

Über Plasteinbildung.

I. Mitteilung.

Von

A. Rakoczy.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der kais. St. Wladimir-Universität in Kiew.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. September 1911.)

Die ersten Autoren, die sich mit der Untersuchung der Danilewskischen Reaktion befaßt haben — Okunew,¹⁾ Lawrow,²⁾ Sawjalow,³⁾ — nahmen an, daß die Fähigkeit, Plasteine zu bilden, ausschließlich dem Labferment (Chymosin) zukommt; bald stellte es sich aber heraus, daß der Saft der Bauchspeicheldrüse eine analoge Wirkung auf Albumosenlösungen ausübt (Okunew,⁴⁾ Delezenne und Mouton,⁵⁾ Botazzi⁶⁾), ebenso der Magensaft des Hundes (Nencki und Sieber,⁷⁾ M. Lawrow und Salaskin⁸⁾), der Magensaft des Menschen (Tedeschi,⁹⁾ Allaria¹⁰⁾), Pepsinpräparate (Wait,¹¹⁾ Lawrow¹²⁾), verschiedene Organextrakte verschiedener Tiere (Okunew,¹³⁾ Nürnberg,¹⁴⁾ Botazzi), Papayotin (Kurajeff,¹⁵⁾ Saccharow¹⁶⁾) und andere Fermente pflanzlicher Herkunft (Gerber¹⁷⁾) usw.

¹⁾ Okunew, Diss. St. Petersburg. 1895 (russ.).

²⁾ Lawrow, Diss. St. Petersburg. 1897 (russ.); Diese Zeitschr., Bd. 26.

³⁾ Sawjalow, Diss. Jurjew. 1899 (russ.); Pflügers Arch., Bd. 85.

⁴⁾ Okunew, Wratsch 1900, S. 662 (russ.).

⁵⁾ Delezenne und Mouton, C. rend. Soc. biol., Bd. 63, S. 277.

⁶⁾ Botazzi, Arch. di Fisiol., Bd. 1, S. 453; Bd. 5, S. 317; Bd. 6, S. 169.

⁷⁾ Nencki und Sieber, Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 291.

⁸⁾ M. Lawrow und Salaskin, Diese Zeitschrift, Bd. 36, S. 277.

⁹⁾ Tedeschi, Biochem. Zentralbl., Bd. 3, S. 119 (Ref.).

¹⁰⁾ Allaria, Malys Jahresber., Bd. 37, S. 430 (Ref.).

¹¹⁾ Wait, Diss. Jurjew 1905 (russ.).

¹²⁾ Lawrow, Diese Zeitschrift. Bd. 51.

¹³⁾ Okunew, Verhandl. russ. Ärzte, 1901, S. 310 (russ.).

¹⁴⁾ Nürnberg, Hofmeisters Beitr., Bd. 4, S. 543.

¹⁵⁾ Kurajeff, Hofmeisters Beitr., Bd. 1, S. 121.

¹⁶⁾ Saccharow, «Russkij Wratsch», 1902, Nr. 49 (russ.).

¹⁷⁾ Gerber, C. rend. Soc. biol., Bd. 66, S. 1122; Bd. 67, S. 322.

Sämtliche hier aufgezählten, die Fähigkeit, Plasteine zu bilden, besitzenden Substanzen hatten gleichzeitig auch eine milchkoagulierende Wirkung, d. h. enthielten nach der Vorstellung von Hammarsten und dessen Anhängern Chymosin. Deshalb waren keine Gründe vorhanden, an der anfangs ausgesprochenen Meinung, daß sich die Plasteine unter der Einwirkung des Chymosins bilden, zu zweifeln.

Der Sachverhalt änderte sich aber nach dem Auftreten der Theorie von der Identität des Pepsins und Chymosins. Wenn die Forschungen von Pawlow und Parastschuk u. a. auch nicht alle Physiologen von dem Nichtvorhandensein des Chymosins überzeugt haben, so zeigten sie doch, daß alle Labpräparate eine offenkundige oder versteckte proteolytische Wirkung besitzen und folglich vom dualistischen Standpunkt aus Pepsin enthalten. Wenn das nun aber einmal festgestellt war, so verloren alle früheren Versuche ihre Bedeutung, da mit gleichem Recht angenommen werden konnte, daß die Danilewskische Reaktion, sowohl vom Chymosin, als auch von dem in den Labpräparaten enthaltenen Pepsin bedingt werde. Die mit dem Saft der Bauchspeicheldrüse, dem Papayotin usw. angestellten Versuche bewiesen auch nichts; alle diese Substanzen wiesen nicht nur eine milchkoagulierende, sondern auch eine proteolytische Wirkung auf.

