

A vörös vérfesték bomlása trypsin hatására.

Írta: REINBOLD BÉLA dr.

A vörös vérfesték tudvalevőleg két főalkatrészből áll, mely egymástól aránylag könnyen különválasztható. Amíg azonban a vörös vérfesték oxyhaemoglobin alakjában bizonyos nehézségek leküzdése után aránylag tisztán és kémiaileg egységesen előállítható, addig e komponensek egyikéről sem állíthatjuk azt, hogy tisztán és eredeti állapotának megfelelő alakban ismerjük. Az eljárás, melylyel a globint — a vérfestéknek fehérje-komponensét — a haematinnak nevezett chromofor csoporttól elkülönítjük, nem bonyolult ugyan, a beavatkozás azonban többnyire meglehetősen erélyes, úgy, hogy az elsődleges bomlás termékei a tovább menő hatások termékeivel szennyeződhetnek. A termékek kémiai tisztaságáról annál kevésbé lehetünk meggyőződve, mert ennek vizsgálására nem rendelkezünk megfelelő eljárásokkal. Nem kívánnék itt annak részletezésébe bocsátkozni, hogy a fehérje-komponensre nézve e tekintetben miféle nehézségekkel állunk szemben. Körülbelül ugyanazok ezek, mint amelyekkel a fehérjék kémiájában általában találkozunk. A másik komponens — a haematin — sötétszínű amorph anyag, mely a legtöbb közömbös oldószerben egyáltalában nem, egyes oldószerekben nyomokban oldódik. E tulajdonságokból már látszik, hogy a hasonló tulajdonságú szennyezésektől ép oly nehéz megtisztítani, mint e szennyezések jelenlétéről, vagy távollétéről, meggyőződni.

Azok előtt, kik a haematin kémiai szerkezetére vonatkozó kutatásokat ismerik és tudják, hogy azok a szerzők, kiknek a haematinra vonatkozó ismereteink legtöbbjét köszönjük, e tekintetben milyen részletekbe menő következtetésekbe bocsátkoztak, ez a körülmény mindenesetre sajátságosnak tűnhetik fel. Meg kell azonban gondolni, hogy a szerkezetre vonatkozó adatok többé-kevésbé közvetett okoskodáson alapulnak, melyek során ez a körülmény is

számbavételezett, másfelől pedig a kiindulási anyag tisztasága félig-meddig biztosította a megvizsgált anyag tisztaságát. A szerkezetre nézve egyébként az egyes szerzők felfogásában jelentékeny különbségek vannak. A szerkezet biztos felderítésének akadálya pedig bizonyára nemcsak a haematiummolekula nagyságában és bonyolult voltában rejlik — hiszen a kémia már ennél nagyobb nehézségekkel is megküzdött — hanem inkább és főleg a tiszta haematin előállításának bizonytalanságában. Ennek megszüntetésével a szerkezetre vonatkozó elméletek is egységesebb alapra helyezkedhetnének.

A haematin előállítására vonatkozólag a következőkről kell megemlékeznünk:

Az oxyhaemoglobiu — mint azt már HOPPE SEYLER F. leírta — már igen gyenge savak hatása alatt häematinra és globinra bomlik. Ezek mellett SCHULTZ¹ szerint még egy albumose-szerű anyag is keletkezik, LAWROW² pedig a bomlástermékek között zsírsavakat is talált. Lúgok behatása hasonló bomláshoz vezet. Ismeretes, hogy tömény NaOH-oldattal a vér haematin-képződés folytán szennyes, zöld színű lesz. A fölös hydrazin hydrat hatására végbemenő bomlás³ lényege ugyanez, csak hogy a felszabaduló chromofor-csoport egyben haemochromogenné redukálódik. CAZENEUVE és BRETEAU⁴ azt ajánlja, hogy az alvadékot, mit a vérből Na₂SO₄ hozzáadása és melegítés útján nyerhetünk, vonjuk ki 1% sóskasavat tartalmazó 93%-os alkohollal és a kivonatból a haematint cseppenként hozzáadott ammoniákkal csapjuk ki. El szerzők szerint az így nyert haematint előbb alkohollal való mosással, majd 5%-os ammoniákban való feloldás és ecetsavval való kiesapás útján, végül vízzel, alkohollal és aetherrel mosás útján kell megtisztítani.

Lényegében hasonló STRYZOWSKI-nak⁵ következő eljárása: Defibrinált vérből kétszeres mennyiségű alkohollal csapadékot választunk le és ezt 100 r. 95%-os alkoholnak, 500 r. aethernek és 12 r. sóskasavnak keverékével kivonjuk. A kivonatból száraz NH₃-gáz bevezetésére haematinból és sóskasavas ammoniumból álló csapadék válik ki, melyet aetherrel ki kell mosni és gyengén

¹ SCHULTZ FR. N. Zeitschrift für physiologische Chemie 24, 468 [1898]

² LAWROW D. Zeitschrift für physiologische Chemie 26, 345 [1899]

³ HÜPNER G. Archiv für Anatomie und Physiologie 1899, 491 l.

⁴ CAZENEUVE P. és BRETEAU B. Comptes rendu de l'académie des sciences 128, 678 [1899].

⁵ STRYZOWSKI C. Pharmaceutische Post 30, 2 [1897] Chemisches Centralblatt 1897, I. 295.

ammoniakos alkohollal kivonni. Ebből a kivonatból, ha bepároljuk, grafityszerű por alakjában válik ki a haematin.

Ugyanezen csoportba tartozik PIETTRE és VILA¹ eljárása, mely szerint a vérfestéket vízfürdőn 3% hangyasavat tartalmazó methylalkohollal kezeljük, az oldatot megszűrjük és bepároljuk. A maradékból a szerzők szerint kristályos haematin válik ki.

HUSSON² és JÄDERHOLM³ szerint jod hatására a vérfestékből ugyancsak haematin és globin keletkezik. KRUKENBERG⁴ úgy találta, hogy a vérfestékből kairin, thallin vagy salicylsav hatására haematin hasad le. PUGLIESE⁵ a varasbéka mérgeének hasonló hatását látta. HAMSİK⁶ a savval való bontás helyett a lúg közvetlen alkalmazását előnyösebbnek találta; eljárása szerint a vért egyenlő mennyiségű 40%-os NaOH-oldattal kell főznünk 3–5 órán át. Ha az így nyert sötétszínű folyadékot megszűrjük, közömbösítjük és térfogatának 8–10-szeresére felhígítjuk, bőséges barna csapadék válik ki, mely más bomlástermékek mellett mintegy 20%-nyi haematint tartalmaz.

A haematin előállításának e közvetlen módjai mellett meg kell emlékeznünk azokról az eljárásokról, melyek közvetett úton, nevezetesen a haeminen át juthatnak haematinhoz. Ilyen eljárás a NENCKI—SIEBER⁷-féle, mely szerint a haemint, melyet előbb vérből nagyobb mennyiségben előállítunk, híg lúgban feloldjuk és az oldatból sósavval haematint csapunk ki. EPPINGER⁸ a készítmény tisztasága érdekében jónak látta a lúgot jéghidegen alkalmazni, az oldatot azonnal igen híg kénsavba beleszűrni és az így keletkezett csapadékkal, melyet még hideg és forró vízzel is kimosott, az egész folyamatot ismételni.

Csak érinteni óhajtom e helyen, hogy LAIDLAW⁹ haematoporphyrinból STOKES-féle keverékkel és hidrazin-hydrattal való főzéssel,

¹ PIETTRE M. és VILA A. Comptes rendu de l'académie des sciences 141 1041 [1906]

² HUSSON C. Compt. rend. de l'acad. des Sc. 81, 477, [1875.]

³ JÄDERHOLM A. Archiv für pathol Anat. 77, 488, [1879.]

⁴ KRUKENBERG C. F. W. Chemische Untersuchungen zur Wissenschaftlichen Medizin Jena 1. 80 [1886]; Jahresber. u. d. Fortschritte der Tierchemie 16, 111 [1887]

⁵ PUGLIESE A. Arch. di Farm. e di Terap. 2 Fasc. II [1894] Jahresber. ü. d. Fortsch. d. Tierchemie 24, 452, [1895].

⁶ HAMSİK A. Zeitschrift f. physiol. Chemie 80, 34, [1912.]

⁷ NENCKI M. és SIEBER N. Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft 17, 2267 [1884].

⁸ EPPINGER P. Inaug. Diss. München, 1907.

⁹ LAIDLAW P. P. Journal of Physiol. 31, 464, [1904].

tehát synthesis útján, egy Fe-tartalmu barna anyagot állított elő, melyet haematinnak tartott. KÜSTER¹ szerint azonban ez az anyag a mesoporphyrin hydroxyferrisójának tekintendő.

