut Pasteur, T. 20, 1906, No. 6.

2) Ehrlich, P. und Sachs, H., Ueber den Mechanismus der Amboceptorenwirkung. Berlin. klin. Wochenschr., 1902, No. 21.

gleichen Kombination hat später Klein[1]) gearbeitet und dabei die Beobachtung gemacht, daß aktives Pferdeserum durch das Digerieren mit Meerschweinchenblut die komplettierende Fähigkeit für das System „Meerschweinchenblut—inaktives Rinderserum" verliert. Da das Pferdeserum dabei gleichzeitig seinen Agglutiningehalt eingebüßt hat, vertrat Klein die Auffassung, daß das Komplement durch den Prozeß der Deglutination zerstört wird. Gegen diese Deutung wandte sich Browning[2]), indem er zunächst feststellte, daß die Komplemente des Pferdeserums unbeeinflußt bleiben, wenn das Digerieren mit Meerschweinchenblut bei niedriger Temperatur (0°) geschieht, obwohl unter diesen Bedingungen für agglutinierende Wirkung und Agglutininbindung das Optimum gegeben ist. Die Ursache für den Komplementverlust durch Vorbehandeln des Pferdeserums bei höherer Temperatur sieht Browning darin begründet, daß das Pferdeserum Amboceptoren für Meerschweinchenblut enthält, durch deren Vermittelung die Komplemente bekanntlich nur bei höherer, nicht bei niedriger Temperatur gebunden werden. Daß das Pferdeserum Amboceptoren für Meerschweinchenblut enthält, haben bereits Morgenroth und Sachs[3]) durch den Nachweis, daß es im Verein mit aktivem Meerschweinchenserum die Hämolyse des Meerschweinchenbluts bedingt, gezeigt. Dagegen fanden sie das Pferdeserum nur in seltenen Fällen, und auch dann nur in hohen Dosen geeignet, Meerschweinchenblut zu lösen. Es fehlt also im Pferdeserum meistens das für den eigenen auf Meerschweinchenblut wirkenden Amboceptor geeignete „dominante" Komplement. Da nun, wie bekannt, ein Amboceptor nach seiner Vereinigung mit der Zelle ein aktives Serum seiner sämtlichen Komplementfunktionen berauben kann und nach Ehrlich und Sachs[4]) unter geeigneten Bedingungen auch „nicht dominante" Komplemente gebunden werden können, während das „dominante" Komplement in Lösung bleibt, so bot die von Browning gegebene Erklärung keine Schwierigkeit. Browning vertritt nämlich die Auffassung, daß das Komplement des Pferdeserums, welches für den Rinderamboceptor dominant, für den Pferdeamboceptor aber nicht dominant ist, auch durch Vermittelung des eigenen Amboceptors durch das Meerschweinchenblut absorbiert wird. Der von Klein beschriebene Komplementverlust war dadurch auf Grund der Amboceptortheorie hinreichend erklärt, und Browning konnte noch den weiteren Nachweis

1) Klein, A., Ueber die Beeinflussung des hämolytischen Komplements durch Agglutination und Präzipitation. Wien. klin. Wochenschr., 1905, No. 48.

2) Browning, C. H., Agglutination und Komplementschwund. Wien. klin. Wochenschr., 1906, No. 15.

3) Morgenroth, J. und Sachs, H., Ueber die Komplettierbarkeit der Amboceptoren. Berlin. klin. Wochenschr., 1902, No. 27.

4) Ehrlich, P. und Sachs, H., Ueber die Vielheit der Komplemente des Serums. Berl. klin. Wochenschr., 1902, No. 14 u. 15.

erbringen, daß es gelingt, auch bei anderen Blutarten, welche an und für sich das Pferdeserum nicht der Komplemente berauben, durch Einschaltung eines spezifischen Amboceptors die gleichen Verhältnisse zu reproduzieren. Während nämlich Rinderblut keinen Einfluß auf Pferdeserum ausübt, bindet es das für inaktives Rinderserum geeignete Pferdekomplement, wenn es mit einem spezifischen, beim Kaninchen gewonnenen Amboceptor vorbehandelt ist, ohne daß das derart präparierte Rinderblut durch Pferdeserum gelöst wird. Die Hämolyse des Meerschweinchenblutes durch die kombinierte Wirkung von inaktivem Rinderserum und aktivem Pferdeserum ist also nach Browning folgendermaßen aufzufassen: Der Rinderamboceptor hat eine höhere Avidität zum Pferdekomplement, als der freie Pferdeamboceptor. Werden daher Rinderserum und Pferdeserum gleichzeitg gemischt, so tritt Hämolyse ein. Wird aber das Pferdeserum zuerst mit Meerschweinchenblut digeriert, so vereinigt sich der Pferdeamboceptor mit der Blutzelle und durch die nunmehr erfolgende, die komplementophile Gruppe betreffende Aviditätssteigerung wird auch das Komplement an den Pferdeamboceptor gebunden. Diese Bindung wird nun durch die sekundäre Verfestigung irreversibel und kann auch durch den nachträglich zugesetzten, an und für sich avideren Rinderamboceptor nicht mehr gesprengt werden (cf. Figuren 1 und 2 der beigegebenen Tafel).

Bordet und Gay, denen die Arbeit von Browning offenbar noch nicht bekannt war, berichten nun über Versuchsresultate, von denen ein großer Teil bereits von Klein und Browning erhalten war. Wesentlich neu aber ist folgender von Bordet und Gay mitgeteilter Versuch: Amboceptorbeladene Rinderblutkörperchen lösen sich nicht in Pferdeserum, wohl aber in einem Gemisch von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum. Hier kann — so folgern die Autoren mit Recht — das Rinderserum nicht als Amboceptor fungieren, sondern muß eine zur Hämolyse notwendige Komponente darstellen, die weder mit dem Amboceptor, noch mit dem Komplement identisch ist. In analoger Weise soll dann auch in der Kombination: Meerschweinchenblut—inaktives Rinderserum—Pferdeserum das Rinderserum nicht als Amboceptor wirken, sondern als ein dritter Bestandteil die Hämolyse bedingen. Bordet und Gay vertreten also die Auffassung, daß im Pferdeserum Amboceptor und Komplement enthalten, aber nicht imstande sind, hämolytisch zu wirken, wenn nicht die dritte im Rinderserum befindliche Komponente in Aktion tritt. Dieser rein hypothetische Bestandteil des Rinderserums wird von den Autoren als „colloide de boeuf“ bezeichnet. Das Kolloid hat nach Bordet und Gay folgende Eigenschaften: es ist thermischen Einflüssen (56°) und der Aufbewahrung gegenüber stabil, wird von den Blutzellen erst gebunden, wenn letztere mit Amboceptor und Komplement beladen sind, und bewirkt dann Agglutination und Hämolyse. Bordet und Gay suppo-

nieren also hier einen ganz neuartigen Stoff im Rinderserum, der bei der Hämolyse eine so ausschlaggebende Rolle spielen soll, für dessen Wirkung aber bisher jedes Analogon fehlt. Die Deutung, welche die Autoren dem von Ehrlich und Sachs beschriebenen Phänomen gegeben haben, ist allerdings eine Hypothese, die jeglichen Beweises entbehrt. Denn wenn auch die Rolle des Rinderserums bei der Hämolyse des amboceptorbeladenen Rinderbluts durch Pferdeserum nicht als Amboceptorwirkung aufgefaßt werden kann, so berechtigt doch nichts dazu, auf Grund eines reinen Analogieschlusses auch im Falle der Hämolyse des Meerschweinchenbluts durch inaktives Rinderserum und Pferdeserum dem Rinderserum den Amboceptorcharakter abzusprechen. Zum mindesten müßte der Nachweis gefordert werden, daß in der Tat Meerschweinchenblut, welches mit Pferdeserum digeriert ist, also im Bordet-Gayschen Sinne Amboceptor und Komplement gebunden hat, nunmehr bei Zusatz von inaktivem Rinderserum der Hämolyse anheimfällt. Daß dies nicht der Fall ist, haben bereits Klein und Browning gezeigt, und letzterer hat für dieses Verhalten eine mit der Amboceptortheorie im besten Einklang stehende Erklärung gegeben. Auch Bordet und Gay ist dieses Experimentum crucis für ihre Theorie nicht geglückt. Sie schließen allerdings daraus, daß Meerschweinchenblutkörperchen, die mit Pferdeserum vorbehandelt sind, durch inaktives Rinderserum stark agglutiniert werden, auf eine Bindung des „Kolloides“. Da aber Hämolyse und Agglutination nicht als Folgen ein und derselben Substanz betrachtet werden können, so ist der von den Autoren gezogene Schluß auf den hämolytischen Bestandteil des Rinderserums nicht berechtigt. Bordet und Gay suchen allerdings das Mißglücken des für sie so wichtigen Versuches dadurch zu erklären, daß sie in dem Ausbleiben der Hämolyse einen durch die starke Agglutination bedingten antagonistischen Effekt erblicken; es lösten sich nämlich in ihren Versuchen die derart agglutinierten Blutkörperchen auch dann nicht, wenn sie in einem frischen Gemisch von inaktivem Rinderserum und Pferdeserum aufgeschwemmt wurden. Man vermißt aber einen Versuch, der die Frage mit Sicherheit zur Entscheidung bringen müßte. Wenn nämlich die mit Pferdeserum digerierten Meerschweinchenblutzellen die hämolytische Komponente des Rinderserums absorbieren, so müßte letzteres die Fähigkeit, Meerschweinchenblut im Verein mit Pferdeserum zu lösen, verloren haben. Allerdings geben Bordet und Gay einmal an, daß inaktives Rinderserum, nach der Verbehandlung mit amboceptorbeladenem Rinderblut, das mit Pferdeserum digeriert war, Meerschweinchenblut im Verein mit Pferdeserum schwächer und langsamer löst, als natives Rinderserum. Hätte man schon in diesem Falle nach den Anschauungen von Bordet und Gay eine vollständige Erschöpfung des Rinderserums erwarten müssen, so fehlt eben der schon erwähnte, offensichtlich prinzipiell wichtige, Versuch vollständig.

II.

Wir suchten nun bei unseren Untersuchungen zunächst diese Lücke auszufüllen. Als Blutmenge diente 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut, das natürlich serumfrei gewaschen war. Das Rinderserum war durch $^1/_2$-stündiges Erhitzen auf 53—54° inaktiviert. In allen Versuchen wurde die Flüssigkeitsmenge durch physiologische Kochsalzlösung auf gleiches Volumen gebracht, das mindestens 2,0 ccm, höchstens 2,3 bis 2,5 ccm betrug. Die Einstellung des Pferdeserums zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1.

Mengen des aktiven Pferdeserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut durch Pferdeserum	
	a bei Zusatz von 0,1 ccm inaktivierten Rinderserums	b ohne weiteren Zusatz
0,5	komplett	0
0,35	„	
0,25	fast komplett	
0,15	mäßig	
0,1	wenig	
0,05	Spürchen	
0	0	

Nun wurde je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut mit je 0,35 ccm Pferdeserum, der sicher aktivierenden Menge eine Stunde bei 37° digeriert. Sodann wurde zentrifugiert. Eine Prüfung der Abgüsse zeigte, daß das wirksame Prinzip von den Blutkörperchen gebunden war (s. Tabelle 2).

Tabelle 2.

Mengen des inaktivierten Rinderserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut durch inaktiviertes Rinderserum + 0,35 ccm Pferdeserum	
	a natives Pferdeserum	b mit Meerschweinchenblut digeriertes Pferdeserum
0,25	komplett	Spur
0,15	„	Spürchen
0,1	„	0
0,05	mäßig	0
0,025	Spur	0
0	0	0

Die mit Pferdeserum vorbehandelten Blutsedimente wurden nunmehr mit absteigenden Mengen inaktiven Rinderserums 1 Stunde lang bei 37° digeriert. Dabei trat keine Hämolyse ein. Die Röhrchen wurden sodann zentrifugiert und die Abgüsse mit je 0,35 ccm Pferdeserum und den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut digeriert (Reihe A).

In einer Kontrollreihe B wurde das Sediment von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut mit 0,35 ccm Pferdeserum und den Abgüssen von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut, das, ohne mit Pferdeserum vor-

behandelt zu sein, eine Stunde lang mit absteigenden Mengen inaktiven Rinderserums digeriert war, gemischt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3.

Mengen des inaktiven Rinderserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut durch 0,35 ccm Pferdeserum und inaktives Rinderserum	
	A Rinderserum mit Blut vorbehandelt, das zuvor mit Pferdeserum digeriert war	B Rinderserum mit nativem Blut vorbehandelt
0,25	komplett	komplett
0,15	„	„
0,1	fast komplett	fast komplett
0,05	mäßig	mäßig
0,025	Spur	Spur
0	0	0

Die Tabelle zeigt deutlich, daß das Meerschweinchenblut auch dann nicht das wirksame Prinzip des Rinderserums absorbiert, wenn es zuvor mit Pferdeserum digeriert wurde. Dieses Versuchsergebnis, das zu wiederholten Malen bestätigt wurde, zeigt also, daß die Annahme von Bordet und Gay, nach welcher das von ihnen als Träger der hämolytischen Wirkung supponierte Kolloid des Rinderserums von den mit Pferdeserum digerierten Blutzellen gebunden wird, irrig ist. Es sei übrigens bemerkt, daß auch wir eine starke Agglutination beobachteten, als wir zu dem mit Pferdeserum vorbehandelten Meerschweinchenblut Rinderserum zufügten. Trotzdem fanden wir aber stets das abzentrifugierte Rinderserum in vollem Besitz seiner die Hämolyse des Meerschweinchenblutes durch Pferdeserum vermittelnden Fähigkeit.

Damit soll natürlich nicht bestritten werden, daß die Angaben von Bordet und Gay, nach denen Meerschweinchenblut nach der successiven Vorbehandlung mit Pferdeserum und inaktivem Rinderserum gegenüber der hämolytischen Kraft des wirksamen Gemisches resistent ist, zu Recht bestehen können. Auch wir verfügen über derartige Beobachtungen, haben allerdings das Ausbleiben der Hämolyse nur dann wahrgenommen, wenn die Meerschweinchenblutkörperchen mit einem Ueberschuß von Pferdeserum vorbehandelt waren. Dabei war es gleichgültig, ob die Vorbehandlung nur mit Pferdeserum geschah oder ob dieser noch ein Digerieren in inaktivem Rinderserum folgte. Charakteristisch aber ist, daß auch dann, wenn die Meerschweinchenblutkörperchen resistent geworden waren, die Absorption der hämolytischen Komponente des Rinderserums ausblieb.

Für den folgenden Versuch, welcher diese Verhältnisse illustriert, wurden zunächst die minimalen Mengen des aktiven Pferdeserums und

inaktiven Rinderserums ermittelt, welche vereint gerade noch komplette Hämolyse bewirkten; dieselben betrugen je 0,25 ccm.

Es wurden zwei gleiche Reihen angesetzt: je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut und absteigende Mengen aktiven Pferdeserums. Nach 1-stündigem Verweilen bei 37° wird zentrifugiert und in folgender Weise verfahren:

A. Die Sedimente der Reihe A werden mit je 0,25 ccm aktiven Pferdeserums und inaktiven Rinderserums (mit Kochsalzlösung auf ein Gesamtvolumen von ca. 2,25 ccm gebracht) digeriert.

B. Die Sedimente von Reihe B werden nochmals mit je 0,25 ccm inaktiven Rinderserums (und Kochsalzlösung) 1 Stunde bei 37° digeriert, sodann wird abzentrifugiert und zu den nunmehr erhaltenen Sedimenten je 0,25 ccm Pferdeserum + 0,25 ccm inaktiven Rinderserums gefügt.

C. Die nach dem Zentrifugieren bei B erhaltenen Abgüsse werden mit Meerschweinchenblut und je 0,25 ccm Pferdeserum gemischt (Gesamtvolumen ca. 2,25 ccm).

Das Ergebnis zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4.

Mengen des zur Vorbehandlung benutzten Pferdeserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut		
	A	B	C
1,0	Spur	Spur	komplett
0,5	mäßig	mäßig	„
0,25	komplett	komplett	„
0,15	„	„	„
0,1	„	„	„
0	„	„	„

Die Tabelle zeigt, daß bei der Vorbehandlung des Meerschweinchenblutes mit der zur kompletten Hämolyse ausreichenden Pferdeserummenge (0,25 ccm) die Blutkörperchen nicht ihre normale Empfindlichkeit verlieren, daß dagegen ein Ueberschuß von Pferdeserum, gleichgültig aber, ob nachträglich noch Rinderserum eingewirkt hat oder nicht, eine Resistenz der Blutzellen gegenüber dem sonst hämolytischen Gemisch bedingt. Aus Kolumne C der Tabelle ergibt sich aber gleichzeitig, daß auch in diesem Falle das Rinderserum nichts von seiner Fähigkeit, im Verein mit Pferdeserum hämolytisch zu wirken, eingebüßt hat. Ueber die Ursache der durch die Vorbehandlung mit Pferdeserum allein oder mit Pferdeserum und Rinderserum entstandenen Resistenz des Meerschweinchenblutes kann man nur Vermutungen hegen. Es ist sehr wohl möglich, daß es sich um eine antagonistische Wirkung der Agglutination gegenüber der Hämolyse handelt, wie es Bordet und Gay annehmen. Man könnte vielleicht auch daran denken, daß Pferde- und Rinderamboceptor an denselben Receptoren der Blutzellen angreifen und daher durch die Vorbehandlung mit einem Ueberschuß

von Pferdeserum dem Rinderamboceptor der Zugang gewehrt ist. Wie dem auch sei, jedenfalls ergibt sich aus unseren Versuchen, daß die bei der Hämolyse wirksame Komponente des Rinderserums nicht gebunden wird, wenn die Meerschweinchenblutkörperchen vorher mit aktivem Pferdeserum digeriert waren. Die Annahme von Bordet und Gay, daß das Rinderserum die Hämolyse durch ein „Kolloid“ bewirkt, das erst nach Verankerung von Amboceptor und Komplement an die Meerschweinchenblutzellen in Aktion tritt, muß daher aufgegeben werden. Dagegen erklärt sich die schon durch Klein beobachtete Tatsache, daß Meerschweinchenblut nach der Vorbehandlung mit Pferdeserum nicht mehr durch inaktives Rinderserum gelöst wird, zwanglos in dem von Browning gedeuteten Sinne. Das Komplement des Pferdeserums ist eben durch Vermittelung des Pferdeamboceptors, ohne für diesen dominant zu sein, bereits an die Zelle gebunden und daher für den Rinderamboceptor nicht mehr disponibel. Die Figuren 1 und 2 der beigegebenen Tafel sollen die Verhältnisse veranschaulichen. Es sei übrigens bemerkt, daß in diesem Falle die Hämolyse weder durch einen Ueberschuß von Rinderserum zu erzielen ist, noch dann eintritt, wenn die Vorbehandlung des Meerschweinchenblutes mit einer minimalen, komplett lösenden Dosis Pferdeserums erfolgte. Im Gegensatz dazu ist die Hämolyse des vorher mit Pferdeserum digerierten Blutes bei Zusatz von Rinderserum + Pferdeserum nur dann gehemmt, wenn die Vorbehandlung mit einer großen Pferdeserummenge geschah. Daraus ergibt sich schon, daß die von Bordet und Gay auf eine einheitliche Ursache bezogenen Vorgänge der Resistenz gegenüber Rinderserum allein und gegenüber der kombinierten Wirkung von Rinderserum und Pferdeserum durchaus getrennt betrachtet werden müssen. Im ersten Falle fehlt das Komplement und die Hemmung ist daher eine absolute, im zweiten Falle ist Komplement vorhanden und das Ausbleiben der Hämolyse ist hier eine sekundäre Folgeerscheinung, die von quantitativen Bedingungen beherrscht wird. Nach alledem scheint uns für den von Ehrlich und Sachs beschriebenen Fall der Hämolyse des Meerschweinchenblutes durch inaktiviertes Rinderserum und Pferdeserum nicht die geringste Veranlassung vorzuliegen, die von diesen Autoren gegebene Deutung, der zufolge der Amboceptor im Rinderserum enthalten ist, aufzugeben. Für die Annahme einer dritten, an der Hämolyse beteiligten Komponente fehlt für diese Kombination die Notwendigkeit.

Trotzdem suchten wir noch andere Belege dafür zu erbringen, daß die beiden Komponenten des Pferdeserums und inaktiven Rinderserums in direkten Beziehungen zu einander stehen, resp. daß der im Pferdeserum enthaltene Amboceptor an der Hämolyse nicht beteiligt ist. Dies

ist uns auch in mehrfacher Hinsicht gelungen. Wenn sich Rinderamboceptor und Pferdekomplement erst zum wirksamen Hämolysin vereinigen müssen, bevor sie zu den Zellreceptoren in Beziehung treten, so war anzunehmen, daß die Hämolyse rascher erfolgt, wenn Pferdeserum und Rinderserum vor dem Blutzusatz eine Zeitlang digeriert waren, als wenn alle drei Komponenten auf einmal gemischt werden. Wir verfuhren daher in folgender Weise:

Es wurden zwei Reihen angesetzt:

Reihe A. Absteigende Mengen Pferdeserums (Gesamtvolumen 0,75 ccm) wurden 1 Stunde bei 37° gehalten, sodann erfolgte Zusatz von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut + 0,5 ccm inaktives Rinderserum.

Reihe B. Absteigende Mengen Pferdeserums wurden mit je 0,5 ccm inaktiven Rinderserums 1 Stunde bei 37° digeriert, darauf Zusatz von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut.

Die eingetretene Hämolyse wurde nach 5, 15, 30 Minuten und nach 2 Stunden notiert. Das Ergebnis zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5.

Mengen des Pferdeserums ccm	Eingetretene Hämolyse							
	Reihe A				Reihe B			
	5 Min.	15 Min.	30 Min.	2 Std.	5 Min.	15 Min.	30 Min.	2 Std.
0,75	0	0	stark	komplett	stark	komplett	komplett	komplett
0,5	0	0	mäßig	„	„	fast kompl.	„	„
0,35	0	0	wenig	stark	0	mäßig	fast kompl.	„
0,25	0	0	0	wenig	0	0	stark	stark
0,15	0	0	0	Spur	0	0	wenig	wenig
0,1	0	0	0	Spürchen	0	0	0	Spur
0,05	0	0	0	0	0	0	0	Spürchen
0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Hämolyse in der Tat erheblich rascher in Erscheinung tritt, wenn Pferdeserum und inaktives Rinderserum zunächst eine Zeitlang zusammen gewesen waren. Die Reaktion zwischen Rinderamboceptor und Pferdekomplement ist dann eben bereits erfolgt, und dadurch ist die Inkubationszeit, welche der Hämolyse vorangeht, eine geringere geworden. Uebrigens kann, wie die Tabelle zeigt, auch der hämolytische Endeffekt ein etwas größerer sein, wenn Amboceptor mit Komplement vereint digeriert worden sind. Offenbar ist dieser Umstand darauf zurückzuführen, daß das Pferdekomplement durch den 1-stündigen Aufenthalt bei 37° bereits eine geringe Abschwächung erfährt, während die aus Rinderamboceptor und Pferdekomplement resultierende Verbindung resistenter ist. Es braucht nicht besonders erwähnt zu werden, daß diese Befunde mit der Kolloidtheorie unvereinbar sind.

Man könnte nun die Beteiligung des Rinderserums als Amboceptor direkt erweisen, wenn es gelänge, die Amboceptoren des Pferdeserums zu entfernen. Bekanntlich besitzt die Immunitätsforschung eine durch

Ehrlich und Morgenroth[1]) aufgefundene Methode, um Amboceptor und Komplement eines aktiven Serums zu trennen. Digeriert man nämlich rote Blutkörperchen bei 0° mit aktivem Serum, so werden nur die Amboceptoren gebunden, die Komplemente bleiben in der Zwischenflüssigkeit erhalten. Bei den normalen Hämolysinen ist allerdings eine Schwierigkeit darin gelegen, daß auch die Bindung des Amboceptors bei 0° in den meisten Fällen nicht vollständig, sondern nur partiell erfolgt. Auch die Amboceptoren des Pferdeserums werden, wie sich bereits aus der Arbeit von Browning ergibt, nur zu einem gewissen, wenn auch nicht unerheblichen, Teile bei 0° von den Meerschweinchenblutzellen gebunden. Charakteristisch aber ist, daß das Pferdeserum nach der Vorbehandlung mit Meerschweinchenblut bei 0° seine Fähigkeit im Verein mit inaktivem Rinderserum hämolytisch zu wirken, in vollem oder fast ungeschwächtem Maße bewahrt. Nach der von Bordet und Gay vertretenen Anschauung müßte man erwarten, daß dies, wenn überhaupt eine irgendwie wesentliche Amboceptormenge gebunden worden ist, nicht der Fall ist. Denn diese Autoren glauben ja, daß das Pferdeserum als Amboceptor an der Hämolyse beteiligt ist, und es müßte sich danach eine Verarmung des Pferdeserums an Amboceptor in einer Reduktion der hämolytischen Kraft dokumentieren. Man könnte nun allerdings einwenden, daß der Amboceptor im Pferdeserum im Ueberschuß vorhanden und es daher irrelevant ist, ob ein Teil fehlt oder nicht. Dieser Einwand kann aber auf seine Beweiskraft experimentell geprüft werden. Wenn das bei 0° mit Meerschweinchenblut digerierte Pferdeserum noch genügend Amboceptor enthält, um im Sinne von Bordet und Gay, mit inaktivem Rinderserum vereint, die volle hämolytische Wirksamkeit zu entfalten, so müßte es bei einer nachfolgenden Behandlung mit Meerschweinchenblut bei 37° seine die Hämolyse vermittelnde Fähigkeit in demselben oder sogar in höherem Grade einbüßen, als natives Pferdeserum. Das Experiment zeigt, daß das Gegenteil der Fall ist. Die einschlägigen Verhältnisse ergeben sich zwar bereits aus der Tabelle 2 der Browningschen Arbeit, wir lassen aber doch noch einen analogen Versuch folgen.

Es werden drei Reihen angesetzt, welche je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut und absteigende Mengen Pferdeserums, das mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt war, enthalten. Das Gesamtvolumen beträgt überall 2 ccm.

Die Röhrchen der Reihe A bleiben $1^1/_2$ Stunden bei 37° stehen, sodann wird zentrifugiert. Die erhaltenen Abgüsse werden mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut + 0,3 ccm inaktiven Rinderserums digeriert.

Reihe B. Nach 2-stündigem Verweilen bei 0° wird zentrifugiert. Die Abgüsse werden wie bei A behandelt.

1) Ehrlich, P. und Morgenroth, J., Zur Theorie der Lysinwirkung. Berliner klin. Wochenschr., 1899.