Durch welches Ferment wird nun aber die Bildung der Plasteine hervorgerufen? — Diese Frage ist von verschiedenen Forschern verschieden beantwortet worden.

Nencki und Sieber haben die Vermutung ausgesprochen, daß die Riesenmolekel des Magenferments eine besondere plasteinbildende Seitenkette besitzt.

M. Lawrow und Salaskin betrachten die Plasteinbildung, sowie die Milchkoagulation, als den Ausdruck der Reversibilität der Pepsinwirkung; auch Pawlow¹⁾ ist derselben Meinung.

Sawjalow²⁾ hält die Milchkoagulation für das Resultat der direkten Pepsinwirkung, während er die Plasteinbildung

¹⁾ Pawlow und Parastschuk, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 415.

²⁾ Sawjalow, Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 307; Bd. 54, S. 119.

übereinstimmend mit letztgenannten Forschern als eine umgekehrte, synthetische Reaktion auffaßt und am allerwenigsten Gründe dafür sieht, sie dem Chymosin zuzuschreiben, «wenn es überhaupt existiert.»

Lawrow¹⁾ läßt die Frage unentschieden und bezeichnet die Reaktion als eine Folge der Pepsin- resp. Chymosinwirkung. Hammarsten²⁾ gibt die Möglichkeit des Vorhandenseins eines selbständigen plasteinbildenden Ferments zu, während Oppenheimer,³⁾ sowie Fuld⁴⁾ sogar daran zweifeln, ob man es hier überhaupt mit einem fermentativen Prozeß zu tun hat.

Herzog⁵⁾ untersuchte den hemmenden Einfluß des Antipepsins (Ascaridenpreßsaft) auf die Plasteinbildung durch Pepsin-, Trypsin- und Papayotinpräparate und erhielt positive Resultate, während das Antipepsin auf die Milchkoagulation durch dieselben Präparate keine hemmende Wirkung zeigte. Hieraus schloß er, daß sich die Plasteine unter der Einwirkung der proteolytischen Fermente, nicht aber des Chymosins bilden. Die Herzogschen Versuche haben ihre Beweiskraft eingebüßt, seit es ihm in einer neuen Arbeit⁶⁾ gelungen ist, eine hemmende Wirkung desselben Ascaridenpreßsafts auf die Milchkoagulation durch Pepsin- und sogar Labpräparate nachzuweisen.

Somit ist die Frage nach der Ursache, der man die Umwandlung der Albumosen in Plasteine zuzuschreiben hätte, bis jetzt noch nicht aufgeklärt.

In meiner früheren Arbeit⁷⁾ bin ich auf Grund der in der Literatur niedergelegten Daten und meiner eigenen Versuche zu dem Schlusse gelangt, daß die Frage von der Identität des Pepsins und Chymosins in Abhängigkeit von Art und Alter des Tieres verschieden zu beantworten ist: bei den nicht zu den

¹⁾ l. c.

²⁾ Hammarsten, Lehrbuch d. physiol. Chemie, 7. Aufl., 1910, S. 448.

³⁾ Oppenheimer, Die Fermente, 1909, Spez. Teil, S. 285.

⁴⁾ Fuld, Hofmeisters Beitr., Bd. 2, S. 169.

⁵⁾ Herzog, Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 305.

⁶⁾ Herzog, Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 306.

⁷⁾ Rakoczy, Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 421.

Säugetieren gehörigen Tieren und den erwachsenen Säugern lassen sich die Erscheinungen der Milchkoagulation in Übereinstimmung mit der Identitätstheorie durch die Wirkung nur eines Fermentes, des Pepsins, erklären: man ist jedoch gezwungen, beim Kalbe und einigen anderen neugeborenen Säugtieren das Vorhandensein des Chymosins zuzugeben. Von diesem Standpunkt aus erscheint die Frage, welches Ferment die Plasteinbildung hervorruft, zum Teil als schon a priori entschieden: wenn diese Reaktion durch Magensäfte erwachsener Säugtiere (z. B. von Hunden) bewirkt wird, in denen nach unserem Dafürhalten kein Chymosin enthalten ist, so kommt offenbar die Fähigkeit der Plasteinbildung nicht ausschließlich dem Chymosin zu. Sie kann dem Pepsin allein, oder dem Pepsin und Chymosin, oder endlich irgend einer dritten, die proteolytischen Fermente überall begleitenden Substanz angehören. Zur Lösung dieser Frage sollen die im folgenden beschriebenen Versuche beitragen.