A felsorolt eljárások sokféleségéből is arra a gondolatra juthatunk, hogy az az anyag, mit különböző szerzők különböző eljárásokkal előállítottak és haematinnak neveztek, lehetett ugyan rokontermészetű, de aligha volt teljesen azonos. Valóban semmi bizonyítékunk sincsen, mely a különböző készítmények azonosságát mutatná, sőt nélkülözzük az egyes készítmények egységességének és kémiai tisztaságának bizonyítékait is. Eltekintve attól, hogy a készítményeket a vér többi alkotórészeinek, valamint a globinnak bomlástermékei szennyezhetik, az erősebb lúg- vagy sav-behatás a chromofor csoportnak továbbmenő bomlásához, molekulán belüli átrakodásokhoz vezethet; sav és alkohol jelenléte esetén különböző eszterek keletkezésére gondolhatunk. A haematinnak haeminen át való előállítása alkalmával pedig mindezen folyamatok már a haemin előállítása rendén szerepelhetnek. Mindazon kísérletekben, melyekben a szerzők ezt a módszert alkalmazták, de készítményük tisztaságára súlyt helyeztek, igyekeztek a haemint magát különböző átkristályosító eljárásokkal egységessé tenni.

Természetes, hogy ezek tudatában nem lehetünk megnyugodva a felől, hogy a haematin, mit eljárásainkkal a vérfestékből előállíthatunk, valóban megfelel a vérfesték chromofor csoportjának. Hogy e csoportot lehetőleg eredeti alakjában különválasszuk, más — és pedig lehetőleg enyhe — eljárással kell próbálkoznunk.

Ez a gondolat vezette ZEYNEK-et², midőn a vérfestéket gyenge sósav jelenlétében pepsinnel digerálta. A pepsin-sósav hatása alatt a haemoglobinnak fehérje-komponense szétesvén a prosthetikus csoport szabaddá váltott és savban oldhatatlan lévén, kicsapódott. Ezt a terméket ZEYNEK „Verdauungshaematin“-nak nevezte el és KÜSTER-rel együtt feltételezi, hogy ez az az anyag, mely a vérfesték chromofor csoportjának tényleg megfelel. A viszonyt illetőleg különben, mely a vérfesték és haematin között feltételezendő, KÜSTER³-nek az a véleménye, hogy ez a haematin nem az *oxyhaemoglobin* chromofor csoportjának, hanem a *methaemoglobinénak* felel meg, míg *oxyhaemoglobin* megfelelő komponensét, mely eddig elő nem állítottott, haemochromogenperoxyd névvel jelöli.

¹ KÜSTER W. (és DEHLE P.) Zeitschr. für physiol. Chemie 86, 51, [1913].

² ZEYNEK R. Zeitschr. für physiol. Chemie 30, 126, [1900].

³ KÜSTER W. Berichte der deutsch. chem. Gesellsch. 43, 370, [1910].

A vörös vérfestéknek pepszinnel és sósavval való emésztése révén még SOLLMANN¹ és GARZIA² állított elő haematint.

A vérfestéknek trypsinnel való bomlására illetőleg kevés adattal rendelkezünk. HOPPE SEYLER F. már 1877-ben megjegyezte, hogy a pankreas fermentummal szemben az oxyhaemoglobin kevésbé ellenálló, mint a redukált haemoglobin, a bomlás menetéről azonban nem nyújtott közelebbi adatokat. ZEYNEK az ő „Verdauungshaematinjára” vonatkozó közleményében azt jegyzi meg, hogy a vörös vérfestéknek emésztéses bontása trypsinnel nem sikerült. Ismeretes a vérsavónak antitryptikus hatása, melynél fogva a vérnek, helyesebben a vérsavónak igen kis mennyisége a fehérjék mesterséges trypticus emésztődését nagyfokban akadályozza, illetőleg a trypsinogen aktiválódását meggátolja.

Ezeknek az adatoknak egybevetése után nem látszott kizártnak az, hogy a vérfesték trypsinnel ZEYNEK ellenkező eredménye dacára is sikeresen bontható. Fel lehetett ugyanis tételezni, hogy elegendő oxygenium jelenlétében és a vérfesték ú. n. önredukciójának kizárásával, továbbá a vérsavónak lehetőleg tökéletes eltávolítása után a trypsin hatását mi sem fogja akadályozni.

A kérdés azért látszott a megvizsgálásra érdemesnek, mert a trypsin-emésztés gyengén lúgos kémhatás mellett folyván le, a beavatkozás a haematin szempontjából a pepsin-sósav-emésztésnél is enyhébbnek mondható, míg ellenben a fehérje-komponens szempontjából jóval erélyesebb, mint ez. Remélni lehetett tehát, hogy az eljárás tiszta és kémiailag egységes haematinhoz vezet, mely a vörös vérfesték prosthetikus csoportjának épügy, vagy még inkább megfelel, mint a ZEYNEK-féle „Verdauungshämatin.”

Kísérleteimben az idevágó kérdések közül a következőkre igyekeztem feleletet találni: Van-e a vérfestéknek része a vér antitryptikus hatásában? Lehet-e trypsinhatással a haemoglobinból és néhány közvetlen származékából (oxyhaemoglobin, methaemoglobin, szénoxydhaemoglobin) haematint vagy haematinszerű terméket kapni?

Hogyan foly le a vérfesték emésztődése levegő jelenlétében és levegő kizárásával?

¹ SOLLMANN F. *Americ. Journ. Pharm.* 74, 275 [1902]; *Chem. Centralbl.* 1902, II. 229.

² GARZIA F. *Biochem. Zeitschrift* 16 277 [1909].

Van-e a vörös vérfestéknek antitryptikus hatása?

E kérdésre vonatkozó kísérleteimben egyrésztől különböző, friss vérfesték-készítményeket, stromasuspensiót, vagy teljes vért, másrésztől KAHLBAUM-féle trypsinből készült vízes glicerines oldatot használtam. Pontosán a FULD—GROSS-féle¹ eljárást követve, az utóbbiból minden kísérlet alkalmával egy-egy sorozat kémcsőben különböző (0.1—1.0 cm³) mennyiségeket 0.85%-os konyhasóoldattal 1—1 cm³-re hígítottam fel, előbb 1—1 cm³ híg vérfesték-oldatot vagy stromasuspensiót adtam hozzá, majd miután ezzel mintegy 15 perccet szobahőmérséken állott, valamennyi próbát 1—1 cm³ 1%-os kasein-oldattal kevertem. Egyidejűleg készült az ellenőrző sorozat, melybe a megvizsgálandó vérfesték-oldat helyett 1—1 cm³ 0.85%-os NaCl-oldatot adtam. 40°-os vízfürdőben 1/2 órán át tartó digesztálás után a sorozat minden tagját alkoholos ecetsavval kezeltem,² megfigyelve, hogy melyek maradnak e kezelésre tiszták és melyek lesznek zavarosak. E kísérletek alábbi kimutatásában feltüntetett szám a két csoport határán levő szélső tisztán maradó tagot jelzi, mutatva egyszerszint a kérdéses próbához adott trypsin-oldat mennyiségét tízedeköbcentiméterekben kifejezve. E számnak, melyet az emésztődés határértékének nevezhetünk, magasabbnak kell lennie, mint az ellenőrző próbában kapott párhuzamos érték, ha a trypsin hatását a megvizsgált anyag gátolja, ezzel azonosnak kell lennie, ha a megvizsgált anyag a trypsin hatása tekintetében közömbös, ellenben kisebb lesz ennél, ha az illető anyag a trypsin hatásának kifejlődését segíti.

Minden sorozat egyik tagja ellenőrzésül szolgált és vérfesték-oldat helyett konyhasó-oldattal hígítva került a thermostatba.

	Az emésztődés határértéke
I. Konyhasó-oldattal többször mosott lóvértestekből nyert, többször átkristályosított 26. sz. vérfesték-készítmény.....	6
Lóvértetek stromájának suspensiója.....	5
Ellenőrzés.....	6
II. Konyhasó-oldattal többször mosott lóvértestekből nyert, többször átkristályosított 28. sz. vérfesték-készítmény.....	6
Konyhasó-oldattal többször mosott lóvértestekből nyert, többször átkristályosított 1. sz. vérfesték-készítmény.....	6

¹ J. WOHLGEMUTH: Grundriss der Fermentmethoden. J. SPRINGER Berlin, 1913. 195. l.

² A stromasuspensióval végzett kísérletekben a folyadékot előbb természetesen megsűrtem.