Reihe C. Nach 2-stündigem Aufenthalt bei 0° wird zentrifugiert. Die Abgüsse werden mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut 2 Stunden bei 37° digeriert. Die nunmehr durch Zentrifugieren erhaltenen Abgüsse werden mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut + 0,3 ccm inaktiven Rinderserums digeriert. Das Ergebnis zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6.

Mengen des halbverdünnten Pferdeserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut durch 0,3 ccm inaktiven Rinderserums und Pferdeserum			
	nativ	vorbehandelt mit Meerschweinchenblut		
		A bei 37°	B bei 0°	C bei 0° + 37°
0,5	komplett	fast komplett	komplett	komplett
0,25	„	stark	„	„
0,15	„	mäßig	„	fast komplett
0,1	„	Spur	stark	mäßig
0,05	stark	Spürchen	mäßig	wenig
0,025	mäßig	0	wenig	Spur
0	0	0	0	0

Das bei 0° vorbehandelte Pferdeserum hat also durch nachfolgendes Digerieren bei 37° nur wenig von seiner die Hämolyse vermittelnden Fähigkeit eingebüßt, jedenfalls ist die Abnahme erheblich geringer, als bei direkter Vorbehandlung des nativen Serum bei 37°. Dies ist um so charakteristischer, als man in vorstehender Tabelle schon nach dem Digerieren bei 0° eine geringfügige Abnahme der hämolytischen Kraft beobachten kann, die wohl auf ein nicht ganz vollständiges Gewinnen der Abgüsse zu beziehen ist. Das Resultat steht durchaus im Widerspruch zu der Kolloidtheorie. Denn wenn das Pferdeserum zugleich als Amboceptor und Komplement wirkt, das Rinderserum aber nur im Bordet-Gayschen Sinne als „Kolloid" an der Hämolyse beteiligt ist, so müßte die successive Vorbehandlung bei 0° und 37° eine größere Verarmung an wirksamem Prinzip herbeiführen, als das alleinige Digerieren bei 37°. Das gegensätzliche Versuchsergebnis steht hingegen mit der von Ehrlich und Sachs vertretenen Auffassung in bestem Einklang und war auf Grund derselben sogar vorauszusehen. Das Pferdeserum liefert eben nur das Komplement. Durch die Vorbehandlung bei 0° wird ein Teil der Amboceptoren entfernt, so daß das nunmehr erhaltene Serum komplementreich, aber amboceptorarm ist. Wenn man nun dieses Serum noch einmal bei 37° mit Meerschweinchenblut digeriert, so wird durch den noch vorhandenen Amboceptorgehalt eine geringe Komplementmenge entfernt. Der Komplementverlust muß aber unbedingt hinter demjenigen zurückbleiben, der zu beobachten ist, wenn das noch amboceptorreiche native Serum mit Meerschweinchenblut digeriert wird. Die experimentelle Analyse zeigt somit, daß die

von Bordet und Gay gegebene Deutung mit den Tatsachen nicht in Einklang gebracht werden kann, und sie bestätigt aufs neue, daß im vorliegenden Fall das Rinderserum als Amboceptor mit dem Pferdeserum als Komplement zusammenwirkt.

III.

Unsere weiteren Bestrebungen mußten naturgemäß auf den von Bordet und Gay mitgeteilten Versuch gerichtet sein, der in ihrer Arbeit ein so wichtiges Beweisglied bildet. Es handelt sich um den eigenartigen Befund, daß Rinderblut, mit spezifischem Amboceptor beladen, sich in Pferdeserum nicht löst, dagegen in einem Gemisch von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum der Hämolyse anheimfällt. In der Tat besteht eine gewisse formale Analogie zu der Hämolyse des Meerschweinchenbluts durch das gleiche Gemisch, und da bei der Hämolyse des amboceptorbeladenen Rinderbluts unmöglich das Rinderserum als Amboceptor beteiligt sein kann, glaubten Bordet und Gay schließen zu müssen, daß auch bei der Hämolyse des Meerschweinchenbluts das Rinderserum nicht als Amboceptor wirkt. Daß dieser Analogieschluß nicht zutreffend ist, haben die vorangehenden Ausführungen gezeigt. Es schien uns indessen von großem Interesse zu sein, in den eigenartigen Wirkungsmechanismus bei der Kombination mit Rinderblut etwas tiefer einzudringen. Stellt doch die von Bordet und Gay gegebene Deutung, nach welcher das Rinderserum als „Kolloid" die bereits mit Amboceptor und Komplement präparierten Blutzellen erst löst, eine Annahme dar, die eigens für den vorliegenden Fall konstruiert ist und eine ganz neue Art der Serumhämolyse bedeutet. Daher glaubten wir, doch versuchen zu müssen, die beobachteten Erscheinungen einer Erklärung auf Grund der bisher bekannten Vorgänge zugänglich zu machen.

Wir benutzten zu unseren Versuchen ein vom Kaninchen durch Vorbehandlung mit Rinderblut gewonnenes, inaktiviertes Immunserum, das 1 ccm 5-proz. Rinderblut bei Zusatz von 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement in der Menge von 0,0005 ccm gerade noch komplett löste. Um die Hämolyse des Rinderbluts durch das Gemisch „Pferdeserum—inaktives Rinderserum" zu bewirken, war eine Amboceptormenge von 0,05 ccm erforderlich. Wenn daher in folgendem kurz von präpariertem Rinderblut gesprochen wird, so ist zu verstehen, daß 1 ccm 5-proz. Rinderblut mit 0,05 ccm Amboceptor vorbehandelt wurde. Geringere Amboceptormengen reichten nicht mehr zur vollständigen Hämolyse aus, größere waren zu vermeiden, weil dann Pferdeserum an und für sich bereits in kleinen Mengen Hämolyse bewirkte. Ueberhaupt müssen wir nach unseren Erfahrungen berichten, daß Pferdeserum auch das in der beschriebenen Weise präparierte Rinderblut in

zahlreichen Fällen bei Verwendung größerer Mengen in mehr oder weniger hohem Grade bereits an und für sich löst, und es ist oft unmöglich, eine Pferdeserumdosis zu bestimmen, die an und für sich unwirksam ist, im Verein mit inaktivem Rinderserum aber komplette Hämolyse bedingt. Darin ist bereits ein Unterschied gegenüber der Hämolyse des Meerschweinchenbluts gegeben, da im letzteren Falle das Pferdeserum sich stets unwirksam oder doch nur sehr geringgradig hämolytisch erwies. Wir haben aber noch weitere markante Differenzen aufgefunden, die von vornherein gegen die Identifizierung des Wirkungsmechanismus in den beiden von Bordet und Gay analogisierten Fällen sprechen. Zunächst zeigte es sich nämlich, daß ein Ueberschuß von Rinderserum die Hämolyse des präparierten Rinderbluts durch Pferdeserum und Rinderserum hemmt, während bei der Hämolyse des Meerschweinchenbluts der Grad der Hämolyse von der Rinderserummenge unabhängig ist. Es sei gestattet, einen solchen Versuch anzuführen.

Es wurden 2 Reihen angesetzt:

Reihe A: 1 ccm präpariertes 5-proz. Rinderblut + absteigende Mengen inaktiven Rinderserums + 0,15 ccm Pferdeserum (minimale Menge).

Reihe B: 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut + absteigende Mengen inaktiven Rinderserums + 0,25 ccm Pferdeserum (minimale Menge).

Die eingetretene Hämolyse zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7.

Mengen des inaktiven Rinderserums ccm	Reihe A	Reihe B
1,0	wenig	komplett
0,5	mäßig	„
0,25	fast komplett	„
0,1	komplett	„
0,05	mäßig	mäßig
0,025	wenig	wenig
0,01	Spur	Spur
0	0	0

Da sich also das Rinderserum in den beiden Fällen so verschiedenartig verhält, kann seine Wirkung auch nicht auf ein und dieselbe Ursache bezogen werden. Nach der Anschauung von Bordet und Gay ist aber das Rinderserum in beiden Fällen weder als Amboceptor, noch als Komplement beteiligt, wirkt vielmehr als Kolloid in dem erörterten Sinne. Während daher das differente Verhalten auf Grund dieser Annahme nicht zu verstehen ist, erklärt es sich ohne weiteres von unserem Standpunkte aus, indem eben bei der Hämolyse des Meerschweinchenbluts das Rinderserum den Amboceptor darstellt, bei der Hämolyse des präparierten Rinderbluts aber in anderer Weise wirken muß.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Phänomenen besteht in folgendem. Wenn man präpariertes Rinderblut mit Pferdeserum und inaktivem Rinderserum successive digeriert, so bleibt ebenso, wie bei analoger Vorbehandlung des Meerschweinchenbluts, die Hämolyse aus. Während aber Meerschweinchenblut, wenn eine große Pferdeserummenge eingewirkt hat, auch gegenüber der kombinierten Wirkung von Pferdeserum und inaktivem Rinderserum sich resistent erweist, ist dies beim präparierten Rinderblut nicht der Fall. Bevor wir die einschlägigen Verhältnisse näher schildern, seien zuvor einige allgemeine Angaben über das Verhalten der Komponenten bei der Hämolyse des präparierten Rinderbluts mitgeteilt. Was zunächst das inaktive Rinderserum anlangt, so läßt es sich weder durch Schweineserum noch durch Kaninchenserum ersetzen. Auch inaktives Hammelserum [1]) erwies sich ungeeignet, dagegen wirkte inaktives Ziegenserum im Verein mit Pferdeserum in analoger, wenn auch schwächerer Weise, wie Rinderserum [2]). Auch das Verhalten der im Pferdeserum vorhandenen Komponente gegenüber thermischen Einflüssen wurde geprüft, und es zeigte sich, daß das Rinderserum nach $^1/_2$-stündigem Erhitzen bei 55° wirksam ist, dagegen durch $^1/_2$-stündiges Erhitzen bei 65° die Fähigkeit, im Verein mit Pferdeserum präpariertes Rinderblut zu lösen, verliert. Was nun die Beziehungen der einzelnen Komponenten zu den präparierten Blutzellen anlangt, so wird das aktive Pferdeserum durch Vorbehandeln mit präpariertem Blut seiner wirksamen Komponente beraubt, und zwar verliert es sowohl in Bestätigung der Angaben Bordets und Gays die Fähigkeit, präpariertes Rinderblut, als auch, wie schon Browning gezeigt hat, diejenige, Meerschweinchenblut im Verein mit inaktivem Rinderserum zu lösen. Diese Uebereinstimmung ist zu erwarten, da ja das Pferdeserum bei beiden Kombinationen als Komplement wirkt und beiderseits ein geeigneter Amboceptor vorhanden ist, um die Absorption des Komplements zu vermitteln, ohne daß dabei Hämolyse eintritt. In beiden Kombinationen besteht aber auch insofern Kongruenz, als auch das präparierte Rinderblut nach der Vorbehandlung mit Pferdeserum trotz erfolgter Bindung des Pferdekomplements nicht bei Zusatz von inaktivem Rinderserum gelöst wird. Dagegen löst sich derart vorbehandeltes Blut in einem Gemisch von Pferdeserum und inaktivem Rinderserum, das aus minimalen Mengen der beiden Komponenten besteht, ohne weiteres. Wir lassen einen entsprechenden Versuch folgen.

1) Aktives Hammelserum löst an und für sich in geringem Grade präpariertes Rinderblut, wird aber durch Zusatz von Pferdeserum verstärkt.

2) Es sei übrigens bemerkt, daß auch bei der Hämolyse des Meerschweinchenbluts das Rinderserum durch Ziegenserum ersetzt werden kann. Der Wirkungsmechanismus ist in beiden Fällen derselbe.

Es werden zwei gleiche Versuchsreihen angestellt. Jede Reihe enthält je 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut und absteigende Mengen aktiven Pferdeserums (Gesamtvolumen 2 ccm). Nach 2-stündigem Verweilen bei 37° wird abzentrifugiert. Die zwei ersten, die größten Pferdeserummengen enthaltenden Blutproben erwiesen sich spurweise gelöst.

A. Die Abgüsse werden mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. präparierten Rinderblut + 0,1 ccm inaktiven Rinderserums (minimale, zur kompletten Hämolyse erforderliche Dosis) digeriert.

B. Die Sedimente werden in Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,1 ccm inaktiven Rinderserums aufgeschwemmt.

C. Die Sedimente werden in Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,1 ccm inaktiven Rinderserums + 0,35 ccm Pferdeserum aufgenommen.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8.

Mengen des Pferdeserums	Eingetretene Hämolyse von 1 ccm 5-proz. präparierten Rinderblut + 0,1 ccm inaktiven Rinderserums + Pferdeserum			
ccm	Kontrolle	A	B	C
1,0	komplett	wenig	0	komplett
0,5	„	Spur	0	„
0,35	„	Spürchen	0	„
0,25	stark	0	0	„
0,15	mäßig	0	0	„
0,1	Spur	0	0	„
0	0	0	0	„

Die Tabelle zeigt in Kolumne B das gleiche Verhalten, wie bei dem entsprechenden Vorgehen mit Meerschweinchenblut. Obwohl das Pferdeserum gebunden ist, die Blutkörperchen also Amboceptor und Komplement verankert haben, bleibt die Hämolyse bei Zusatz von inaktivem Rinderserum aus. Auch hier kann also das wesentliche Argument, welches die Bordet-Gaysche Kolloidtheorie zu stützen geeignet wäre, nicht erbracht werden. Daß in diesem Fall von einer Resistenz der vorbehandelten Blutzellen nicht gesprochen werden kann, zeigt deutlich Kolumne C der Tabelle, aus der hervorgeht, daß die Blutzellen in einem geeigneten Gemisch sich vollständig auflösen.

Bordet und Gay geben allerdings auch in diesem Falle an, daß präparierte und mit Pferdeserum vorbehandelte Rinderblutkörperchen das wirksame Prinzip des inaktiven Pferdeserums absorbieren. Sie beschreiben aber als Folgeerscheinung nur eine starke Agglutination, ohne die Frage, ob dabei Hämolyse, die man doch nach ihrer Theorie erwarten muß, eintritt oder nicht, zu berühren. Andererseits wird von den Autoren mitgeteilt, daß Rinderserum durch die Einwirkung auf Rinderblut, das präpariert und mit Pferdekomplement beladen ist, die Fähigkeit verliert, präpariertes Rinderblut bei Zusatz von Pferdeserum zu

agglutinieren; über die hämolytische Wirkung fehlt auch hier eine Angabe. Allerdings soll nach den Autoren derart vorbehandeltes Rinderserum Meerschweinchenblut bei kombinierter Wirkung mit Pferdeserum schwächer und langsamer agglutinieren und lösen. Jedenfalls hielten wir es für erforderlich, uns über die einschlägigen Verhältnisse eingehend zu orientieren. Wir folgten dabei der schon bei der Analyse der Hämolyse des Meerschweinchenbluts erörterten Versuchsanordnung.

Es werden zwei Reihen aufgestellt. Jede Reihe enthält je 1 ccm präpariertes 5-proz. Rinderblut, das eine Stunde lang mit je 0,5 ccm Pferdeserum (= 2 zur kompletten Hämolyse erforderliche Dosen) bei 37° vorbehandelt und sodann von der Zwischenflüssigkeit abzentrifugiert war, und absteigende Mengen inaktiven Rinderserums. Nach einstündigem Verweilen bei 37° wird zentrifugiert. Die Abgüsse werden einerseits mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. präparierten Rinderblutes + 0,25 ccm Pferdeserum, andererseits mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut + 0,25 ccm Pferdeserum, digeriert. Das Ergebnis ist aus Tabelle 9 zu ersehen.

Tabelle 9.

Mengen des inaktiven Rinderserums	Hämolyse von			
	1 ccm 5-proz. präparierten Rinderblut durch 0,25 ccm Pferdeserum +		1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut durch 0,25 ccm Pferdeserum +	
ccm	a vorbehandeltes Rinderserum	b natives Rinderserum	a vorbehandeltes Rinderserum	b natives Rinderserum
0,35	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	„	„	fast komplett	fast komplett
0,15	„	„	stark	„ „
0,1	stark	stark	wenig	mäßig
0,05	mäßig	mäßig	Spürchen	Spur
0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt, daß auch mit Pferdekomplement beladenes Rinderblut nicht befähigt ist, inaktives Rinderserum seines die Hämolyse bedingenden Prinzips zu berauben, und zwar ist das derart vorbehandelte Rinderserum in vollem oder fast ungeschwächtem Grade geeignet, die Hämolyse sowohl des präparierten Rinderbluts als auch diejenige des Meerschweinchenbluts unter Mitwirkung des Pferdeserums zu vermitteln. In letzterer Hinsicht stehen also unsere experimentellen Ergebnisse in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben von Bordet und Gay. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß Rinderserum auch durch Meerschweinchenblut, das mit aktivem Pferdeserum vorbehandelt war, nichts von seiner die Hämolyse des präparierten Rinderbluts vermittelnden Funktion einbüßte.

Durch die beiden erörterten Tatsachen, daß nämlich:

1) präpariertes Rinderblut, das mit aktivem Pferdeserum vorbehandelt wurde, sich in inaktivem Rinderserum nicht löst,
2) das die Hämolyse vermittelnde Prinzip des Rinderserums durch mit Pferdeserum vorbehandeltes präpariertes Rinderblut nicht absorbiert wird,

ist erwiesen, daß die Hämolyse des präparierten Rinderbluts durch die kombinierte Wirkung von inaktivem Rinderserum und aktivem Pferdeserum ebensowenig, wie die unter gleichen Bedingungen erfolgende Hämolyse des Meerschweinchenbluts vom Standpunkte der von Bordet und Gay aufgestellten Kolloidtheorie zu erklären ist. Wir haben gesehen, daß das Experiment die einfachsten Postulate, die wir auf Grund der von Bordet und Gay vertretenen Auffassung fordern müssen, nicht erfüllen kann. Für den Fall der Meerschweinchenbluthämolyse ergibt sich die den Tatsachen ohne weiteres gerecht werdende Deutung daraus, daß nicht das Pferdeserum, wie es Bordet und Gay supponieren, sondern das Rinderserum den hämolytisch wirksamen Amboceptor liefert. Dieser Rinderamboceptor ist, wie schon Ehrlich und Sachs erwiesen haben, dadurch charakterisiert, daß er erst nach der Vereinigung mit dem Pferdekomplement von den roten Blutkörperchen verankert wird.

Um eine Erklärung für die Hämolyse des präparierten Rinderblutes zu geben, ist es, wie dies schon Bordet und Gay mit Recht ausführen, nicht möglich, dem Rinderserum eine Amboceptorrolle zu vindizieren. Man könnte nun daran denken, daß das inaktivierte Rinderserum als ein Komplementoid wirkt. Allerdings müßte dann die Funktion dieses Komplementoids eine eigenartige sein. Man müßte annehmen, daß das wirksame Pferdekomplement an ungeeigneter Stelle von den amboceptorbeladenen Blutzellen gebunden wird, so daß es nicht zur Wirkung gelangt, „nicht dominant“ ist. Die Rolle des Rinderkomplementoids würde dann darin bestehen, dem Pferdekomplement gewissermaßen den richtigen Weg zu weisen. Man könnte sich nämlich vorstellen, daß das Komplementoid eine höhere Avidität hat als das Pferdekomplement und daher diejenige Amboceptorgruppe, an der das Komplement nicht dominant ist, sperrt. Das Pferdekomplement würde dann von der an und für sich weniger aviden komplementophilen Amboceptorgruppe verankert werden, an der es dominant ist. Die Möglichkeiten der Deutung ließen sich noch variieren, immer aber müßte man annehmen, daß das Rinderkomplementoid bereits an und für sich von dem präparierten Rinderblut gebunden wird. Nun kann man aber leicht zeigen, daß das wirksame Prinzip des Rinderserums durch Vorbehandlung mit präparierten Rinderblutkörperchen nichts von seiner Wirkungskraft einbüßt. Es ergibt sich daraus, daß die erörterte Anschauung, nach welcher das Rinderserum als Komplementoid wirken würde, nicht zu Recht bestehen kann.

Wir mußten uns also nach anderen Erklärungsmöglichkeiten umsehen, und es lag nahe, daran zu denken, daß auch bei der Hämolyse des präparierten Rinderblutes inaktives Rinderserum und Pferdeserum in direkten Beziehungen zueinander stehen. Die Tatsache, daß der auf Meerschweinchenblut wirkende Amboceptor des Rinderserums bereits an und für sich eine so ausgesprochene Verwandtschaft zum Pferdekomplement hat, legte die Vermutung nahe, daß das Rinderserum auch antikomplementäre Wirkungen entfalten könnte. Muß ja doch ein in Bezug auf das Komplement avider Amboceptor, wenn die für ihn geeigneten Blutzellen fehlen, wie ein Antikomplement wirken. In der Tat haben wir zeigen können (cf. Tab. 7), daß das inaktive Rinderserum in größeren Mengen die Hämolyse des präparierten Rinderblutes hemmt, eine Hemmung, die nur durch antikomplementäre Wirkungen verursacht sein kann. Dieser Befund mußte bereits die Vermutung nahelegen, daß inaktives Rinderserum und Pferdeserum auch bei dem hämolytischen Effekt in irgend welchen Beziehungen zueinander stünden. Wir gingen daher in der Weise vor, daß wir einerseits absteigende Mengen Pferdeserums allein eine Stunde bei 37° stehen ließen und darauf präpariertes Rinderblut + 0,5 ccm inaktives Rinderserum hinzufügten, andererseits Gemische von absteigenden Mengen Pferdeserums mit je 0,5 ccm inaktiven Rinderserums 1 Stunde bei 37° vor dem Blutzusatz digerierten. Die eingetretene Hämolyse wurde dann zeitlich verfolgt und ist in Tabelle 10 notiert.

Tabelle 10.

Mengen des aktiven Pferdeserums	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. präparierten Rinderblut durch Pferdeserum + inaktives Rinderserum							
	A Pferdeserum 1 Stunde bei 37°				B Pferdeserum + Rinderserum 1 Stunde bei 37°			
ccm	5 Min.	15 Min.	30 Min.	2 Std.	5 Min.	15 Min.	30 Min.	2 Std.
0,75	0	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett
0,5	0	mäßig	fast kompl.	„	„	„	„	„
0,35	0	wenig	mäßig	fast kompl.	stark	„	„	„
0,25	0	0	0	stark	mäßig	mäßig	stark	stark
0,15	0	0	0	mäßig	0	wenig	wenig	mäßig
0,1	0	0	0	Spur	0	0	0	Spur
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt die gleichen Verhältnisse, wie wir sie bereits bei der Hämolyse des Meerschweinchenblutes kennen gelernt haben. Auch die Hämolyse des präparierten Rinderblutes erfolgt in deutlicher Weise rascher, wenn Pferdeserum und inaktives Rinderserum vor dem Blutzusatz einige Zeit gemischt werden. Es ergibt sich also bereits daraus, daß

eine Reaktion zwischen Bestandteilen des Pferdeserums und des Rinderserums erfolgt. Zu einem wirksamen Komplex, wie bei der Hämolyse des Meerschweinchenblutes, kann diese Reaktion nicht führen; denn das Rinderserum kann ja, wie schon mehrfach erwähnt, nicht als Amboceptor in Betracht kommen. Man dürfte aber nicht fehlgehen, wenn man für die Hämolyse des präparierten Rinderblutes annimmt, daß das inaktive Rinderserum die Funktion hat, einen Bestandteil des Pferdeserums zu binden, welcher die Wirkung des die Hämolyse bedingenden Pferdekomplements hemmt. Um ein Autoantikomplement des Pferdeserums kann es sich dabei nicht handeln. Diese Möglichkeit wird schon deshalb ausgeschlossen, weil das Pferdekomplement von den präparierten Rinderblutzellen gebunden wird. Dagegen erschien es durchaus denkbar, daß die fragliche Substanz des Pferdeserums, welche die Hämolyse hemmt und durch Rinderserum gebunden wird, ein Bestandteil von Komplement- oder Komplementoidcharakter ist. Die Wirkung dieses zweiten Komplements des Pferdeserums würde darin bestehen, daß es präpariertes Rinderblut nicht löst, aber eine höhere Avidität als das wirksame Komplement besitzt. Seine Bindung würde zur Folge haben, daß das wirksame Komplement an ungeeigneter Stelle, an der es nicht dominant ist, verankert wird. Diese Anschauung kann auf ihre Richtigkeit geprüft werden, wenn der Nachweis gelingt, daß die Bindung des wirksamen Pferdekomplements an das präparierte Rinderblut und die Hämolyse des letzteren unter dem Einfluß von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum zwei voneinander unabhängige Vorgänge sind, d. h. daß eine Bindung des wirksamen Prinzips des Pferdeserums erfolgt, ohne daß unter gleichen Bedingungen bei gleichzeitiger Gegenwart von inaktivem Rinderserum Hämolyse eintritt. Dieses Postulat konnten wir nun erfüllen. Man kann nämlich die geforderten Verhältnisse sehr leicht darstellen, wenn man das Rinderblut mit einer geringeren Amboceptormenge digeriert. Wir verfuhren folgendermaßen:

Es wurden zwei gleiche Reihen angesetzt, welche je 1 ccm 5-proz. Rinderblut und absteigende Mengen Amboceptor (inaktiviertes Serum des mit Rinderblut vorbehandelten Kaninchens) enthielten. Nach 1-stündigem Verweilen bei 37° wurde zentrifugiert. Nun wurden die Sedimente der

Reihe A mit einem Gemisch von je 0,2 ccm Pferdeserum + 0,1 ccm inaktiven Rinderserums digeriert[1]).

Reihe B mit je 0,2 ccm Pferdeserum 1 Stunde bei 37° digeriert[1]), sodann wurde abzentrifugiert und den nunmehr erhaltenen Sedimenten je 0,1 ccm inaktiven Rinderserums zugefügt.

Reihe C. Die bei B erhaltenen Abgüsse wurden mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. präparierten Rinderblut (in der gewöhnlichen Weise mit 0,05 ccm Amboceptor präpariert) und 0,1 ccm inaktiven Rinderserums digeriert.

1) Gesamtvolumen stets = 2 ccm.

Das Ergebnis ist aus Tabelle 11 zu ersehen.

Tabelle 11.

Mengen des zur Vorbehandlung dienenden Amboceptors ccm	Eingetretene Hämolyse: Reihe A Verschiedengradig präpariertes Rinderblut + 0,2 ccm Pferdeserum + 0,1 ccm inaktives Rinderserum	Reihe B Verschiedengradig präpariertes Rinderblut + 0,2 ccm Pferdeserum, zentrifugieren, + 0,1 ccm inaktives Rinderserum	Reihe C Stark präpariertes Rinderblut (0,05 ccm) + 0,1 ccm inaktives Rinderserum + 0,2 ccm bereits digeriertes Pferdeserum
0,1	komplett	0	Spürchen
0,05	„	0	„
0,025	stark	0	„
0,015	wenig	0	„
0,01	Spur	0	„
0,005	0	0	„
0,0025	0	0	wenig
0	0	0	komplett

Die Tabelle zeigt, daß Rinderblut, welches mit der 10-fach geringeren Amboceptormenge (0,005 ccm) präpariert ist, sich in Bezug auf die Bindung des Pferdekomplements ebenso verhält, wie stark, mit 0,05 ccm Amboceptor, präpariertes Blut (Reihe C). Gleichwohl ist derart schwach präpariertes Rinderblut der kombinierten Wirkung von Pferdeserum und inaktivem Rinderserum gegenüber resistent (Reihe A). Daß auch ein successiver Zusatz von Pferdeserum und inaktivem Rinderserum nicht etwa zur Hämolyse führt, ergibt sich aus Reihe B der Tabelle. Wir haben also hier die geforderten Verhältnisse in ausgesprochener Weise vor uns, und es ergibt sich in der Tat, daß wir das Phänomen der Bindung des Pferdekomplements und dasjenige seiner hämolytischen Wirkung gesondert betrachten müssen.

