

Zur Differenzierung der Trypsinverdauung und proteolytischen (autolytischen) Leberfermentwirkung.

Von

Friedrich Simon-Berlin.

(Aus der chem. Abteilung des pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. November 1910.)

Für die Bewertung der Rolle, die die autolytischen Vorgänge innerhalb des physiologischen Geschehens spielen, kann es keineswegs gleichgültig sein, in welchem Sinne die Frage nach dem Entstehungsort bzw. der Herkunft der autolytischen Fermente beantwortet werden muß. Schon kurze Zeit, nachdem E. Salkowski¹⁾ als erster systematische Untersuchungen über die Autodigestion (Autolyse) der Organe angestellt hatte, wurden von Neumeister²⁾ Bedenken gegen den autochthonen Ursprung der eiweißspaltenden Organfermente, insbesondere des proteolytischen Leberfermentes geäußert, das er als ein vom Pankreas abstammendes Trypsin aufgefaßt wissen wollte.

Bevor jedoch auf diese Anschauungen Neumeisters eingegangen werden soll, verdienen wohl gewisse Einwendungen O. Cohnheims³⁾ gegen die Lehre von der Selbständigkeit der Autodigestion hier einige Beachtung. Cohnheim meint, da man nicht mit Fermentlösungen bei der Autolyse arbeite, sondern das Ferment erst während der Versuche allmählich in Lösung gehe, könne man hier nicht den für die proteolytische Fermentwirkung sonst so charakteristischen stürmischen Beginn be-

¹⁾ E. Salkowski, Über Autodigestion d. Organe. (Zeitschr. f. klin. Medizin, Suppl. z. Bd. XVII, S. 77. 1890.

²⁾ Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chemie. 1893. Bd. I, S. 106.

³⁾ O. Cohnheim, Die Physiologie d. Verdauung u. Ernährung. Berlin u. Wien. 1908. S. 117.

obachten. Damit verliere man aber jedes Urteil darüber, ob es sich um ein starkes Ferment handle, das im Stoffwechsel der Gewebe eine Rolle spielen könne, oder ob die Gewebe nur kleine Fermentmengen enthalten, die dem Blute und den weißen oder roten Blutkörperchen entstammen könnten. Diese Einwendungen können allerdings experimentell nur schwer widerlegt werden. Immerhin scheinen manche Befunde gegen die hier angedeutete Auffassung Cohnheims zu sprechen. So konnte M. Jacoby¹⁾ eine kräftig wirkende Aldehydase aus einer Leber gewinnen, die er zuvor mit 15 Litern 0,7%iger Kochsalzlösung durchgespült hatte. Ferner sind die Versuchsergebnisse Pretis²⁾ bemerkenswert, der in sechs Bestimmungen eine Steigerung der fermentativen Proteolyse bei «blutfreien» Kaninchenlebern gegenüber bluthaltigen Organen nachweisen konnte. Anknüpfend an die Beobachtungen Pretis hat dann in neuester Zeit E. Bloch³⁾ Autolyseversuche an völlig blutfreien Lebern angestellt. Die Versuchsanordnung war hier so gewählt, daß die Lebern am lebenden Tier in situ von der Aorta aus mit großen Mengen physiologischer Kochsalzlösung solange durchgespült wurden, bis die Abflüssigkeit keine Guajakreaktion mehr zeigte. Als Resultat dieser Versuche ergab sich, daß die auf die beschriebene Weise blutfrei gemachten Lebern gleichwohl beträchtliche autolytische Fermentwirkungen aufwiesen, daß also «die Enzyme nicht allein im Blute vorhanden sind und von hier aus zu den Geweben treten, sondern daß in der Tat intracelluläre, autochthone Organfermente während des Lebens tätig sind».

Wir kommen nun zu den experimentellen Beweisen, die gegen die von Neumeister gehegten Zweifel an der autochthonen Abstammung der autolytischen Organfermente geliefert wurden. Was insbesondere die Neumeistersche Anschauung von der Identität des proteolytischen Leberfermentes mit einem ursprünglich vom Pankreas secernierten und durch Resorption in die Leber gelangten Trypsin betrifft, so sei zunächst an die

¹⁾ M. Jacoby, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 141. 1900.

²⁾ L. Preti, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 494. 1907.

³⁾ E. Bloch, Biochem. Zeitschr., Bd. XXI, S. 519. 1909.

Versuchsergebnisse von Matthes¹⁾ erinnert, dem es gelang, auch an den Lebern von Hunden, denen mehrere Tage zuvor das Pankreas extirpiert worden war, noch recht beträchtliche proteolytische Fermentwirkungen nachzuweisen. Diese Befunde würden sich, wie auch Jacoby²⁾ betont, mit der Neumeisterschen Hypothese nur unter der Voraussetzung vereinbaren lassen, daß die einmal vom Pankreas produzierten Fermente in der Leber abgelagert werden müßten, ohne dort einem raschen Verbrauche zu unterliegen — eine Annahme, die allerdings eine geringe Wahrscheinlichkeit besitzt.

Doch selbst, wenn man die Matthes'schen Resultate nicht als ausreichenden Gegenbeweis gelten lassen will, läßt sich gleichwohl eine Reihe anderer Argumente für die biochemische Verschiedenheit des Trypsins und des proteolytischen Leberfermentes anführen. Diese Argumente beziehen sich einmal auf die Verschiedenheit der Reaktion, die als Optimum der beiden entsprechenden Fermentwirkungen beobachtet wird: dann aber auch auf die Differenz der Spaltungsprodukte, die im Verlaufe der tryptischen Eiweißverdauung einerseits und der Leberautolyse andererseits gebildet werden.