	Az emésztődés határértéke
Konyhasó-oldattal többször mosott lóvértestekből nyert, többször átkristályosított 10. sz. vérfesték-készítmény.....	10
Konyhasó-oldattal többször mosott szarvasmarha vértestekből előállított, agyaglapon átkristályosítás nélkül szárított oxyhaemoglobin.....	9—10
Ellenőrzés	10
III. Saját vérem kb. 100-szorosan hígítva	erős gátlás (10 erős zavarodást ad)
Ellenőrzés	10
IV. Konyhasó-oldattal többször mosott lóvértestekből nyert, többször átkristályosított 17/a. számú vérfesték-készítmény.....	4
Konyhasó-oldattal többször mosott lóvértestekből nyert, többször átkristályosított 21. számú vérfesték-készítmény.....	4
Konyhasó-oldattal többször mosott lóvértestekből nyert, többször átkristályosított 26. számú vérfesték-készítmény.....	5
A II. kísérletben is használt szarvasmarha-vérfestékkészítmény	4
Mosott lóvértestekből nyert stroma suspensiója.....	4
Ellenőrzés.....	5—6

Kitűnt a kísérletekből, hogy míg a teljes vér a casein trypsin-emésztődését nagyfokban gátolja, addig a savtól mosás útján megszabadított vértesteknek sem stromája, sem vérfestéke nem mutat hasonló hatást. Sőt ha az ellenőrző próbákkal szemben mutatkozó csekély különbséget számbavesszük, inkább a trypsin-emésztést elősegítő hatásról lehetne beszélni. Ennek megállapítása után némi kilátással kezdek azokhoz a kísérletekhez, melyeknek fennebb már említett célja volt a vörös vérfestéknek chromofor csoportját a fehérje-komponenstől enyhén, trypsin-hatással különválasztani és ZEYNEK „Verdauungshämatin“-jával analog terméket előállítani. Természetesen fennállott még annak a lehetősége, hogy a vérfesték — bár a trypsinnel szemben gátló hatást nem gyakorol — ezzel a fermentummal szemben különös ellenállóképességet tanúsíthat.

Lehet-e trypsin-emésztés útján a vörös vérfestékből haematin-szerű terméket kapni? Hogyan foly le az emésztődés levegő nélkül és hogyan levegő jelenlétében?

Előzetes kísérlet.

Lóvérből készült tiszta (kevés methaemoglobint tartalmazó) száraz kristályos oxyhaemoglobint kevés 1^o/₁₀₀-os Na₂CO₃ oldatban felkevertem, trypsinglycerinnel 3—4 napig 35—45°-os vízfürdőben digeráltam, miközben a folyadék színképének változását időről-időre megfigyeltem. Az elnyelési színkép kezdetben csak két elnyelési csíkot mutatott, melyek az oxyhaemoglobin és methaemoglobin csíkjainak

¹ Kétszeres töménységű trypsin-oldattal.

felelték meg. Nem szabad elfelejteni t. i., hogy az oxyhaemoglobin csikjai mögött a methaemoglobin csikjai, ha a két festékanyag együtt van jelen, mintegy elrejtőzhetnek és ezt, ha a methaemoglobin viszonylagos mennyisége csekély, egyáltalában nem, ha jelentékeny, csak gyakorlott szemmel, az első csík előtt mutatkozó előárnyékból és a két csík közötti terület homályosságából lehet megállapítani. E csíkok mellett az emésztés folyamán időről-időre a methaemoglobin savanyú oldataira jellemző csík is fellépett a vörösben anélkül, hogy az oldat kémhatása savanyúvá változott volna. E csík néhány csepp Na_2CO_3 -oldatnak hozzáadására eltűnt.

E jelenség mellett feltűnt, hogy a methaemoglobin-csíkok az oxyhaemoglobin-csíkok rovására fokozatosan előtérbe léptek, az emésztődés előrehaladásával azonban a csíkok általában gyengültek, a színek homályossá, elmosódottá vált.

A digesztálás negyedik napján, midőn a methaemoglobin-csíkokat már alig lehetett látni, a folyadékot ecetsavval megsavanyítottam, mire bőséges, sötétbarna csapadék keletkezett. A centrifuga segítségével elkülönített folyadék halványbarna színű volt, ecetsav további hozzáadására csapadékot nem adott, színe jéges, jellegzetes elnyelési csíkok nem látszóttak.

A csapadékot vízzel, melyben nem, vagy csak alig oldódott, centrifuga segítségével háromszor kimostam. A sötétbarna anyag, mely mikroskoppal nézve semmiféle jellemző szerkezetet sem mutatott, agyaglapon fekete, elég könnyen vörösesbarna porrá dörzsölhető rögökben száradt. Vízben, hideg 95%-os alkoholban nem oldódott, forró alkoholban kis mértékben, jégecetben, pyridinben, pyridines vízben, piperidinben, NaOH -oldatban, KOH -oldatban, NH_4OH -oldatban, mésvízben, trimethylamin vizes oldatában jól oldódott, baryt-vízzel zavaros folyadékot adott.

Hámin előállítására a száraz perből a szokott módon (fedőlemez alatt konyhasós jégecettel melegítve) nem sikerült; a jégecetes oldatból azonban, ha azt konyhasós hozzáadása után kémesőben tovább főztem, kevés kristályos anyag ülepedett le, mely rosettákba rendeződött apró szürke tükből állott.

Sósavas acetonnal, sósavas alkohollal valamivel bőségesebb háminyszerű kristályos csapadékokhoz lehetett jutni.

Az anyag híg NaOH -ban oldva pyridinnel és redukáló anyaggal színe, színe képe és kristályai által jól jellemzett haemochromogent adott.

A kísérlet eredményének összegezésében látjuk, hogy az oxyhaemoglobin fokozatosan methaemoglobinná alakult, ezzel az átalakulással párhuzamosan az oxyhaemoglobin és methaemoglobin együttes mennyisége csökkent, végül teljesen elfogyott. Az oldatban ekkor jelentékeny mennyiségű haematin jelenlétét lehetett kimutatni. E folyamattal kapcsolatosan a színek ismételt megváltozásából a folyadék lúgos kámhatásának csökkenését lehetett megállapítani. Azt a jelenséget, hogy az oldat a kísérlet bizonyos szakaszaiban a lúgos methaemoglobin-oldatok két csikját és a savanyú methaemoglobin-oldatok vörösben levő csikját egyidejűleg mutatta, magyarázza az a korábbi megfigyelésem¹, hogy a lúgos methaemoglobin-oldatok

¹ Dolgozatok LECHNER KÁROLY dr. negyedszázados tanári működésének emlékére. Kolozsvár, 1915. 442. l.

színképe sav fokozatos behatására fokozatosan megy át a savanyú oldatok színképébe, miközben az „átmeneti színkép“ úgy a lúgos, mint a savanyú oldatok esikjait mutatja. A közömbösítés határán e hatás kiváltására már a levegő szénsava is elegendő.

A vérfesték tryptikus emésztésének terméke nagyjában megegyezett a közönséges haematinnal, valamint a ZEYNER-féle „Verdauungshaematinnal“. Különbözött ezektől keletkezésének módja által, megegyezett a „Verdauungshaematinnal“ abban, hogy a közönséges haematinnal ellentétben aránylag könnyen adott haeminszerű kristályokat.

I. kísérletcsoport.

A) Többször átkristályosított, kissé methaemoglobin tartalmú, de egyébként tiszta, lóvérből nyert oxyhaemoglobinnak kb. 5%-os oldatát, mely kb. $\frac{1}{200}$ n. NaOH oldattal készült. 1%-nyi KAHLBAUM-féle trypsinnel keverve, 38°-os vízfürdőbe helyeztem. Az oldat ekkor az oxyhaemoglobin és methaemoglobin kevert színképét mutatta, ecetsav fölöslegének hozzáadására nem zavarodott meg. 5–6 óra múlva a színkép és a folyadék színének megváltozása, a methaemoglobin mennyiségének növekvését mutatta, ecetsav hozzáadása ekkor sem okozott csapadékot. 17–18 óra múltán a sötétbarnára vált folyadék ecetsavval bőséges barna csapadékot adott, anélkül azonban, hogy a színes anyag teljesen kivált volna. A csapadék leüleptése után a folyadék még sötétbarna volt.

A csapadék vízzel mosás után sósavas acetonban könnyen oldódott, az oldatból azonnal fehér pelyhes üledék csapódott ki, ennek eltávolítása is az aceton lassú elpárolgása után pedig haeminszerű kristályok váltak ki.

B) Ugyanezen vérfesték-oldathoz, híg sósavval való közömbösítése után cseppenként annyi tömény sósavat adtam, hogy az oldat HCl-tartalma 0.3%-ra emelkedett. Az oldat az első pár csepp híg sósav hozzáadására mérsékelten megzavarodott, további sósavhozzáadására azonban teljesen földerült. Az így előkészített folyadékot 5%-nyi GRÜBLER-féle pepsin-glycerinnel kevervén, 38°-os vízfürdőbe helyeztem. Kb. 18 óra alatt bőséges haeminszerű csapadék vált ki, mely vízzel mosás után sósavas acetonban könnyen és teljesen feloldódott, az aceton elpárolgása után pedig haeminszerű kristályokat adott.

C) Ugyanezen vérfesték-oldat minden hozzáadás nélkül 38°-os vízfürdőben ugyanezen idő alatt methaemoglobin-tartalmának növekvésén kívül más változást nem mutatott.

E kísérletben vérfesték-oldatból úgy pepsinsósavval, mint trypsinnel haeminszerű anyagot nyertem, mely sósavas acetonnal mindkét esetben könnyen adott haeminkristályokat, míg proteolytikus fermentumok nélkül a vérfesték bomlása nem következett be.