Als Objekt für die Bestimmung der plasteinbildenden Fähigkeit diente Pepton Witte in wässrigen Lösungen von verschiedener Konzentration und zwar von 10—20% bis zu 40—50%: die letzteren wurden durch Abdampfen von 20%iger Lösung erhalten. Vor dem Versuch wurde die Peptonlösung mit HCl angesäuert (auf 100 ccm 15—20 ccm n_{11} -HCl), je 5 ccm in Reagenzgläschen gegossen und nach Zusatz von 1,0 oder 0,5 ccm des zu untersuchenden Saftes und 1 Tropfen Toluol die Reagenzgläschen verkorkt und in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf von 12—30 Stunden gaben die schwachen (10—20%igen) Lösungen einen mehr oder weniger reichlichen Niederschlag, während die starken (40—50%igen) sich trübten und zu einer gelatinösen Masse gerannen. In Abhängigkeit von der Kraft (Menge) des zugesetzten Saftes und von der Dauer seiner Wirkung verläuft der Koagulationsprozeß verschieden und lassen sich mehrere Stufen desselben unterscheiden. Diese Veränderungsstufen entsprechen, wie ich mich überzeugen konnte, ziemlich genau der Menge der zur Bildung gelangten Plasteine, so daß 2 Proben, die ceteris paribus die gleichen sichtbaren Veränderungen aufweisen, die gleichen oder

einander nahe kommenden Niederschlagsgewichte geben. Zur Bestimmung der letzteren wurden in das Reagenzglas mit den gebildeten Plasteinen 2—3 Volumina kochendes Wasser gegossen; das Gemisch wurde nach Umschütteln gekocht, auf ein Filter von bekanntem Gewicht gebracht und nach Auswaschen mit Wasser, Spiritus und Äther das Filter mit dem Niederschlag getrocknet und gewogen.

Die proteolytische Kraft der zu vergleichenden Säfte wurde nach Mett bestimmt, die koagulierende Kraft durch Zusatz von 1,0 ccm saurer Fermentlösung (n_{20} -HCl) zu 10 ccm Milch bei 39—40° C.

A. Vergleichung von Säften mit gleicher milchkoagulierender bei verschiedener proteolytischer Kraft.

1. Rinder- und Kalbsmageninfusionen mit n_{20} -HCl durch Verdünnung mit HCl von gleicher Konzentration auf ein und dieselbe Koagulationskraft gebracht:

	Koagulation Sek.	Verdaut (22 St.) mm	Plasteinbildende Wirkung (24 Stunden)	
			20%ige Peptonlösung	40%ige Peptonlösung
Rinderinfusion . . .	50	13	Reichl. Niederschlag	Festes Gerinnsel
> gekocht	∞	0	Unverändert	Unverändert
Kalbsinfusion . . .	52	2,0	Geringer Niederschl.	>
> gekocht	∞	0	Unverändert	>

2. Derselbe Versuch mit anderen Infusionen: jeder der zu vergleichenden Infusionen wurde ein gleiches Volumen der anderen gekochten zum Ausgleich der Salzmengen und anderer Beimengungen zugesetzt:

	Koagulation Sekund.	Verdaut (12 St.) mm	Plasteinbildende Wirkung (12 Stunden)
			45%ige Peptonlösung
Rinderinfusion .	80	5,5	Festes, trübes Gerinnsel
Kalbsinfusion . .	75	0,25	Keine Gerinnung, leichte Trübung