Die einfachste Vorstellung, die man sich von dem Mechanismus des ganzen Erscheinungskomplexes machen kann, ist wohl folgende: Bei der Vielheit der Amboceptoren in einem und demselben Immunserum, die sich besonders aus den Studien Ehrlichs und Morgenroths ergeben hat, steht der Annahme nichts entgegen, daß es sich um zwei verschiedene Amboceptorfraktionen in dem zum Präparieren des Rinderblutes dienenden Immunserum handelt. Der eine Amboceptor ist in starker Konzentration vorhanden und bindet das Pferdekomplement, das aber für ihn nicht dominant ist. Der andere Amboceptor ist im Immunserum nur in geringer Menge vorhanden, für ihn ist das Pferdekomplement dominant. Dadurch ist in der Tat erklärt, daß bereits eine geringe Amboceptormenge Komplement bindet, die Hämolyse aber erst bei einem erheblichen Ueberschuß von Immunserum eintritt. Stark und schwach konzentrierter Amboceptor des

Immunserums stehen also gewissermaßen in analogen Beziehungen, wie Pferde- und Rinderamboceptor bei der Hämolyse des Meerschweinchenblutes. Ein wesentlicher Unterschied ist allerdings vorhanden. Bei der Hämolyse des Meerschweinchenblutes überwiegt die Avidität des Rinderamboceptors zum Pferdekomplement diejenige des Pferdeamboceptors, und es tritt daher bei gleichzeitiger Gegenwart der beiden Amboceptoren Hämolyse ein. Für die Hämolyse des präparierten Rinderbluts genügt dagegen das Vorhandensein der beiden Amboceptortypen nicht. Das Komplement wird hier offenbar auch unter diesen Verhältnissen von dem Amboceptor, für den es nicht dominant ist, verankert. Um es dem anderen Amboceptor zu übermitteln, bedarf es der Mitwirkung des inaktiven Rinderserums, das, wie wir gesehen haben, zu dem Pferdeserum in direkten Beziehungen stehen muß. Diese Beziehungen kann man sich nun nicht anders als darin gelegen vorstellen, daß das Rinderserum einen Bestandteil des Pferdeserums von Komplementcharakter bindet, welcher das wirksame Pferdekomplement an den zur Hämolyse ungeeigneten Amboceptor leitet. Es handelt sich hier nicht etwa um ein neuartiges Erklärungsprinzip, sondern um Verhältnisse, die bereits durch Ehrlich und Marshall bekannt sind. Ehrlich und Marshall[1]) haben nämlich bei einer von ihnen analysierten Kombination nachgewiesen, daß die Bindung eines bestimmten, nicht dominanten Komplementes erst dann erfolgte, wenn eine andere komplementophile Gruppe des Amboceptors das entspechende Komplement, das in diesem Falle das dominante war, gebunden hatte. Um ein analoges Verhalten dürfte es sich auch in der uns beschäftigenden Frage handeln.

Gelingt es nun, den die Bindung des wirksamen Pferdekomplements an den ungeeigneten Amboceptor veranlassenden Bestandteil des Pferdeserums zu entfernen, was eben durch die Wirkung des Rinderserums geschieht, so gelangt das Pferdekomplement an den anderen, wirksamen Amboceptor, und es kann Hämolyse erfolgen. Wenn dem aber so ist, so muß auch die Bindung des Pferdekomplements an das schwach präparierte Rinderblut ausbleiben, wenn der diese Bindung veranlassende Bestandteil des Pferdeserums durch das Rinderserum unschädlich gemacht ist. Daß dies der Fall ist, konnten wir in der Tat zeigen, und wir möchten daher die Aufmerksamkeit ganz besonders auf den folgenden Versuch, der gewissermaßen das Experimentum crucis für die entwickelten Anschauungen darstellt, lenken. Wir verfuhren folgendermaßen:

Es wurden zwei Reihen angesetzt:

Reihe A. Je 0,35 ccm Pferdeserum bleiben, mit Kochsalzlösung auf je 1,1 ccm Volumen gefüllt, $^1/_2$ Stunde bei 37° stehen, sodann werden

1) Ehrlich, P. und Marshall, H. T., Ueber die komplementophilen Gruppen der Amboceptoren. Berliner klin. Wochenschr., 1902, No. 25.

sie mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. schwach präparierten (0,005 ccm Amboceptor) Rinderblut $1^1/_2$ Stunden bei 37° digeriert. Sodann wird abzentrifugiert. Zu den Abgüssen werden absteigende Mengen inaktiven Rinderserums (1 ccm Volumen) gefügt, und diese Gemische werden auf die Sedimente von je 1 ccm 5-proz. stark präparierten (0,05 ccm Amboceptor) Rinderbluts gegossen.

Reihe B. Je 0,35 ccm Pferdeserum + absteigende Mengen inaktiven Rinderserums (Gesamtvolumen = 1,1 ccm) werden nach $^1/_2$-stündigem Verweilen bei 37° mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. schwach präparierten (0,005 ccm Amboceptor) Rinderblut $1^1/_2$ Stunden bei 37° digeriert. Sodann werden die durch Zentrifugieren erhaltenen Abgüsse auf die Sedimente von je 1 ccm stark präparierten (0,05 ccm Amboceptor) 5-proz. Rinderblutes gegossen und je 1 ccm Kochsalzlösung hinzugefügt.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12.

Mengen des inaktiven Rinderserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. stark präparierten Rinderbluts	
	Reihe A durch Rinderserum und mit schwach präpariertem Blut vorbehandeltes Pferdeserum	Reihe B durch die mit schwach präpariertem Blut vorbehandelten Gemische von Rinderserum und Pferdeserum
0,75	Spur	komplett
0,5	„	„
0,35	„	„
0,25	„	stark
0,15	„	mäßig
0,1	„	Spur
0	0	0

Aus der Tabelle ist deutlich zu ersehen, daß die Bindung des Pferdekomplements an schwach präpariertes Rinderblut ausbleibt, wenn dem Pferdeserum genügende Mengen des inaktiven Rinderserums zugefügt werden. Dieses Ergebnis zeigt zunächst die gänzliche Unhaltbarkeit der von Bordet und Gay vertretenen Anschauung. Denn man hätte nach ihr unbedingt erwarten müssen, daß in Reihe B die Hämolyse geringer, keinesfalls aber stärker, als in Reihe A erfolgt. Denn in Reihe B sind ja die Verhältnisse so gelegen, daß auch dem „Kolloid" der Autoren Gelegenheit gegeben ist, durch das schwach präparierte und mit Komplement beladene Blut absorbiert zu werden. Tatsächlich zeigt sich das gegenteilige Verhalten, das mit der Kolloidtheorie in direktem Widerspruch steht. Dagegen konnte dieses Versuchsresultat auf Grund der von uns ausgesprochenen Vermutung vorausgesagt werden. Die Tabelle zeigt in der Tat zur Evidenz, daß das Rinderserum die Bindung des Pferdekomplements an das schwach präparierte Rinderblut hindert. Wir gelangen, von dieser Erkenntnis ausgehend, auch zu einem Verständnis

der Beteiligung des Rinderserums an der Hämolyse des stark präparierten Rinderbluts durch Pferdeserum. Es handelt sich offenbar um ziemlich komplizierte Verhältnisse, für die wir vorläufig die in den Figuren 3—7 der beigegebenen Tafel zur schematischen Darstellung gebrachten Deutung vorschlagen möchten.

Fig. 3 stellt die Konstitution des Immunserums dar. Der eine Amboceptor *a* ist nur schwach konzentriert, der andere *b* in großer Menge vorhanden.

In Fig. 4 sind die Verhältnisse skizziert, wie sie nach unserer Vorstellung bei dem Digerieren stark präparierten Rinderbluts mit Pferdeserum eintreten. Das zum Präparieren benutzte Immunserum enthält zwei Amboceptortypen, den stark konzentrierten Amboceptor *b* und den nur in schwacher Konzentration vorhandenen Amboceptor *a* (cf. Fig. 3). Für den letzteren ist das im Pferdeserum vorhandene Komplement $c\alpha$ dominant. Das Pferdeserum enthält aber außer diesem Komplement noch einen weiteren komplementartigen Bestandteil $c\beta$, der eine starke Verwandtschaft zur komplementophilen Gruppe β des Amboceptors *b* besitzt. Die Verankerung der Komponente $c\beta$ an β hat zur Folge, daß die Avidität der gleichfalls an dem Amboceptor *b* befindlichen Gruppe α, welche an und für sich mit $c\alpha$ nicht reagiert, derart gesteigert wird, daß nunmehr der Amboceptor *b* auch das wirksame Komplement $c\alpha$ mit starker Avidität an sich reißt. Da letzteres aber für den Amboceptor *b* nicht dominant ist, bleibt die Hämolyse aus.

Fig. 5 veranschaulicht die Wirkung des im Rinderserum enthaltenen Bestandteils *r*. Derselbe bindet $c\beta$, wodurch die Steigerung der Avidität der an *b* befindlichen Gruppe α ausbleibt. Es muß daher $c\alpha$ von *a* verankert werden, wodurch die Hämolyse bedingt wird.

Fehlt der Amboceptor *a*, d. h. ist das Rinderblut nur schwach präpariert, so wird beim Digerieren mit Pferdeserum durch den Amboceptor *b*: $c\beta$ und durch Vermittelung dieser Reaktion auch $c\alpha$ gebunden werden. Der Abguß kann also stark präpariertes Blut auch bei Gegenwart von inaktivem Rinderserum nicht lösen (cf. Fig. 6 der Tafel, Versuch Tabelle 12 A). Wird hingegen das schwach präparierte Blut, das also nur den Amboceptor *b* gebunden hat, mit dem Gemisch: Pferdeserum —inaktives Rinderserum digeriert, so bleibt, da der wirksame Amboceptor *a* fehlt, die Hämolyse aus. Da aber die Rinderkomponente *r*: $c\beta$ bindet, bleibt auch $c\alpha$ frei, und so kommt es, daß in diesem Falle der Abguß auf stark präpariertes Rinderblut bereits an und für sich hämolytisch wirkt (cf. Fig. 7 der Tafel, Versuch Tabelle 12 B).

Natürlich müssen außer den erörterten Momenten auch die Bedingungen der Massenwirkung berücksichtigt werden. Wenn z. B. einer geringen Menge Rinderserums ein großer Ueberschuß des Amboceptors *b* gegenübersteht, so wird die Reaktion zwischen *b* und $c\beta$ noch eintreten können, sie wird aber langsamer und unvollständiger erfolgen, als wenn das Rinderserum überhaupt fehlt. Ist nun gleichzeitig der Amboceptor *a* vorhanden, so wird ein Teil von $c\alpha$ noch Gelegenheit finden an *a* heranzugehen, so daß die Hämolyse statthat. Fehlt aber der Amboceptor *a*, ist also das Rinderblut schwach präpariert, so wird $c\alpha$ noch an den Amboceptor *b* gebunden werden können, so daß der Abguß seine hämolytische Kraft verloren hat. So ist es zu verstehen, daß bei dem in Tabelle 12 mitgeteilten Versuch in der Kontrolle, die aus einfachen Gemischen von stark präpariertem Rinderblut, 0,35 ccm Pferdeserum und absteigenden Mengen inaktiven Rinderserums bestand, noch 0,1 ccm des letzteren komplette Hämolyse vermittelte, während sich aus Tabelle 12 B ergibt, daß schwach präpariertes Rinderblut ein Gemisch von 0,1 ccm inaktiven Rinderserums + 0,35 ccm Pferdeserum seiner hämolytischen Kraft beraubt.

Andererseits wird man ein quantitatives Erhaltensein des wirksamen Pferdekomplements nach dem Digerieren mit schwach präpariertem Rinderblut erwarten dürfen, wenn man einen Ueberschuß von inaktivem Rinderserum gleichzeitig einwirken läßt. Wir möchten uns erlauben, noch hierfür einen experimentellen Beleg anzuführen.

Es werden zwei Reihen angesetzt:

Reihe A enthält je 0,5 ccm schwach präpariertes 10-proz. Rinderblut + 0,5 ccm Kochsalzlösung + absteigende Mengen aktiven Pferdeserums [1]).

Reihe B enthält je 0,5 ccm schwach präpariertes 10-proz. Rinderblut + 0,5 ccm inaktives Rinderserum + absteigende Mengen aktiven Pferdeserums [2]).

Nach $1^1/_2$-stündigem Aufenthalt bei 37° wird zentrifugiert. Die dabei in Reihe B wahrzunehmende geringgradige Hämolyse ist in Tabelle 13 notiert.

Tabelle 13.

Mengen des Pferdeserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. schwach präparierten Rinderbluts durch absteigende Mengen Pferdeserums	
	A allein	B + 0,5 ccm inaktives Rinderserum
0,75	0	stark
0,5	0	wenig
0,35	0	0
0,25	0	0
0,15	0	0
0,1	0	0
0	0	0

Nunmehr wird zu den Abgüssen der Reihe A je 0,5 ccm inaktives Rinderserum, zu den Abgüssen der Reihe B je 0,5 ccm Kochsalzlösung

1) Pferdeserum + Kochsalzlösung vorher 1 Stunde bei 37°.
2) Pferdeserum + Rinderserum vorher 1 Stunde bei 37°.

gefügt. Die Gemische werden mit den Sedimenten von je 1 ccm 5-proz. stark präparierten Rinderbluts digeriert.

In einer gleichzeitig angesetzten Kontrollreihe C wurde in der Weise verfahren, daß Gemische von je 0,5 ccm inaktiven Rinderserums + absteigende Mengen Pferdeserums 2 Stunden bei 37° digeriert wurden, worauf Zusatz von stark präpariertem Rinderblut erfolgte.

Das Ergebnis ist in Tabelle 14 notiert.

Tabelle 14.

Mengen des Pferdeserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. stark präparierten Rinderbluts		
	Reihe A	Reihe B	Reihe C
0,75	stark	komplett	komplett
0,5	wenig	„	„
0,35	Spur	„	„
0,25	0	fast komplett	fast komplett
0,15	0	stark	wenig
0,1	0	mäßig	Spur
0	0	0	0

Die Tabelle zeigt in der Tat, daß das Pferdekomplement beim Digerieren mit schwach präpariertem Rinderblut unter gleichzeitiger Gegenwart einer reichlichen Rinderserummenge quantitativ erhalten bleibt, während es an und für sich von dem präparierten Blute, wie sich aus Reihe A ergibt, gebunden wird. Dieser markante Unterschied wird noch beweiskräftiger durch den Umstand, daß bei der Einwirkung der Gemische von Pferdeserum und Rinderserum auf das schwach präparierte Blut bereits eine geringe Hämolyse eintritt, wie wir dies aus Tabelle 13 B ersehen. Trotz dieser bereits stattfindenden Wirkung, mit der offenbar ein, wenn auch geringer Verbrauch vergesellschaftet sein muß, ist das Endresultat gerade umgekehrt, als man es a priori erwarten sollte. Es ist damit ein gravierendes Argument für die Richtigkeit der von uns diskutierten Anschauungen erbracht. Man darf wohl annehmen, daß der Bestandteil $c\beta$ des Pferdeserums ein Komplement darstellt, nur daß dieses weder für den Amboceptor a noch für b dominant ist. Die Rolle des Rinderserums besteht demnach einfach in einer antikomplementären Wirkung. Offenbar sind die Amboceptoren des Rinderserums im allgemeinen durch eine hohe Avidität der komplementophilen Gruppen ausgezeichnet, wie wir dies insbesondere für den auf Meerschweinchenblut wirkenden und durch Pferdeserum komplettierbaren Amboceptor nachweisen konnten. Solche Amboceptoren aber müssen, wenn die Zellen, auf welche sie angepaßt sind, fehlen, im Sinne von Antikomplementen wirken. Es erklärt sich dadurch auch, daß das inaktivierte Rinderserum, wie wir wiederholt gesehen haben, in überschüssigen Mengen die Hämolyse des stark präparierten Rinderbluts durch das Pferdekomplement $c\alpha$ hemmen kann, obwohl es selbst

— in geringeren Mengen — erst diese Hämolyse ermöglicht. Man muß eben annehmen, daß im Rinderserum auch komplementophile Gruppen α in sehr geringer Menge vorhanden sind, so daß dasselbe in großen Dosen auch eine ablenkende Wirkung auf das Komplement $c\alpha$ ausüben kann.

Was die beiden Komplemente des Pferdeserums ($c\alpha$ und $c\beta$) anlangt, so scheint deren quantitatives Verhältnis individuell gewissen Schwankungen zu unterliegen. Wir haben bereits erwähnt, daß das Pferdeserum bereits an und für sich präpariertes Rinderblut in wechselndem Grade löst. Von dem gewonnenen Standpunkte aus muß diese durch das Pferdeserum allein bedingte Hämolyse offenbar um so stärker sein, je mehr die Konzentration des Komplements $c\alpha$ im Pferdeserum diejenige des Komplements $c\beta$ überwiegt. Würde das Komplement $c\beta$ überhaupt fehlen, so müßte die durch Pferdeserum allein bedingte Hämolyse ebenso stark sein, als die bei kombinierter Einwirkung von Pferdeserum und inaktivem Rinderserum erfolgende. Solche extreme Fälle haben wir allerdings nicht beobachtet. Immerhin aber haben wir Pferdesera in den Händen gehabt, die präpariertes Rinderblut bereits an und für sich in einer Menge von 0,35—0,3 ccm komplett lösten, während die komplette Hämolyse durch Zusatz von inaktivem Rinderserum nur bis zur Dose von 0,15 ccm Pferdeserum verstärkt wurde. Es ergeben sich also auch aus einer kritischen Verwertung der kasuistischen Befunde Konsequenzen, die sich der von uns gegebenen Deutung zwanglos einfügen.

So glauben wir gezeigt zu haben, daß die von Bordet und Gay erhobenen Einwände gegen die Auffassung der bei der Hämolyse des Meerschweinchenblutes beteiligten Komponente des Rinderserums als Amboceptor hinfällig sind. Die von Bordet und Gay versuchte Deutung hat sich andererseits bei eingehender Analyse in direktem Widerspruch zu einer Reihe von experimentellen Befunden erwiesen. Dagegen fügt sich das gesamte Tatsachenmaterial in die sich aus der Amboceptortheorie ergebenden Anschauungen zwanglos ein. Die eigentümliche Rolle des Rinderserums erklärt sich ohne weiteres durch die hohe Avidität der in ihm enthaltenen komplementophilen Gruppen resp. Amboceptoren zum Komplement, und dies trifft sowohl für die Hämolyse des Meerschweinchenblutes als auch für diejenige des präparierten Rinderblutes zu. Es erübrigt sich also, dem Rinderserum, wie dies Bordet und Gay tun, neuartige und ganz singuläre Qualitäten zu vindizieren, und wir können das Fazit unserer Untersuchungen dahin resumieren, daß auch die scheinbaren Ab-

weichungen von der Regel nur Variationen der durch die Amboceptortheorie formulierten Gesetzmäßigkeit der cytotoxischen Wirkungen darstellen.

Zusammenfassung.

1) Entgegen der von Bordet und Gay vertretenen Anschauung wirkt bei der Hämolyse des Meerschweinchenblutes durch aktives Pferdeserum und inaktives Rinderserum nicht das Pferdeserum, sondern das Rinderserum als Amboceptor.

2) Das Meerschweinchenblut absorbiert das Komplement des Pferdeserums durch Vermittelung eines Pferdeamboceptors, für den das Pferdekomplement nicht dominant ist.

3) Nachträgliches Zufügen von Rinderserum zu dem mit Pferdeserum vorbehandelten Meerschweinchenblut bedingt keine Hämolyse, die man nach Bordet und Gay erwarten müßte. Ebensowenig wird die hämolytische Komponente des Rinderserums dabei gebunden. Die von Bordet und Gay aufgestellte Theorie, nach welcher ein „Kolloid" des Rinderserums als dritte Komponente bei der Cytotoxinwirkung von den mit Amboceptor und Komplement beladenen Blutzellen absorbiert wird und dieselben löst, ist also irrig.

4) Dagegen spricht für eine direkte Vereinigung des Rinderamboceptors mit dem Pferdekomplement der Umstand, daß die Hämolyse erheblich rascher erfolgt, wenn die beiden Sera vor dem Blutzusatz digeriert sind.

5) Es gelingt, dem Pferdeserum durch Vorbehandeln mit Meerschweinchenblut bei 0° einen großen Teil des Amboceptors zu entziehen, ohne den Komplementgehalt zu vermindern. Trotz des Amboceptorverlustes hat das Pferdeserum die Fähigkeit, im Verein mit Rinderserum hämolytisch zu wirken, bewahrt, und büßt davon nunmehr beim Digerieren mit Blut weniger ein, als natives Serum. Auch daraus ergibt sich, daß der die Hämolyse vermittelnde Amboceptor im Rinderserum enthalten ist.

6) Der von Bordet und Gay erhobene Befund, daß sich mit Amboceptor beladenes (präpariertes) Rinderblut in einem Gemisch von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum, aber nicht in Pferdeserum allein löst, konnte bestätigt werden. Dagegen erwies sich ihre Deutung, nach welcher das Rinderserum die bereits mit Pferdeserum vorbehandelten präparierten Rinderblutzellen als „Kolloid" löst und von ihnen gebunden wird, durch folgende Ergebnisse als irrig:

7) Präpariertes Rinderblut absorbiert das Pferdekomplement, ohne gelöst zu werden. Derart vorbehandeltes Blut wird aber auch durch Zusatz von inaktivem Rinderserum nicht gelöst, noch hat es die Fähigkeit, letzteres seiner die Hämolyse vermittelnden Funktion zu berauben.

8) Es hat sich dagegen ergeben, daß auch im Falle der Hämolyse des präparierten Rinderbluts inaktives Rinderserum und Pferdeserum in direkten Beziehungen zueinander stehen. Wenn man beide Sera vor dem Zusatz des präparierten Rinderbluts digeriert, so wird eine erhebliche Beschleunigung der Hämolyse erzielt.

9) Rinderblut bindet auch das Pferdekomplement, wenn es mit einer geringen Menge Amboceptor vorbehandelt ist, obwohl zur Hämolyse durch Pferdeserum und inaktives Rinderserum eine weit größere Amboceptormenge erforderlich ist. Daraus ergibt sich, daß im Immunserum zwei verschiedene Amboceptoren vorhanden sind, von denen der eine, stark konzentrierte (*b*) das Pferdekomplement absorbiert, wenn das Rinderserum fehlt, der andere, schwach konzentrierte (*a*) das Pferdekomplement bindet, wenn Rinderserum zugegen ist. Nur im letzteren Falle tritt Hämolyse ein.

10) Das Rinderserum verhindert die Bindung des Pferdekomplements, an das schwach präparierte (Amboceptor *b*) Rinderblut, ohne in diesem Falle die Hämolyse zu vermitteln.

11) Da das Rinderserum aber nicht auf das präparierte Blut, sondern auf das Pferdeserum einwirkt, so ergibt sich, daß das Rinderserum einen Bestandteil des Pferdeserums bindet, dem die Funktion zukommt, die Bindung des Pferdekomplements an den Amboceptor *b* zu ermöglichen und zu bewirken.

12) Die kombinierte Wirkung des Pferdeserums und inaktiven Rinderserums bei der Hämolyse des präparierten Rinderbluts erklärt sich also durch die antikomplementäre Wirkung des Rinderserums, die sich aber wesentlich nur auf einen komplementartigen Bestandteil des Pferdeserums erstreckt, welcher die Bindung des wirksamen Pferdekomplements an einen Amboceptor *b* bedingt, während es nur für den Amboceptor *a* wirksam ist. Das von Bordet und Gay beschriebene Phä-

nomen ist also durch die von ihnen gegebene Deutung nicht zu erklären, dagegen ergibt sich das Verständnis des gesamten Tatsachenkomplexes aus den Prinzipien der Amboceptortheorie.

Erklärung zu den Figuren auf der Tafel.

Die vom Pferde stammenden Bestandteile sind rot, die Komponenten des Rinderserums blau markiert.

Figuren 1 und 2 betreffen die Hämolyse des Meerschweinchenblutes durch die kombinierte Wirkung von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum.

z: Meerschweinchenblutzelle; *ar*: Amboceptor des Rinderserums; *ap*: Amboceptor des Pferdeserums; *c*: Komplement des Pferdeserums.

Figur 1 veranschaulicht die Verhältnisse, wie sie bei gleichzeitigem Mischen von Blut, Pferdeserum und Rinderserum eintreten. Der Rinderamboceptor (*ar*) vereinigt sich mit dem Pferdekomplement (*c*), so daß Hämolyse erfolgt.

In Figur 2 ist das Meerschweinchenblut zuerst mit Pferdeserum ($ap + c$) digeriert. Die Blutzelle absorbiert den Pferdeamboceptor (*ap*) und dieser verankert das Pferdekomplement (*c*). Für den nachträglich zugesetzten Rinderamboceptor (*ar*) ist nun das Pferdekomplement (*c*) nicht mehr disponibel, so daß die Hämolyse ausbleibt.

Die Figuren 3—7 betreffen die Hämolyse des amboceptorbeladenen Rinderblutes durch die kombinierte Wirkung von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum.

z: Rinderblutzelle; *a* und *b*: Partialamboceptoren des Immunserums (*a* schwach, *b* stark konzentriert); α und β: komplementophile Gruppen; $c\alpha$: das für den Amboceptor *a* dominante Komplement des Pferdeserums; $c\beta$: der zweite komplementartige Bestandteil des Pferdeserums, welcher weder für *a* noch für *b* dominant ist, dessen Bindung an den Amboceptor *b* aber erst die komplementophile Gruppe α des Amboceptors *b* reaktionsfähig macht; *r*: wirksamer Bestandteil des Rinderserums (Antikomplement-Amboceptor?), welcher $c\beta$ bindet.

Figur 3: Konstitution des Immunserums; der Amboceptor *a* ist nur schwach, der Amboceptor *b* stark konzentriert im Immunserum vorhanden.