II. kísérletcsoport.

A) Kétszer mosott lóvértestpépet vízben oldván az oldatot, mely az oxyhaemoglobin tiszta színképét mutatta és ecetsav hozzáadására nem változott, 1%-nyi 1%-os trypsinoldattal kevertem és 40°-os vízfürdőbe helyeztem. Az oldat

5 óra alatt teljesen megbarnult, színképében a savanyú methaemoglobin-oldatok ismert csikja mutatkozott a vörösben, bár a folyadék lakmusszal szemben megtartotta lúgos kémhatását. Fölös ecetsav hozzáadására bőséges haematinszerű csapadék vált ki.

B) Ugyanezen oldat azonos körülmények között, de trypsin nélkül ugyan-ezen időben egyáltalában nem változott meg. A methaemoglobin csikja csak $2\frac{1}{2}$ nap múlva kezdett jelentkezni, az oldat ecetsavval ekkor sem adott csapadékot.

Feltűnő e kísérletben, hogy a vértetek vizes oldata trypsin nélkül 40° -os vízfürdőben még $2\frac{1}{2}$ nap múlva sem mutatott lényeges változást (még jelentékeny methaemoglobin képződést se), addig ugyanezen oldat trypsinnel, azonos körülmények között teljes mértékben megváltozott, részben methaemoglobinná alakulván át, részben továbbmenő bomlással haematint szolgáltatván.

III. kísérletcsoport.

A) Konyhasó-oldattal ismétellen mosott lóvérteteknek és a stromától ismételt aether-kezeléssel megszabadított meglehetősen tömény vizes oldatát, mely a tiszta oxyhaemoglobint színképét mutatta, 1° -nyi 1° -os trypsin-oldattal kevervén, 40° -os vízfürdőbe helyeztem.

A folyadék színe 2 óra alatt már némi barnulást mutatott, a színképen azonban közvetlen spektroskopiával nem lehetett változást észrevenni. A következő 6 óra alatt a vízfürdő hőmérséklete zavar következtében 20° -ra esökkent. Ez alatt az oldat nem változott észrevehetően. Miután azonban a thermostatot 40° -ra újból felmelegítettem, a methaemoglobin csikja a színkép vörös részében további $1\frac{1}{2}$ óra alatt észrevehető lett. A folyadék ecetsavval ekkor még nem adott csapadékot.

Továbbá $11\frac{1}{2}$ óra múltán a methaemoglobin csikja kifejezettebb lett és a folyadék egy próbája ecetsavval csapadékot adott. Ujabb 7 óra elteltével, mikor a folyadék a lúgos és savanyú methaemoglobin-oldatok átmeneti színképét mutatta, egy kis részletből a haematint ecetsavval kiesapván, centrifugálással eltávolítottam. A felderült oldat színképében savi kémhatás mellett 3 csik mutatkozott, melyek közül kettő az oxyhaemoglobinnak, 1 a savanyú methaemoglobin-oldatnak felelt meg. A kezdetben tiszta oxyhaemoglobin-oldat tehát az emésztésnek eme szakaszában változatlan oxyhaemoglobin mellett methaemoglobint és haematint tartalmazott. A kísérleti folyadéknak ilyen összetételű megmaradt főtömegét ekkor 3 részre osztottam. Ezek elsejét minden további változtatás nélkül még egy napig tovább melegítettem, ecetsavval megsavanyítottam és a folyadékot a bőséges haematin-csapadéktól centrifugálással megszabadítottam. Az oldat sötétbarna volt, elnyelési színképéből az oxyhaemoglobin csikjai eltűntek, a methaemoglobin savanyú oldatának jellemző csikja kifejezetten látszott.

A folyadék második és harmadik részletéhez — szétosztásuk előtt — addig adtam szabályos NaOH-oldatot, míg a vörösben levő methaemoglobin-csik eltűnt, vagyis az oldat methaemoglobinnal, mint indikátorral szemben is lúgossá változott.

B) A meglúgosított folyadék felét, mint második részletet, további változtatás nélkül tovább melegítettem és 24 óra elteltével ugyanúgy kezeltem, mint az első részletet. A bőséges haematin-csapadéktól megszabadított savanyú folyadék

ebben az esetben is csak metnaemoglobint tartalmazott, az oldat barna színe azonban jóval halványabb volt, mint az első részleté ugyanilyen kezelés után.

C) A meglúgosított folyadék másik feléhez, mint harmadik részlethez még 10%-nyi 1%-os trypsinoldatot adtam és ezután úgy kezeltem, mint a két első részletet. Ez a folyadék, mely a második részlettől fokozott trypsintartalma által az elsőtől ezen kívül erősebb lúgossága által is különbözött, az utolsó 24 órai emésztés után szintén bőséges haematin-esapadékot adott. Az ettől megszabadított folyadék azonban az előző részletektől eltérően csaknem teljesen szintelen, methaemoglobinmentes volt.

D) Az eredeti vértestoldat egy kis próbáját trypsin hozzáadása nélkül a többi próbával együtt thermostatba helyeztem. E próba 48 óra múlva is az oxyhaemoglobin változatlan színeképét mutatta, ecetsavval megsavanyítva csapadékot ekkor sem adott.

E kísérletesoportból — az előzőkkel összehasonlítva — azt látjuk, hogy jelentékeny töménységű oldatokban az oxyhaemoglobinnak emésztődéséhez, illetve methaemoglobinná való átalakulásához és komponenseire való bomlásához jóval hosszabb időre van szükség, mint híg oldatokban. A folyamat jobban halad, ha több lúgról gondoskodunk, mint amennyi híg oldatokban szükséges, teljessé azonban csak akkor lesz, ha az emésztő fermentum mennyiségét is jelentékenyen növeljük. Hogy a haematin és methaemoglobin képződése rendén a trypsinnek szerep jut, mutatja a „D” próbának összehasonlítása „A”, „B”, „C” részletekkel.

E) A kísérlethez teljesen előkészített „A” részletből mintegy 50 cm³-t a digesztálás megkezdése előtt elvontam és belőle a fölösleges oxygeniumot metan (földgáz) átáramoltatásával elűzvé, üvegesöbe forrasztottam. Ezt a próbát, mely az „A” részlettől csak abban különbözött, hogy a levegő nem juthatott hozzá, ugyanígy és ugyanannyi ideig melegítettem, mint amazt. A kísérlet végén a csövet megnyitván, tartalmát a cső falára rakódott kevés haematinszerű csapadéktól megszabadítottam és egy próbáját ecetsavval megsavanyítottam, mire haematin csapódott ki. Az ettől centrifugán felderített folyadék elnyelési színeképében ecetsavtól savanyú kémhatás mellett a savanyú methaemoglobin-oldatok esikja gyengen, az oxyhaemoglobinnak jellemző két esikja erősen látszott.

A kísérlet folytatásaként a folyadék megmaradt főtömegéhez még 10%-nyi 1%-os trypsin-oldatot adtam és most már nyitottan ugyanazon thermostatban hagytam. Ezzel a próba a „D” részlethez lett hasonló. Az eddig megkíméltöött oxyhaemoglobin most már úgy változott, mint a „D” részletben, ecetsavval való megsavanyításra bőséges haematin-esapadék vált ki és a folyadék csaknem teljesen szintelen lett.

„E” részlet viselkedését „A” részletével összehasonlítva, azt figyelhettem meg, hogy akkor, ha az oxyhaemoglobin lúgos, trypsin-tartalmú oldatát a szabad levegőtől elzárva melegítettem, az oxyhaemoglobinnak az a bomlása, mely hasonló körülmények között szabad levegőn végbemegy, sokkal tökéletlenebb volt. Nevezetesen

az oxyhaemoglobinnak nagyobb része maradt változatlanul és a kísérlet végén aránylag csekély volt a methaemoglobin mennyisége. A kísérlet végén kiesapódó haematin mennyiségében nem mutatkozott szembeötlő különbség.

IV. kísérletcsoport.

Lovérből a szokott módon tiszta kristályos oxyhaemoglobint állítottam elő, ebből teljesen friss állapotában vízzel lehetőleg tömény oldatot készítettem, ezt az oldatlan részekről (oxyhaemoglobin fölöslege, esetleges szennyezések) centrifugálással megtisztítottam és lepárolt vízzel térfogatának kétszeresére hűgítettem. Ennek az oldatnak egy részéhez 10%-nyi 3^o-os trypsin-oldatot és 1%-nyi 1/10 n. NaOH oldatot adtam, másik részét pedig csak 1%-nyi 1/10 NaOH-oldattal kevertem.

