

Weitere Untersuchungen über die Verwendbarkeit des Seidenpeptons zum Nachweis peptolytischer Fermente.

Von

Emil Abderhalden und Eugen Steinbeck.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 12. August 1910.)

Es sind aus dem hiesigen Institute mehrere Arbeiten hervorgegangen, die zeigen, daß das Seidenpepton in einfachster Weise gestattet, in Organen peptolytische Fermente festzustellen. Wir haben diese Versuche fortgesetzt und dabei beobachtet, daß der Erfolg der Untersuchung ganz wesentlich von der Beschaffenheit des Seidenpeptons abhängt. Es sei deshalb nochmals kurz geschildert, in welcher Weise wir im hiesigen Institute das Seidenpepton gewinnen. Als Ausgangsmaterial verwenden wir Seidenabfälle. Diese werden, nachdem sie 48 Stunden bei 100° getrocknet worden sind, in 70%ige Schwefelsäure eingetragen. Gewöhnlich gehen wir von 1 kg Seidenabfällen aus und verwenden die fünffache Menge Schwefelsäure. In neuerer Zeit haben wir aber auch weniger angewandt. Bei Verwendung der dreifachen Menge waren die Resultate noch ganz gute, während die Anwendung der zweifachen Menge unbefriedigende Resultate ergab. Es traten dabei schwer lösliche gallertige Produkte auf, die die weitere Verarbeitung sehr störten. Die schwefelsaure Lösung ließen wir 4 Tage lang bei 25° stehen. Dann wurde die Lösung mit der zehnfachen Menge Wasser verdünnt, nachdem vorher das Gefäß mit der Seidenpeptonlösung in Eis gestellt worden war.

Nun entfernten wir die Schwefelsäure durch Zusatz der berechneten Menge an festem, feingepulvertem Baryumhydroxyd. Hierbei wird fortwährend umgerührt. Am besten turbiniert man das Gemisch. Nach etwa 12stündigem Stehen wird dann das Baryumsulfat durch doppelte Faltenfilter filtriert oder durch mit Tierkohle getränkte, gehärtete Filter abgenutscht. Der Baryumsulfatniederschlag wird wiederholt in der Reibschale mit de-

stilliertem Wasser von 25° zerrieben und wieder durch Filtration oder durch Dekantieren vom Waschwasser getrennt. Verfolgt man keine besonderen Zwecke, so kann man den Baryumsulfatniederschlag auch mit Wasser auskochen. Eine Gefahr ist nur dann vorhanden, wenn die Neutralisation der Schwefelsäure mit Baryt keine genügende war, d. h. wenn noch ein Überschuß von Schwefelsäure oder von Baryt vorhanden ist. Durch das Kochen besteht dann die Gefahr eines weiteren Abbaues des Peptons bis zu Aminosäuren. Nachdem man sich nochmals überzeugt hat, daß die vereinigten Filtrate vom Baryumsulfatniederschlag frei von Schwefelsäure und Baryt sind, wird unter vermindertem Druck bei einer 40° des Wasserbades nicht übersteigenden Temperatur eingeengt. Meistens verläuft die Destillation ganz glatt, manchmal jedoch verhindert lebhaftes Schäumen der Flüssigkeit das Einengen. In diesem Fall kommt man am besten zum Ziel, wenn man die Seidenpeptonlösung aus einem Scheidetrichter in den Destillationskolben während der Destillation eintropfen läßt. Hat man die Seidenpeptonlösung auf ein kleines Volumen gebracht, dann prüft man noch einmal auf Schwefelsäure und Baryt. Aus unbekannter Ursache entziehen sich oft ganz beträchtliche Mengen von Baryt dem Nachweis. Es empfiehlt sich, auf alle Fälle eine Probe einzudampfen und zu veraschen. Ergibt sich ein Baryum enthaltender Rückstand, dann verdünnt man am besten die Seidenpeptonlösung und erwärmt sie auf etwa 60° und fügt nunmehr die annähernd berechnete Menge Schwefelsäure hinzu. Gewöhnlich gelingt es dann leicht, die letzten Reste von Baryt zu entfernen. Nunmehr engt man die Seidenpeptonlösung noch weiter ein, bis sie dickflüssig wird. Nun trägt man die gelbbraun gefärbte Lösung unter beständigem Rühren in absoluten Alkohol ein. Dabei fällt das Seidenpepton in Form von hellgelb gefärbten bis farblosen Flocken aus. Es ist von Wichtigkeit, das Zugießen der Seidenpeptonlösung zu einer bestimmten Menge Alkohol nur so lange fortzusetzen, als das Seidenpepton sich sofort in fester Form und möglichst farblos abscheidet. Sobald das Seidenpepton in Sirupform im Alkohol untersinkt, muß der Zusatz von Seidenpeptonlösung abgebrochen werden, d. h. man nimmt eine neue Menge Alkohol und be-