Nachdem zuerst Schwiening³⁾ festgestellt hatte, daß die proteolytische Wirkung des Leberfermentes bei neutraler Reaktion intensiver als bei alkalischer verläuft, konnte Biondi⁴⁾ durch Zusatz geringer Salzsäuremengen sogar eine erhebliche Steigerung der autolytischen Eiweißspaltung erzielen. Dieses Verhalten, das einen strikten Gegensatz zu den bekannten Reaktionsbedingungen der pankreatischen Proteolyse darstellt, konnte auch von Baer und Loeb⁵⁾ beobachtet werden. Diese Autoren

¹⁾ Matthes, Über d. Herkunft d. autolyt. Fermente. Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. LI, S. 442 ff. 1904.

²⁾ Jacoby i. Oppenheimers Handb. d. Biochemie, Bd. II, H. I, S. 178. Jena 1910.

³⁾ Schwiening, Über fermentative Prozesse i. d. Organen. (Virchows Archiv, Bd. CXXXVI, S. 444. 1894.)

⁴⁾ Biondi, Beitr. z. Lehre der fermentat. Prozesse i. d. Organen. (Virchows Archiv, Bd. CXLIV, S. 373. 1896.)

⁵⁾ Baer u. Loeb, Über d. Bedingungen d. autolyt. Eiweißspaltung. (Archiv f. exp. Path. u. Pharm., Bd. LIII, S. 1. 1905.)

fanden aber nicht nur eine durch Säurezusatz bewirkte Beschleunigung, sondern auch eine durch passende Alkalisierung leicht zu erreichende Verlangsamung der Leberautodigestion — eine Beobachtung, die dann auch durch die Untersuchungen von v. Drjewezki¹⁾ und von Preti²⁾ bestätigt werden konnte. Die Befunde aller dieser Forscher sind ferner für die Differenzierung des proteolytischen Leberfermentes dem Pankreas- und Darmerepsin gegenüber von Wichtigkeit. Denn für das Pankreaserepsin wurde von Vernon³⁾ eine Alkaleszenz von 1—2% Natriumcarbonat als Optimum der Fermentwirkung festgestellt, während O. Cohnheim⁴⁾ das Darmerepsin bei schwach saurer Reaktion überhaupt unwirksam fand und sogar einen schwer schädigenden Einfluß länger dauernder Behandlung dieses Fermentes mit Salzsäure beobachtete.

Bietet also schon das Studium der Reaktionsbedingungen, unter denen sich der Ablauf der genannten Fermentationsprozesse vollzieht, gewisse Merkmale zur Unterscheidung des proteolytischen Leberfermentes und des Trypsins (sowie auch des Erepsins), so können auch die bei der Leberautolyse einerseits und bei der tryptischen Verdauung andererseits entstehenden Produkte der Eiweißspaltung zur weiteren Differenzierung der beiden Fermentwirkungen dienen. Als Unterscheidungsmerkmal zwischen Autodigestion und Trypsinwirkung kann die bekannte Tryptophanreaktion herangezogen werden, die nämlich bei 60 bis 68 stündigen Autolysegemischen nach Biondi (l. c.) fast immer negativ ausfällt, bei pankreatischen Verdauungsflüssigkeiten der gleichen Dauer jedoch nie vermißt wird.

Als besonders charakteristisches Produkt der proteolytischen Leberfermentwirkung glaubt nun Jacoby⁵⁾ das Am-

¹⁾ v. Drjewezki, Über d. Einfluß d. alkal. Reaktion auf d. autolyt. Vorgänge i. d. Leber. (Biochem. Zeitschr., Bd. I, S. 229. 1906.)

²⁾ Preti, Beitr. z. Kenntnis d. Autolyse. (Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 485. 1907.)

³⁾ Vernon, The peptone-splitting ferments of the pancreas and intestine. (The Journal of Physiology, 1904, Vol. XXX, S. 330 ff.)

⁴⁾ Cohnheim, Die Umwandlung des Eiweißes durch d. Darmwand. (Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 451. 1901.)

⁵⁾ Jacoby, Autolyse d. Zelle in Oppenheimers Handb. d. Biochemie, 1910, Bd. II, H. I, S. 178.

moniak ansprechen zu müssen. Dieser Forscher konnte nachweisen,¹⁾ daß sich bei der Leberautolyse durch Magnesia austreibbarer Stickstoff bildet, der zum großen Teile neugebildetem Ammoniak entspricht. Später fanden dann Ammoniak: Kutscher²⁾ bei der Autodigestion der Thymus, Kutscher und Seemann³⁾ bei der Autolyse des Darmes, Reh⁴⁾ bei der Autolyse der Lymphdrüsen.

Doch die Ammoniakbildung ist, wie E. Salkowski⁵⁾ hervorhebt, keineswegs als solche spezifisch für die Autodigestion; sie findet sich vielmehr auch bei der Eiweißspaltung durch Pepsin (E. Zunz⁶⁾ sowie Dzierzowski und Salaskin,⁷⁾ durch Trypsin (Hirschler,⁸⁾ Stadelmann,⁹⁾ Dzierzowski und Salaskin,¹⁰⁾ Mochizuki,¹¹⁾ durch Erepsin (O. Cohnheim¹²⁾).