3. Gleiche Versuche mit anderen Infusionen:

	Koagulation Sek.	Verdaut (12 St.) mm	Plasteinbildende Wirkung (18 Stunden)	
			10%ige Peptonlösung	45%ige Peptonlösung
Rinderinfusion	50	7,0	Reichl. Niederschlag	Festes, trübes Gerinnsel
Kalbsinfusion	50	1,0	Unbedeut. »	Verdickte, trübe Flüssigkeit
Rinderinfusion	130	4,8	Reichl. »	Festes, trübes Gerinnsel
Kalbsinfusion	125	ca. 0,2	Geringfüg. »	Fast unverändert

4. Die Kalbsinfusion zwecks Trennung von Pepsin und Chymosin dialysiert: Niederschlagslösung (Pepsin) und Filtrat (Chymosin) auf die gleiche Koagulationskraft gebracht, sodann zu jeder der Lösungen ein gleiches Volumen der anderen gekochten hinzugesetzt:

	Koagulation Sek.	Verdaut (18 St.) mm	Plasteinbildende Wirkung (24 Stunden)	
			20%ige Peptonlösung	45%ige Peptonlösung
Niederschlagslösung	58	5,0	Reichl. Niederschlag	Festes Gerinnsel
Filtrat	55	ca. 0,1	Geringfüg. »	Unverändert
Gekochtes Gemisch .	∞	0	Unverändert	»

In diesen Versuchen haben wir einen gewissen Parallelismus zwischen plasteinbildender und verdauender Wirkung; sie schließen jedoch noch nicht die Beteiligung auch des Chymosins an dem Prozeß der Plasteinbildung aus: stark verdünnte Kalbsinfusionen (Versuche 1, 2 und 3), sowie Chymosinlösung (Versuch 4) gaben bei sehr geringer proteolytischer Kraft, besonders in verhältnismäßig schwachen (10—20%igen) Peptonlösungen, Niederschläge. Ob nun diese Niederschläge als das Resultat der Wirkung geringer in den untersuchten Infusionen enthaltener Pepsinmengen oder des Chymosins selbst aufzufassen sind — zur Aufklärung dieser Frage wurden Versuche mit Säften angestellt, die bei ungleicher Koagulationskraft die gleiche proteolytische Kraft besaßen.

B. Vergleichung von Säften mit gleicher Verdauungskraft bei verschiedener Koagulationskraft.

5. Rinder- und Kalbsinfusionen mit $n/20$ -HCl wurden durch Verdünnung mit $n/20$ -HCl auf die gleiche Verdauungskraft gebracht.

	Koagulation Sekunden	Verdaut (12 Stund.) mm	Plasteinbildende Wirkung (24 Stunden) 40%ige Peptonlösung
Rinderinfusion .	85	4,0	Verdickte, trübe Flüssigkeit
Kalbsinfusion .	ca. 5	4,0	Vollkommen festes, trübes Gerinnsel

6. Der gleiche Versuch mit anderen Infusionen:

	Koagulation	Verdaut (18 Stund.) mm	Plasteinbildende Wirkung (24 Stunden) 45%ige Peptonlösung
Rinderinfusion .	50 Min.	4,0	Schwach bewegliches Gerinnsel
Kalbsinfusion .	25 Sek.	4,0	Festes unbewegliches Gerinnsel

Zur, wenn auch nur annäherungsweise Bestimmung des quantitativen Verhältnisses zwischen den plasteinbildenden Kräften der zu vergleichenden Säfte wird jeder derselben mit $n/20$ -HCl 2-, 4-, 8- und 16mal verdünnt und sodann zu je 5 ccm des angesäuerten Peptons Witte je 0,5 ccm solcher verdünnten Infusion zugesetzt und nach Beendigung des Versuches (30 Stunden) werden alle Reagenzgläschen in bezug auf die Gerinnungsstufe verglichen, worauf man in allen Portionen die Gewichte der gebildeten Plasteine ermittelt. Auf der umstehenden Tabelle sind die Resultate der Vergleichung dargestellt, wobei auf einer und derselben horizontalen Linie diejenigen Portionen aufgeführt werden, die die gleichen äußeren Koagulationsanzeichen aufwiesen.