Úgy a trypsinmentes, mint a trypsin-tartalmú részlet egy-egy kb. 10 cm³-nyi próbájából alkalmas csőben légszivattyúval és H₂ átvezetésével annyira eltávolítottam a szabad, lazán kötött és absorbeált oxygeniumot, hogy az oldat a „redukált haemoglobin” elnyelési szinképét mutatta. Erre a folyadékot a levegőtől egy csap elfordításával (a trypsin próbánál), illetve a cső leforrasztásával elzártam. Az oldat szinképében ekkor az oxyhaemoglobin (és lúgos methaemoglobin) csikjai mellett észrevehető volt a savanyú methaemoglobin-oldatok csikja a vörösben. Ezért a trypsin-tartalmú vérfestéköldatból¹ megfelelő részletet kivéve, annyi NaOH-oldattal kevertem, hogy a savanyú methaemoglobin-oldatok csikja eltűnt. Erre ennek az oldatnak is mintegy 10 cm³-étől az erre alkalmas csőben eltávolítottam az oxygent és a csövet beferrasztottam. Egyidejűleg valamennyi oldatból egy-egy részletet nyílt kémcsőbe öntöttem, majd valamennyi próbát egyszerre 40^o-os víz-fürdőbe helyeztem.

A kísérlet eredménye a következő volt:

¹ Trypsinmentes már nem állott rendelkezésünkre.

I. TÁBLÁZAT.

Trypsinmentes oldat, kevés lúggal.

Idő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen, zárt csőben	
	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, a megsavanyított oldat színe	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után
V/31. d. e. 1/2 12 ó. (kezdet)	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II. ¹ Vastagrétegben Hb _m ^s I. jól látszik.	—	Hb _r . Hb _m ^s I. vastag rétegben sem látszik.	—
d. u. 2 ó.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II. Hb _m ^s I. kifejezett.	—	"	—
d. u. 4 ó.	"	Tiszta marad. Erős Hb ₀ I. II. Kifej. Hb _m ^s I.	"	—
d. u. 6 ó.	"	"	"	—
VI/1. d. e. 9 ó.	Zavaros lett, téglavörös csapadék. Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II. Hb _m ^s I. Centrifugálás után tovább melegítetik.	Zavarosság nem fokozódik. Színe, mint előbb.	"	—
d. u. 1/2 5 ó.	—	—	"	—
VI/2. d. e. 10 ó.	Újból csapadék képződött, színe nem változott.	A centrifugált folyadék tiszta marad. Erős Hb ₀ I. II. Gyenge Hb _m ^s I.	"	—
A csövet megnyitjuk				
	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II., pár perc múlva Gyenge Hb _m ^s I.		Tiszta marad Hb ₀ I. II. Kifejezett Hb _m ^s I.	

¹ Ebben és a következő táblázatokban:

Hb₀ I. II. = az oxyhaemoglobin két jellemző csíkja.

Hb_m¹ I. II. = a lúgban oldott methaemoglobinnak az előbbiekhöz hasonló két csíkja.

Hb_m^s I. = a híg savban oldott methaemoglobinnak jellemző csíkja a vörösben.

Hb_r = a redukált haemoglobin jellemző csíkja.

II. TÁBLÁZAT.
 Trypsintartalmú oldat, kevés lúggal.

Idő	A.		B.	
	Nyitott csőben		Zárt csőben korlátozott O ₂ hozzájutással	
	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, szinkép a megsavanyítás után	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, szinkép a megsavanyítás után
V/31. d. e. 1/2. 12 ó.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II.; gyenge Hb _m ^s I.	—	Hb _r	—
d. u. 2 ó.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II.; erősebb Hb _m ^s I.	—	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II.; kifejezett Hb _m ^s I.	—
d. u. 4 ó.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II.; még erősebb Hb _m ^s I.	Zavarodás. Gyenge Hb ₀ I. II.; erős Hb _m ^s I.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II.; erős Hb _m ^s I.	—
d. u. 6 ó.	Gyenge Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II.; ezeknél erősebb Hb _m ^s I.	Barna csapadék. Gyenge Hb ₀ I. II.; erős Hb _m ^s I.	"	—
VI. 1. d. e. 9 ó.	Hb _m ^s I. Hb ₀ } I. II. helyén elmosódott árnyék. Hb _m ¹ }	Bőséges barna csapadék. Szüredék bordó-vörös Hb _m ^s I., halvány Hb ₀ I. II., de az első csik halványabb, mint a második.	"	—
d. u. 1/5 ó.	Hb _m ^s I. gyengült. Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II. helyén két csik látszik, melyek közül az első halványabb, mint a második.	—	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II.; Hb _m ^s I.	—
VI/2. d. e. 10 ó.	Hb _m ^s I. eltűnt. Hb ₀ } I. II. mint Hb _m ¹ } előbb.	Igen bőséges barna csapadék. A felderített folyadék igen halványbarna. Hb ₀ I. II. helyén 2 elmosódott csik Hb _m ^s I. 1 cm-nél vastagabb rétegben látható.	Hb _m ¹ } I. II. Hb ₀ } gyenge; Hb _m ^s I. erős.	—
			A csövet megnyitjuk	
			Közvetlenül nem változott.	Igen bő csapadék, szüredék barna, erős Hb _m ^s I.; gyenge Hb ₀ I. II.

III. TÁBLÁZAT.
Trypsintartalmú oldat elegendő lúggal.

I d ő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen, zárt csőben	
	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, szinkép a megsavanyítás után	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, szinkép a megsavanyítás után
VI/31. d. e. $\frac{1}{2}$ 12 ó. (kezdet)	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.	—	Hb _r	—
d. u. 2 ó.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.; kifejezett Hb _m ^s I.	—	Hb _r ; Hb _m ^s I. jól látszik.	—
d. u. 4 ó.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.; jól kifejezett Hb _m ^s I.	Barna csapadék Erős Hb _m ^s I.; gyenge Hb ₀ I., II.	"	—
d. u. 6 ó.	Hb _m ^s I. Gyenge Hb _m ¹ } I., II. Hb ₀ }	Barna csapadék. Hb _m ^s I.; gyenge Hb ₀ I., II.	"	—
VI/1. d. e. 9 ó.	Gyenge Hb _m ^s I.; Hb ₀ } I., II. he- Hb _m ¹ } lyén el- mosódott csíkok, melyek vastag rétegben egy csíkká olvad- nak össze. Le- vegővel rázva nem változik.	Bőséges barna csapadék. Szű- redék bordó- vörös. Erős Hb _m ^s I., halvány Hb ₀ I., II. (az első csík a másodiknál halványabb.)	Hb _r ; Hb _m ^s I. el- tűnt.	—
d. u. $\frac{1}{2}$ 5 ó.	Mint előbb.	Bőséges barna csapadék. Szű- redék halvány rózsaszínes- barna. 1 cm. rétegben Hb _m ^s I. látszik, halvány Hb ₀ I., II. (az első csík elmosódott.)	Hb _r	—

Idő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen, zárt csőben	
	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után
VI/2. d. e. 10 ó.	Hb _m ^s I. eltűnt.	Bőséges barna csapadék. Halványbarna; több cm.-es rétegben Hb _m ^s I. halványan látszik; árnyék a zöldben.	Hbr	—
			A csövet megnyitjuk	
			Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.; rövid idő múlva Hb _m ^s I. is fellép.	Mérsékelt mennyiségű barna csapadék. Szűredék sötét Hb ₀ színű. Hb ₀ I. II.; gyenge Hb _m ^s I.
1/4 12 ó.			Megnyitás után tovább melegítve	
			Erős Hb _m ^s I.; gyenge Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.	Elég bőséges barna csapadék. Erős Hb _m ^s I. Halvány Hb ₀ I., II.

A fennebbi három táblázatot áttekintve, látjuk, hogy a kevés alkalit tartalmazó trypsinmentes oxyhaemoglobin-oldat (I. tábl. A. rovat), mely már a kísérlet elején tartalmazott némi methaemoglobint, nyitott kémcsőben 6 órai digesztálás alatt csak annyiban változtatta meg összetételét, hogy methaemoglobin-tartalma emelkedett. Haematin képződésnek nyoma sem látszott. A digesztálás további folyamán, vagyis 21, 30, 46 óra alatt némi halvány vörösesbarna csapadék keletkezett ugyan benne, ez azonban nem volt haematin. Az oldat oxyhaemoglobin és methaemoglobin tartalmát a kísérlet végéig úgyszólván változatlanul megtartotta.

Ezzel szemben az oldat másik részében (II. tábl. A. rovat), mely teljesen hasonló módon kezeltetett, de trypsin is tartalmazott, már az emésztés első négy órájában jelentékenyen szaporodott a methaemoglobin az oxyhaemoglobin rovására, a negyedik órában már a haematin képződés kezdetét is meg lehetett állapítani. Az emésztés 6-ik órájában a keletkezett haematin mennyisége már jelentékeny volt, a 21-ik órától kezdve az oxyhaemoglobin színe megszűnt típusos lenni. A kísérlet további folyamán a haematin

mennyisége gyarapodott, végül a vérfesték csaknem teljesen eltűnt.

Valamivel több lúggal a folyamat menete ugyanaz volt. (III. tábl. A. rovat).