Was nun die in der vorliegenden Arbeit ausschließlich zur Erörterung stehende Differenzierung der fermentativen Proteolyse bei der tryptischen Eiweißverdauung und bei der Leberautolyse betrifft, so genügt also der Nachweis des Ammoniaks als Produkt der Leberautodigestion nicht zu ihrer Charakterisierung: eigentümlich für sie ist vielmehr, wie Jacoby¹³⁾ zeigen konnte, die «Überführung von fest gebundenem Stickstoff in locker gebundenen», während nach den Versuchen von Mochi-

1) Jacoby, Über die fermentative Eiweißspaltung u. Ammoniakbildung i. d. Leber. (Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 149. 1900.)

2) Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 114. 1901.

3) Kutscher u. Seemann, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 432. 1902.

4) Reh, Hofmeisters Beiträge Bd. III, S. 569. 1903.

5) Salkowski, Die deutsche Klinik am Eingange d. 20. Jahrh. Bd. XI, S. 159. 1903.

6) E. Zunz, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 132. 1899.

7) Dzierzowski u. Salaskin, Centralblatt f. Physiol. v. 3. August 1901. Heft 9.

8) Hirschler, Diese Zeitschrift, Bd. X, S. 302. 1886.

9) Stadelmann, Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXIV. 1888.

10) Dzierzowski u. Salaskin (l. c.).

11) Mochizuki, Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 44, 1902.

12) Cohnheim, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 134. 1902.

13) Jacoby, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 149. 1900.

zuki¹⁾ diese Umwandlung bei der tryptischen Verdauung von Serumalbumin nicht zu beobachten ist.

Aus dieser kurzen Übersicht der bezüglichen Literatur ergibt sich, daß es an beweiskräftigen Widerlegungen der Neumeisterschen Hypothese von der Identität des proteolytischen Leberfermentes mit dem Trypsin keineswegs mangelt. Gleichwohl schien zur weiteren Präzisierung der zwischen beiden Fermenten offenbar bestehenden biochemischen Differenzen besonders die Frage der Ammoniakbildung bei der Leberautolyse und bei der tryptischen Eiweißverdauung eine erneute experimentelle Bearbeitung zu lohnen — und zwar aus folgenden beiden Gesichtspunkten.

Erstens erschien es wünschenswert, nicht nur den zeitlichen Fortgang der Ammoniakbildung, wie es bereits Jacoby²⁾ bei der Leberautolyse getan hatte, bei beiden zur Erörterung stehenden Fermentationsprozessen durch fortlaufende Bestimmungen zu verfolgen, sondern auch in Paralleluntersuchungen an den gleichen Objekten das jeweilige Verhältnis der fortschreitenden Ammoniakbildung zur Größe der gleichzeitig erreichten Gesamtproteolyse zu ermitteln.

Der zweite Gesichtspunkt war ein methodologischer und ergab sich vornehmlich aus der Kritik, die in den letzten Jahren an den bisher in der physiologischen Chemie üblichen Methoden der Ammoniakbestimmung geübt worden war. In dieser Hinsicht sei besonders auf die Arbeit von Grafe³⁾ verwiesen, der durch gründliche Nachprüfungen die Überlegenheit der Krüger-Reich-Schittenhelmschen Methode über das früher häufig angewendete Verfahren von Nencki-Zaleski dartun konnte. So erschien es also geboten, die mit den älteren Ammoniakbestimmungsmethoden gewonnenen Ergebnisse der oben genannten Autoren nach dem von Schittenheim⁴⁾ modifizierten Verfahren von M. Krüger und O. Reich⁵⁾ nachzuprüfen.

¹⁾ Mochizuki (l. c.).

²⁾ Jacoby, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 149. 1900.

³⁾ E. Grafe, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 300. 1906.

⁴⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 73. 1903.

⁵⁾ Krüger u. Reich, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 165. 1903.

Nachdem ich mich gelegentlich anderer (klinischer) Untersuchungen¹⁾ von der Brauchbarkeit und Genauigkeit der Krüger-Reich-Schittenhelmschen Methode überzeugt hatte, folgte ich sehr gern der Anregung von Herrn Geh.-Rat Salkowski, dieses Verfahren auch zum Studium der bei der tryptischen Eiweißverdauung und bei der Leberautolyse beobachteten Ammoniakbildung zu verwenden.

A. Pankreatinverdauung einiger Eiweißkörper.

1. Digestion von Eiereiweiß mit Pankreatin «Rhenania».

500 ccm einer Eiereiweißlösung, von der je 10 ccm einem Trockenrückstand von durchschnittlich 0,5126 g entsprachen, wurden mit 1,5 g Pankreatin «Rhenania» und 3 ccm Chloroform versetzt und gut durchgeschüttelt. Unmittelbar nach der Herstellung des Verdauungsgemisches wurden 100 ccm desselben (unter Zusatz von Chlornatrium und Essigsäure) durch Kochen auskoaguliert, nach dem Erkalten auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, gemischt und durch ein trockenes Filter filtriert. Von dem völlig klaren Filtrat wurden Proben von je 20 ccm abpipettiert und zur Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl, sowie zur Ammoniakbestimmung nach Krüger-Reich-Schittenhelm verwendet. Mit Bezug auf die Ausführung des letzteren Verfahrens möchte ich bemerken, daß ich mich (abgesehen von ganz unwesentlichen Abweichungen) genau nach den Vorschriften Schittenhelms²⁾ gerichtet habe — mit dem einzigen Unterschiede, daß ich die Austreibungszeit des Ammoniaks auf eine Stunde ausgedehnt habe, während Schittenhelm die ganze Bestimmung schon nach 30—40 Minuten beendet.