Figuren 4 und 5: Mechanismus der Hämolyse des stark präparierten Rinderblutes durch Pferdeserum und inaktives Rinderserum:

Figur 4: Stark präpariertes Rinderblut ist mit Pferdeserum digeriert. Der Bestandteil $c\beta$ des Pferdeserums wird vom Amboceptor *b* gebunden, und diese Bindung veranlaßt die Verankerung des Pferdekomplementes $c\alpha$ an den Amboceptor *b*. Da aber $c\alpha$ nicht für *b*, sondern nur für *a* dominant ist, bleibt die Hämolyse aus.

Figur 5: Stark präpariertes Rinderblut ist mit einem Gemisch von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum digeriert. Der Bestand-

teil *r* des Rinderserums bindet die Komponente $c\beta$ des Pferdeserums. $c\beta$ kann daher nicht an den Amboceptor *b* gelangen. Da letzterer aber an und für sich nicht mit dem Pferdekomplement $c\alpha$ reagiert, wird $c\alpha$ von dem Amboceptor *a* gebunden, und es erfolgt Hämolyse.

Figuren 6 und 7 veranschaulichen die Verhältnisse, wie sie dann eintreten, wenn das Rinderblut mit einer geringen Immunserummenge präpariert ist, also nur den Amboceptor *b* gebunden hat:

Figur 6: Schwach präpariertes Rinderblut ist mit Pferdeserum digeriert. $c\beta$ wird von *b* gebunden, und durch diese Bindung wird die Verankerung von $c\alpha$ an *b* vermittelt. Es tritt keine Hämolyse ein. Wenn man zentrifugiert, so fehlt im Abguß das Pferdekomplement.

Figur 7: Schwach präpariertes Rinderblut ist mit einem Gemisch von Pferdeserum und inaktivem Rinderserum digeriert. Die Komponente *r* des Rinderserums vereinigt sich mit $c\beta$. Dadurch wird auch $c\alpha$ nicht von *b* gebunden und bleibt frei. Wird zentrifugiert, so enthält der Abguß das Pferdekomplement.

Beiträge zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente.

Von

Dr. Rudolf Hecker,
Privatdozent an der Universität München.

Mit 4 Abbildungen.

I. Die hämolytische Wirkung der Seifen.

Die schon längere Zeit bekannte Tatsache, daß die Seifen starke Hämolysine und im Blute in ziemlich erheblicher Konzentration — nach Kobert 0,12 Proz. — vorhanden sind, hat in neuerer Zeit mehrfach Anregung gegeben, die Beziehungen des Seifengehalts zu den hämolytischen Wirkungen des Blutserums zu erforschen. Noguchi [1]) und v. Liebermann [2]) haben etwa gleichzeitig und unabhängig voneinander festgestellt, daß die hämolytische Wirkung der Seifen durch Zusatz von Blutserum oder Serumalbumin aufgehoben wird. v. Liebermann erblickt darin wohl mit Recht die Ursache dafür, daß die Seifen im Blutserum trotz ihrer relativ hohen Konzentration nicht zur hämolytischen Wirkung gelangen. Aus dem Umstande, daß inaktive Gemische von Seife und Serumalbumin wieder hämolytisch werden, wenn Oelsäure in nicht lösender Menge zugesetzt wird, schließt er, daß Oelsäure und Seife in ähnlichen Beziehungen stehen, wie Amboceptor und Komplement bei der Serumhämolyse.

Noguchi, der einerseits mit verschiedenen Alkaliseifen, andererseits mit alkoholischen Extrakten aus Blut und Organen arbeitete, kam zu ähnlichen Schlußfolgerungen. Er konnte zeigen, daß die hämolytische Wirkung der Seifenlösungen wie auch der Extrakte durch Blutserum aufgehoben wird. Diese Inaktivierung ist aber nach Noguchi nur eine scheinbare, da das Gemisch hämolytisch wirkt, wenn ein geeigneter Amboceptor für die Blutzellen vorhanden ist. Noguchi nimmt daher keinen Anstand, die Seifen des Blutserums mit den Komplementen zu identifizieren, indem letztere nur deshalb beim Fehlen der Amboceptoren inaktiv seien, weil die gleichzeitig vorhandenen Serumbestandteile als hemmende Faktoren interferieren.

---

1) Noguchi, H., On certain complementary substances. Proc. of the soc. for experim. biology and medicine, Vol. 4, 1907, No. 3.

2) v. Liebermann, L., Ueber Hämagglutination und Hämatolyse. Biochem. Zeitschr., Bd. 4, April 1907, Heft 1.

Bei der prinzipiellen Wichtigkeit der Frage erscheint es geboten, hier über einige Versuche zu berichten, die im Anschluß an die Mitteilung von Noguchi angestellt wurden. Ich verwandte dazu folgende Materialien:

1) 1-proz. Lösungen von ölsaurem Natron (Kahlbaum) in 0,85-proz. Kochsalzlösung;

2) 5-proz. Aufschwemmungen von Rinderblut in Kochsalzlösung (serumfrei gewaschen); Testmenge 1 ccm;

3) das inaktivierte Serum eines mit Rinderblut vorbehandelten Kaninchens als Amboceptor; komplett lösende Dosis bei Zusatz von Meerschweinchenkomplement = 0,0015 ccm;

4) normales Kaninchenserum.

Zu den Versuchen wurden in der Regel 0,05 ccm der 1-proz. Seifenlösung verwandt; es entsprach dies ungefähr dem doppelten Multiplum derjenigen Menge, welche 1 ccm 5-proz. Rinderblut gerade komplett löste. Die Hemmung der Seifenhämolyse durch Blutserum konnte ich nun ohne weiteres bestätigen. Es zeigte sich dabei, daß die Hemmung etwas intensiver war, wenn Serum, Seife und Blutzellen sofort digeriert wurden, als wenn der Blutzusatz erst nach $^1/_2$-stündigem Stehen der Gemische von Serum und Seife erfolgte. Ueber die Ursache dieses merkwürdigen Verhaltens kann ich nichts aussagen. In den folgenden Versuchen wurden alle Komponenten auf einmal gemischt. Die Gemische blieben, wenn nicht anders vermerkt ist, zwei Stunden bei 37° und wurden über Nacht im Eisschrank aufbewahrt, bevor das Resultat notiert wurde.

Um die Wirkung der Gemische von Blutserum und Seife auf natives Blut und auf Blut und Amboceptor zu ermitteln, wurden zwei Reihen angesetzt:

Reihe A enthält 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,05 ccm 1-proz. ölsaures Natron + absteigende Mengen aktiven Kaninchenserums.

Reihe B enthält außer den sub A genannten Komponenten noch je 0,015 ccm Amboceptor.

Das Ergebnis ist aus Tabelle 1 ersichtlich:

Tabelle 1.

Mengen des aktiven Kaninchenserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Rinderblut durch Gemische von Seife und aktivem Kaninchenserum	
	A ohne Amboceptor	B mit Amboceptor
0,25	0	komplett
0,15	0	„
0,1	0	„
0,05	0	„
0,025	fast komplett	wenig
0,015	komplett	„
0,01	„	fast komplett
0	„	komplett

Die Tabelle zeigt zunächst, daß Kaninchenserum die durch ölsaures Natron bedingte Hämolyse in hohem Maße aufhebt. Diese Hemmung fehlt bei oberflächlicher Betrachtung scheinbar in Reihe B, in welcher Amboceptor vorhanden ist. Aber dieses Fehlen der antihämolytischen Wirkung ist eben offenbar nur ein scheinbares. Man darf nicht übersehen, daß das aktive Kaninchenserum Komplemente für den zur Verwendung gelangenden Amboceptor enthält, und es entsteht daher die Frage, ob die in B zum Ausdruck kommende Hämolyse ausschließlich den Komplementen des Kaninchenserums oder auch der Gegenwart der Seife zuzuschreiben ist. Allerdings scheint die letztere Möglichkeit von vornherein wenig Wahrscheinliches für sich zu haben. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wird nämlich die Hämolyse in Reihe B durch geringere Mengen Kaninchenserums ebenfalls, wenn auch nur in mäßigem Grade, gehemmt, und diese antihämolytische Wirkung mußte um so mehr auffallen, als beim Fehlen des Amboceptors in Reihe A diese geringen Mengen nicht mehr im stande sind, eine Hemmungswirkung zu entfalten. Andererseits sind die Versuchsbedingungen in A und B insofern different, als in Reihe B außer dem aktiven Serum noch die geringen Mengen des den Amboceptor enthaltenden Serums in Betracht kommen, und es könnte sich daher immerhin um eine Summation hemmender Funktionen handeln.

Aus diesen Gründen schien es wünschenswert, die Versuchsanordnung in mehrfacher Hinsicht zu variieren. Zunächst suchte ich die Komplemente dadurch auszuschalten, daß ich das Kaninchenserum durch $^1/_2$-stündiges Erhitzen auf 56° inaktivierte. Der in Tabelle 2 mitgeteilte Versuch entspricht durchaus dem in Tabelle 1 notierten und weicht nur darin ab, daß das gleiche Kaninchenserum vor dem Gebrauch $^1/_2$ Stunde auf 56° erhitzt war.

Tabelle 2.

Mengen des inaktiven Kaninchenserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Rinderblut durch Gemische von Seife und inaktivem Kaninchenserum	
	A ohne Amboceptor	B mit Amboceptor
0,25	0	0
0,15	0	0
0,1	0	0
0,05	stark	0
0,025	komplett	mäßig
0,015	„	stark
0,01	„	komplett
0	„	„

Wir ersehen also, daß die hämolytische Wirkung der Gemische in Reihe B sofort schwindet, wenn das Serum

inaktiviert ist, und man wird daher nicht fehlgehen, wenn man die in Tabelle 1 wahrzunehmende Hämolyse auf den Komplementgehalt des Kaninchenserums bezieht. Die Hemmung des inaktiven Serums übertrifft sogar bei Gegenwart des Amboceptors noch etwas die bei der Hämolyse von nativem Blut in Erscheinung tretende, und es war nunmehr die Frage zu beantworten, ob dafür die geringen, den Amboceptor enthaltenden Serummengen verantwortlich wären. Um die letzteren auszuschalten, wurde das Rinderblut in der Weise präpariert, daß es mit Amboceptor (im Verhältnis: 1 ccm 5-proz. Blut + 0,015 ccm Amboceptor) eine Stunde lang bei 37° digeriert, sodann durch Zentrifugieren und Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung von den Serumspuren befreit und schließlich in Kochsalzlösung wieder 5 Proz. aufgeschwemmt wurde. Es wurde dann gleichzeitig derart präpariertes und natives Rinderblut verwandt, um den Einfluß des Serums auf die Hämolyse durch ölsaures Natron festzustellen. Gleichzeitig wurde die Hemmungserscheinung auch zeitlich verfolgt, indem das Resultat nach 1, 2 und 20 Stunden notiert wurde.

Der Versuch bestand aus drei Reihen:

Reihe A: je 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,05 ccm 1-proz. ölsaures Natron + absteigende Mengen aktiven Kaninchenserums.

Reihe B: je 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut + 0,05 ccm 1-proz. ölsaures Natron + absteigende Mengen aktiven Kaninchenserums.

Reihe C: je 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut + absteigende Mengen aktiven Kaninchenserums. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3.

Mengen des aktiven Kaninchen-serums	Eingetretene Hämolyse								
	Reihe A nach			Reihe B nach			Reihe C nach		
ccm	1 Std.	2 Std.	20 Std.	1 Std.	2 Std.	20 Std.	1 Std.	2 Std.	20 Std.
0,25	Spur	stark	stark	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
0,15	0	Spur	Spur	„	„	„	„	„	„
0,1	0	0	0	fast kplt.	fast kplt.	„	fast kplt.	„	„
0,05	0	0	0	mäßig	stark	fast kplt.	stark	stark	fastkplt.
0,025	0	mäßig	kompl.	0	Spur	Spur	Spur	wenig	mäßig
0,015	0	„	„	0	0	0	0	Spur	Spur
0,01	0	fast kplt.	„	0	0	0	0	0	0
0	fastkplt.	kompl.	„	0	stark	kompl.	0	0	0

Die Tabelle ist in mehrfacher Hinsicht charakteristisch. Zunächst zeigt sie in Reihe A wiederum die Hemmung der Seifenhämolyse durch Blutserum. Daß in den ersten Röhrchen eine hämolytische Wirkung wahrzunehmen ist, dürfte durch den Gehalt des aktiven Kaninchenserums an normalen Amboceptoren eine hinreichende Erklärung finden. In Reihe B ist zwar an Stelle der in A vorhandenen Hemmung Hämolyse getreten, aber der Grad dieser Hämolyse

ist nicht stärker, ja sogar etwas geringer, als in Reihe C, in der ausschließlich die Komplemente des Kaninchenserums als hämolytisches Agens in Betracht kommen. Auf eine Aktivierung unwirksamer Gemische von Seife und Serum durch Amboceptoren im Sinne Noguchis kann also auch aus diesem Versuch nicht geschlossen werden. Trotz des Präparierens des Blutes war auch hier die hemmende Wirkung des Serums auf die Seifenhämolyse bei Amboceptorengegenwart nicht zu vermeiden, wie sich aus dem unteren Ende der Reihe B ergibt. Dem hohen Grade dieser Wirkung steht allerdings ein Umstand gegenüber, der Beachtung erfordert. Vergleicht man nämlich die ohne Serumzusatz angesetzten Kontrollröhrchen von Reihe A und B, so kann man nicht verkennen, daß die Hämolyse des nativen Blutes durch ölsaures Natron erheblich rascher erfolgt, als diejenige des präparierten Blutes. Es scheint also die Verankerung des Amboceptors an die Blutzelle bereits an und für sich eine Verzögerung der durch Seife bedingten hämolytischen Reaktion herbeizuführen. Bevor wir auf diese Verhältnisse etwas näher eingehen, sei bemerkt, daß man ganz analoge Resultate erhält, wenn man statt des aktiven das inaktivierte Kaninchenserum verwendet. Nur tritt die Hemmung unter diesen Umständen noch markanter in Erscheinung, wie es Tabelle 4 zeigt.

Tabelle 4.

Mengen des inaktiven Kaninchen-serums	Hämolyse durch 0,05 ccm 1-proz. ölsaures Natron + absteigende Mengen inaktiven Kaninchen-serums von	
	A 1 ccm 5-proz. Rinderblut	B 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut
ccm		
0,25	0	0
0,15	0	0
0,1	0	0
0,05	0	0
0,025	Spur	0
0,015	mäßig	0
0,01	fast komplett	0
0	komplett	stark

Auch hier ist zu ersehen, daß das präparierte Blut durch ölsaures Natron in geringerem Grade gelöst wird, als das native. Bei besonderer Prüfung zeigte es sich nun in der Tat, daß das präparierte Blut eine gewisse Resistenz gegenüber der hämolytischen Wirkung der Seife angenommen hat, die besonders bei zeitlicher Beobachtung in Erscheinung tritt. Die Tabelle 5 (s. p. 44) gibt darüber Aufschluß.

Wie diese Resistenz des präparierten Rinderblutes gegenüber der Seifenhämolyse zu erklären ist, muß dahingestellt bleiben. Jedenfalls erscheint dieser Befund insofern bedeutungsvoll,

Tabelle 5.

Mengen der 1-proz. Lösung von ölsaurem Natron	Hämolytische Wirkung des ölsauren Natrons auf			
	A 1 ccm 5-proz. natives Rinderblut		B 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut	
ccm	nach 2 Std.	nach 20 Std.	nach 2 Std.	nach 20 Std.
1,0	komplett	komplett	komplett	komplett
0,5	„	„	„	„
0,25	„	„	fast komplett	„
0,15	„	„	„ „	„
0,1	„	„	stark	„
0,05	„	„	0	stark
0,025	0	Spürchen	0	Spürchen
0,015	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0
0	0	0	0	0

als sich aus ihm berechtigte Zweifel an der Identität von Komplementen und Seifen ergeben. Auch sonst konnten die vorliegenden Versuche die Angaben Noguchis über das Zusammenwirken von Seife und Blutserum nicht bestätigen. Da sie aus äußeren Gründen abgeschlossen werden mußten, können natürlich keine weitgehenden Schlußfolgerungen aus ihnen gezogen werden. Es wäre ja denkbar, daß bei den Variationen der Versuchsanordnung, deren Möglichkeiten zahlreich sind, mit Noguchi übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Die mitgeteilten Befunde sind jedenfalls geeignet, zur Vorsicht in der Deutung zu mahnen, und man darf mit um so größerem Interesse der Mitteilung der ausführlichem Versuchsprotokolle Noguchis entgegensehen.

II. Die Wirkung von Alkali und Säure auf die Komplemente.

In der schon erwähnten Arbeit gibt v. Liebermann[1]) an, daß es gelingt, hämolytische Sera durch Zusatz von Alkali derart zu inaktivieren, daß sie bei Neutralisation der verwendeten Alkalimenge wieder aktiv werden. Diese Befunde stehen in einem gewissen Gegensatz zu bekannten Erfahrungen[2]), nach denen Alkalien in dem Sinne schädigend auf die Komplemente wirken, daß letztere ihre hämolytische Funktion einbüßen. Offenbar hängt das erhaltene Resultat wesentlich von der verwendeten Alkalimenge ab, und es erschien mir daher wünschenswert, die quantitativen Verhältnisse der Alkaliwirkung etwas näher zu untersuchen.

Zu den Versuchen diente Normal-Natronlauge. Bekanntlich wirken die Alkalien an und für sich in größeren Mengen als hämolytische Gifte, und man muß daher bei Beurteilung der Versuchsergebnisse eine

1) Liebermann, L. v., l. c.

2) Cf. Ehrlich, P. und Sachs, H., Ueber die Vielheit der Komplemente des Serums. Berl. klin. Wochenschr., 1902, No. 14 u. 15.

etwa durch Natronlauge bedingte Hämolyse in Berücksichtigung ziehen. Als Blut diente 1 ccm 5-proz. Rinderblut, als Amboceptor 0,015 ccm des auch zu den vorangehenden Versuchen benutzten Immunserums, als Komplement frisches Meerschweinchenserum. Um einen Einblick in die Wirkung der Natronlauge auf das Komplement zu erhalten, wurde folgendermaßen verfahren.

Absteigende Mengen n. NaOH (mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und auf gleiches Volumen gebracht) wurden mit je 0,05 ccm ($^1/_2 \cdot 0{,}1$) Meerschweinchenserum (2—3faches Multiplum der komplett lösenden Dose) 2 Stunden lang im Eisschrank digeriert. Zwei gleiche derartige Reihen wurden angesetzt:

Reihe A: erhielt dann Zusatz von je 0,5 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung + 0,015 ccm Amboceptor + 1 ccm 5-proz. Rinderblut.

Zu Reihe B wurden absteigende Mengen (Volumen 0,5 ccm) n. Salzsäure zugefügt, die den vorher verwandten Natronlaugemengen äquivalent waren. Außerdem je 0,015 ccm Amboceptor + 1 ccm 5-proz. Rinderblut.

Die eingetretene Hämolyse wurde nach $1^1/_2$ und 20 Stunden notiert (cf. Tabelle 6).

Tabelle 6.

Mengen der n. NaOH	Eingetretene Hämolyse			
	Reihe A nach		Reihe B nach	
ccm	$1^1/_2$ Std.	20 Std.	$1^1/_2$ Std.	20 Std.
$\frac{1}{50}$ n. 0,5	0	mäßig	0	0
0,4	0	„	0	Spürchen
0,35	0	wenig	0	Spur
0,3	0	„	Spur	stark
$\frac{1}{100}$ n. 0,5	0	„	komplett	komplett
0,45	0	„	„	„
0,4	Spur	mäßig	„	„
0,35	komplett	komplett	„	„
0,3	„	„	„	„
0,25	„	„	„	„
0,2	„	„	„	„
0	„	„	„	„

Das Versuchsresultat, welches sich aus der Tabelle ergibt, ist besonders nach $1^1/_2$-stündiger Beobachtung sehr eklatant. In beiden Reihen sehen wir, daß größere Mengen der Natronlauge die Komplementwirkung aufgehoben haben, und zwar ist das Komplement dauernd inaktiviert, da es (Reihe B) auch nach dem Neutralisieren mit Salzsäure nicht wieder wirksam wird. Auffallend ist übrigens das gänzliche Ausbleiben der Hämolyse in den ersten Röhrchen der Reihe A insofern, als die darin enthaltenen Natronlaugemengen zur hämolytischen Wirkung genügen. Augenscheinlich wird aber durch die gleichzeitige Gegenwart des Blutserums die Natronlaugehämolyse gehemmt, wohl durch Reaktionen, welche sich zwischen den Eiweißstoffen und Alkalien abspielen. Nach längerer Zeit (20 Stunden)

ist auch eine hämolytische Wirkung zu bemerken, die wir auf die alkalische Reaktion des Mediums beziehen müssen, die aber doch den Grad der unter sonst gleichen Bedingungen beim Fehlen des Serums eintretenden Hämolyse nicht erreicht. Sehr markant wird nun der Unterschied zwischen Reihe A und B, wenn wir diejenigen Glieder der Reihe, welche mittlere Alkalimengen ($\frac{1}{100}$ n. 0,5—0,4 ccm NaOH) enthalten, betrachten. Während hier in Reihe A unter dem Einfluß der schwach alkalischen Reaktion die Komplementwirkung aufgehoben ist, tritt sie nach dem Neutralisieren in Reihe B wieder in vollem Umfange in Erscheinung. Es bestehen also in dieser Zone solche Verhältnisse, wie sie durch v. Liebermann beschrieben worden sind. Bei einer gewissen Konzentration von NaOH ist das Komplement unwirksam, wird aber durch genaues Neutralisieren wieder aktiviert. Während also Alkali in großen Mengen die Komplemente zerstört, resp. dauernd inaktiviert, bedingt es in geringerer Konzentration eine Inaktivierung des Komplements, welche reversibel ist. Das derart inaktivierte Komplement kann in Bestätigung der Angaben von Liebermanns wieder zu der wirksamen Form restituiert werden.

Es fragte sich nun, wie sich die Komplemente bei der Einwirkung von Salzsäure verhalten. Schon Ehrlich und Morgenroth[1]) hatten beobachtet, daß Salzsäure die Komplemente dauernd inaktiviert. Immerhin war aber die Möglichkeit gegeben, daß bei einer geeigneten Säurekonzentration, ebenso wie bei der Natronlaugewirkung, die Inaktivierung ein reversibler Vorgang ist. Ich verfuhr daher in ganz analoger Weise.

Absteigende Mengen Normal-Salzsäure wurden mit je 0,05 ccm ($^1/_2 \cdot 0{,}1$) Meerschweinchenserum 2 Stunden lang im Eisschrank digeriert, in zwei gleichen Reihen:

Reihe A: erhielt dann Zusatz von je 0,5 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung + 0,015 ccm Amboceptor + 1 ccm 5-proz. Rinderblut.

Zu Reihe B wurden absteigende Mengen Normal-Natronlauge zugefügt, die den vorher verwandten Säuremengen äquivalent waren. Außerdem: je 0,015 ccm Amboceptor + 1 ccm 5-proz. Rinderblut.

Die eingetretene Hämolyse zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7.

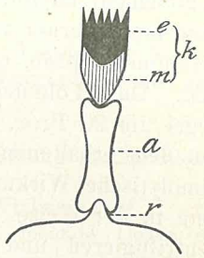
Mengen der n. HCl ccm	Eingetretene Hämolyse	
	Reihe A	Reihe B
$\frac{1}{50}$ n. 0,35	0	0
0,3	0	0
$\frac{1}{100}$ n. 0,5	0	0
0,45	Spur	Spur
0,4	stark	stark
0,35	komplett	komplett

1) Ehrlich, P. und Morgenroth, J., Ueber Hämolysine. II. Mitteilg. Berl. klin. Wochenschr., 1899, No. 22.

Aus Tabelle 7 ergibt sich, daß Salzsäure ebenso wie Natronlauge das Komplement inaktiviert. Die Wirkung der Salzsäure unterscheidet sich aber insofern von derjenigen der Natronlauge, als eine Restitution des Komplements durch Neutralisieren auch bei mäßigem Säuregrade nicht gelingt.

III. Ueber das Verhalten der Komplemente bei der Dialyse.

Die folgenden Untersuchungen schließen sich unmittelbar an Versuchsergebnisse von Brand[1]) an, über welche vor kurzem berichtet wurde. Brand konnte zunächst das von Ferrata[2]) unter Morgenroths Leitung entdeckte Phänomen bestätigen, daß nämlich bei der Dialyse des Meerschweinchenserums das hämolytische Komplement in zwei Komponenten zerfällt, von denen die eine in dem bei der Dialyse ausfallenden Globulinniederschlag, die andere in der Flüssigkeit enthalten ist. Jede dieser Komponenten ist an und für sich unwirksam, ihre Vereinigung in salzhaltiger Lösung führt zur Wiederherstellung des wirksamen Komplementes. In Verfolg dieser wichtigen Tatsachen konnte Brand feststellen, daß von den amboceptorbeladenen Blutzellen lediglich die im



Figur 1. Schema der Komplementwirkung nach Brand. r = Receptor der Blutzelle; a = Amboceptor; m = Mittelstück; e = Endstück; $k = m + e$: Komplement.

Sediment enthaltene Komponente gebunden wird, die Komponente des Abgusses dagegen in keinen Beziehungen zu dem Komplex „Receptor—Amboceptor“ steht. Es lag daher nahe anzunehmen, daß die Beziehungen zwischen den beiden Komponenten analoge sind, wie diejenigen zwischen Amboceptor und Komplement nach der Amboceptortheorie, und auf Grund dieser Anschauung wurde die Sedimentkomponente „Mittelstück“, die Abgußkomponente „Endstück“ benannt.

Die Wirkung des Komplementes kann man sich daher, unter Berücksichtigung der von Ferrata und Brand erhobenen Befunde im Sinne der obigen, der Arbeit von Brand entnommenen schematischen Darstellung vorstellen (s. Fig. 1).

Brand berichtet ferner über ein sehr eigenartiges Verhalten des Mittelstückes. Während es nämlich in Wasser aufgeschwemmt, seine

1) Brand, E., Ueber das Verhalten der Komplemente bei der Dialyse. Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 34.

2) Ferrata, A., Die Unwirksamkeit der komplexen Hämolysine in salzfreien Lösungen und ihre Ursache. Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 13.

Fähigkeit durch das Endstück zum wirksamen Komplement restituiert zu werden, bewahrt, büßt es dieselbe in physiologischer Kochsalzlösung rasch ein. Aber es gelingt im letzteren Falle, die volle Komplementwirkung zu erhalten, wenn man das in Kochsalzlösung aufbewahrte Mittelstück isoliert an die amboceptorbeladenen Blutzellen binden läßt und erst zu den durch Zentrifugieren erhaltenen Blutsedimenten das Endstück fügt.