obachtet hier dieselben Vorsichtsmaßregeln wie vorher. Man kann so aus 1 kg Seidenabfällen leicht 200–300 g Seidenpepton erhalten. Dampft man die alkoholischen Filtrate nochmals ein, und wiederholt man den ganzen Prozeß, so kann man noch ganz beträchtliche Mengen von brauchbarem Seidenpepton gewinnen.

Noch reinere Präparate von Seidenpepton erhielten wir, wenn wir die wässrige Seidenpeptonlösung möglichst stark eindampften und dann den Rückstand mit Methylalkohol auskochten. Die heiße methylalkoholische Lösung trugen wir dann in absoluten Äthylalkohol ein. Wir verwendeten zu allen unseren Versuchen nur Seidenpepton, das auf eine der genannten Weisen gewonnen war. Diese Präparate lösen sich in Wasser sehr leicht und geben eine hellgelb gefärbte Lösung. Die Reaktion der Lösung ist schwach sauer bis amphoter. Die Substanz ist nicht hygroskopisch. Noch reinere Präparate, die wir speziell für die optische Methode im hiesigen Institute verwenden, werden erhalten, wenn die wässrige Seidenpeptonlösung aus 1%iger Lösung mit 10%iger Phosphorwolframsäurelösung gefällt wird. Wird der Niederschlag in der üblichen Weise mit Baryt zerlegt, dann erhält man schneeweißes Seidenpepton, das vollständig luftbeständig ist und absolut farblose Lösungen gibt. Wir hatten Gelegenheit, mit Präparaten zu arbeiten, die den von uns gestellten Anforderungen nicht entsprachen. Wir erhielten auch damit meistens positive Resultate, doch erst bei viel längerer Versuchsdauer. Auch war die Ausscheidung des Tyrosins lange nicht so ausgiebig wie in Kontrollversuchen mit unseren reineren Präparaten.

Unseren Versuchen lagen zwei Fragestellungen zugrunde:

1. Wie läßt sich das Vorkommen von peptolytischen Fermenten in normalen und pathologisch veränderten Organen am besten demonstrieren?

Bei Verwendung von 25%iger Seidenpeptonlösung läßt sich das Vorkommen von peptolytischen Fermenten in verschiedenartigen Geweben am schönsten in folgender Weise zur Anschauung bringen. Wir haben z. B. normale Nieren, ferner Stauungsnieren, Fettnieren usw. nach der Technik der pathologischen Anatomen in zwei Hälften geteilt und dann diese, nach-