Genau in der gleichen Weise wurden dann von der Verdauungsmischung, die in gut schließender Glasstöpselflasche bei 40° im Thermostaten digeriert wurde, nach 48, 96, 168

¹⁾ Fr. Simon und E. Meyer, Zeitschrift f. Urologie, Bd. IV, H. 9, S. 660. 1910.

²⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 77 u. 78. 1903.

Stunden, sowie nach 22 Tagen Portionen von je 100 ccm abgenommen und für die Bestimmung von Gesamtstickstoff und Ammoniak verarbeitet. Ausdrücklich sei noch erwähnt, daß die Verdauungsflüssigkeit bei Beendigung der Versuchsreihe (ebenso wie bei den später zu beschreibenden Versuchen mit Fibrin und Casein) keine Zeichen der Zersetzung, Fäulnis oder Schimmelbildung aufwies.

Tabelle 1.

Pankreatinverdauung von Eiereiweißlösung.

Datum	Dauer der Digestion	Nicht koagulierbarer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
2. V. 1910	Vor Beginn der Digestion	0,0812	0	—
4.	48 Stunden	0,42	0,0034	150,0 : 1
6.	96 „	0,6664	0,0068	119,0 : 1
9.	168 „	0,7364	0,0153	58,4 : 1
24.	22 Tage	0,728	0,0357	24,8 : 1

2. Digestion von Casein mit Pankreatin «Rhenania».

30 g Casein-Hammarsten (bezogen von Grübler) werden in 600 ccm Chloroformwasser durch Schütteln gut verteilt. Von dieser Mischung wird sofort eine Portion von 100 ccm für die ersten Bestimmungen abgenommen, um den durch den Albumosegehalt des Pankreatins und eine etwaige schnell eintretende Wirkung des Pankreatins verursachten Fehler auszuschließen. Erst nach Entnahme dieser Portion wurden 2 g Pankreatin «Rhenania» zu der Verdauungsmischung zugesetzt, worauf schließlich noch mit Natriumcarbonat schwach alkalisiert wurde. Die erste Portion, wie auch alle späteren, die nach 48-, 144-, 216-, 288 stündiger und 22 tägiger Digestion (40° C.) entnommen wurden, wurden in der gleichen Weise wie bei der Versuchsreihe 1 verarbeitet — mit dem einzigen Unterschiede, daß die Koagulation der Eiweißkörper — Ausfällung des Caseins — ohne Erhitzung, nur durch vorsichtigen Zusatz sehr verdünnter Essigsäure bewirkt wurde.

Tabelle 2.
Pankreatinverdauung von Casein.

Datum	Dauer der Digestion	Nicht koagulier- barer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
11. V. 1910	Vor Beginn der Digestion	0,0084	0	—
13.	48 Stunden	0,6412	0,0102	76,3 : 1
17.	144 „	0,686	0,0323	25,8 : 1
20.	216 „	0,7084	0,0425	20,2 : 1
23.	288 „	0,7084	0,0459	18,7 : 1
2. VI.	22 Tage	—	0,0629	—

3. Digestion von Fibrin mit Pankreatin (Merck).

Für diese Versuchsreihe wurden 125 g frischen, gut ausgewaschenen Fibrins mit 750 ccm Chloroformwasser unter Zugabe von 2,5 g Pankreatin (Merck) bei schwach sodaalkalischer Reaktion im Thermostaten (40°) digeriert. Die einzelnen Portionen wurden zwecks Bestimmung des nicht koagulierbaren Stickstoffes und des gebildeten Ammoniaks vor dem Zusatz des Pankreatins, sowie nach 48-, 144-, 240-, 288 stündiger und nach 22 tägiger Digestion entnommen und in der gleichen Weise wie bei Versuchsreihe 1 auskoaguliert und weiter verarbeitet.

Tabelle 3.
Pankreatinverdauung von Fibrin.

Datum	Dauer der Digestion	Nicht koagulier- barer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
27. V. 1910	Vor Beginn der Digestion	0,0028	0	—
29.	48 Stunden	0,4956	0,0119	50,5 : 1
2. VI.	144 „	0,5152	0,0187	33,4 : 1
6.	240 „	0,5208	0,034	18,6 : 1
8.	288 „	0,518	0,0425	14,8 : 1
18.	22 Tage	—	0,1037	—

Will man nun die vorstehenden drei Versuchsreihen einer vergleichenden Beurteilung unterziehen, so sei zunächst bemerkt, daß es nicht zulässig erscheint, die für den gesamten unkoagulierbaren Stickstoff und für das gebildete Ammoniak gewonnenen absoluten Zahlen etwa zur Aufstellung quantitativer Differenzen der drei hier geprüften proteolytischen Prozesse zu verwenden. Wenn man jedoch hierauf mit Rücksicht auf die keineswegs völlig kongruenten Versuchsbedingungen, die für die Digestion der drei Eiweißkörper eingehalten wurden, Verzicht leistet, so lassen sich aus den relativen Beziehungen der gefundenen Analysenwerte gewisse Übereinstimmungen im Ablaufe der tryptischen Verdauung des Eiereiweißes, Caseins und Fibrins ableiten:

1. Die Mengen des nicht koagulierbaren Stickstoffes steigen kontinuierlich vom Beginn der Digestion bis zu einem Zeitpunkte, der zwischen der 168. und 240. Stunde des Verdauungsversuches liegt, um dann entweder konstant zu bleiben oder um einen geringen Wert zu sinken, der wohl als innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler liegend angenommen werden kann.