Welches auch immer das Verhältnis zwischen dem Gewicht des Niederschlags und der Kraft der Infusion sein möge, jedenfalls sind wir, wenn 2 Lösungen unter gleichen Bedingungen die gleichen Veränderungen in einer Peptonlösung hervor-

Rinderinfusion			Kalbsinfusion		
Verdünnungsstufe	Sichtbare Veränderung des Gemisches	Gewicht des Niederschlages	Verdünnungsstufe	Sichtbare Veränderung des Gemisches	Gewicht des Niederschlages
			Unverdünnt	Festes, trübes Gerinnsel	0,125
			2 mal	id.	0,0965
Unverdünnt	Schwach beweglich, trübes Gerinnsel	0,073	4 .	Schwach beweglich, trübes Gerinnsel	0,074
2 mal	Verdickte, schwach getrübe Flüssigkeit	0,0465	8 .	Verdickte, schwach getrübe Flüssigkeit	0,045
4 .	Sehr schwach getrübe Flüssigkeit	0,0325	16 .	Sehr schwach getrübe Flüssigkeit	0,030
8 .	Unverändert	0,0175	32 .	Unverändert	—

bringen, berechtigt, hieraus zu schließen, daß die plasteinbildenden Kräfte der verglichenen Lösungen einander gleich sind. In unserem Versuche mußte man, damit die Kalbsinfusion ihrer Wirkung nach auf die gleiche Stufe mit der Rinderinfusion gebracht würde, die erstere 4mal verdünnen. Folglich besaß die Kalbsinfusion eine um 4mal größere plasteinbildende Kraft als die Rinderinfusion. Ob dieser Überschuß an plasteinbildender Kraft der Kalbsinfusion vom Chymosin oder von irgend einer in dieser Infusion enthaltenen selbständigen plasteinbildenden Substanz abhängt — zur Lösung dieser Frage haben wir Versuche mit erwärmten Infusionen angestellt.

7. Vergleichung von Kalbsinfusion mit derselben im Laufe von 48 Stunden bei 40° C. erwärmten Infusion; zum Ausgleich der proteolytischen Kraft wurde die nicht erwärmte Infusion mit gekochter verdünnt.

	Koagulation Sekunden	Verdaut 20 Stund.) mm	Plasteinbildende Wirkung (24 Stunden) 40° oige Lösung von Pepton Witte
Nicht erwärmt .	20	4,5	Festes, trübes Gerinnsel
Erwärmt (48 St.)	197	4,75	Fast unverändert, schwache Trübung

Dieser Versuch zeigt, daß in der Kalbsinfusion gleichzeitig mit der Zerstörung des Chymosins eine scharf ausgeprägte Abschwächung ihrer plasteinbildenden Kraft erfolgt. Wenn wir annehmen, daß die Fähigkeit, Plasteine zu bilden, nicht dem Chymosin selbst, sondern irgend einer anderen Substanz zukommt, so werden wir zugeben müssen, daß diese letztere ihre plasteinbildende Kraft gleich dem Chymosin bei 2tägigem Erwärmen im Brutschrank einbüßt. Indessen beweist der folgende Versuch, daß sich diese Fähigkeit in der Rinderinfusion anders dem Erwärmen gegenüber verhält, als in der Kalbsinfusion.

8. Vergleich der erwärmten Rinderinfusion mit nicht erwärmter:

	Koagulation Minuten	Verdaut (22 Stund.) mm	Plasteinbildende Wirkung (22 Stunden, 40%ige Peptonlösung, je 5 ccm auf:		
			1,0 ccm In- fusion	0,5 ccm Infusion	0,25 ccm Infusion
Nicht erwärmt	3	7,5	Festes Gerinnsel	Schwach bewegliches Gerinnsel	Dickflüssig
Erwärmt (48 Stund.)	5	7,0	Festes Gerinnsel	Bewegliches Gerinnsel	

Im gegebenen Falle wurde die plasteinbildende Kraft, ebenso wie die proteolytische, nur ganz unbedeutend abgeschwächt, mit anderen Worten: in der Kalbsinfusion (Vers. 7) verschwindet sie gleichzeitig mit der Zerstörung des Chymosins, während sie in der Rinderinfusion (Vers. 8), die kein oder nur sehr wenig Chymosin enthält, die gleiche Beständigkeit der Erwärmung gegenüber aufweist wie das Pepsin. Deshalb liegt kein Grund vor zu der Annahme, daß die Danilewskische Reaktion von irgend einer selbständigen Substanz hervorgerufen wird: am wahrscheinlichsten erscheint die Voraussetzung, daß die plasteinbildende Fähigkeit allen proteolytischen Fermenten und also auch dem Chymosin zukommt.