Nyilvánvaló tehát, hogy az oxyhaemoglobin vázolt bomlásában és pedig nemcsak a haematin felszabadulásában, hanem az oxyhaemoglobinnak methaemoglobinná alakulásában is a trypsin hatása szerepel. Az a körülmény, hogy az első táblázaton feltüntetett kísérletben a haematin képződés csak a negyedik órában kezdett észrevehető lenni, mikor az oxyhaemoglobin már csaknem teljes mennyiségében methaemoglobinná változott, azt a következtetést engedi meg, hogy a haematin nem párhuzamosan oxyhaemoglobinnal és methaemoglobinnal keletkezik, hanem egy olyan bomlási folyamat révén jön létre, melynek egyik foka a methaemoglobin képződése.

Zárt csőben ugyanezen oldat oxygeniumtól mentesen, trypsin nélkül (I. tábl. B. rovat) ugyanezen vízfürdőben melegítve 46 óra alatt nem változott, állandóan a redukált haemoglobin színképét mutatta. A kísérlet végén levegővel összerázván, színképében túlnyomóan az oxyhaemoglobin csíkjai mutatkoztak, mi mellett a methaemoglobin csíkja is látszott, de nem sokkal erősebben, mint a kiindulási anyagban. Haematin nem keletkezett.

Ugyanezen oldat más része trypsinhozzáadás után, korlátozott O_2 -hozzájutással (II. tábl. B. rovat), ugyanazon vízfürdőben qualitative ugyanúgy változott, mint a szabadon digerált trypsin-tartalmu oldat, quantitative azonban ettől annyiban különbözött, hogy a kísérlet végén még jelentékeny mennyiségű oxyhaemoglobint és methaemoglobint tartalmazott. Úgy a methaemoglobin, mint a haematin keletkezése kétségtelenül korlátozott volt.

Teljesen zárt csőben a trypsin-tartalmu, oxygenmentes oldat úgy a kísérlet elején, mint végén a redukált haemoglobin tiszta színképét mutatta, bár a digerálás 2—6 órájában e mellett a savanyú methaemoglobin-oldatok vörösben levő csíkja is látszott. Az alkalikus methaemoglobin csíkjai a redukált haemoglobin erős csíkja mögött mintegy elrejtőzhetnek. Abból, hogy egy időre az említett csík feltűnt, arra következtethetünk, hogy a folyadékban átmenetileg savanyú termékek keletkeztek, melyek később megint háttérbe szorultak.

A cső megnyitása után a folyadék előbb az oxyhaemoglobin két csíkját mutatta, (mely mögött az alkalikus methaemoglobin oldat

csíkjai is rejtőzhetnek), röviddel ezután azonban a methaemoglobin vörösből levő csíkja is mutatkozott. Ezt a jelenséget úgy is foghatjuk fel, hogy a levegő szénsavának hatására a methaemoglobinnak átmeneti színe jött létre, de nem lehetetlen, hogy egyben a methaemoglobin mennyisége is növekedett.

Ecetsavval az oldatból csekély mennyiségű haematint lehet kicsapni, a szüredék azonban még jelentékeny mennyiségű vérfeestet és pedig túlnyomórészt oxyhaemoglobint, kisebb részben methaemoglobint tartalmazott.

Kétségtelen, hogy oxygenium hiányában trypsinhatás alatt úgy a methaemoglobin képződés, mint a haematin képződés csak igen tökéletlenül ment végbe. Hogy az oxygeniumnak e folyamatban valóban szerepe van, kitűnik abból is, hogy e folyadék most már szabadon tovább melegítettén, rövid idő múlva jelentékenyen vesztett oxyhamoglobin tartalmából, minek rovására a methaemoglobin mennyisége növekedett. E mellett pedig ecetsavval kicsapható haematin bőségesen keletkezett benne.

V. kísérletcsoport.

Kb. 2 liter friss szarvasmarhavér centrifugálással ülepitett vértesteit 1%-os NaCl-oldattal két ízben kimostam, megfagyasztottam és kevés vízzel feloldottam. Az oldatot aetherrel két ízben összeráztam, a stromától centrifugálással megszabadítottam, megsűrtem, az aethert belőle tiszta levegőárammal elűztem. Ilyen módon 350 cm³ sötétpiros tömény oxyhaemoglobin oldatot nyertem (e kísérletcsoport törzsoldata,) melynek színeiben sem közvetlenül, sem híg ecetsavval való savanyítás után nem lehetett methaemoglobin csíkot látni.

E törzsoldatból 30 cm³-t 300 cm³-re hígítva és 5 cm³. kb. n. NaOH-oldattal keverve, a IV. kísérletcsoportéhoz hasonlóan következő próbákhoz használtam.

IV. TÁBLÁZAT.

Trypsinmentes oldat.

Idő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen, zárt csőben	
	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után
VI/13. d. e. $\frac{1}{2}$ 10 ó. (kezdet)	Hb ₀ I., II.	Tiszta marad. Hb ₀ I., II.; Hb _m ^s I. nyoma	Hb _r	—
d. e. $\frac{3}{4}$ 12 ó.	Hb ₀ ¹ } I., II. Hb _m ¹ }	Tiszta marad. Erős Hb ₀ I., II.; gyenge Hb _m ^s I.	„	—
d. u. $\frac{1}{2}$ 2 ó.	„	„	„	—
d. u. 4 ó.	—	Tiszta marad. Gyenge Hb ₀ I., II.; erős Hb _m ^s I.	„	—
d. u. $\frac{1}{2}$ 8 ó.	Hb ₀ ¹ } I., II. Hb _m ¹ }	Tiszta marad. Erős Hb _m ^s I.	„	—
VI/14. d. e. $\frac{3}{4}$ 10 ó.	Hb _m ¹ I., II.	Tiszta marad. Erős Hb _m ^s I. zöldtől jobbra sötét	„	—
d. u. 4 ó.	Hb _m ¹ I., II. elő- árnyékkal	—	—	—
VI/15. d. e. 10 ó.	Gyenge Hb _m ¹ I. II. előárnyékkal	Tiszta marad. Gyengébb Hb _m ^s I. jobb fél sötét	„	—
d. u. 4 ó.	Igen gyenge Hb _m ¹ I., II. elő- árnyékkal	A sav főlegében feloldódó világoscsapadék Hb _m ^s I. jól látható, jobb fél sötét	„	—
VI/16 d. e. 10 ó.	—	—	„	—
d. e. $\frac{3}{4}$ 11 ó.	—	—	A csövet megnyitom, tartalmát levegővel rázom	
			Hab rózsaszínű Hb ₀ I., II.	Tiszta marad. Hb ₀ I., II.; Hb _m ^s I. nyoma

Idő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen, zárt csőben	
	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után
d. u. 6. ó.	—	—	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.	Tiszta marad. Elég erős Hb _m ^s I.; homályos Hb ₀ I., II.
VI/18. d. 12 ó.	—	—	Homályos Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.; előnyomuló árnyék	Tiszta marad. Erős Hb _m ^s I.; előnyomuló árnyék

V. TÁBLÁZAT.

Trypsintartalmu oldat.

Idő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen, zárt csőben	
	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után
VI/13. d. e. 1/2 10 ó. (kezdet)	Hb ₀ I., II.	Tiszta marad. Hb ₀ I., II.; Hb _m ^s I. nyoma	Hb _r	—
d. e. 3/4 12 ó.	Hb ₀ } Hb _m ¹ } I., II.	Zavarodás. Hb ₀ I., II. jóval gyengébb, Hb _m ^s I. kb. ugyan olyan, mint a megfelelő trypsin nélküli részletben	"	—
d. u. 1/2 2 ó.	—	Zavarodás. Gyenge csíkok, különösen Hb ₀ I., II. gyengült	"	—
d. u. 4. ó.	Barna. Hb ₀ } Hb _m ¹ } I. II. kétes árnyék a pirosban.	Bőséges barna csapadék. Szűredék halvány rózsaszínes. Hb _m ^s I.; Hb ₀ I. II. Sulfosalicylsavval zavarodás	"	—

I d ő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen, zárt csőben	
	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, színe a megsavanyítás után
e. 1/2 8 ó.	Árnyék a pirosban	Bőséges barna csapadék. Folyadék igen halvány sárga; elnyelési csík nem látszik. Sulfosalicylsavval csekély zavarodás.	Hbc	—
VI/14. d. e. 3/4 10	Csík a pirosban, „előnyomuló árnyék“	Bőséges, barna, laza pelyhes csapadék. Folyadék mint előbb, de sulfosalicylsavval nem ad zavarodást	Vékony rétegben a csík kettősnek látszik	—
VI/16. d. e. 10 ó.	—	—	Homályos. Színekép. mint előbb	—
d. e. 3/4 11 ó.	—	—	A csövet megnyitom	
			Habja barna. Szép Hb ₀ } I. II.; Hb ₁ } Hb _m ^s nyoma	Nem zavarosodik jobban. Szép Hb ₀ I., II.; Hb _m ^s I.
d. u. 6 ó.	—	—	Nyíltan tovább melegítve	
			Elmosódott színekép: „előnyomuló árnyék“, jellemző csíkok nélkül	Zavarodás fokozódik. Hb _m ^s I. látszik
VI/18. d. 12 ó.	—	—	Színekép nem változott	Barna csapadék. Folyadék csaknem teljesen színtelen. Hb _m ^s I. nem látszik. Sulfosalicylsavval csapadék nem keletkezik.