2. Die Mengen des bei der tryptischen Verdauung aus den Eiweißkörpern abgespaltenen Ammoniaks steigen kontinuierlich vom Beginne der Digestion bis zum 22. Tage ihrer Dauer, zu welchem Zeitpunkte die Versuche abgebrochen werden.

3. Das Mengenverhältnis des gesamten, nicht koagulierbaren Stickstoffes zum gleichzeitig gebildeten Ammoniakstickstoff wird während der fortschreitenden tryptischen Verdauung von Eiereiweiß, Casein und Fibrin kontinuierlich enger.

B. Autodigestion von Leber.

I. Autodigestion von normaler tierischer Leber.

1. Autodigestion von normaler Kalbsleber.

200 g Kalbsleber wurden zu feinem Brei gehackt und mit 2 l Chloroformwasser, das durch Schütteln von 2 l destillierten Wassers mit 10 ccm Chloroform bereitet worden war, durchgeschüttelt und im Thermostaten bei 40° digeriert. Vor Beginn der Autodigestion sowie nach 48, 144, 216, 288, 384

Stunden und 22 Tagen ihrer Dauer wurden Portionen des (durch Umrühren immer gut verteilten) Gemisches von je 250 ccm abgenommen, unter Zusatz von je 5 g primären Kaliumphosphats durch Erhitzen auskoaguliert, auf das ursprüngliche Volumen nach dem Erkalten wieder aufgefüllt, gut durchgemischt und durch ein trockenes Filter filtriert. Von dem meist klaren, in einzelnen Fällen ganz wenig opaleszenten Filtrate wurden je 50 ccm zur Bestimmung des gesamten unkoagulierbaren Stickstoffes und je 25 ccm zur Bestimmung des Ammoniaks verwendet.

Tabelle 4.

Autodigestion von normaler Kalbsleber.

Datum	Dauer der Digestion	Nicht koagulierbarer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
14.VI.1910	Vor Beginn der Digestion	0,0168	0,00544	3,75 : 1
16.	48 Stunden	0,0664	0,01496	5,2 : 1
20.	144 „	0,07672	0,01088	8,6 : 1
23.	216 „	0,14056	0,00952	17,9 : 1
26.	288 „	0,15176	0,01292	14,3 : 1
30.	384 „	0,15456	0,01428	13,1 : 1
6.VII.	22 Tage	0,16128	0,01632	12,0 : 1

2. Autodigestion von normaler frischer Kaninchenleber.

Versuch a. Ein 2050 g schweres Kaninchen, das vom 18.—27. Juni täglich mit etwa 500 g gemischtem Futters (Kohlrabi, Mohrrüben und Kartoffeln) ernährt worden war, wurde am 28. Juni durch Genickschlag und Halsschnitt getötet. Unmittelbar nach dem Tode wurde dem Tiere die Leber entnommen. Nach Entfernung der Gallenblase wurde die frisch entnommene Leber (Gewicht = 77 g) sofort in einer Porzellanreischale zu feinem Brei zerrieben. Der Leberbrei wurde mit dem zehnfachen Volumen seines Gewichtes Chloroformwasser gut verrührt und zur Autodigestion im Thermostaten

bei 40° angesetzt. Von dem Autolysengemisch wurden nach 72-, 144-, 240stündiger, sowie nach 22 tägiger Digestion Portionen von je 150 ccm entnommen und in der gleichen Weise wie bei der Kalbsleberautolyse zur Bestimmung des unkoagulierbaren Stickstoffes und des Ammoniaks verarbeitet.

Tabelle 5.

Autodigestion von normaler frischer Kaninchenleber.

Datum 1910	Dauer der Digestion	Nicht koagulier- barer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
1. VII.	72 Stunden	0,0448	0,0102	5,3 : 1
4.	144	0,05936	0,01088	6,6 : 1
8.	240	0,09632	0,01632	7,2 : 1
20.	22 Tage	0,11648	0,02108	6,7 : 1

Versuch b. Wiederholung des Versuches a mit der unmittelbar nach der Tötung entnommenen Leber eines 2370 g schweren Kaninchens, das zuvor 10 Tage hindurch mit den gleichen Nahrungsmitteln wie das erste Kaninchen gefüttert worden war. Gewicht der frisch entnommenen Leber (ohne Gallenblase): 68 g.

Tabelle 6.

Autodigestion von normaler frischer Kaninchenleber.

Datum 1910	Dauer der Digestion	Nicht koagulier- barer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
22. VII.	72 Stunden	0,07616	0,01054	8,8 : 1
25.	144	0,0952	0,01224	9,4 : 1
28.	216	0,10528	0,0102	12,5 : 1
3. VIII.	15 Tage ¹⁾	0,11536	0,01156	12,1 : 1

¹⁾ Diese Versuchsreihe mußte aus äußeren Gründen schon am 15. Tage abgebrochen werden.

Wenn man ebenso wie bei den Trypsinversuchen auch bei der vergleichenden Betrachtung der drei Autolyseversuche von einer kritischen Verwertung der absoluten Analysenzahlen absehen will, so lassen sich als Übereinstimmungen im Ablaufe der vorstehenden drei Versuchsreihen die folgenden zusammenfassen:

1. Die Mengen des nicht koagulierbaren Stickstoffes steigen kontinuierlich vom Beginne der Autodigestion bis zu dem Zeitpunkte ihrer willkürlichen Unterbrechung, die bei zwei Versuchsreihen nach 22 Tagen, bei der dritten nach 15 Tagen vorgenommen wurde.