Es schien von großem Interesse zu sein, in die Ursachen, welche der eigentümlichen Veränderung des Mittelstückes in physiologischer Kochsalzlösung zu Grunde liegen, einen näheren Einblick zu erhalten. Meine Versuchsanordnung schließt sich eng an diejenige von Brand an. Als Blut diente je 1 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung von Rinderblut (serumfrei gewaschen) in physiologischer Kochsalzlösung, als Amboceptor das inaktivierte Serum eines mit Rinderblut vorbehandelten Kaninchens, von welchem 0,0015 ccm genügten, um 1 ccm 5-proz. Rinderblut unter Mitwirkung von 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement komplett zu lösen. Als Komplement wurde stets Meerschweinchenserum verwandt. Die Dialyse, welche in Fischblasen vorgenommen wurde, erfolgte gegen fließendes Leitungswasser 24 Stunden lang. Das Volumen des Meerschweinchenserums war dabei in der Regel um 20 Proz. gestiegen (von 15,0 auf 18,0 ccm). Zuweilen wurde von dem erhaltenen Gesamtdialysat ein kleiner Teil zur Prüfung auf hämolytische Wirkung entnommen. Im übrigen geschah die Verarbeitung in der Weise, daß die das Endstück enthaltende Flüssigkeit durch Zentrifugieren und Filtrieren geklärt wurde. Dieser Abguß wird mit A bezeichnet. Das Sediment wurde wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich auf das entsprechende Volumen des Gesamtdialysats mit Wasser aufgefüllt. Sollte das Sediment in verschiedenen Medien aufbewahrt werden, so wurden abgemessene Teile der Aufschwemmung in Wasser nochmals zentrifugiert und die Niederschläge mit der betreffenden Flüssigkeit (Wasser, 0,85-proz. Kochsalzlösung, 7,8-proz. Rohrzuckerlösung) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

Wir bezeichnen mit:

B: das in Kochsalzlösung aufgenommene Sediment;

C: das in Wasser aufgenommene Sediment;

D: das in 7,8-proz. Rohrzuckerlösung aufgenommene Sediment.

Das durch Kochsalzlösung alterierte Mittelstück (B) wird in folgendem kurz „Kochsalzmittelstück“ benannt.

Zur Prüfung gelangten meist 5-fache Verdünnungen der Materialien in physiologischer Kochsalzlösung, die unmittelbar vor Gebrauch hergestellt wurden. Kamen Mischungen von Mittelstück und Endstück zur Verwendung, so wurde je 1 Teil der beiden Komponenten in 3 Teilen physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Zunächst suchte ich mich davon zu überzeugen, ob das Mittelstück

auch dann in ungeänderter Weise wirkt, wenn das bei der Dialyse erhaltene Sediment in isotonischer (7,8-proz.) Rohrzuckerlösung aufbewahrt wird. Das ist in der Tat der Fall. Rohrzuckerlösung und Wasser verhalten sich in Bezug auf die Konservierung des Mittelstückes ganz analog, während Kochsalzlösung die schon erörterte Alteration bedingt. Schon Brand hat darauf hingewiesen, daß diese Labilität des Mittelstückes in Kochsalzlösung dafür spricht, daß im Blutserum Mittelstück und Endstück zum wirksamen Komplement vereinigt sind. Denn im Blutserum sind ja durch den Salzgehalt die Bedingungen gegeben, welche zu einer raschen Unwirksamkeit des freien Mittelstückes führen müßten. Demgegenüber könnte man allerdings einwenden, daß die bei der Dialyse erhaltenen Serumkomponenten vielleicht überhaupt nicht mit den im nativen Serum bestehenden Verhältnissen in Parallele gesetzt werden dürfen. Es schien daher wünschenswert, noch festzustellen, wie sich dialysiertes Serum in seiner Gesamtheit gegenüber dem Einfluß des Salzes verhält. Ich verfuhr folgendermaßen:

Meerschweinchenserum wurde 24 Stunden lang dialysiert. Sodann wurden je 1,5 ccm des gut durchgeschüttelten Gesamtdialysats entnommen.

Probe I wurde mit 0,15 ccm Wasser,

Probe II mit 0,15 ccm einer 10-proz. Kochsalzlösung (entsprechend einem Salzgehalt von 0,91 Proz.) versetzt.

Von beiden Proben wurde die aktivierende Wirkung auf 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,015 ccm Amboceptor (ca. 10 lösende Dosen ermittelt und zwar sofort nach der Gewinnung und nach 24-stündigem Lagern. Zur Anwendung gelangten 5-fache Verdünnungen der beiden Proben in physiologischer Kochsalzlösung.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8.

Mengen des Dialysats	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,015 ccm Amboceptor durch			
	I. dialysiertes Meerschweinchenserum		II. dialysiertes und wieder besalzenes Meerschweinchenserum	
ccm	sofort	nach 24 Std.	sofort	nach 24 Std.
0,2	komplett	komplett	komplett	komplett
0,1	„	„	„	„
0,05	„	„	„	„
0,03	fast komplett	fast komplett	„	„
0,02	stark	stark	fast komplett	stark
0,01	wenig	mäßig	mäßig	mäßig
0,005	Spur	Spur	Spur	Spur
0	0	0	0	0

Sieht man von äußerst geringfügigen Differenzen, die wohl durch die Grenzen der Methodik bedingt sind, ab, so ergibt sich aus der Tabelle eine gute Uebereinstimmung der hämolytischen Wirkung in allen vier Reihen. Das besalzene Gesamt-

dialysat hat sich also ebenso stabil erwiesen, wie das salzfreie, und man kann daraus schließen, daß sich einerseits die Verhältnisse im nativen und dialysierten Serum durchaus entsprechen, und daß andererseits auch die durch Dialyse getrennten Komponenten sich bei Gegenwart von Salz wieder zum wirksamen Komplement vereinigen, ohne daß es dazu erst der Bindung des Mittelstücks an die amboceptorbeladene Zelle bedarf.

Meine weiteren Studien waren zunächst der Frage gewidmet, welcher Art die Veränderung des Mittelstücks in physiologischer Kochsalzlösung ist. Nach der bereits durch Brand entdeckten Tatsache, daß das Kochsalzmittelstück untauglich zur Hämolyse im direkten Mischungsversuch ist, aber noch zur Wirkung gelangt, wenn es isoliert an die amboceptorbeladene Blutzelle gebunden wird, hätte man glauben können, daß es sich um eine antagonistische Wirkung handele, welche gegen das Endstück gerichtet ist, und deren Träger durch die vorherige Bindung des Mittelstückes an den Amboceptor und das Entfernen der Zwischenflüssigkeit eliminiert wird. Allerdings kann man sich das Entstehen eines solchen neuartigen Körpers nur schwer vorstellen, und das Experiment zeigte auch, daß diese Annahme nicht zutreffend sein dürfte. Unterläßt man nämlich das Entfernen der Zwischenflüssigkeit nach der Verankerung des in Kochsalzlösung aufbewahrten Mittelstückes an die amboceptorbeladene Blutzelle, so tritt nach Zusatz des Endstückes ebenfalls Hämolyse ein. Der entsprechende Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt:

Meerschweinchenserum wurde 24 Stunden lang dialysiert, sodann Abguß (A) und Sediment in der üblichen Weise gewonnen, letzteres in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (B). Nach 24-stündigem Lagern von A und B wurden die folgenden Versuchsreihen ausgeführt:

Reihe I: 1 ccm 5-proz. präpariertes[1]) (0,015 ccm Amboceptor) Rinderblut + absteigende Mengen einer 5-fachen Verdünnung von A + B.

Reihe II: 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut + absteigende Mengen B (5-fache Verdünnung) bleiben 1 Stunde bei 37°, dann zentrifugieren, zu den Sedimenten werden entsprechende absteigende Mengen A gefügt (Gesamtvolumen 2 ccm).

Reihe III: Sedimente von je 1 ccm präparierten 5-proz. Rinderblut + absteigende Mengen B werden 1 Stunde bei 37° gehalten, sodann wird direkt A in entsprechenden Mengen zugesetzt.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 9.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß es durchaus nicht notwendig ist, die das Kochsalzmittelstück enthaltende

1) Das Präparieren wurde in der Weise vorgenommen, daß Blut mit Amboceptor in entsprechendem Verhältnis 1 Stunde bei 37° digeriert wurde. Sodann wurde die Zwischenflüssigkeit durch Zentrifugieren und Waschen entfernt und das Blut wieder 5-proz. in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Tabelle 9.

Mengen der 5-fachen Verdünnungen ccm	Eingetretene Hämolyse		
	Reihe I	Reihe II	Reihe III
1,0	Spur	komplett	komplett
0,5	Spürchen	"	"
0,25	0	"	"
0,15	0	fast komplett	fast komplett
0,1	0	stark	stark
0,05	0	Spur	wenig
0,025	0	0	Spürchen
0	0	0	0

Flüssigkeit nach der Bindung des Mittelstückes an das amboceptorbeladene Blut zu entfernen, um eine Hämolyse durch das Endstück zu erzielen. Die Annahme, daß in dem in Kochsalzlösung aufbewahrten Sediment neben dem Mittelstück noch ein zweiter Stoff, welcher die Wirkung des Endstückes hemmt, wirkt, verliert dadurch bereits sehr an Wahrscheinlichkeit.

Gleichwohl erwies sich das in Kochsalzlösung aufbewahrte Sediment geeignet, die Hämolyse durch wirksames Komplement — natives Meerschweinchenserum — zu hemmen, eine Hemmung, die durch das in Wasser aufgenommene Mittelstück natürlich niemals zu erzielen ist. In gleicher Weise wirkte das Kochsalzsediment auch antilytisch gegenüber der kombinierten Wirkung von Endstück und Mittelstück (A + C). Es zeigte sich hier das eigenartige Verhalten, daß die durch das Kochsalzsediment verursachte Hemmung erheblich markanter in Erscheinung tritt, wenn Kochsalzsediment (B) mit A + C gleichzeitig digeriert wird, als wenn es zunächst mit dem Endstück (A) allein digeriert ist und erst später der Zusatz des wirksamen Mittelstückes (C) erfolgt. Ich lasse einen entsprechenden Versuch folgen:

Es werden zwei Reihen angesetzt:

Reihe I. Mischungen von absteigenden Mengen Kochsalzsediment (B) und gleichen Mengen (0,04 ccm) Endstück werden ½ Stunde bei 37° digeriert, sodann erfolgt Zusatz von je 0,04 ccm Mittelstück (C) + 0,015 ccm Amboceptor + 1 ccm 5-proz. Rinderblut.

Reihe II. Absteigende Mengen Kochsalzsediment (B) + 0,04 ccm A + 0,04 ccm C werden ½ Stunde bei 37° digeriert, sodann Zusatz von 0,015 ccm Amboceptor + 1 ccm 5-proz. Rinderblut.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 10 (s. p. 52).

Dieser Versuch zeigt also, daß die durch das Kochsalzsediment bedingte Hemmung erheblich intensiver ist, wenn alle 3 Komponenten (A, B und C) vor dem Blut- und Amboceptorzusatz gemischt werden, als wenn das Kochsalzsediment nur mit dem Endstück A digeriert wird und der Zusatz des wirksamen Mittelstücks (C) erst später erfolgt. Die Erklärung für dieses Verhalten ist wohl darin

Tabelle 10.

Mengen von B ccm	Eingetretene Hämolyse	
	Reihe I	Reihe II
0,2	mäßig	0
0,1	stark	0
0,05	fast komplett	0
0,03	„ „	Spur
0,02	„ „	mäßig
0,01	„ „	stark
0,005	komplett	fast komplett
0	„	komplett

zu suchen, daß im ersten Falle das Mittelstück C eine Zeitlang bei 37° in Kochsalzlösung gehalten wird. An und für sich ist darin allerdings keine Ursache für die Inaktivität gegeben, da ja gleichzeitig das Endstück A vorhanden ist, und die Kontrolle in Reihe II zeigt ja auch, daß Hämolyse eintritt, wenn Endstück und Mittelstück gleichzeitig in Kochsalzlösung digeriert werden. Diese Tatsache steht im Einklang mit dem bereits mitgeteilten Befund, daß Gemische von Endstück und Mittelstück, resp. die Gesamtdialysate in Kochsalzlösung haltbar sind. Wenn nun andererseits die gleichzeitige Gegenwart des Kochsalzmittelstücks B Gemische von Endstück und Mittelstück unwirksam macht, so liegt die Annahme nahe, daß das Mittelstück in Kochsalzlösung derart alteriert wird, daß es eine höhere Avidität zum Endstück erhält, mit anderen Worten, daß das Kochsalzmittelstück eine größere Verwandtschaft zum Endstück besitzt, als das native (in Wasser aufbewahrte) Mittelstück. Wenn dem so ist, so wird in der Tat das Ergebnis der Tabelle 10 verständlich. In Reihe II wird dann nämlich das Endstück durch das Kochsalzmittelstück gebunden, das Mittelstück C bleibt auf diese Weise frei in Kochsalzlösung und geht daher die bekannte Veränderung ein. Es wird selbst hemmend und verstärkt die antilytische Wirkung des Kochsalzmittelstücks. In Reihe I liegen die Bedingungen insofern andersartig, als hier das Kochsalzmittelstück zunächst nur mit dem Endstück digeriert ist. Das erst nachträglich zugefügte Mittelstück C ist in voller Wirksamkeit vorhanden und kann noch geringe frei gebliebene Mengen des Endstücks zur Wirkung bringen, so daß die Hemmung der Hämolyse, wenn auch ausgesprochen, nicht den hohen Grad erreicht.

Was nun das Verhalten des Kochsalzmittelstücks bezüglich der Hämolyse anlangt, so darf ich daran erinnern, daß amboceptorbeladenes Blut durch ein Gemisch von Endstück und Kochsalzmittelstück nicht gelöst wird, aber noch der Hämolyse anheimfällt, wenn die beiden Komponenten successive zugesetzt werden. Von der erörterten Auffassung ausgehend, daß das Kochsalzmittelstück mit dem Endstück besonders avide reagiert, müssen wir nun weiter folgern, daß die Verbindung „Endstück—Kochsalzmittelstück“ ihre Reaktionsfähigkeit mit der amboceptorbeladenen Zelle eingebüßt hat, während, wie wir wissen, das freie Kochsalzmittelstück von der amboceptorbeladenen Blutzelle noch gebunden wird. Derartige Beeinflussungen der Reaktionsfähigkeit einer Gruppe durch die Besetzung einer anderen sind ja in der Immunitätsforschung zahlreich bekannt. Es sei besonders an die vielfach bei den Amboceptoren beobachteten Erscheinungen dieser Art erinnert. So berichten z. B. Ehrlich und Marshall[1]) über Aviditätssteigerungen, Ehrlich und Sachs[2]) über Aviditätsverschiebungen im negativen Sinne, welche durch die Besetzung anderer komplementophiler Amboceptorgruppen vermittelt werden.

Fig. 2.

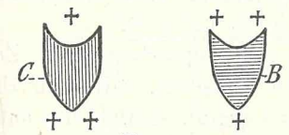


Fig. 3.

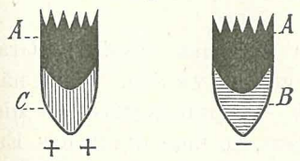


Fig. 4.

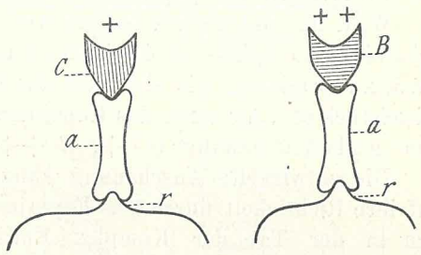


Fig. 2. Veränderung des Mittelstücks in Kochsalzlösung. C = natives Mittelstück; B = Kochsalzmittelstück.

Fig. 3. Verbindungen von Mittelstück und Endstück. A = Endstück; C = natives Mittelstück; B = Kochsalzmittelstück.

Fig. 4. Verhalten des Mittelstücks nach der Verankerung an die amboceptorbeladene Blutzelle. r = Receptor der Blutzelle; a = Amboceptor; C = natives Mittelstück; B = Kochsalzmittelstück.

Die Veränderungen, denen das Mittelstück in Kochsalzlösung unterliegt, kann man sich danach folgendermaßen vorstellen: Die Avidität des Mittelstücks zum Endstück wird durch den Aufenthalt in Kochsalzlösung erhöht, und durch die Reaktion zwischen Endstück und Kochsalzmittelstück verliert letzteres seine an und für sich noch vorhandene, aber vielleicht bereits verringerte Reaktionsfähigkeit mit der amboceptorbeladenen Zelle. Daher kommt es, daß bei successivem Zusatz von Kochsalzmittelstück und Endstück Hämolyse eintritt, daß dagegen bei gleichzeitigem Zufügen von beiden Komponenten durch die rasch erfolgende Verbindung derselben die Hämolyse vereitelt wird.

1) Ehrlich, P. und Marshall, H. T., Ueber die komplementophilen Gruppen der Amboceptoren. Berl. klin. Wochenschr., 1902, No. 25.

2) Ehrlich, P. und Sachs, H., Ueber den Mechanismus der Antiamboceptorwirkung. Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 19/20.

Die einschlägigen Verhältnisse dürften durch die vorstehenden Schemen veranschaulicht werden.

In Figur 2 sind die Alterationen dargestellt, welche das Mittelstück in Kochsalzlösung erfährt. Das ursprüngliche, in Wasser aufbewahrte Mittelstück (*C*) reagiert mit dem Endstück (+) und hat eine hohe Avidität zur amboceptorbeladenen Zelle (++). Das Kochsalzmittelstück (*B*) besitzt eine gesteigerte Avidität zum Endstück (++) und reagiert, aber vielleicht weniger stark, mit der amboceptorbeladenen Zelle (+).

Figur 3 betrifft die aus der Vereinigung von Mittelstück und Endstück resultierenden Komplexe. Die aus Endstück und nativem Mittelstück (*A—C*) entstehende Verbindung reagiert ungeschwächt mit der amboceptorbeladenen Zelle (++). Die Vereinigung von Endstück und Kochsalzmittelstück (*A—B*) führt zu einem Reaktionsprodukt, das die Avidität zur präparierten Zelle verloren hat (—).

Wird das Mittelstück isoliert von der amboceptorbeladenen Zelle gebunden, so behält es in jedem Falle die Fähigkeit, mit dem Endstück zu reagieren, wie sich dies aus Figur 4 ergibt. Sowohl das native Mittelstück (*C*), als auch das Kochsalzmittelstück (*B*) haben die Avidität zum Endstück bewahrt (*C* +, *B* ++).

Die entwickelte Anschauung kann bis zu einem gewissen Grade auf ihre Richtigkeit durch das Experiment geprüft werden. Wenn nämlich in der Tat der Komplex Endstück—Kochsalzmittelstück nicht mehr mit den präparierten Blutzellen reagiert, so muß durch das Endstück die Bindung des Kochsalzmittelstücks verhindert werden. Letzteres wird ja isoliert von den amboceptorbeladenen Blutzellen verankert, und die erfolgte Verankerung kann dadurch nachgewiesen werden, daß das derart vorbehandelte Blut durch das Endstück gelöst wird. Wenn also das Endstück die Bindung des Kochsalzmittelstückes hemmt, so dürfen die mit einem Gemisch von beiden digerierten präparierten Blutzellen durch Zusatz des Endstücks nicht mehr gelöst werden. In der Tat konnte ich nachweisen, daß dies der Fall ist. Diese Verhältnisse lassen sich besonders deutlich zur Darstellung bringen, wenn man die Blutzellen nicht mit einer zu großen Amboceptormenge präpariert. Einmal werden nämlich an stark präparierten Blutkörperchen offenbar auch minimale Mengen freien Kochsalzmittelstücks gebunden, so daß es unter diesen Umständen schwer ist, eine vollständige Aufhebung der Hämolyse zu erzielen, wenn auch die Hemmung recht markant ist. Dann aber wirkt das Endstück auf stark präpariertes Blut, wie dies schon Brand angibt, sehr oft bereits an und für sich mehr oder weniger stark hämolytisch. Jedenfalls ergeben sich bei einer geringeren Amboceptormenge erheblich durchsichtigere Versuchsbedingungen. Das zum folgenden Versuch dienende Blut war in der Weise präpariert, daß je 1 ccm 5-proz. Blutaufschwemmung mit je 0,0067 ($^1/_{15}$. 0,1) ccm Amboceptor vorbehandelt wurde.

Es werden Gemische von je 0,05 ($^1/_5$. 0,25) ccm B und absteigende Mengen A $^1/_2$ Stunde bei 37° digeriert, sodann wird überall 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut zugesetzt. Nach einstündigem Verweilen bei 37° wird zentrifugiert, die Zwischenflüssigkeit abgegossen, und die Blutsedimente werden in Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,04 ($^1/_5$. 0,2) ccm A aufgenommen.

Das aus Tabelle 11 zu ersehende Ergebnis ist nach 3 und nach 20 Stunden notiert.

Tabelle 11.

Mengen von A ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. präparierten (0,0067 ccm Amboceptor) Rinderblut		
	durch Gemische von 0,05 ccm B + absteigende Mengen A	durch 0,04 ccm A nach Vorbehandeln mit Gemischen von 0,05 ccm B + absteigenden Mengen A	
		nach 3 Std.	nach 20 Std.
0,2	mäßig	0	Spürchen
0,1	Spur	0	"
0,05	0	0	"
0,03	0	0	"
0,02	0	0	"
0,01	0	0	"
0,005	0	0	"
0,003	0	0	"
0,002	0	Spürchen	"
0,001	0	Spur	wenig
0,0005	0	wenig	mäßig
0	0	komplett	komplett

Das in der Tabelle zum Ausdruck gebrachte Versuchsergebnis wird also der gestellten Forderung vollständig gerecht. Es zeigt sich in der Tat, daß das Endstück A die Bindung des Kochsalzmittelstücks B an die amboceptorbeladene Zelle verhindert, und es ist sogar auffallend, wie geringe Mengen des Endstücks zu dieser antagonistischen Wirkung ausreichen können. Nach 3-stündiger Beobachtung ist der Ausfall des Versuches absolut beweisend, aber auch die nach 20 Stunden zu bemerkende äußerst geringgradige Hämolyse kann an den Konsequenzen dieses Ergebnisses nichts ändern. Auch diese Befunde sprechen gegen die Annahme, daß in dem Kochsalzsediment neben dem Mittelstück eine zweite antilytische Substanz vorhanden ist. Denn man würde dabei nicht verstehen können, warum die Bindung des Mittelstücks dann ausbleibt. Dagegen ist das Ergebnis im Sinne der diskutierten Anschauung verständlich, nach welcher eben das durch Kochsalz veränderte Mittelstück und der hemmende Stoff eine einheitliche Substanz (B) darstellt, die nach primärer Bindung an die amboceptorbeladene Zelle die Hämolyse vermittelt, nach primärer Vereinigung mit dem Endstück aber ihre Reaktionsfähigkeit einbüßt und dann antilytisch wirkt.

Weitere Untersuchungen betrafen die Beziehungen der beiden Komponenten: Mittelstück und Endstück zu den amboceptorbeladenen Blutzellen. Zwar war bereits durch BRAND im Prinzip entschieden, daß nur das Mittelstück von dem Komplex „Receptor—Amboceptor" gebunden wird, das Endstück also erst nach der Vereinigung des Mittelstückes mit den amboceptorbeladenen Blutzellen reagiert. Aber es schien doch weiterhin von Interesse zu sein, die näheren Details dieser Reaktionen zu untersuchen, und die von EHRLICH und MORGENROTH[1]) aufgefundene grundlegende Tatsache, daß bei niedriger Temperatur nur der Amboceptor, nicht das Komplement gebunden wird, drängte dazu, speziell die Abhängigkeit der Bindungsverhältnisse von der Temperatur zu prüfen.

Ich verfuhr folgendermaßen:

In zwei Parallelreihen wurden je 1 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut (0,015 ccm Amboceptor) und absteigende Mengen der 5-fachen Verdünnung des Mittelstückes:

a) 1 Stunde bei 37°,

b) $1^1/_2$ Stunden bei 0° digeriert.

Sodann wurden die durch Zentrifugieren von der Zwischenflüssigkeit befreiten Blutsedimente in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,03 ccm ($^1/_5$. 0,15) Endstück (A) aufgenommen.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12.

Mengen von C ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. präparierten Rinderblut durch		
	C	0,03 ccm A nach Vorbehandeln mit C	
		bei 37°	bei 0°
0,2	mäßig	komplett	komplett
0,1	wenig	„	„
0,05	Spur	„	„
0,03	0	„	„
0,02	0	„	fast komplett
0,01	0	fast komplett	mäßig
0,005	0	wenig	wenig
0	0	0	0

Aus der Tabelle geht unzweifelhaft hervor, daß das Mittelstück C auch bei 0° von den amboceptorbeladenen Blutzellen gebunden wird, wenn auch die Möglichkeit gegeben ist, daß die Bindung bei 0° langsamer erfolgt, als bei höherer Temperatur.

Um nun die Abhängigkeit der Beziehungen des Endstücks zu dem bereits gebundenen Mittelstück von der Temperatur zu ergründen, wurde in der Weise vorgegangen, daß zunächst präpariertes Blut mit dem Mittelstück bei 37° vorbehandelt wurde.

1) EHRLICH, P. und MORGENROTH, J., Zur Theorie der Lysinwirkung. Berl. klin. Wochenschr., 1899.

25 ccm 5-proz. präpariertes Rinderblut (auf 1 ccm 5-proz. Aufschwemmung: 0,015 ccm Amboceptor) wurden mit 2,5 ccm Mittelstück (B) + 22,5 ccm Kochsalzlösung eine Stunde bei 37° digeriert. Sodann wurde das durch Zentrifugieren erhaltene Sediment mit physiologischer Kochsalzlösung auf 25 ccm aufgefüllt. Die derart gewonnene 5-proz. mit Amboceptor + Mittelstück beladene Blutaufschwemmung diente zu dem weiteren Versuch. Je 1 ccm derselben wird mit absteigenden Mengen von Endstück digeriert, und zwar.

Reihe I und II $1^1/_2$ Stunden bei 0°, Reihe III: direkt bei 37°.

Nach $1^1/_2$-stündigem Aufenthalt von Reihe I und II bei 0° werden die Röhrchen der Reihe I zentrifugiert und die nach dem Abgießen der farblosen Flüssigkeit erhaltenen Blutsedimente in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Reihe II kommt direkt (ohne Zentrifugieren) in den Brutschrank.

Das Versuchsresultat ist aus Tabelle 13 zu ersehen.

Tabelle 13.

Mengen von A ccm	Eingetretene Hämolyse		
	Reihe I	Reihe II	Reihe III
0,2	komplett	komplett	komplett
0,1	stark	„	„
0,05	wenig	„	„
0,03	0	„	„
0,02	0	„	„
0,01	0	stark	stark
0,005	0	Spur	Spur
0	0	0	0

Der gleiche Versuch wurde mit der Variante wiederholt, daß das Rinderblut mit einer geringeren Amboceptormenge (auf 1 ccm 5-proz. Blut: 0,002 ccm Amboceptor) präpariert war. Der in Tabelle 14 notierte Versuch entspricht im übrigen in Bezug auf Anordnung und Mengenverhältnisse durchaus dem vorangehenden.