E kísérletpár eredményeit egymással összevetve, azt látjuk, hogy míg a trypsinmentes oldatban nyitott csőben (IV. táblázat A. rovat) 56 óra alatt sem keletkezik ecetsavval kicsapható haematin, addig a trypsin-tartalmú oldatban azonos körülmények között (V. táblázat A. rovat) cz már az emésztés második órájában kimutatható fokra emelkedik, 24 óra alatt pedig annyira teljessé lesz, hogy az ecetsavval megsavanyított folyadék teljesen vérfestékmentes. A methaemoglobin keletkezését illetőleg itt némileg más viszonyok mutatkoztak, mint az I. táblázaton feljegyzett kísérletben. Míg ott t. i. a nyitott csőben digerált trypsin nélküli oxyhaemoglobin-oldat festékének nagyrésze 50 óra alatt változatlan maradt és csak kis része alakult át methaemoglobinná, addig ebben az esetben az oxyhaemoglobin nagyobb része már az emésztés 6 első órájában methaemoglobinná alakult, a 10-ik órától kezdve pedig oxyhaemoglobin már nem is volt kimutatható. A keletkezett methaemoglobin sem volt állandó, hanem fokozatosan átalakult egy másik barna festékanyaggá, mely jellemző csíkokat az elnyelési színekben nem mutatott és ecetsavval nem csapódott ki, a haematin-tól tehát különbözött.

Ilyenformán methaemoglobin képződés tekintetében a trypsinmentes és trypsin-tartalmú oldatok között nem mutatkozott az az ellentét, mi az I. és II. táblázatban feltüntetett kísérletekben kidomborodott. A trypsin-tartalmú oldatban a talán gyorsabb methaemoglobin képződést ellensúlyozhatta a methaemoglobinnak haematin-képződés közben való gyors bomlása. Zárt csőben a trypsin- és oxygenium-mentes oldat (IV. tábl. B. rovat) ebben a kísérletben is változatlan maradt egész a cső megnyitásáig, vagyis mintegy 72 óráig. A cső megnyitását követő időben az oxyhaemoglobin ugyanúgy változott, mint a kezdettől fogva nyitottan kezelt próbában.

A zárt csőben kezelt O_2 -mentes trypsin-tartalmú oldat (V. tábl. B. rovat) redukált haemoglobinja szintén meglehetősen állandónak mutatkozott, amennyiben a methaemoglobin csíkjai csak a 24-ik órában kezdtek mutatkozni. A 72 óra múltán megnyitott cső tartalmában a vérfesték jelentékeny része oxyhaemoglobin alakjában volt jelen, haematin-képződés pedig nem volt kimutatható. A cső megnyitása után az oldatból előbb az oxyhaemoglobin, később a methaemoglobin eltűnt, haematinnak adván helyet.

O_2 távollétében tehát a haemoglobinból nem keletkezett methaemoglobin, akár volt trypsin az oldatban, akár nem volt; épígy elmaradt a haematin keletkezése is. O_2 hozzájutása után úgy a trypsin, mint a trypsinmentes próbában megindult a methaemoglobin-

képződés és ezzel kapcsolatosan a trypsines próbában haematin is keletkezett.

Miután az eddigi kísérletekből az látszott, hogy az oxigenium jelenléte a vörös vérfesték trypsin-emésztődéséhez szükséges, érdekesnek véltem kísérletet végezni arra nézve, hogy az oxygenium helyettesíthető-e más olyan gázzal, mely helyét a vérfestékmolekulában el szokta foglalni, például szénoxyddal? A kérdés megoldásától egyben közvetett feleletet vártam arra a másik kérdésre, hogy vajjon a haematin keletkezése tulajdonképen oxydatiós folyamat-e, vagy az oxygenium jelenléte a vérfestékmolekulát a trypsin hydrolytikus hatása számára egyszerűen hozzáférhetővé teszi? Fel lehet tételezni ugyanis, hogy amennyiben az oxygenium e szerepében oxydáló hatás nélküli gázzal helyettesíthető, az utóbbi eshetőség áll fenn.

VI. kísérletcsoport.

Az V. kísérletcsoport tízszeresen hígított törzsoldatának egy trypsinmentes és egy trypsintartalmú részletét tiszta szénoxyddal kezeltem és pedig mindkét részletnek egyik felét nyílt edényben, míg a benne levő oxyhaemoglobin lehetőleg teljesen szénoxydhaemoglobinná alakult át, másik felét beforrasztható csőben az oxygeniumnak kiszivattyúzás és hydrogeniummal való kimosás útján való teljes elűzése után. Utóbbi részleteket CO alatt a csövekbe beforrasztottam. Valamennyi részlet egyidejűleg az V. kísérletcsoport próbáival együtt a közös 40°-os vízfürdőbe állítattott.

VI. TÁBLÁZAT.

Kísérletek szénoxydhaemoglobin-oldattal.
Trypsinmentes oldat.

I d ő	A.		B.	
	Nyitott csőben		Zárt csőben, O ₂ -mentesen CO alatt	
	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, szinkép a megsavanyítás után	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, szinkép a megsavanyítás után
V/13. d. e. 1/2, 10 ó. (kezdet)	Hb _{co} I., II.	—	Hb _{co} I., II.	—
d. e. 3/4, 12 ó.	"	—	"	—
d. u. 1/2, 2 ó.	Színe változatlan. Hb _{co} I., II.	—	"	—
d. u. 4 ó.	Változatlan.	Tiszta marad. Hb _{co} I., II.	"	—
d. u. 1/2, 8 ó.	"	"	"	—
VI/14. d. e. 10 ó	Barnás árnyalat. Hb _{co} } I., II. Hb _m ¹ }	Tiszta marad. Erős Hb _{co} I., II.; jól látható Hb _m ^s I.	Nem barnás. Hb _{co} I., II.	—
d. u. 4 ó.	Hb _{co} } I., II. elő- Hb _m ¹ } árnyékkal.	—	"	—
VI/15. d. e. 10 ó.	"	Tiszta marad. Hb _{co} I., II.; erős Hb _m ^s I.	"	—
VI/16. d. e. 10 ó.	Hb _m ¹ I., II.	Tiszta marad. Erős Hb _m ^s I., Hb _{co} I., II. el-tűnt. Zöldtől a pirosig előnyomuló árnyék.	A kísérlet kezdete óta nem változott.	—
d. e. 3/4, 11 ó.	—	—	A csövet megnyitom	
d. u. 6 ó.	—	—	Változatlan.	Tiszta marad. Hb _{co} I., II.
VI/18. d. 12. ó.	—	—	"	Hb _m ^s I. nem látszik.
			Hb _{co} } I., II. elő- Hb _m ¹ } árnyékkal.	Tiszta marad. Hb _{co} I., II.; elég erős Hb _m ^s I.

VII. TÁBLÁZAT.

Kísérletek szénoxydhaemoglobin-oldattal.
Trypsintartalmú oldat.

I d ő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen CO alatt, zárt csőben	
	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, a megsavanyított oldat szinképe	A lúgos oldat szinképe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, a megsavanyított oldat szinképe
VI/13. d. e. $\frac{1}{2}$ 10 ó (kezdet)	Hb _{CO} I., II.	—	Hb _{CO} I., II.	—
d. e. $\frac{3}{4}$ 12 ó.	"	—	"	—
d. u. $\frac{1}{2}$ 2 ó.	Barnás árnyalat. Hb _{CO} I., II.	—	"	—
d. u. 4 ó.	Barnás árnyalat. Hb _{CO} } Hb _m ¹ } I., II.	Némi zavarodás. Erős Hb _{CO} I. II.; gyenge Hb _m ^s I.	"	—
e. $\frac{1}{2}$ 8 ó.	Barnás Hb _{CO} } Hb _m ¹ (?) } I., II. homályos Hb _m ^s I. (kétes.)	Zavarodás. A centrifugálásal derített folyadék halvány cseresznyepiros. Tiszta Hb _{CO} I., II. Hb _m ^s I. nem látszik.	"	—
VI/14. d. e. 10 ó.	Zöldesbarna, áteső fényben meggylészínű. Hb _{CO} I. II. el-tűnt, elmosódott csik a vörösben, zöldtől a vörösig előnyomuló árnyék.	Laza, pelyhes, barna bőséges csapadék. Folyadék szintelen; elnyelési csikok nincsenek. Sulfosalicylsavval nem ad csapadékot.	Habjának barnás árnyalata van, az egész kissé sötétebb.	—
d. u. 4 ó.	—	—	Habja barnás-Hb _{CO} I., II. zöldtől a vörösig előnyomuló árnyék.	—
VI/15. d. e. 10 ó.	—	—	"	—
VI/16. d. e. 10 ó.	—	—	"	—
d. e. $\frac{3}{4}$ 11 ó.	—	—	A csövet megnyitom	
			Nem változik.	Zavarodás. A centrifugával megtisztított folyadék halvány rózsaszín. Hb _{CO} I., II.