2. Die Mengen des bei der Leberautodigestion gebildeten Ammoniaks steigen bei der ersten und dritten Versuchsreihe bis zu einer gewissen Höhe, um dann in merkbarer Weise zu fallen und schließlich wieder allmählich zuzunehmen. Allerdings ist dieser auffallende zeitliche Verlauf der Ammoniakbildung bei der zweiten Versuchsreihe nicht direkt zu beobachten; immerhin macht der außerordentlich geringe Zuwachs, den die Ammoniakmenge in dem Zeitraum von der 72. bis zur 144. Stunde der Autodigestion erfährt, die Annahme wahrscheinlich, daß innerhalb dieses Zeitraumes die Ammoniakmenge vorübergehend konstant oder vielleicht sogar ebenfalls vermindert gewesen sein könnte. Ohne nun eine Interpretation dieses bemerkenswerten Befundes versuchen zu wollen, möge zur Erklärung der hier beobachteten Intensitätsschwankungen der Ammoniakbildung die Andeutung gegeben sein, daß bei der Autolyse von Kalbs- und Kaninchenleber neben den bekannten Vorgängen des Eiweißabbaues sich zeitweise auch synthetische Prozesse abspielen könnten. Man müßte also für unsere Autolyseversuche eine Rückverwandlung von bereits abgespaltenem Ammoniak in eine festere Bindungsform des Stickstoffes, die der Aufschließung mit der Krüger-Reich-Schittenhelmschen Methode nicht zugänglich ist, supponieren.

3. Die Multipla, um welche die Mengen des nicht koagulierbaren Stickstoffes die Mengen des gleichzeitig gebildeten Ammoniakstickstoffes übertreffen, steigen während der fortschreitenden Autodigestion von Kalbs- bzw. Kaninchenleber

kontinuierlich bis zu einem Zeitpunkte, der zwischen dem 9. und 10. Autolysetage beobachtet wurde, um dann langsam wieder abzunehmen.

II. Autodigestion von menschlicher Leber pathologischer Herkunft.

Fall 1. 52jähriger Mann (Sektions-Nr. 778, 6. VII. 1910). Pathologisch-anatomische Diagnose: Carcinoma laryngis. Fettige Degeneration der Herzmuskulatur. Arteriosclerose der Aorta und Coronararterien. Metastasen in der linken Lunge. Bronchitis. Tracheitis. Pleuritis adhaesiva. Alte tuberkulöse Narben in der linken Lungenspitze. Hämorrhagien der Duodenalschleimhaut. Leber gänzlich frei von Krebsmetastasen. Unmittelbar nach Vornahme der Sektion werden Teile der Leber zu feinem Brei gehackt. Der Leberbrei wird mit dem zehnfachen Volumen seines Gewichtes Chloroformwasser zur Autodigestion im Thermostaten bei 40° angesetzt. Einzelne Portionen werden nach 72-, 144-, 216 stündiger, sowie nach 20 tägiger Digestion entnommen und in der bei der Kalbsleber beschriebenen Weise zur Bestimmung des nicht koagulierbaren Stickstoffes und des Ammoniaks verarbeitet.

Tabelle 7.

Autodigestion von metastasenfrier Leber eines Falles von Carcinoma laryngis.

Datum 1910	Dauer der Digestion	Nicht koagulier- barer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
9. VII.	72 Stunden	0,104	0,00884	14,2 : 1
12.	144 >	0,11984	0,01224	11,9 : 1
15.	216 >	0,12096	0,01292	11,4 : 1
26.	20 Tage	0,1624	0,01564	12,6 : 1

Fall 2. 37jährige Frau (Sektions-Nr. 782, 7. VII. 1910). Pathologisch-anatomische Diagnose: Sarkom des Femur. Metastasen im Myokard. Schlaffes braunes Herz. Metastasen der Pleura und Lungen. Pleurit. Erguß. Milzschwellung. Leber gänzlich frei von Metastasen.

Teile der Leber werden unmittelbar nach Vornahme der Sektion in der gleichen Weise wie bei Fall 1 zur Autodigestion angesetzt. Die Verarbeitung des Autolysengemisches geschieht dann in der oben beschriebenen Art.

Tabelle 8.

Autodigestion von metastasenfrier Leber eines Falles von Sarkoma femoris.

Datum 1910	Dauer der Digestion	Nicht koagulier- barer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
10. VII.	72 Stunden	0,1736	0,01292	16,3 : 1
13.	144 >	0,18816	0,01496	15,3 : 1
16.	216 >	0,19099	0,01288	18,0 : 1
18.	264 >	0,196	0,01496	15,9 : 1

Fall 3. 30jährige Frau (Sektions-Nr. 847, 22. VII. 1910). Verblutungstod nach vaginalem Kaiserschnitt. Anämie der Bauchorgane. Blutiger Inhalt in der Bauchhöhle. Perihepatitische Verwachsungen. Milzschwellung. Zahlreiche Schrumpferde in den Nieren. Laktierende Mammae. Leber (mit Ausnahme der Anämie) ohne Besonderheiten. Die Anstellung und weitere Behandlung der Leberautolyse geschieht in der oben beschriebenen Weise.