Tabelle 14.

Mengen von A ccm	Eingetretene Hämolyse		
	Reihe I	Reihe II	Reihe III
0,2	0	komplett	komplett
0,1	0	mäßig	stark
0,05	0	Spur	wenig
0,03	0	Spürchen	Spur
0,02	0	0	Spürchen
0,01	0	0	0
0,005	0	0	0
0	0	0	0

In der folgenden Tabelle 15 sollen noch die Kontrollen angeführt werden, welche die hämolytische Wirkung des Endstückes A auf präpariertes Blut, das nicht weiter mit Mittelstück vorbehandelt war, betreffen.

Tabelle 15.

Mengen von A ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. präparierten Rinderbluts durch A	
	0,015 ccm Amboceptor. Kontrolle zu Tabelle 13	0,002 ccm Amboceptor. Kontrolle zu Tabelle 14
0,2	fast komplett	0
0,1	mäßig	0
0,05	„	0
0,03	wenig	0
0,02	Spur	0
0,01	Spürchen	0
0,005	0	0
0	0	0

Eine Durchsicht der mitgeteilten Tabellen 13—15 zeigt deutlich, daß die Bindung des Endstückes an das verankerte Mittelstück bei 0° ausbleibt. Die Beziehungen des Endstückes zum Mittelstück bei niedriger Temperatur differieren also markant von denjenigen des Mittelstücks zu der amboceptorbeladenen Zelle. Diese Feststellung erscheint von besonderem Interesse. Wenn die Schlußfolgerungen, die man bisher aus den Kältetrennungsversuchen von Ehrlich und Morgenroth gezogen hat, und nach welchen bei 0° eine Trennung des aktiven hämolytischen Serums zwischen Amboceptor und Komplement erfolgt, richtig sind, so hätte man eigentlich erwarten sollen, daß bereits das Mittelstück bei 0° nicht verankert wird. Im Gegensatz dazu zeigen meine Versuche, daß die Bindung des Mittelstückes auch bei 0° erfolgt, daß dagegen bei 0° die Bindung zwischen Mittel- und Endstück, die bei höherer Temperatur eintritt, ausbleibt. Damit ist allerdings noch nicht gesagt, daß auch die aus Mittelstück und Endstück bereits entstandene Verbindung, resp. das wirksame Komplement des nativen Serums in der Kälte in die beiden Komponenten dissociiert wird, wenn auch die Möglichkeit für ein solches Verhalten nach den erhobenen Befunden durchaus besteht. Weitere Untersuchungen werden darüber Klarheit schaffen müssen. Immerhin erscheint es nicht ausgeschlossen, daß bei der Kältetrennung des wirksamen Hämolysins die Spaltung nicht zwischen Amboceptor und Komplement, sondern innerhalb des Komplements zwischen Mittelstück und Endstück erfolgt.

Zusammenfassung.

1) Die hämolytische Wirkung des ölsauren Natrons wird durch aktives und inaktives Kaninchenserum gehemmt.

2) Der Nachweis, daß inaktive Gemische von ölsaurem Natron und Serum auf amboceptorbeladenes Blut

noch hämolytisch wirken, konnte nicht erbracht werden. Soweit dies bei Verwendung aktiven Serums der Fall war, mußte die eingetretene Hämolyse auf den Komplementgehalt des Serums bezogen werden.

3) Amboceptorbeladenes Blut erwies sich der Hämolyse durch ölsaures Natron gegenüber etwas resistenter als natives Blut.

4) Natronlauge zerstört in größerer Menge die Komplemente, in geringerer Menge bewirkt sie eine inaktive Modifikation des Komplements, die beim Neutralisieren wieder wirksam wird (in Uebereinstimmung mit v. Liebermann).

5) Durch Salzsäure wird das Komplement, sofern überhaupt eine Einwirkung stattfindet, dauernd inaktiviert.

6) Die bei der Dialyse des Meerschweinchenserums im Sediment erhaltene Komplementkomponente, das Mittelstück Brands, bewahrt nicht nur im Wasser, sondern auch in 7,8-proz. Rohrzuckerlösung seine Reaktionsfähigkeit.

7) Während das Mittelstück in Kochsalzlösung, wie Brand gezeigt hat, unfähig wird, in Verein mit dem Endstück (Abgußkomponente) als Komplement zu wirken, bewahrt das besalzene Gesamtdialysat, ebenso wie das salzfreie die Aktivität.

8) Das durch den Aufenthalt in Salzlösung alterierte Kochsalzmittelstück erweist sich auch dann wirksam, wenn es vor dem Zusatz des Endstückes zu den amboceptorbeladenen Blutzellen zugesetzt wird, ohne daß es notwendig ist, vor dem Zufügen des Endstückes die Zwischenflüssigkeit zu entfernen.

9) Das Kochsalzmittelstück hemmt die Hämolyse durch wirksames Komplement, ebenso wie diejenige durch die kombinierte Wirkung von Mittelstück und Endstück. Die Hemmung ist in letzterem Falle stärker, wenn das Kochsalzmittelstück vor Zusatz von Blut und Amboceptor mit beiden Komponenten, als wenn es nur mit dem Endstück digeriert wird und erst später der Zusatz des wirksamen Mittelstückes erfolgt.

10) Die Bindung des Kochsalzmittelstückes an die amboceptorbeladene Blutzelle wird durch das Endstück verhindert.

11) Es ergibt sich die Anschauung, daß das Mittelstück in Kochsalzlösung derart alteriert wird, daß es eine höhere Avidität zum Endstück erhält, nach der Ver-

einigung mit diesem aber seine Reaktionsfähigkeit zur amboceptorbeladenen Blutzelle einbüßt.

12) Die Bindung des Mittelstückes an die amboceptorbeladene Blutzelle erfolgt auch bei 0°, diejenige des Endstückes an das durch die amboceptorbeladene Zelle verankerte Mittelstück nur bei höherer Temperatur. Es erscheint daher die Möglichkeit gegeben, daß die Spaltung des aktiven Hämolysins in der Kälte nicht zwischen Amboceptor und Komplement, sondern zwischen Mittelstück und Endstück erfolgt.

Beitrag
zur
biologischen Eiweißdifferenzierung[1]).

Von

W. Rickmann, Deutsch-Südwestafrika.
Kaiserlicher Veterinärrat.

---

1) Abdruck aus der Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene, XVII. Jahrg., 1907, No. 6.

Im folgenden möchte ich mir erlauben, über einige Versuchsergebnisse zu berichten, die ich während einer kurzen Tätigkeit im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. zu beobachten Gelegenheit hatte. Es handelt sich um die Spezifität bei der biologischen Eiweißdifferenzierung. Bekanntlich stehen für die Untersuchung der verschiedenen Eiweißarten zwei Serumreaktionen zur Verfügung. Dem erprobten, von UHLENHUTH und WASSERMANN in die forensische Praxis eingeführten Präzipitierungsverfahren ist in neuerer Zeit durch M. NEISSER und SACHS [1]) eine zweite Methode angereiht worden: das sogenannte Ablenkungsverfahren, welches auf den Untersuchungen von GENGOU [2]) und MORESCHI [3]) basiert. Ich habe beide Methoden in vergleichenden Untersuchungen herangezogen. Zur Verfügung stand mir ein Serum, das vom Kaninchen durch Vorbehandeln mit Menschenserum erhalten war. Die Prüfung dieses Antiserums erstreckte sich auf sein Verhalten gegenüber Menschen- und Schweineserum.

Behufs Verwendung des Antiserums zur Ablenkungsreaktion mußte zunächst eine sorgfältige Bestimmung seines Wertes vorgenommen werden. Ich lasse dieselbe in extenso folgen, um zugleich das im Frankfurter Institut geübte Verfahren zu veranschaulichen. Das zur Anwendung gelangende hämolytische System ist die Kombination: „Rinderblut — inaktives, vom Kaninchen gewonnenes Immunserum für Rinderblut (Amboceptor) — aktives Meerschweinchenserum (Komplement)". Zuerst erfolgt die Einstellung des Amboceptors. Je 1 ccm 5-proz. Rinderblutaufschwemmung werden mit je 0,1 ccm Meerschweinchenserum und absteigenden Mengen inaktivierten Serums des mit Rinderblut vor-

1) Berliner klin. Wochenschr., 1905, No. 44, u. 1906, No. 3.
2) Annales Inst. Pasteur, T. 16, 1902.
3) Berliner klin. Wochenschr., 1905, No. 37.

behandelten Kaninchens gemischt[1]). Die Gemische werden 2 Stunden bei 37° C gehalten. Danach oder bei folgendem Aufenthalt im Eisschrank am nächsten Morgen wird das Resultat notiert. Die Einstellung des Amboceptors veranschaulicht Tabelle 1.

Tabelle 1.

Blut	Amboceptor ccm	Komplement ccm	Hämolyse
1 ccm 5-proz. Rinderblut	0,0025	0,1	komplett
do.	0,0015	0,1	„
do.	0,001	0,1	„
do.	0,00075	0,1	„
do.	0,0005	0,1	fast komplett
do.	0,00035	0,1	stark
do.	0,00025	0,1	„
do.	0,00015	0,1	„
do.	0,0001	0,1	mäßig
do.	—	0,1	—

Die Tabelle zeigt, daß die komplett lösende Dosis des Amboceptors zwischen 0,0005 und 0,00075 ccm gelegen ist. Wir wählen in der Regel zu weiteren Versuchen das $1^1/_2$- bis 2-fache Multiplum der komplett lösenden Dose, in unserem Falle 0,001 ccm. Für diese Amboceptormenge wird nun der Komplementbedarf nach dem aus Tabelle 2 ersichtlichen Schema festgestellt.

Tabelle 2.

Blut	Amboceptor ccm	Komplement ccm	Hämolyse
1 ccm 5-proz. Rinderblut	0,001	0,1	komplett
do.	0,001	0,075	„
do.	0,001	0,05	fast komplett
do.	0,001	0,035	stark
do.	0,001	0,025	mäßig
do.	0,001	0,015	„
do.	0,001	0,01	wenig
do.	0,001	—	—

Die komplett lösende Dosis des benutzten Meerschweinchenserums liegt demnach zwischen 0,05 und 0,075 ccm. Wir verwenden wiederum ein $1^1/_2$- bis 2-faches Multiplum, im vorliegenden Falle 0,1 ccm. Das zu verwendende hämolytische System muß also sein: „1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,001 ccm Amboceptor + 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement."

Unter Verwendung dieses Systems wurde nunmehr der Wirkungswert des durch Immunisieren mit Menschenserum vom Kaninchen gewonnenen Antiserums bestimmt. In drei Parallelreihen wurden ab-

1) In allen Röhrchen wird durch Auffüllen mit physiologischer (0,85-proz.) Kochsalzlösung gleiches Volumen hergestellt, das in der Regel zwischen 2,1 und 2,5 ccm liegt.

steigende Mengen des Antiserums mit je 0,1 ccm Meerschweinchenserum gemischt. Außerdem enthielt:

Reihe a: 0,1 ccm einer 1 : 100 verdünnten Lösung von Menschenserum;

Reihe b: 0,1 ccm einer 1 : 1000 verdünnten Lösung von Menschenserum;

Reihe c: 0,1 ccm physiologische Kochsalzlösung.

Die Reihen wurden 1 Stunde bei 37° gehalten, sodann erfolgte zu allen Röhrchen ein Zusatz von 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,001 ccm Amboceptor. Tabelle 3 zeigt das Ergebnis.

Tabelle 3.

Mengen des Antiserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Rinderblut: a 0,001 ccm Menschenserum	b 0,0001 ccm Menschenserum	c kein Menschenserum
0,1	Spürchen	Spürchen	komplett
0,075	„	„	
0,05	„	0	
0,035	0	0	
0,025	0	0	
0,02	0	Spur	
0,015	0	wenig	
0,01	Spürchen	„	
0	komplett	komplett	

Um nun die für das Ablenkungsverfahren geeignete Dosis des Antiserums auszuwählen, wird folgendes zu berücksichtigen sein. Da man für die praktische Anwendung fordern muß, daß das Antiserum mindestens $^1/_{10000}$ ccm des homologen Serums nachzuweisen erlaubt, werden in Reihe b diejenigen Mengen in Betracht kommen, die eine vollständige Aufhebung der Hämolyse bewirken. Ferner dürfte es zweckmäßig sein, eine zwar sicher hemmende Menge des Antiserums zu verwenden, aber auch das notwendige Minimum nicht zu sehr zu übersteigen. Von diesen Gesichtspunkten aus wurden im vorliegenden Fall 0,2 ccm einer 6-fachen Verdünnung des Antiserums $^1/_6 \cdot 0{,}2$ = 0,033 . . . ccm) als Testdose determiniert.

Nunmehr wurde zu den eigentlichen Ablenkungsversuchen geschritten und die Wirkung des Antiserums auf Menschenserum einerseits, auf Schweineserum andererseits geprüft. Die Versuchsanordnung gestaltete sich demnach folgendermaßen:

Je $^1/_6 \cdot 0{,}2$ ccm Antiserum wurden mit je 0,1 ccm Meerschweinchenserum und absteigenden Mengen Menschenserums (Reihe a) resp. Schweineserums (Reihe b) gemischt. Die Gemische blieben 1 Stunde bei 37°, sodann erfolgte überall Zusatz von 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,001 ccm Amboceptor. Das Resultat zeigt Tabelle 4.

Die Tabelle zeigt, daß die gewählte Antiserummenge ($^1/_6 \cdot 0{,}2$ ccm)

Tabelle 4.

Mengen des Serums ccm	Eingetretene Hämolyse bei Verwendung von a Menschenserum	b Schweineserum
0,1	0	komplett
0,01	0	
0,001	0	
0,0001	0	
0,00001	Spur	
0	komplett	

noch 0,0001 ccm Menschenserum durch vollständige Aufhebung der Hämolyse anzeigt, aber auch noch bei Anwesenheit von 0,00001 ccm Menschenserum eine fast vollständige Hemmung der Hämolyse bedingt. Im Gegensatz dazu ergibt sich aus Reihe b, daß bei Zusatz von Schweineserum auch in den größten zur Verwendung gelangten Mengen jegliche Reaktion ausbleibt. Besonders hervorgehoben sei, daß Menschen- und Schweineserum sowohl in nativer Form, als auch in inaktiviertem Zustande herangezogen wurden, um dem etwaigen Einwande zu begegnen, daß möglicherweise der Komplementgehalt des Schweineserums in Reihe b die hämolytische Wirkung verstärke und so eine Ablenkungsreaktion verdecke. In beiden Fällen wurde aber das in Tabelle 4 notierte Ergebnis erhalten. Es folgt aus diesem Versuche, daß das untersuchte, auf Menschenserum wirkende Antiserum beim Ablenkungsverfahren in absolut spezifischer Weise Menschen- und Schweineeiweiß zu differenzieren gestattet. Selbst ein 10000-faches Multiplum derjenigen Menge, in welcher Menschenserum noch nachweisbar ist, gibt bei Verwendung von Schweineserum nicht die geringste Reaktion.

Wie verhält sich nun dasselbe Antiserum gegenüber Menschen- und Schweineserum bei Anstellung der Präzipitierungsmethode? Die Versuche, welche diese Frage beantworten sollten, wurden in der Weise angestellt, daß je 2 ccm der verdünnten Serumlösungen mit dem Antiserum unterschichtet wurden, in der Weise, daß das Antiserum vorsichtig vom Rande der unten spitz endigenden Röhrchen zugesetzt wurde. Es wurden zwei Parallelreihen angesetzt. In der einen betrug die Menge des Antiserums nach der Vorschrift Uhlenhuths 0,1 ccm, in der anderen wurde die auch zu den Ablenkungsversuchen gewählte Menge benutzt, also 0,2 ccm der sechsfachen Verdünnung. Die Reaktion wurde zeitlich verfolgt und galt zunächst nach 20 Minuten entsprechend den von Uhlenhuth für die forensische Praxis gegebenen Regeln als abgeschlossen [1]). Die Röhrchen wurden sodann geschüttelt, kamen über

1) Cf. Uhlenhuth, Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Jena 1905.

Nacht in den Eisschrank, und nach 24 Stunden wurde noch einmal die inzwischen erfolgte Sedimentierung notiert. Ein Beispiel einer Reihe gleichartig verlaufener Beobachtungen zeigt Tabelle 5 A und B.

Tabelle 5.

A.

Mengen des Serums 2 ccm	Wirkung von 0,1 ccm Antiserum auf Menschenserum: sofort beobachtet	Menschenserum: Sediment	Schweineserum: sofort beobachtet	Schweineserum: Sediment
$^1/_{10}$	—	—	nach 5′: + ? nach 10′: + (deutlich)	mäßig
$^1/_{100}$	nach 5′: +	stark flockig	nach 15′: + ? nach 20′: + (schwach)	sehr gering
$^1/_{1000}$	nach 10′: + (schwach) nach 15′: + (deutlich)	mäßig	keine Reaktion	fehlt
$^1/_{10000}$	nach 15′: ? nach 20′: + ? (äuß. schw.)	sehr gering	—	—

B.

Mengen des Serums 2 ccm	Wirkung von $^1/_6 \cdot 0{,}2$ ccm Antiserum auf Menschenserum: sofort beobachtet	Menschenserum: Sediment	Schweineserum: sofort beobachtet	Schweineserum: Sediment
$^1/_{10}$	—	—	nach 15′: + (?) nach 20′: + (deutlich)	wenig
$^1/_{100}$	nach 5′: + (Hauch) nach 10′: + (deutlich)	mäßig	nach 20′: + (schwach)	Spur
$^1/_{1000}$	nach 6′: + (?) nach 12′: + (schwach) nach 15′: + (mäßig) nach 20′: + (deutlich)	wenig	keine Reaktion	0
$^1/_{10000}$	keine Reaktion zu sehen	in Spuren?	—	—

Was bei einer Durchsicht der Tabellen sofort auffällt, ist die Tatsache, daß unser Antiserum auch mit Schweineserum durch Präzipitierung reagiert. Es handelt sich um eine der heterologen Reaktionen, die ja, wie bekannt, nicht nur das Eiweiß verwandter Tierarten betreffen, sondern sich oft auf die gesamte Säugetierreihe erstrecken, wie es besonders die Untersuchungen Nuttalls gelehrt haben. Das von uns benutzte, durch Immunisieren mit Menschenserum gewonnene Antiserum gibt also auch mit Schweineserum eine positive Präzipitinreaktion. Freilich ist die Menge des Schweineserums, welche mit dem Antiserum eben noch reagiert, 100 mal so groß als die entsprechende Menge Menschenserums, und man kann daher die Spezifitätsbreite des Antiserums gegenüber den beiden Serumarten mit 1:100 bezeichnen. Im Gegensatz dazu konnte bei Anstellung der Ablenkungsreaktion eine Spezifitätsbreite von mindestens 1:10000 er-

mittelt werden. Ohne aus diesen Beobachtungen irgendwelche verallgemeinernde Schlüsse ziehen zu wollen, möchte ich doch diese Differenz bei Anstellung der beiden biologischen Verfahren hervorheben. Sie erscheint mir aus dem Grunde von Interesse, weil sie einen Fall betrifft, in dem die Präzipitinmethode ein zu Trugschlüssen veranlassendes positives Ergebnis zeitigt, während das Ablenkungsverfahren einen negativen, richtigen Befund ergibt.

Die Ursache, welche ein derartig verschiedenes Resultat erklärt, wäre wohl zunächst darin zu suchen, daß bei der Ablenkungsmethode eine nicht unerheblich geringere Menge des Antiserums zur Verwendung gelangt als bei der Präzipitinreaktion. In dieser geringeren Menge ist naturgemäß die Quote der nicht spezifischen Partialantikörper sehr reduziert, so daß auch die Gefahr der nicht spezifischen Reaktionen vermindert ist. In dieser Erwägung habe ich die Präzipitinreaktion auch mit derjenigen Antiserummenge, die bei dem Ablenkungsverfahren in Anwendung kam, angestellt ($^1/_6$. 0,2 ccm, cf. Tabelle 5 B). Die Reaktion mit Schweineserum war in diesem Falle erheblich geringer, aber doch noch immer wahrzunehmen. Gleichzeitig war aber auch die Empfindlichkeit der Reaktion mit Menschenserum um das Zehnfache verringert. Aus diesem Grunde wird ja auch bei der Präzipitierungsmethode von einer Verminderung der Antiserummenge zwecks Ausschaltung der nicht spezifischen Reaktionen abgeraten. Bei dem Ablenkungsverfahren dagegen ist die Verwendung geringerer Antiserummengen nicht nur nicht schädlich, sondern meist sogar zweckmäßig. Ob die Spezifitätsbreite beim Ablenkungsverfahren etwa allgemein eine größere ist als bei der Präzipitinreaktion, muß dahingestellt bleiben. Jedenfalls dürften weitere Untersuchungen von diesem Gesichtspunkte aus erwünscht sein. Die Heranziehung des Ablenkungsverfahrens neben der Präzipitierungsmethode erscheint mir in allen Fällen, in denen es sich um die Unterscheidung von Eiweißarten verschiedener Provenienz handelt, so auch für die veterinärpolizeiliche Kontrolle der verschiedenen Fleischnahrungsmittel aber empfehlenswert. Der Gang der Untersuchung ist durch die eingefügten Tabellen genügend skizziert. Die etwas größere Umständlichkeit der Ausführung ist leicht dadurch einzuschränken, daß sowohl der hämolytische Amboceptor als auch das Antiserum lange Zeit aufbewahrt werden können und dann stets in der einmal bestimmten Menge benutzt werden. Zur eigentlichen Untersuchung kommen dann nur die in Tabelle 2 und 4 notierten Versuche in Betracht.

Ueber die Spezifität
der
biologischen Eiweißdifferenzierung.

Von

Dr. J. Bauer,
jetzt Assistenzarzt an der akademischen Kinderklinik zu Düsseldorf.

Die Untersuchungen, über welche im folgenden berichtet werden soll, stellen die Fortsetzung zu der vorstehend abgedruckten Arbeit von Rickmann[1]) dar. Rickmann hat gezeigt, daß die Spezifität bei der biologischen Eiweißdifferenzierung sehr verschieden in Erscheinung treten kann, je nach dem Verfahren, welches zur Untersuchung herangezogen wird. Bekanntlich stehen für die biologische Eiweißanalyse zwei Methoden zur Verfügung. Dem altbewährten von Uhlenhuth, Wassermann und Schütze in die forensische Praxis eingeführten Verfahren der Präzipitation hat sich die von M. Neisser und Sachs[2]) ausgearbeitete Methode der Eiweißdifferenzierung durch die komplementablenkende Wirkung der aus den Eiweißantigenen und ihren Antikörpern entstehenden Komplexe angereiht. Rickmann hat nun gefunden, daß ein durch Vorbehandeln von Kaninchen mit Menschenserum gewonnenes Antiserum bei Verwendung des Ablenkungsverfahrens Menschen- und Schweineserum auch in starker Konzentration zu differenzieren erlaubte, während es bei Anstellung der Präzipitinreaktion auch mit Schweineserum, wenn auch erst in etwa 100-fach stärkerer Konzentration, reagierte. Daß die Spezifität bei der Präzipitinreaktion keine absolute, sondern eine quantitative ist, darf als allgemein bekannt vorausgesetzt werden, und besonders war es Nuttall, der in umfassenden Versuchsreihen zeigte, daß ein stark wirkendes Antiserum, welches durch Vorbehandeln mit einer Säugetierblutart gewonnen ist, mit dem Blut der ganzen Säugetierreihe durch Präzipitatbildung reagiert. Allerdings treten diese heterologen Reaktionen nur in konzentrierteren Blutlösungen

1) Rickmann, W., Beitrag zur biologischen Eiweißdifferenzierung. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg., 17. Jahrg., 1907, No. 6.

2) Neisser, M. u. Sachs, H., Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 44; s. auch 1906, No. 3.

und langsamer auf. Man kann sie auch wesentlich dadurch reduzieren, daß man einen geringen Zusatz von Antiserum wählt. Da aber in letzterem Falle auch die homologe Reaktion nicht unbeträchtlich an Empfindlichkeit und Schärfe einbüßt, so ergibt sich für die Praxis der forensischen Blutdifferenzierung die von UHLENHUTH und BEUMER[1]) hervorgehobene Konsequenz, mit stark verdünnten Blutlösungen (1 : 1000 — 1 : 10000) zu arbeiten und die Reaktion nach spätestens 20 Minuten als abgeschlossen zu betrachten. Wenn auch bei strikter Einhaltung dieser Regeln die Gefahr einer Täuschung durch heterologe Reaktionen sehr vermindert oder aufgehoben ist, so schien es doch nicht nur in wissenschaftlichem Interesse, sondern auch in Hinblick auf die Verhältnisse der Praxis geboten, näher zu untersuchen, ob die von RICKMANN beobachtete Ueberlegenheit der Ablenkungsreaktion in Bezug auf die Spezifität allgemeiner anzutreffen ist. Denn auch in der Praxis kann es nur erwünscht sein, die Verhältnisse so zu gestalten, daß die Spezifität des biologischen Eiweißnachweises markanter und ohne wesentliche Einschränkung der Beobachtungszeit in Erscheinung tritt.

Bevor ich auf die Schilderung meiner Versuche eingehe, halte ich es für nicht überflüssig, auf das im hiesigen Institut übliche Verfahren der Komplementablenkung hinzuweisen.

Als hämolytisches System dient in der Regel die Kombination: Rinderblut—inaktives Serum eines mit Rinderblut vorbehandelten Kaninchens (Amboceptor)—aktives Meerschweinchenserum (Komplement). Von dem Amboceptor muß die minimale komplett lösende Dosis bekannt sein, d. h. diejenige Menge, welche 1 ccm 5-proz. Rinderblut bei Zusatz von 0,1 ccm Meerschweinchenserum gerade noch komplett löst. Als Testmenge wird das $1^1/_2$—2-fache Multiplum gewählt. Ebenso dient als Testmenge des Komplements das $1^1/_2$—2-fache Multiplum derjenigen Dosis, welche 1 ccm 5-proz. Rinderblut bei Zusatz der Testmenge des Amboceptors gerade noch komplett löst.

Das Antiserum, welches als Reagens für die Differenzierung des Eiweißes dient, darf nun nicht in einer beliebigen Menge verwandt werden. Daß zu geringe Mengen zu vermeiden sind, ist selbstverständlich. Aber auch ein Ueberschuß von Antiserum ist in den meisten Fällen zu vermeiden. Einmal wirken größere Serummengen, wie allgemein bekannt, sehr oft bereits an und für sich antikomplementär, dann aber kann ein Ueberschuß des Antiserums, wie MORESCHI[2]), NEISSER und SACHS[3]), LIEFMANN[4]) gezeigt haben, auch die antihämo-

1) UHLENHUTH, Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Jena 1905.