dem sie vorher mit physiologischer Kochsalzlösung möglichst vollständig blutfrei gewaschen worden waren, in 25%ige Seidenpeptonlösung gehängt und zwar so, daß das Gewebe von allen Seiten von der Lösung umspült war. Die Lösung überschichteten wir mit etwas Toluol und brachten sie dann in den Brutschrank. Bei einem Versuche hatten wir Gelegenheit, eine Fehlerquelle zu beobachten. Das Organstück tauchte mit einem Teil in die Toluollösung hinein und zeigte auf diesem ganzen Teil eine regellose Tyrosinabscheidung. Es war fraglich, ob von den Stellen aus, an denen das Tyrosin zur Abscheidung gelangte, auch die Spaltung des Seidenpeptons herbeigeführt worden war. Es war die Möglichkeit vorhanden, daß das Toluol als Fällungsmittel gewirkt hatte. Bei richtiger Anstellung des Versuches beobachtet man oft schon nach 3 bis 5 Stunden Abscheidung von Tyrosin auf der Schnittfläche des Organs. Nach 12 Stunden ist das Bild schon ein viel deutlicheres. Hat man die Kapsel der Niere abgezogen, dann findet man auch die Außenfläche von Tyrosinkristallen besetzt. Auf der Schnittfläche sind die Tyrosinkristalle im Wesentlichen nur in der Rindenschicht der Niere zu beobachten, die Markschicht dagegen ist meist ganz frei von Abscheidungen. Die Krystalle haften so gut am Organ, daß man es mit Leichtigkeit durch Waschen von Seidenpepton befreien und dann härten kann. Bis jetzt haben wir hierzu nur Alkohol benutzt. Es können jedoch auch nach anderen Methoden Dauerpräparate gewonnen werden. Es dürfte zu Vorlesungsversuchen kaum eine bessere Methode geben zur Demonstration des Vorkommens von peptolytischen Fermenten in den Geweben. Wir haben, wie schon erwähnt, auch pathologisch veränderte Nieren untersucht. Bei der Fettniere war die Tyrosinabscheidung vermindert, ja gewisse Teile der Rinde waren vollständig frei von Tyrosinkristallen. Die Stauungsniere, die erst kurze Zeit bestanden hatte, wies vermehrte Tyrosinabscheidung in der Rinde auf. Bei chronischer Nephritis konnten die schon schwer veränderten Stellen daran erkannt werden, daß die Tyrosinabscheidung fehlte. Diese Versuche sind alle mit Nieren von Hunden durchgeführt worden. Sehr hübsche Präparate erhält man auch bei

Verwendung von Leber, Ovarien, Hoden und auch von anderen Organen. Wir müssen vorläufig die Frage noch offen lassen, ob die Tyrosinabscheidung gerade an den Stellen erfolgt, in denen auch das Ferment vorhanden ist, d. h., wir müssen es unentschieden lassen, ob die beobachteten Bilder unmittelbar für eine Fermenttopographie in den Organen verwendbar sind. Von den Organen aus werden die Fermente auch an die Seidenpeptonlösung abgegeben und bewirken dann außerhalb des Gewebes ebenfalls Spaltung. Es läßt sich dies leicht daran erkennen, daß an den Gefäßwänden nach einiger Zeit Tyrosinabscheidung erfolgt. Es wäre möglich, daß das auf den Geweben niedergeschlagene Tyrosin sekundär an diese Stellen gelangt wäre. Hier müssen weitere Versuche entscheiden. Wir verfügen noch über viele Beobachtungen an normalen und pathologisch veränderten Geweben, wir halten sie jedoch noch nicht für ausreichend zu bestimmten Schlüssen.

2. Wann lassen sich bei Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien zum erstenmal peptolytische Fermente nachweisen?

Wir haben bis jetzt die verschiedenen Entwicklungsstadien des Hühnchens systematisch untersucht und ferner Schweineembryonen verschiedenen Alters geprüft. Es ergab sich, daß beim Hühnchen zum erstenmal peptolytische Fermente in den Geweben am 7. bis 8. Tage nachweisbar sind. Schweineembryonen von 3,2 cm Länge (Alter ca. 37 Tage) wiesen keine Spaltung in den Geweben auf. Ein Embryo von 3,3 cm Länge zeigte in der Leber Spaltung und ein solcher von 4,8 cm in der Niere. Bei Embryonen von 2,8 und 2,2 cm war überhaupt keine Spaltung erkennbar. Alle übrigen Embryonen (5,9 cm, 6,9 cm, 9,3 cm, 9,5 cm, 10,6 cm, 7 cm, 11 cm, 13 cm, 14,6 cm, 15,5 cm, 18,9 cm) zeigten fast durchweg in allen untersuchten Organen (Herz, Leber, Lunge, Magen, Dünndarm, Pankreasdrüse, Niere, Geschlechtsorgane) Spaltung. Am ausgesprochensten war die Tyrosinausscheidung bei der Leber und der Niere. Wechselnde Resultate ergaben Herz, Magen und Dünndarm. Diese Untersuchungen werden im hiesigen Institute fortgesetzt.