Tabelle 9.

Autodigestion von Leber einer am Ende der Schwangerschaft an Verblutung verstorbenen Frau.

Datum 1910	Dauer der Digestion	Nicht koagulier- barer N g in 100 ccm des Filtrates	Ammoniak	Nicht koagulierbarer N : Ammoniak-N
25. VII.	72 Stunden	0,12544	0,00816	18,6 : 1
28.	144 >	0,14784	0,01224	14,6 : 1
31.	210 >	0,15344	0,01224	15,2 : 1
5. VIII.	14 Tage	(0,19488	0,03128)	—

(Zur Kritik der beiden Bestimmungen vom 5. VIII. 10. möchte ich bemerken, daß der auffallend hohe Ammoniakwert wohl einer in der Nacht vom 4. zum 5. August einsetzenden Schimmelbildung zuzuschreiben war. Mit gutem Grunde könnte deshalb auch die Bestimmung des gesamten nicht koagulierbaren Stickstoffes als unzuverlässig beanstandet werden. Bei dieser Gelegenheit sei jedoch ausdrücklich hervorgehoben, daß alle anderen Autolysegemische während der ganzen Digestionsdauer keinerlei Zeichen der Zersetzung, Fäulnis oder Schimmelbildung aufwiesen.)

Mit Bezug auf die drei Autolyseversuche an menschlichen Lebern pathologischer Herkunft ist zu berücksichtigen, daß die Auswahl der Fälle, die zunächst blind und zufällig erscheint, auf Grund gewisser theoretischer Überlegungen und experimenteller Ergebnisse (Yoshimoto, siehe später) getroffen wurde, nämlich in der Absicht, solche Lebern als Versuchsmaterial zu benutzen, die bei völligem Fehlen makroskopischer pathologisch-anatomischer Veränderungen eine Steigerung der autolytischen Vorgänge erwarten ließen. Diese Erwartung wurde auch nicht getäuscht. Denn in den beiden, an den Lebern eines Carcinom- bzw. Sarkomfalles angestellten Autodigestionsversuchen konnten eine gegenüber der Norm beträchtlich vermehrte Bildung nicht koagulierbaren Stickstoffes nachgewiesen und so die Befunde Yoshimotos¹⁾ in gewissem Sinne bestätigt werden. Dieser Autor konnte nämlich bei seinen Autolyseversuchen an carcinomatösen Lebern zeigen, daß die von ihm beobachtete Steigerung der proteolytischen Fermentwirkung sich nicht nur auf die Geschwulstmasse selbst, sondern auch auf die anscheinend normalen Anteile derselben Leber bezog. Auffällig erscheint in den hier mitgeteilten Versuchsergebnissen nur der Umstand, daß — im Gegensatz zu Yoshimotos Material — die autolysierten Lebern (wie auch alle übrigen Bauchorgane der betreffenden Leichen) makroskopisch frei von Krebs- bzw. Sarkometastasen waren. Große Schwierigkeiten bietet auch das Verständnis des letzten Autodigestionsversuches. Hier

¹⁾ S. Yoshimoto, Biochem. Zeitschrift, Bd. II, S. 299. 1909.

wurde ebenfalls eine gegenüber der Norm erheblich vermehrte Bildung des nicht koagulierbaren Stickstoffes festgestellt. Daß unter den Erklärungsmöglichkeiten dieses — soweit ich sehe — isolierten Befundes sowohl Graviditätsveränderungen als auch der schon von Preti¹⁾ erwähnte Einfluß der durch den Verblutungstod herbeigeführten Anämie des Organes in Betracht kommen könnten, soll und kann hier nur angedeutet werden.

Der in ihren ursächlichen Bedingungen zwar keineswegs geklärten, aber in allen drei mit menschlichen Lebern angestellten Autodigestionsversuchen deutlich ausgesprochenen Vermehrung des nicht koagulierbaren Stickstoffes geht aber die Intensität der Ammoniakbildung durchaus nicht immer parallel. Denn die nach 72-, 144-, 216ständiger Autolyse aus menschlichem Lebereiweiß abgespaltenen Ammoniakmengen übertreffen die nach der gleichen Digestionsdauer bei der Autolyse von Kalbs- bzw. Kaninchenleber gebildeten Ammoniakmengen keineswegs regelmäßig und in allen Fällen.

Unterzieht man nun — ohne Rücksicht auf die absoluten Analysenzahlen — den zeitlichen Verlauf der Gesamtproteolyse und der Ammoniakbildung bei der Autodigestion menschlicher Lebern einer vergleichenden Betrachtung, so zeigt sich folgendes Verhalten:

1. Die Mengen des nicht koagulierbaren Stickstoffes steigen kontinuierlich vom Beginne der Autodigestion bis zu dem Zeitpunkte ihrer willkürlichen Unterbrechung, die bei einer Versuchsreihe nach 20 Tagen und bei den anderen beiden (aus äußeren Gründen)²⁾ schon nach 14 bzw. 11 Tagen stattfand.

2. Während hinsichtlich der kontinuierlichen Vermehrung des unkoagulierbaren Stickstoffes vollkommene Übereinstimmung mit dem bei der Autodigestion tierischer Leber beobachteten Verhalten besteht, zeigen sich im Verlaufe der Ammoniak-

¹⁾ L. Preti, Diese Zeitschrift, Bd. L. S. 494. 1907.