2) MORESCHI, C., Zur Lehre von den Antikomplementen, II. Mitt. Berl. klin. Wochenschr., 1906, No. 4.

3) l. c.

4) LIEFMANN, H., Ueber die Komplementablenkung bei Präzipitationsvorgängen. Berl. klin. Wochenschr., 1906, No. 15.

lytische Wirkung verhindern. Es werden daher zur Bestimmung des Antiserums absteigende Mengen desselben mit der Testdosis des Komplements einerseits, andererseits mit Komplement + Antigen gemischt. Als Antigen dient das homologe Serum. Da für die forensische Praxis zu fordern ist, daß $^1/_{10\,000}$ ccm Blutserum noch nachgewiesen werden kann, so wird als Antigendosis 0,0001 ccm des entsprechenden Serums gewählt. Die Gemische bleiben 1 Stunde im Brutschrank, sodann erfolgt Zusatz von Blut und Amboceptor. Man wählt dann ein $1^1/_2$—2-faches Multiplum der gerade noch vollständig hemmenden Dosis des Antiserums als Testdosis. Bedingung ist natürlich, daß diese Menge des Antiserums nicht etwa bereits ohne Antigenzusatz antikomplementär wirkt. Die Verwendung derart limitierter geringer Mengen von Antiserum bietet auch den Vorteil, daß eine zu große Empfindlichkeit der Reaktion, die, wie FRIEDBERGER[1]) gezeigt hat, unter Umständen die Beurteilung trüben kann, mit größter Wahrscheinlichkeit vermieden wird.

Das Antiserum ist durch diese einmalige Bestimmung für alle weiteren Untersuchungen eingestellt. Es erübrigt nur, vor dem jedesmaligen Versuch, die komplettierende Dosis eines frischen Meerschweinchenserums für einen Amboceptor von bekanntem Titer festzustellen. In dem eigentlichen Ablenkungsverfahren sind zwei Versuchsreihen erforderlich:

I. Absteigende Mengen des zu differenzierenden Antigens + Testdosis Antiserum + Testdosis Komplement — 1 Stunde bei 37° — Amboceptor + Blut.

II. Absteigende Mengen des Antigens + Testdosis Komplement — 1 Stunde bei 37° — Amboceptor + Blut.

Die Reihe II ist eine notwendige Kontrolle, um etwaige hemmende Wirkungen, welche durch die das Antigen enthaltende Lösung ausgeübt werden, auszuschließen. NEISSER und SACHS[2]) haben diesen ergänzenden Versuch bereits empfohlen, um Fehlerquellen, auf welche später UHLENHUTH[3]) besonders aufmerksam gemacht hat, auszuschließen.

Bei genauer Einhaltung dieser Angaben sind Fehlerquellen, welche einen irrigen positiven Befund vortäuschen, ausgeschlossen. Es ist aber ein Hinweis auf die Methodik auch darum geboten, weil einige Angaben der Autoren, welche geeignet sind, die Gebrauchsfähigkeit des Ablenkungsverfahrens zu beanstanden, offensichtlich auf eine mangelhafte

1) FRIEDBERGER, E., Zur forensischen Eiweißdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittelst Komplementablenkung, nebst Bemerkungen über die Bedeutung des Präzipitates für dieses Phänomen. Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 15.

2) l. c. und Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 39.

3) UHLENHUTH, Komplementablenkung und Bluteiweißdifferenzierung. Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 31.

Versuchsanordnung zu beziehen sein dürften. So haben Ganghofner und Langer[1]) die von mir[2]) empfohlene Anwendung des Ablenkungsverfahrens zum Nachweis von artfremdem Eiweiß im Säuglingsblute beanstandet, auf Grund von Versuchen, aus denen sie schließen zu müssen glaubten, daß das Ablenkungsverfahren keine größere Brauchbarkeit für klinische und experimentelle Zwecke besitzt. Die Autoren beschreiben in ihren Versuchen sogar eine Ueberlegenheit der Präcipitationsmethode über das Komplementablenkungsverfahren. Ihre Versuchsanordnung dürfte allerdings einer strengen Kritik nicht stand halten. Sehr auffällig ist zunächst der Kontrollversuch, in dem 0,001 ccm Meerschweinchenserum hinreicht, um 1 ccm 10-proz. amboceptorbeladenes Ziegenblut innerhalb 10 Minuten komplett zu lösen. Es würde sich hier um eine ganz ungewöhnliche Wirksamkeit des Meerschweinchenkomplements handeln, die sicherlich einen Ausnahmefall darstellen müßte. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß das gleichzeitig vorhandene Antiserum, das in der Menge von 0,5 ccm zur Anwendung kam, an dem hämolytischen Effekt mitbeteiligt war. Einmal ist die Verwendung so außerordentlich großer Antiserumdosen aus den oben erörterten Gründen überhaupt von Nachteil, dann aber ist zu bedenken, daß das Kaninchen, von dem das Antiserum gewonnen war, ein Hämolysin für Ziegenblut enthält, das augenscheinlich in den Versuchen von Ganghofner und Langer an der hämolytischen Wirkung beteiligt war. Die Versuchsbedingungen liegen also schon aus diesen Gründen für den Erfolg der Ablenkungsreaktion recht ungünstig, und es ist daher nicht zu verwundern, daß sich die Autoren bei diesem Vorgehen von der Feinheit des Verfahrens nicht überzeugen konnten.

Was nun meine eigenen Versuche anlangt, so beziehen sich die letzteren auf Antisera, welche vom Kaninchen durch Vorbehandeln mit fremdartigem Serum erhalten wurden. Es gelangten zur Anwendung:

1) Antiserum gegen Pferdeserum,
2) Antiserum gegen Schweineserum,
3) Antiserum gegen Rinderserum,
4) Antiserum gegen Menschenserum.

Die Antisera werden im folgenden kurz durch Vorsetzen der Tierart, gegen deren Eiweiß sie gerichtet sind, als Pferde-Antiserum etc. bezeichnet.

Als Antigene dienten die entsprechenden 4 nativen Serumarten. Zur Präcipitinreaktion wurden je 2 ccm der verschiedenen Verdünnungen ver-

1) Ganghofner und Langer, Ueber die Verwertbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung zum Nachweise von artfremdem Eiweiß im Blute. Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 47.

2) Bauer, J., Ueber den Nachweis der präcipitablen Substanz der Kuhmilch im Blute eines atrophischen Säuglings. Berliner klin. Wochenschr., 1906, No. 22.

wandt. Das Antiserum ließ ich vorsichtig vom Rande der unten konisch ausgezogenen Reagenzgläser (Zentrifugenröhrchen) einlaufen, so daß das Antiserum die Antigenlösung unterschichtete. Die Beobachtung geschah bei Zimmertemperatur und galt zunächst entsprechend den Forderungen der forensischen Praxis nach 20 Minuten als abgeschlossen. Die Röhrchen wurden aber noch durchgeschüttelt über Nacht im Eisschrank aufbewahrt, worauf die inzwischen erfolgte Sedimentierung notiert wurde.

Für die Ablenkungsreaktion wurde je 1 ccm der gleichen Serumverdünnung verwandt; im übrigen wurden die oben erörterten methodischen Vorschriften innegehalten.

Ich lasse nun die einzelnen Untersuchungen folgen.

I. Wirkung des Pferde-Antiserums.

Die Präcipitationsversuche wurden zunächst in der üblichen Weise angestellt, indem ein Antiserumzusatz von 1 : 20 gewählt wurde.

Tabelle 1.
Präcipitation.

Grad der Serumverdünnung	Wirkung von 0,1 ccm Pferde-Antiserum auf			
	Pferdeserum	Schweineserum	Rinderserum	Menschenserum
$^1/_{10}$	—	sofort: + (schwach) 10′: deutlich Sed.: mäßig	5′: + (schwach) Sed: gering	1′: + (schwach) 10′: deutlich Sed.: mäßig
$^1/_{100}$	sofort: deutlich Sed.: stark	7′: + (schwach) Sed.: sehr gering	0	4′: + (schwach) Sed.: gering
$^1/_{1000}$	4′: + (schwach) 6′: deutlich Sed.: mäßig	20′: ? (Hauch)	0	10′: + (schwach) Sed.: sehr gering
$^1/_{10000}$	6′: ? 20′: + (schwach) Sed.: sehr gering	0	0	0
$^1/_{100000}$	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt, daß die Spezifität des Pferde-Antiserums bei starken Verdünnungen des als Antigen dienenden Serums markant in Erscheinung tritt, daß dagegen bei Verwendung konzentrierter Lösungen auch im heterologen Serum Reaktionen eintreten, welche zu Irrtümern Anlaß geben können, wenn der Grad der Serumverdünnung nicht bekannt ist. Wenn man die relative Spezifität durch diejenige Zahl ausdrückt, welche angibt, wie viel mal stärker das heterologe Serum konzentriert sein muß, als das homologe, um etwa die gleiche Reaktion zu ergeben, so kann man auf Grund vorliegender Tabelle die relative Spezifität des Pferde-Antiserums bezeichnen:

gegenüber Schweineserum mit: 100
„ Rinderserum mit: 1000
„ Menschenserum mit: 10

Betrachten wir nun das Ergebnis der Komplementablenkungsmethode. Die Testmenge des Pferde-Antiserums betrug auf Grund vorheriger Einstellung: 0,01 ccm. Das hämolytische System bestand aus 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,002 ccm Amboceptor + 0,1 ccm Komplement (cf. Tabelle 2).

Tabelle 2.

Mengen des Serums	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,01 ccm Pferde-Antiserum auf das Serum von			
ccm	Pferd	Schwein	Rind	Mensch
0,1	0	komplett	komplett	stark
0,01	0			komplett
0,001	0			
0,0001	0			
0,00001	fast komplett			
0	komplett			

Zu der Tabelle ist zu bemerken, daß natürlich Kontrollen angesetzt wurden, in denen die Prüfung ohne Zusatz des Antiserums erfolgte. Es ist über dieselben aber nichts Besonderes zu sagen, da überall komplette Hämolyse eintrat, mit Ausnahme des Röhrchens mit 0,1 ccm Menschenserum, in welchem das Blut, wie in Tabelle 2, nur „stark“ gelöst war. Es ist also diese minimale Hemmung der Hämolyse nicht auf die Wirkung des Antiserums, sondern auf eine geringgradige antihämolytische Wirkung, welche das Menschenserum bereits an und für sich ausübt, zu beziehen. Im übrigen ergibt sich aus der Tabelle die absolute Spezifität des Pferde-Antiserums bei dem Ablenkungsverfahren. Wenn man hier von einer relativen Spezifität sprechen will, so ist sie jedenfalls in allen Fällen größer als 1000.

Es kann kein Zweifel bestehen, daß die Ueberlegenheit der Ablenkungsreaktion in Bezug auf die Specifität wenigstens zu einem großen Teil darauf zurückzuführen ist, daß die zur Anwendung gelangende Antiserummenge erheblich geringer ist, als bei der Präcipitation. Trotzdem gelingt es bei der Präcipitationsmethode nicht immer, die heterologen Trübungen durch die Reduktion des Antiserums auf die bei dem Ablenkungsverfahren ermittelte Testdosis zu vermeiden. In der folgenden Tabelle 3 ist ein Versuch wiedergegeben, in dem als Präcipitin nur 0,01 ccm (0,1 ccm einer 10-fachen Verdünnung) des Pferde-Antiserums dienten.

Die Tabelle zeigt, daß trotz der geringen Antiserummenge die heterologen Reaktionen nicht beseitigt sind. Ueberdies aber ist die Empfindlichkeit der Probe so herabgesetzt, daß die praktische Verwendung nicht in Betracht kommt.

Tabelle 3.

Grad der Serumverdünnung	Wirkung von 0,01 ccm Pferde-Antiserum auf das Serum von			
	Pferd	Schwein	Rind	Mensch
$^1/_{10}$	sofort: + [1] Sed.: stark	10′: + [1] Sed.: wenig	10′: + [1] Sed.: wenig	10′: + (schwach) [1] 15′: deutlich Sed.: mäßig-stark
$^1/_{100}$	2′: + (schwach) 5′: deutlich Sed.: mäßig	0	20′: ? Sed.: ?	20′: sehr schwach Sed.: sehr gering
$^1/_{1000}$	15′: sehr schwach Sed.: sehr gering	0	0	0
$^1/_{10000}$	0	0	0	0

Ueber die Untersuchung der übrigen Antisera, deren Ergebnisse im wesentlichen analog sind, gebe ich eine tabellarische Uebersicht.

II. Wirkung des Schweine-Antiserums.

Tabelle 4.

Grad der Serumverdünnung	Präcipitierende Wirkung von 0,1 ccm Antiserum auf das Serum von			
	Schwein	Rind	Pferd	Mensch
$^1/_{10}$	—	3′: + (schwach) 6′: deutlich Sed.: mäßig	10′: + (schwach) 30′: schwach-deutlich Sed.: gering	5′: + (sehr schwach) Sed.: gering
$^1/_{100}$	—	9′: + (schwach) 20′: deutlich Sed.: gering	25′: + (sehr schwach) 40′: schwach Sed.: sehr gering	0
$^1/_{1000}$	3′: + (schwach) 5′: schwach-deutlich 10: deutlich Sed.: mäßig	25′: + (sehr schwach) Sed.: sehr gering	0	0
$^1/_{10000}$	15′: Hauch 20′: + (ziemlich deutlich) Sed.: gering	0	0	0
$^1/_{100000}$	0	0	0	0

Relative Specifität gegenüber:
Rinderserum = 10—100.
Pferdeserum = 100—1000.
Menschenserum = 1000.

1) Da in diesen Proben Antigen und Antiserum gleich stark verdünnt waren, erfolgte die Unterschichtung schwer, so daß sich die Reaktion zunächst in einer diffusen Trübung dokumentierte.

Tabelle 5.

Komplementablenkung.

Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,002 ccm Amboceptor + 0,075 ccm Komplement.

Testdosis des Schweine-Antiserums: 0,01 ccm.

Mengen des Serums ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,01 ccm Schweine-Antiserum auf das Serum von			
	Schwein	Rind	Pferd	Mensch
0,1	0	komplett	komplett	mäßig
0,01	0			komplett
0,001	0			
0,0001	0			
0,00001	0			
0,000001	wenig			
0	komplett			

Zu bemerken ist, daß in den Kontrollen ohne Antiserum die Schweineserum enthaltenden Röhrchen sämtlich komplett gelöst waren, die übrigen mit Tabelle 5 übereinstimmten. Es treten also bei dem verwandten Schweineantiserum die Empfindlichkeit des Ablenkungsverfahrens (bei $^1/_{100000}$ ccm Schweineserum vollständige Hemmung der Hämolyse) und die strenge Specifität der Reaktion markant in Erscheinung. Die Grenze der relativen Spezifität ist bei 10000 noch nicht erreicht.

Tabelle 6.

Präzipitation mit 0,01 ccm Schweine-Antiserum.

Grad der Serumverdünnung	Wirkung von 0,01 ccm Schweine-Antiserum auf das Serum von			
	Schwein	Rind	Pferd	Mensch
$^1/_{10}$	—	schwache diffuse Trübung [1] Sed.: sehr gering	schwache diffuse Trübung [1] Sed.: sehr gering	? Sed.: sehr gering
$^1/_{100}$	—	0	0	0
$^1/_{1000}$	5′: + (schwach) 15′: deutlich Sed.: gering	0	0	0
$^1/_{10000}$	45′: hauchartige Trübung Sed.: ?	0	0	0
$^1/_{100000}$	0	0	0	0

Bei Verwendung der geringen Menge des Schweine-Antiserums ist also die relative Spezifität erhöht, gleichzeitig aber die Empfindlichkeit der Präcipitinprobe erheblich reduziert.

1) Cf. die Anmerkung zu Tabelle 3.

III. Wirkung des Rinder-Antiserums.

Tabelle 7.

Grad der Serumverdünnung	Präcipitierende Wirkung von 0,1 ccm Antiserum auf das Serum von			
	Rind	Schwein	Pferd	Mensch
$^1/_{10}$	—	sofort: + (deutlich) Sed.: stark	sofort: + (deutlich) Sed.: mäßig	sofort: + (deutlich) Sed.: mäßig
$^1/_{100}$	—	sofort: + (schwach) 4′: deutlich Sed.: mäßig	5′: Hauch 20′: schwach-deutlich Sed.: gering	5′: Hauch 20′: + (schwach-deutlich) Sed.: gering
$^1/_{1000}$	sofort: + (deutlich) Sed.: stark	60′: sehr schwach Sed.: sehr gering	60′: sehr schwach Sed.: ?	60′: Andeutung Sed.: ?
$^1/_{10000}$	sofort: + (schwach) Sed.: mäßig	0	0	0
$^1/_{100000}$	60′: Andeutung Sed.: ? (sehr gering)	0	0	0

Relative Spezifität gegenüber:
Schweineserum = 100
Pferdeserum = 100—1000
Menschenserum = 100—1000

Tabelle 8.

Komplementablenkung.

Da das Rinder-Antiserum einen beträchtlichen Gehalt an hämolytischen Amboceptoren für Rinderblut aufwies, wurde als Amboceptor das inaktivierte Serum eines mit Schweineblut vorbehandelten Kaninchens und dementsprechend Schweineblut verwandt.

Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Schweineblut + 0,1 ccm Amboceptor + 0,1 ccm Meerschweinchenserum.

Testdosis des Rinder-Antiserums: 0,01 ccm.

Mengen des Serums ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,01 ccm Rinder-Antiserum auf das Serum von			
	Rind	Schwein	Pferd	Mensch
0,1	0	komplett	mäßig	stark
0,01	0		komplett	komplett
0,001	0			
0,0001	0			
0,00001	stark			
0	komplett			

Zu bemerken ist, daß in den Kontrollversuchen ohne Antiserum 0,1 ccm des Pferde- und Menschenserums die gleiche geringfügige Hemmung verursachte. Im übrigen ergibt sich auch aus diesem Versuch die Ueberlegenheit der Komplementablenkung über die Präcipitation in Bezug auf die Spezifität. Was die präzipitierende Wirkung einer geringen Menge des Rinder-Antiserums anlangt, so gibt die folgende Tabelle 9 Aufschluß.

Tabelle 9.
Präzipitation mit 0,01 ccm Rinder-Antiserums.

Grad der Serum-verdünnung	Wirkung von 0,01 ccm Rinder-Antiserum auf das Serum von			
	Rind	Schwein	Pferd	Mensch
1/10	—	2′: diffuse Trübg.[1]) Sed.: mäßig	2′: diffuse Trübg.[1]) Sed.: mäßig	2′: diffuse Trübg.[1]) Sed.: mäßig
1/100	—	5′: + (sehr schwach) 20′: deutlich Sed.: gering	5′: + (sehr schwach) 12′: schwach-deutlich Sed.: gering	5′: + (schwach) 12′: schwach-deutlich Sed: gering
1/1000	2′: + (schwach) 5′: + (deutlich) Sed.: mäßig	0	0	0
1/10000	0	0	0	0

Bei Verwendung der geringen Menge des Rinder-Antiserums für die Präzipitinreaktion ist also die Empfindlichkeit erheblich reduziert, ohne daß es gelungen wäre, die heterologen Reaktionen auszuschalten.

IV. Wirkung des Menschen-Antiserums.

Schließlich gelangte noch ein Menschen-Antiserum zur Untersuchung.

Tabelle 10.

Grad der Serum-verdünnung	Präcipitierende Wirkung von 0,1 ccm Menschen-Antiserum auf das Serum von			
	Mensch	Schwein	Rind	Pferd
1/10	—	2′: + (deutlich) Sed.: mäßig	2′: + (deutlich) Sed.: (mäßig)	5′: ? 10′: + (deutlich) Sed.: mäßig
1/100	—	5′: ? 8′: + (schwach) 20′: + (schwach-deutlich) Sed.: mäßig	5′: + (schwach) Sed.: gering	20′: + (schwach) Sed.: gering
1/1000	2′: + (deutlich) Sed.: mäßig	20′: + (schwach) Sed.: sehr gering	20′: ? Sed.: ?	0
1/10000	2′: + (schwach) 8′: + (deutlich) Sed.: gering	0	0	0
1/100000	0	0	0	0

Relative Spezifität gegenüber:
Schweineserum = 100(—10)
Rinderserum = 100—1000
Pferdeserum = 100—1000.

1) Cf. die Anmerkung zu Tabelle 3.

Tabelle 11. Komplementablenkung.
Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,002 ccm Amboceptor + 0,1 ccm Komplement.
Testdosis des Antiserums: 0,02 ccm.

Mengen des Serums ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,02 ccm Menschen-Antiserum auf das Serum von			
	Mensch	Pferd	Schwein	Rind
0,1	0	mäßig	komplett	mäßig
0,01	0	komplett	komplett	komplett
0,001	0	komplett	komplett	komplett
0,0001	0	komplett	komplett	komplett
0,00001	mäßig	komplett	komplett	komplett
0,000001	stark	komplett	komplett	komplett
0	komplett	komplett	komplett	komplett

In den Kontrollen ohne Antiserum hemmten 0,1 ccm Pferde- und Rinderserum in der gleichen Weise.

Tabelle 12. Präcipitation mit 0,02 ccm Menschen-Antiserum.

Grad der Serum-verdünnung	Präcipitierende Wirkung von 0,02 ccm Menschen-Antiserum auf das Serum von			
	Mensch	Pferd	Schwein	Rind
1/10	—	3′: diffus. Trübg.[1]) Sed.: gering	3′: diffus. Trübg.[1]) Sed.: gering	diffuse Trübung[1]) Sed.: gering
1/100	—	0	0	10′: + (sehr schwach) Sed.: sehr gering
1/1000	3′: Hauch 15′: + (deutlich) Sed.: mäßig	0	0	0
1/10000	10 : ? 30′: + (sehr schwach) Sed.: sehr gering	0	0	0

Also auch im Falle des Menschen-Antiserums treten trotz so starker Verminderung der Präcipitinmenge, daß die Reaktion bereits erheblich an Feinheit einbüßt, noch immer heterologe Reaktionen auf.

Ueberblicken wir nunmehr die mitgeteilten Versuchsergebnisse, so ergibt sich übereinstimmend, daß das Ablenkungsverfahren einen bisher noch wenig gewürdigten Vorzug vor der Präcipitinreaktion besitzt, der in der größeren Spezifität besteht. Diese Tatsache hat zunächst nichts Sonderbares insofern, als ja allgemein bekannt ist, daß man die Immunitätsreaktionen durch Verdünnen des Antiserums spezifischer gestalten kann. Können doch durch dieses einfache Hilfsmittel die stets in geringerer Konzentration vorhandenen heterologen Partialantikörper so weit eliminiert werden, daß sie praktisch nicht mehr in Betracht kommen, während die homologen Antikörper noch immer in den verdünnten Lösungen genügend stark wirken. Bei der Präcipitationsmethode ist aber leider eine wesentliche Verminderung der Antiserummenge nicht tunlich, da dann auch die homologe Reaktion an Intensität so einbüßt, daß die Wahrnehmung der Präcipitation bei so starken

1) Cf. die Anmerkung zu Tabelle 3.

Verdünnungen des Antigens, wie sie besonders die forensische Praxis fordert, nicht mehr möglich ist. Bei der Komplementablenkung ist das Arbeiten mit geringen Antiserumdosen möglich, ja sogar, wie erwähnt, in vielen Fällen ein Erfordernis. Es ist also von vornherein zu erwarten, daß die Eiweißdifferenzierung mittels der Komplementablenkung bei folgerichtiger Versuchsanordnung sich spezifischer gestaltet, als bei der Präcipitation, und die mitgeteilten Erfahrungen sprechen in diesem Sinne. Andererseits aber muß hervorgehoben werden, daß auch bei Verwendung der gleichen geringen Antiserummengen, wie sie zur Ablenkung verwandt wurden, noch heterologe Reaktionen auftreten, wenn auch nicht zu verkennen ist, daß sie reduziert sind und langsamer in Erscheinung treten. Diese Befunde stehen gleichfalls mit den Beobachtungen von Rickmann in Einklang. Besonders möchte ich die Aufmerksamkeit auf solche Fälle richten, in denen einerseits bei der Präcipitation heterologe Reaktionen wahrzunehmen waren bei negativem Ausfall der Komplementablenkung, andererseits homologe Reaktionen bei der Präcipitinmethode fehlten, während die Ablenkung positiv ausfiel. Wenn man die Tabellen 2—3, 5—6, 8—9, in denen es sich um Ablenkung und Präcipitation mit der gleichen geringen Antiserummenge handelt, miteinander vergleicht, so zeigt sich in der Tat, daß für die Differenzierung des homologen Eiweißes das Ablenkungsverfahren die empfindlichere Methode darstellt, heterologe Reaktionen dagegen nur bei der Präcipitation wahrzunehmen sind. Wir haben also Verhältnisse gegeben, in denen bei negativem Ausfall der Präcipitation die Ablenkung ein positives Resultat zeitigt und umgekehrt der, wenn auch schwach positive Ausfall der Präcipitinreaktion mit einem negativen Befund der Komplementablenkung vergesellschaftet ist. In beiden Fällen aber entspricht der Ausfall der Ablenkungsmethode den tatsächlichen Verhältnissen. Es hat daher den Anschein, als ob heterologe Komplexe von Antigen und Antikörper bis zu einem gewissen Grade der Fähigkeit der Komplementbindung entbehren, während die Verbindungen von homologem Antigen und Antikörper auch dann Komplement-absorbierend wirken, wenn das Resultat der Präcipitinreaktion unterhalb der Grenze der Sinnfälligkeit gelegen ist. Ob dieser Unterschied der beiden Methoden auf eine Verschiedenheit der präcipitierenden und die Komplementbindung vermittelnden Antikörper zu beziehen ist, soll dahingestellt bleiben. Man könnte ja, wenn es sich um differente Antikörper handelt, annehmen, daß diejenigen vom Amboceptortypus spezifischer sind, als die Präcipitine. Aber diese Fragen bedürfen weiterer Analyse, bevor ein bindender Schluß gezogen werden kann. Jedenfalls ergibt sich aus den vorliegenden Untersuchungen, daß die Komplementablenkungsmethode es erlaubt, die Eiweißdifferenzierung nicht nur empfindlicher und sinnfälliger, sondern auch spezifischer zu gestalten, als die Präcipitation.

Über die Differenzierung des Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten.