I d ő	A.		B.	
	Nyitott csőben		O ₂ -mentesen CO alatt, zárt csőben	
	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, a megsavanyított oldat színe	A lúgos oldat színe és magatartása	Viselkedés ecetsavval, a megsavanyított oldat színe
d. u. 6 ó.			Homályos Hb _{co} I., II. Zöldtől a vörösig előnyomuló árnyék.	Barna csapadék. Homályos Hb _{co} I., II. Hb _m ^s I. látható.
VI/18. d. 12 ó.			Hb _{co} csíkok eltűntek, csak az előbbi árnyék látszik.	Barna csapadék. Folyadék alig színezett, elnyelési csíkok nem látszanak. Sulfosalicylsavval gyenge homály.

A VI. és VII. táblázat adatai azt mutatják, hogy a trypsinmentes szénoxydhaemoglobin nyitott edényben (VI. tábl. A. rovat) 40° hőmérséken mintegy 24 óráig változatlan maradt. Csak a 24 órától kezdve lehetett methaemoglobin jelenlétét kimutatni. Ettől kezdve azonban a methaemoglobin keletkezése elég gyorsan haladt előre úgy, hogy újabb 48 óra alatt a szénoxydhaemoglobin az oldatból teljesen eltűnt, illetve methaemoglobinná alakult. A methaemoglobin mellett az oldat a kísérlet végén egy másik barna festékanyagot is tartalmazott, mely ecetsavval nem csapódott ki, savanyú oldatának színeében elmosódott árnyék mutatkozott, mely a vizsgált réteg vastagságának fokozatos emelésével fokozatosan nyomult előre a zöldtől a pirosig.

A hasonlóan kezelt trypsinmentes oldat (VII. tábl. A. rovat) azonos viszonyok között már az emésztés második órájának végén mutatta a methaemoglobin képződés nyomát. A methaemoglobin mennyisége azonban az emésztés későbbi folyamán nem tudott megnövekedni, sőt az emésztés 10-ik óráján túl az oldatban methaemoglobint ki sem lehetett mutatni. A szénoxydhaemoglobin csíkjai a 10-ik óra végén még látszottak, később ezek is eltűntek. Haematin-képződést az emésztés 6-ik órájában mutathattam ki. 24 óra alatt a vérfesték trypsin hatás alatt teljesen bomlott, ecetsavval bőséges haematin-csapadék keletkezett, a szüredék pedig fehérjementes volt.

Látjuk tehát elsősorban azt a már ismert dolgot, hogy a szénoxydhaemoglobin levegőn állás közben nehezebben alakul át

methaemoglobinná, mint az oxyhaemoglobin. Látjuk továbbá, hogy trypsin jelenléte ezt a folyamatot jelentékenyen meggyorsítja. Megállapíthatjuk végül, hogy a szabad levegőn trypsin hatása alatt a szénoxydhaemoglobinból ép úgy szabadult fel haematin, mint az oxyhaemoglobinból.

A zárt csőben CO alatt melegített trypsinmentes szénoxydhaemoglobin 72 óra alatt egyáltalában nem változott, a cső megnyitása és levegő hozzájutása után azonban methaemoglobin képződés indult meg, mely a cső megnyitása után 7 órával még nem volt ugyan kimutatható, 48 óra múltán azonban már elég nagy fokra emelkedett. Haematin nem keletkezett.

Az ugyanígy kezelt trypsin-tartalmu oldat 24 óra mulva már kezdett barna lenni; a szénoxydhaemoglobin csikjai még 48 óra múltán is jól látszottak, a színekben a zöld és vörös között árnyék lépett fel, mely a réteg vastagításakor fokozatosan nyomult elő a vörös közepéig. A színváltozást természetesen nem methaemoglobin keletkezése okozta, minthogy ennek feltétele hiányzott. A cső megnyitása után a folyadékból ecetsavval azonnal haematin-szerű csapadékot lehetett kicsapni, melynek tehát zárt csőben, O_2 -távollétében, CO jelenlétében, a methaemoglobin-fokozat megkerülésével kellett keletkeznie.

Lehet, hogy e csapadék összetételében különbözik a haematin-tól, nem lehetetlen t. i., hogy a szénoxydhaemoglobin CO-ját magába zárja. Ennek az érdekes kérdésnek megvizsgálása újabb kísérletek feladata lesz.

A cső megnyitása után 7 órával az oldatban methaemoglobint lehetett kimutatni; a szénoxydhaemoglobin bomlása ezután úgy haladt tovább, mint a kezdettől fogva nyitottan kezelt trypsin-oldatban.

Valamennyi kísérlet eredményét összefoglalva megállapíthatjuk a következőket:

Az oxyhaemoglobin a trypsinnek alkalikus oldatokban a fehérjére gyakorolt emésztő hatását nem gátolja, sőt a trypsin hatásának maga is hozzáférhető; e hatás alatt fehérje-komponense sulfosalicylsavval ki nem csapódó bomlástermékekre esik szét, míg chromofor csoportja ecetsavval kicsapható barna anyag alakjában megmarad. Ez az anyag a haematinnal egyező tulajdonságú és eredete, valamint azon sajátága révén, hogy aránylag könnyen haeminné alakítható, a ZEYNEK-féle "Verdauungshaematinhoz" áll közel. A közönséges

haematinnal, valamint a ZEYNEK-féle haematinnal való kémiai egyezősége, illetve azoktól való különbözősége egyelőre nem volt megállapítható, részben azért, mert az így nyert haematint még nem volt alkalmam szabatosan elemezni és megvizsgálni, részben azonban azért, mert — mint azt már említettem — úgy a közönséges haematinnak, mint a ZEYNEK-féle haematinnak körülírtsága serü elég tökéletes. Addig míg ez anyagok különfélesége, vagy egyfélesége eldönthető lesz, a ZEYNEK-féle haematint „*pepsin haematinnak*“, a trypsinhatás révén nyert haematint „*trypsin-haematinnak*“ óhajtanám nevezni, míg minden más úton nyert haematin számára találobb elnevezés híján a KÜSTER-től eredő „ β -haematin“ elnevezést vélném megtartandónak.

A vérfesték e tryptikus bomlásának feltétele az oxygenium jelenléte ép úgy, mint a hogy a sav- vagy lúg-behatás útján való haematin keletkezéséhez oxygenre volt szükség. Ehez képest a redukált haemoglobin a trypsin hatásának nem hozzáférhető. Bizonyos mértékben helyettesítheti az oxygeniumot szénoxyd, bár a szénoxydhaemoglobin tryptikus bomlása nehezebben indul meg és lassabban halad, mint az oxyhaemoglobiné, egyébként azonos körülmények között. Ezenkívül vannak jelek, melyek arra mutatnak, hogy a keletkező haematinszerű anyag a két esetben nem azonos.

Valószínű, hogy a vérfesték trypsinhatás alatt végbemenő bomlásának első foka a methaemoglobin képződés. Erre következtethetünk abból, hogy a haematin felszabadulását a methaemoglobin fellépése rendszeresen megelőzte, a haematin mennyiségének gyarapodása pedig hozzávetőleg egybevágott a methaemoglobin-csíkok gyengülésével. Ezenkívül a haematin képződés elmaradt, illetve késett azokban az esetekben, melyekben a methaemoglobin képződés feltételei hiányoztak, vagy nem voltak kedvezők. Ellene szól e feltevésnek, hogy a levegő kizárása közben trypsinnel digerált szénoxydhaemoglobinnal haematinszerű anyagot lehetett nyerni, anélkül, hogy methaemoglobin keletkezhetett volna. A kérdés mindenestre tüzetesebb megvizsgálást igényel.

Végül meg kell említeni, hogy e kísérletekben az alkalmazott trypsin készítmény az oxyhaemoglobinnak, valamint a szénoxydhaemoglobinnak methaemoglobinná való átalakulását olyan nagy fokban siettette, hogy a methaemoglobin keletkezésében a trypsinnek szerepet kell tulajdonítsunk. Ha ez a feltevés megáll, ebből viszont az következik, hogy a methaemoglobin keletkezése alkalmával az oxyhaemoglobinnak nem a chromofor csoportja változik

meg elsődlegesen, minthogy ez nem fehérje-féle vegyület és így nem esik a trypsin hatásának körébe. Ebben az esetben az átalakulásnak a fehérjecsoport megbomlásával kell kezdődnie, mi vagy következményszerűen maga után vonja a chromofor csoport megfelelő megváltozását, vagy csak megnyitja ennek lehetőségét. Ez is olyan kérdés, melylyel tüzetesebben a jövőben óhajtának foglalkozni.