²⁾ Erschöpfung des nur in geringer Menge zur Verfügung stehenden Materials. Bei der letzten Versuchsreihe vorzeitige Unterbrechung durch Eintritt von Schimmelbildung.

bildung gewisse Differenzen der beiden Versuchsgruppen. Die bei zwei Autolyseversuchen mit tierischer Leber deutlich ausgesprochene temporäre Verminderung der nachgewiesenen Ammoniakmengen wird bei den Autodigestionsversuchen mit menschlicher Leber nur in einem Falle (Sarkom, s. Tab. 8) beobachtet. In den beiden anderen Fällen verläuft die Ammoniakbildung entweder mit kontinuierlicher, allerdings zeitweise äußerst geringer Steigerung (s. Tab. 7) oder mit einer im allgemeinen ansteigenden, nur vorübergehend die gleiche Höhe bewahrenden Intensität (s. Tab. 9). Trotz mancher Schwankungen und Unregelmäßigkeiten ist aber auch bei der Autodigestion menschlicher Lebern ein gewisses retardierendes Moment im zeitlichen Verlaufe der Ammoniakbildung unverkennbar.

Kehren wir nun zu der Frage unseres eigentlichen Themas, der Differenzierung der fermentativen Proteolyse bei der Trypsinverdauung und bei der Leberautolyse zurück, so lassen sich nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Versuche, soweit ihre Zahl überhaupt eine Entscheidung zuläßt, gewisse unterscheidende Merkmale der beiden Fermentationsprozesse aufstellen.

1. Bei der Autolyse normaler Kalbs- bzw. Kaninchenleber, sowie menschlicher Leber verschiedener pathologischer Herkunft steigt der Gehalt des Autolysegemisches an nicht koagulierbarem Stickstoff kontinuierlich vom Beginne der Autodigestion bis zu dem Zeitpunkte ihrer willkürlichen Unterbrechung, die frühestens am 11., in mehreren Versuchsreihen erst am 20. bzw. 22. Digestionstage stattfand.

Bei der tryptischen Verdauung des Eiereiweißes, Caseins und Fibrins dagegen wird eine kontinuierliche Vermehrung des nicht koagulierbaren Stickstoffes nur bis zu einem Zeitpunkte beobachtet, der zwischen der 168. und 240. Stunde des Verdauungsversuches liegt. Nach dem 10. findet bis zum 22. Digestionstage keine Zunahme des unkoagulierbaren Stickstoffes mehr statt.

2. Bei der tryptischen Eiweißverdauung verläuft die Ammoniakbildung mit kontinuierlicher Steigerung vom Beginne

der Digestion bis zum 22. Tage ihrer Dauer, zu welchem Zeitpunkte die Versuche abgebrochen werden.

Bei der Autolyse dagegen nehmen die aus tierischem und menschlichem Lebereiweiß abgespaltenen Ammoniakmengen nur in den ersten Tagen der Autodigestion mehr oder weniger beträchtlich zu. Später (in den meisten Fällen nach dem 6. Digestionstage) machen sich dann — möglicherweise synthetische — Prozesse bemerkbar, die die kontinuierliche Ammoniakvermehrung hemmend beeinflussen. Diese hemmenden Einflüsse sind in einzelnen Fällen so stark, daß eine temporäre Verminderung der bereits abgespaltenen Ammoniakmenge beobachtet werden kann. In anderen Versuchsreihen kommen sie nur als ein zeitweiliges Konstantbleiben oder vorübergehend retardiertes Anwachsen der bisher gebildeten Ammoniakmengen zum Ausdruck. Schließlich (in den meisten Fällen nach dem 9. Digestionstage) verläuft die Ammoniakbildung wieder mit kontinuierlicher Steigerung bis zur Beendigung der Versuche.

3. Berücksichtigt man das Mengenverhältnis des gesamten nicht koagulierbaren Stickstoffes zum gleichzeitig gebildeten Ammoniak, so zeigt sich, daß die Multipla, um welche die Gesamtstickstoffmengen die entsprechenden Ammoniakstickstoffmengen übertreffen, bei der tryptischen Eiweißverdauung vom Beginne der Versuchsreihen an bis zu ihrer Beendigung nach 22 Tagen kontinuierlich kleiner werden.

Bei der Autodigestion normaler Kalbs- bzw. Kaninchenleber dagegen stellen die Werte dieser Multipla — in ihrer zeitlichen Aufeinanderfolge — eine Kurve mit schneller an- und langsamer absteigendem Schenkel dar. Der Gipfel dieser Kurve liegt meist zwischen dem 9. und 10. Tage der Autodigestion.

Beschränkt man sich darauf, nur die in den ersten Digestionstagen gefundenen Mengen an nicht koagulierbarem Stickstoff und an Ammoniak gegenüberzustellen, so zeigt sich, daß die Proportion $\frac{\text{nicht koagulierbarer Stickstoff}}{\text{Ammoniakstickstoff}}$ bei der tryptischen Verdauung regelmäßig einen absolut höheren Wert reprä-

sentiert, als er bei der Autodigestion menschlicher und besonders normaler tierischer Leber berechnet wird.

Will man zum Schlusse die hier vorliegenden Versuchsergebnisse zu einer kurzen Charakteristik der beiden Fermentationsprozesse zusammenfassen, so könnte man sagen, daß sich die Leberautolyse durch eine länger dauernde digestive Beeinflussung der unlöslichen Eiweißkörper und vielleicht auch durch eine temporäre Aktivität synthetischer Prozesse von der tryptischen Verdauung unterscheidet.