Von

H. Sachs und J. Bauer.

In der vorangehenden Arbeit dieses Heftes hat der eine von uns (B.) gezeigt, daß die Komplementablenkungsmethode die Differenzierung des Eiweißes in mehr spezifischer Weise gestattet, als die Präcipitinreaktion. Es gelingt zwar, wie bekannt, auch mit letzterer, die Herkunft von Eiweißlösungen zu ermitteln, wenn man sich an die besonders von Uhlenhuth[1]) stets betonten Kautelen der Verwendung verdünnter Lösungen und einer beschränkten Beobachtungsdauer hält. Diese Vorschriften sind dadurch veranlaßt, daß die heterologen Reaktionen erst in konzentrierteren Lösungen der heterologen Eiweißart und in der Regel erst nach mehr oder weniger längerer Zeit in Erscheinung treten. Bei der Komplementablenkung können diese Beschränkungen fortfallen, weil sich aus den bereits erwähnten Untersuchungen und denjenigen Rickmanns[2]) ergeben hat, daß das Ablenkungsverfahren auch bei Verwendung konzentrierter Eiweißlösungen keine Trübungen durch heterologe Reaktionen erfährt. Die Ursache für dieses differente Verhalten kann gewiß zu einem großen Teile in dem Umstand erblickt werden, daß man bei der Komplementablenkung mit weit geringeren Mengen des Antiserums arbeiten kann und muß, als sie für die Präcipitation erforderlich sind. Es hatte jedoch den Anschein, als ob die Reaktion, welche dem Ablenkungsverfahren zu Grunde liegt, auch an und für sich spezifischer ist, als die Präcipitation.

Was nun die praktische Konsequenz dieser Feststellungen und insbesondere ihre Bedeutung für die forensische Bestimmung der Herkunft

1) Uhlenhuth, Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Jena 1905.

2) Rickmann, W., Beitrag zur biologischen Eiweißdifferenzierung. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene, 17. Jahrg., 1907, No. 6, und Arbeiten aus dem kgl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M., Heft 3, Jena 1907.

des Blutes anlangt, so wird es ja in der Mehrzahl der Fälle gelingen, eine Eiweißlösung herzustellen, welche den von UHLENHUTH geforderten Verdünnungsgrad (1:1000) aufweist. Gleichwohl ist es nicht immer einfach, diesem Postulat nachzukommen, wie sich auch UHLENHUTH und BEUMER[1]) in dieser Hinsicht folgendermaßen äußern: „So leicht es ist, dieses Verhältnis zu bestimmen bei flüssigem Blut oder Serum, so schwierig ist es bei gerichtsärztlichen Untersuchungen von Blutflecken.“ Gänzlich ausgeschlossen aber erscheint es, diese für die Präcipitationsprobe notwendigen Bedingungen zu erfüllen, wenn es sich um die Differenzierung einer Eiweißart in Gemischen von Eiweiß verschiedener Herkunft handelt. Solche Verhältnisse können natürlich in der Praxis leicht vorkommen, sei es daß der Delinquent, um sich zu entlasten, absichtlich z. B. auf einen Menschenblutfleck Tierblut gießt, sei es daß es sein Beruf mit sich bringt, daß an seinen Effekten Tierblut in mehr oder weniger großer Menge haftet. Soweit uns bekannt, liegen in der Literatur hinsichtlich der berührten Frage nur wenige Angaben vor. So geben UHLENHUTH und BEUMER an, daß aus der Mischung mehrerer Blutarten jede einzelne für sich erkannt werden kann. NUTTALL[2]) und ZIEMKE[3]) berichten über Versuche, nach denen die Anwesenheit mehrerer Blutarten nicht störend auf die Reaktion wirkt. Sie arbeiteten aber mit Mischungen, die aus gleichen Teilen der verschiedenen Blutarten hergestellt waren. Wenn auch unter solchen Bedingungen natürlich die Diagnose durch geeignetes Verdünnen ermöglicht ist, so stellen die gleichen Mengenverhältnisse doch nur einen ganz bestimmten Fall aus der Reihe der Möglichkeiten dar, der für die Eiweißdifferenzierung keine wesentlich größeren Schwierigkeiten bietet, als die Untersuchung der einzelnen in der Mischung vorhandenen Eiweißarten. Ganz anders werden aber die Bedingungen, wenn die Mischung mehrere Eiweißarten in verschiedener Konzentration enthält. Es wird dann nicht sehr schwierig sein, das in stärkerer Konzentration vorhandene Eiweiß zu ermitteln, indem man nach dem Vorgange UHLENHUTHS das Gemisch in geeigneter Verdünnung zur Anstellung der Präcipitinprobe heranzieht. Will man aber diejenige Eiweißart nachweisen, welche nur in relativ geringer Menge in dem Gemisch vorhanden ist, so kann man den Forderungen, welche UHLENHUTH für die Ausführung der Reaktion stellt, nicht mehr nachkommen. Denn es kann zwar das gesuchte homologe Eiweiß gerade in

1) UHLENHUTH, l. c.

2) NUTTALL, G. H. F., Blood immunity and blood relationship. Cambridge 1904.

3) ZIEMKE, E., Weitere Mitteilungen über die Unterscheidung von Menschen- und Tierblut mit Hilfe eines spezifischen Serums. Deutsche med. Wochenschr., 1901, No. 42.

einer geeigneten Verdünnung vorhanden sein, gleichzeitig befindet sich aber dann das heterologe Eiweiß in einer weit stärkeren Konzentration in der Lösung, so daß bei positivem Ausfall der Reaktion die Frage entsteht, ob sie durch das verdünnte homologe Eiweiß, oder durch das unter den erörterten Umständen sicher stark konzentrierte heterologe Eiweiß bedingt ist. Solche Verhältnisse kommen in der Tat in der Praxis vor[1]), und wir möchten in dieser Hinsicht eine forensische Untersuchung erwähnen, die vor einigen Jahren, zu einer Zeit, als das Komplementablenkungsverfahren noch nicht zur Verfügung stand, im hiesigen Institut vorlag. Es handelte sich um die Kleidungstücke eines Metzgers, von denen von der gerichtlichen Behörde als wahrscheinlich angenommen wurde, daß die auf ihnen befindlichen ausgedehnten Blutflecke zum größten Teil von Rinder- oder Schweineblut herrührten. Die Frage lautete aber, ob sich unter diesem Blute auch Menschenblut befindet. In den aus den Blutlösungen hergestellten Extrakten konnte nun mittels der Präcipitinreaktion ohne weiteres Schweineeiweiß nachnachgewiesen werden, und zwar noch in Verdünnungen, in denen die Reaktion mit einem Antiserum für Menscheneiweiß absolut negativ ausfiel. In stärkeren Lösungen ergab jedoch auch der Zusatz des Menschen-Antiserums eine deutliche, wenn auch schwächere Reaktion. Da aber in starken Lösungen von reinem Schweineserum die Reaktion mit Menschen-Antiserum in gleicher Weise eintrat, konnte ein Schluß auf das Vorhandensein von Menscheneiweiß nicht gezogen werden, wenn auch letzteres durchaus nicht auszuschließen war. In solchen Bedingungen sind also Grenzen der Präcipitinreaktion gegeben, auf welche, wie es uns scheint, bisher zu wenig geachtet wurde.

Es war nun nach den erwähnten Untersuchungen des einen von uns anzunehmen, daß bei der größeren Spezifität der Wirkung, welche man bei der Ablenkungsmethode leicht erreichen kann, auch die Grenzen für die Differenzierung des Eiweißes in Eiweißgemischen erheblich weitere sein dürften, als bei der Präcipitation. Die folgenden Untersuchungen hatten den Zweck, dieser Annahme durch vergleichende Prüfung eine experimentelle Basis zu verleihen. Was die Methodik anlangt, sei auf die Arbeit von BAUER (l. c.) verwiesen. Wir gingen in der Weise vor, daß wir künstliche Mischungen aus verschiedenen Seris herstellten und die in geringerer Menge vorhandene Serumart mittels Präcipitation einerseits, mittels Komplementablenkung andererseits zu differenzieren suchten. Die Antisera waren vom Kaninchen durch Vorbehandlung mit dem entsprechenden Blutserum gewonnen.

1) Es sei hier ganz besonders auch auf die Möglichkeit hingewiesen, daß der Delinquent die etwa an seinen Kleidungsstücken befindlichen Blutflecken auswäscht und den verbleibenden Rest durch Uebergießen mit einer anderen Blutart zu verdecken sucht.

I. Versuche mit Menschen-Antiserum.

Wir beginnen mit einer Versuchsreihe, welche den Nachweis von Menscheneiweiß betrifft. Es wurden zwei Gemische bereitet:

A: 1 ccm Schweineserum + 0,01 ccm ($^1/_{100} \cdot 1{,}0$) Menschenserum + 8 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

B: 1 ccm Schweineserum + 9 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

Die Gemische wurden in verschiedenen Verdünnungen verwandt, bei der Präcipitinreaktion in der Menge von 2,0 ccm, bei der Ablenkungsmethode je 1 ccm. Bei der Präcipitation wurde sofort 20 Minuten lang beobachtet und am nächsten Tage das ausgefallene Sediment notiert.

Tabelle 1.

Verdünnungsgrad der Gemische	Präcipitierende Wirkung von 0,1 ccm Menschen-Antiserum auf	
	A	B
$^1/_1$	2′: + (deutlich) Sed.: stark	2′: + (schwach-deutlich) 5′: deutlich Sed.: mäßig
$^1/_{10}$	2′: + (schwach) 10′: + (deutlich) Sed.: mäßig	10′: Hauch 20′: + (schwach-deutlich) Sed.: gering
$^1/_{100}$	20′: + (schwach) Sed.: gering	20′: + (schwach) Sed.: sehr gering
$^1/_{1000}$	0	0

Wie die Tabelle zeigt, reagieren beide Gemische bei der Prüfung auf Menscheneiweiß positiv, obwohl letzteres nur in der Mischung A enthalten ist. Zwar sind in der Stärke der Reaktion Differenzen vorhanden, dieselben sind aber sicherlich zu gering, um im praktischen Fall ein Urteil dahin abzugeben, daß in dem einen Gemisch Menscheneiweiß vorhanden ist, in dem anderen nicht. Ganz anders aber liegen die Verhältnisse bei der Ablenkungsreaktion, über welche Tabelle 2 Aufschluß gibt.

Tabelle 2.

Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,002 ccm Amboceptor (vom Kaninchen durch Vorbehandeln mit Rinderblut gewonnenes inaktiviertes Serum) + 0,1 ccm Komplement (Meerschweinchenserum).
Testdosis des Menschen-Antiserums: 0,02 ccm.

Mengen der Gemische ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,02 ccm Menschen-Antiserum auf	
	A	B
1,0	0	komplett
0,1	0	
0,01	0	
0,001	stark	
0	komplett	

Zu bemerken ist, daß in diesem, wie auch in allen folgenden Ablenkungsversuchen die Kontrollen, welche stets ohne Antiserum angesetzt wurden, wenn nicht anders angegeben, komplett gelöst waren. Die vorstehende Tabelle zeigt, daß es auch in dem Gemisch, welches 100mal soviel Schweineserum als Menschenserum enthält, mittels des Ablenkungsverfahrens gelingt, das Menscheneiweiß mit Sicherheit und in sinnfälliger Weise zum Nachweise zu bringen, während das Ergebnis der Präcipitinreaktion nicht eindeutig ist.

Um die Verhältnisse denjenigen der Praxis mehr anzupassen, wurden ferner alte (ca. $^1/_2$ Jahr) Blutflecken, die auf Leinen angetrocknet waren, extrahiert. Es wurden derart Lösungen aus angetrocknetem Schweine- und Menschenblut und durch Verdünnen mit Kochsalzlösung in beiden eine bei kolorimetrischem Vergleich übereinstimmende Konzentration hergestellt. Nun wurden gemischt:

C: 9,9 ccm Schweineblutlösung + 0,1 ccm Menschenblutlösung.

D: 9,9 ccm Schweineblutlösung + 0,1 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

Mit beiden Mischungen wurde nun zunächst die Präcipitinreaktion angestellt. Das zu den folgenden Versuchen benutzte Menschen-Antiserum war ein anderes als in Tabelle 1 und 2.

Tabelle 3.

Verdünnungsgrad der Gemische	Präcipitierende Wirkung von 0,1 ccm Menschen-Antiserum auf	
	C	D
$^1/_2$	2′: + (deutlich) Sed.: mäßig	4′: + (deutlich) Sed.: mäßig
$^1/_{10}$	2′: + (schwach) 7′: deutlich Sed.: mäßig	4′: + (schwach) 10′: + (schwach-deutlich). Sed.: gering
$^1/_{100}$	0	0

Auch hier ist also der Unterschied in der Reaktion ein sehr geringer. Auch wurde kein wesentlich besseres Resultat erzielt, wenn mit der Antiserummenge heruntergegangen wurde bis zu derjenigen Dosis, die für das Ablenkungsverfahren verwandt wurde.

Tabelle 4.

Verdünnungsgrad der Gemische	Präcipitierende Wirkung von 0,015 ccm ($^1/_{10} \cdot 0{,}15$) Menschen-Antiserum auf	
	C	D
$^1/_2$	10′: + (schwach) Sed.: mäßig	15′: + (schwach) Sed.: gering
$^1/_{10}$	10′: + (schwach) Sed.: gering	20′: sehr schwach Sed.: sehr gering

Auch bei Verwendung einer geringen Antiserummenge von 0,015 ccm war also noch immer eine Reaktion in der nur Schweineblut enthaltenden

Lösung zu bemerken. Dagegen wurde beim Anstellen der Komplementablenkung wieder ein absolut spezifisches Resultat erzielt.

Tabelle 5.

Mengen der Gemische ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,015 ccm Menschen-Antiserum auf	
	C	D
1,0	0	komplett
0,1	0	
0,01	0	
0,001	fast komplett	
0	komplett	

Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,002 ccm Amboceptor + 0,05 ccm Komplement (Meerschweinchenserum). In den Kontrollen ohne Antiserum war alles komplett gelöst.

In den weiteren Bereich der Untersuchung wurden nun zunächst solche Fälle gezogen, denen eine praktische Bedeutung zukommt. Es handelt sich hier an erster Stelle um den Nachweis von Fleischverfälschungen auf biologischem Wege. Besonders sind es Beimengungen von Pferdefleisch zu Fleich- und Wurstwaren, deren Ermittelung in der Nahrungsmittelkontrolle eine große Rolle spielt und durch Anwendung der Präzipitation erfolgt. Die folgenden Versuche beschäftigen sich daher mit dem Nachweis von Pferdeserum in Gemischen verschiedener Serumarten.

II. Versuche mit Pferde-Antiserum.

Es wurden folgende Gemische hergestellt:

E: 0,5 ccm (10 ccm $^1/_{20}$) Schweineserum + 0,01 ccm (1 ccm $^1/_{100}$) Pferdeserum.

F: 0,5 ccm (10 ccm $^1/_{20}$) Schweineserum + 1 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

G: 0,5 ccm (10 ccm $^1/_{20}$) Rinderserum + 0,01 ccm (1 ccm $^1/_{100}$) Pferdeserum.

H: 0,5 ccm (10 ccm $^1/_{20}$) Rinderserum + 1 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

Tabelle 6.

Präcipitation.

Verdünnungsgrad der Gemische	Präcipitierende Wirkung von			
	0,1 ccm Pferde-Antiserum auf		0,05 ($^1/_2$. 0,1) ccm Pferde-Antiserum auf	
	E	F	G	H
$^1/_1$	2′: + (schwach) 8′: deutlich Sed.: mäßig	2′: (schwach) 8′: + (schwach-deutlich) 20′: deutlich Sed.: mäßig	9′: sehr schwach 20′: schwach Sed.: gering	9′: sehr schwach 20′: schwach Sed.: gering
$^1/_{10}$	15′: Andeutung 30′: + (schwach) Sed.: gering	15′: ? 30′: sehr schwach Sed.: sehr gering	0	0

Tabelle 7.

Komplementablenkung.

Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,002 ccm Amboceptor + 0,05 ccm (bei G und H 0,075 ccm) Komplement (Meerschweinchenserum). Testdosis des Pferde-Antiserums: 0,015 ccm.

Mengen der Gemische ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,015 ccm Pferde-Antiserum auf			
	E	F	G	H
1,0	0	komplett	0	mäßig
0,1	0		0	komplett
0,01	Spur		stark	
0	komplett		komplett	

Die Kontrollen ohne Antiserum waren komplett gelöst; bei den Gemischen G und H trat in den ersten Röhrchen eine nur mäßige Hämolyse ein. Das Ergebnis stimmt mit den vorhergehenden Versuchen überein, indem es zeigt, das Beimengungen von Pferdeserum, die hier im Verhältnis 1:50 gewählt wurden, durch das Komplementablenkungsverfahren erheblich exakter nachgewiesen werden können, als mittels der Präcipitation.

III. Versuche mit Rinder-Antiserum.

Folgende Mischungen wurden untersucht:

I: 1 ccm Pferdeserum + 0,01 ccm (1 ccm $^1/_{100}$) Rinderserum + 8 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

K: 1 ccm Pferdeserum + 9 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

Tabelle 8.

Präcipitation.

Verdünnungsgrad der Gemische	Präcipitierende Wirkung von			
	0,1 ccm Rinder-Antiserum auf		0,01 ($^1/_{10}$. 0,1) ccm Rinder-Antiserum auf	
	I	K	I	K
$^1/_1$	1′: + (deutlich) Sed.: flockig-stark	1′: + (deutlich) Sed.: flockig-stark	1′: diff. schwache Trübung Sed.: mäßig	1′: diff. schwache Trübung Sed.: mäßig
$^1/_{10}$	1′: + (schwach) 2′: deutlich Sed.: mäßig	1′: + (schwach) 2′: schwach-deutlich 4′: deutlich Sed.: mäßig	3′: + (sehr schwach) 10′: schwach-deutlich Sed.: gering	3′: + (sehr schwach) 10′: schwach-deutlich Sed.: gering
$^1/_{100}$	45′: Andeutung Sed.: sehr gering	45′: Andeutung Sed.: sehr gering	0	0
$^1/_{1000}$	0	0	0	0

Tabelle 9.

Komplementablenkung.

Um die hämolytischen Amboceptoren des Rinder-Antiserums auszuschalten, wurde als Amboceptor das inaktivierte Serum eines mit Schweineblut vorbehandelten Kaninchens benutzt.

Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Schweineblut + 0,1 ccm Amboceptor + 0,1 ccm Komplement (Meerschweinchenserum).

Testdosis des Rinder-Antiserums: 0,01 ccm.

Mengen der Gemische ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,01 ccm Rinder-Antiserum auf	
	I	K
1,0	0	komplett
0,1	0	
0,01	fast komplett	
0	komplett	

Zur Tabelle ist zu bemerken, daß in den Kontrollen ohne Antiserum überall komplette Hämolyse erfolgt war. Der Versuch ist besonders eklatant, da es hier bei der Präcipitation recht schwierig war, überhaupt einen quantitativen Unterschied zwischen der reinen Lösung von Pferdeserum und dem auch Rinderserum enthaltenden Gemisch festzustellen. Das Ablenkungsverfahren hat jedoch auch hier die sinnfällige Differenzierung der beiden Gemische ohne weiteres ermöglicht.

IV. Versuche mit Schweine-Antiserum.

Zu den Versuchen mit Schweine-Antiserum dienten die folgenden Gemische:

L: 1 ccm Rinderserum + 0,01 ccm (1 ccm $^1/_{100}$) Schweineserum + 8 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

M: 1 ccm Rinderserum + 9 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung.

Tabelle 10.

Verdünnungsgrad der Gemische	Präcipitierende Wirkung von 0,1 ccm Schweine-Antiserum auf	
	L	M
$^1/_1$	1′: + (schwach) 5′: deutlich Sed.: mäßig	1′: + (schwach) 5′: deutlich Sed.: mäßig
$^1/_{10}$	20′: + (schwach-deutlich) 30′: deutlich Sed.: gering	20′: + (schwach-deutlich) 30′: deutlich Sed.: gering
$^1/_{100}$	40′: ? Sed.: 0	0

Tabelle 11.

Hämolytisches System: 1 ccm 5-proz. Rinderblut + 0,002 ccm Amboceptor + 0,05 ccm Komplement (Meerschweinchenserum).

Testdosis des Schweine-Antiserums: 0,01 ccm.

Mengen der Gemische ccm	Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,01 ccm Schweine-Antiserum auf	
	L	M
1,0	0	mäßig
0,1	0	komplett
0,01	fast komplett	
0	komplett	

Was die Kontrollen ohne Antiserum anlangt, so hemmten 1 ccm von L und M die Hämolyse etwas; in den übrigen Röhrchen war komplette Hämolyse eingetreten. Auch in diesem Falle tritt also die Ueberlegenheit des Ablenkungsverfahrens über die Präcipitinreaktion in bezug auf die Identifizierung des Blutes in Blutgemischen deutlich hervor. Die Anstellung der Präcipitinreaktion mit der zur Komplementablenkung benutzten geringen Antiserummenge (0,01 ccm) führte zu keinem Ergebnis, weil bei dieser Dosis auch in dem Schweineserum enthaltenden Gemisch L keine Reaktion mehr wahrzunehmen war. Es wurde daher die minimale Menge des Antiserums ermittelt, welche in L noch eine deutlich erkennbare Reaktion verursachte. Die gefundene Menge (0,025 ccm) wurde nun als Testdosis für Präcipitation und Komplementablenkung benutzt. Das Resultat ist in Tabelle 12 notiert.

Tabelle 12.

Verdünnungsgrad der Gemische	Präcipitierende Wirkung von 0,025 ($^1/_4$. 0,1) ccm Schweine-Antiserum auf		Eingetretene Hämolyse bei Wirkung von 0,025 ccm Schweine-Antiserum auf 1 ccm von	
	L	M	L	M
$^1/_1$	3′: diffuse Trübung Sed.: mäßig	3′: diffuse Trübung Sed.: mäßig	0	fast komplett
$^1/_{10}$	5′: Andeutung 10′: deutlich Sed.: mäßig	5′: Andeutung 15′: deutlich Sed.: mäßig	0	komplett
$^1/_{100}$	60′: Andeutung Sed.: 0	60′: Andeutung Sed.: 0	fast komplett	komplett
$^1/_{1000}$	0	0	komplett	komplett

Die Tabelle zeigt also, daß auch bei Verwendung einer möglichst geringen Antiserummenge die Präcipitation den nur quantitativen Charakter der Spezifität nicht verliert und es nicht gestattet, in einem Gemisch, das, wie im vorliegenden Falle, 100mal soviel Pferdeserum

als Schweineserum enthält, letzteres zu differenzieren. Bei dem Komplementablenkungsverfahren gelingt jedoch unter ganz gleichen Bedingungen der Nachweis des Schweineserums in eindeutiger Weise.

Wenn wir nun zum Schluß die mitgeteilten Versuchsergebnisse zusammenfassen, so ergibt sich übereinstimmend, daß der Nachweis von Eiweiß-Beimengungen in Lösungen einer anderen Eiweißart mittels Präcipitation auf große Schwierigkeiten stoßen, wenn nicht überhaupt unmöglich sein kann, daß dagegen das Komplementablenkungsverfahren auch in diesen Fällen erfolgreich zum Ziele führt. In der forensischen Praxis dürfte daher die Methode der Komplementablenkung für die Differenzierung des weniger konzentrierten Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten von ganz besonderer Bedeutung sein.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 2936

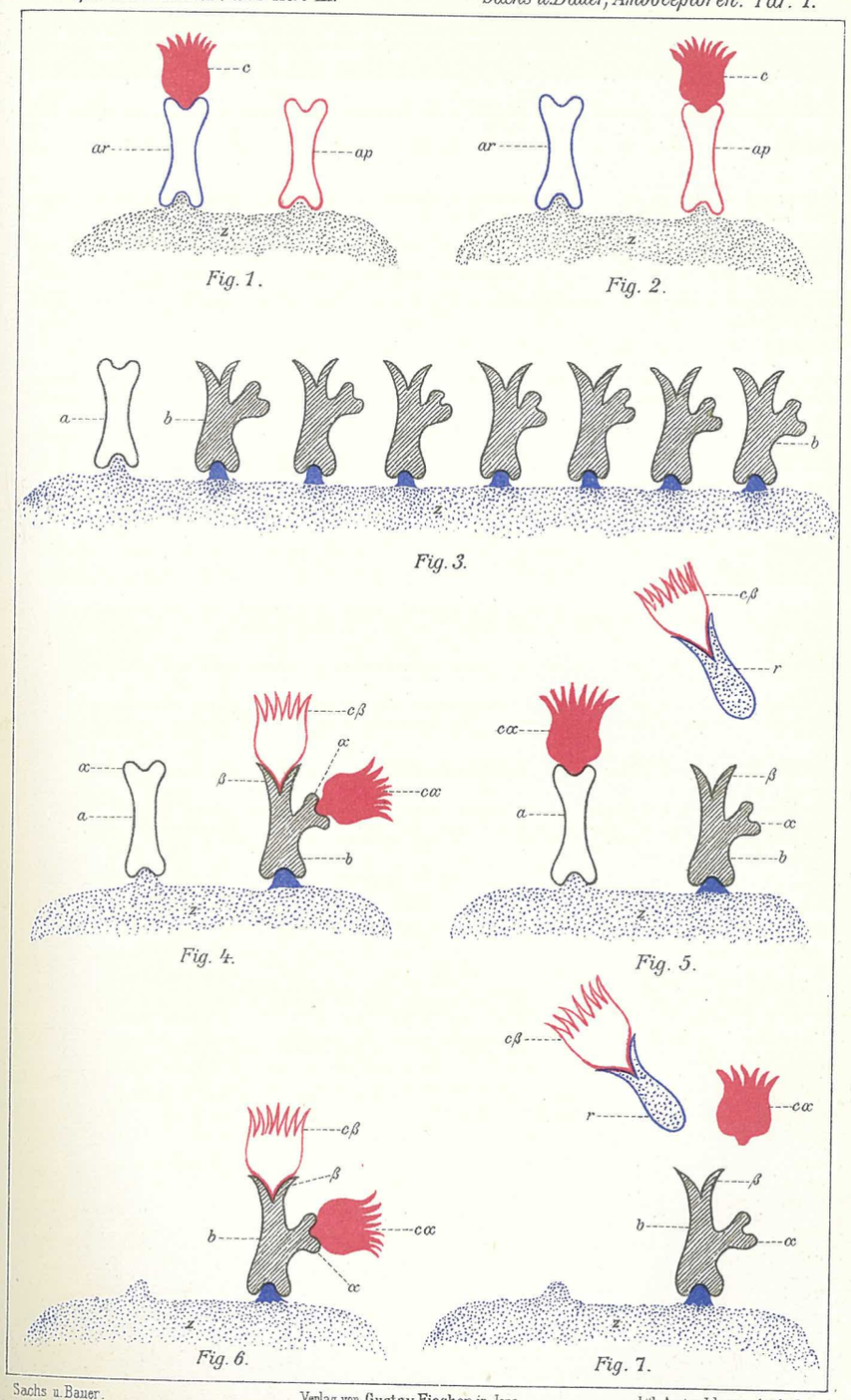


Fig. 1. *Fig. 2.* *Fig. 3.* *Fig. 4.* *Fig. 5.* *Fig. 6.* *Fig. 7.*

Sachs u. Bauer. Verlag von Gustav Fischer in Jena. Lith. Anst. v. Johannes Arndt, Jena.