

Über die tryptische Verdauung durch den Harn.

Von
Filip Johansson.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Upsala.)
(Der Redaktion zugegangen am 2. April 1913.)

Die Untersuchungen über die Frage, ob ein in alkalischer Lösung wirksames Enzym im Harn vorkommt, haben schon vom Anfang an verschiedene Resultate ergeben. Kühne,¹⁾ welcher der erste zu sein scheint, der ein solches gesucht hat, erhielt negatives Resultat. Um Fäulnis zu verhindern, benutzte er Thymol. Ein positives Resultat erhielten dagegen Sahli²⁾ und Gehrig.³⁾ Da aber diese zwei Forscher kein Desinfektionsmittel anwandten, sind ihre Resultate sehr unsicher. Leo,⁴⁾ der gleich wie Kühne Thymol zusetzte, konnte in der Tat nach ihren Methoden kein Trypsin finden. Zu ganz demselben Resultat kamen Stadelmann⁵⁾ und Hoffmann,⁶⁾ die auch Thymol zusetzten. Erst nach Unterbindung der Pankreasausführgänge bei einem Hunde fand Hoffmann, daß eine Sekretion von Trypsin durch den Harn stattfand.

Die jetzt erwähnten Forscher benutzten Fibrin als Substrat. Nach einer anderen Methode arbeitete Fermi,⁷⁾ indem er Gelatine (100 ccm karbolisierte Gelatine zu 900 ccm Harn) anwandte. Er fand aber kein Trypsin weder im Menschenharn noch im Harn von Hund, Vieh, Pferd und Schaf. Wurde

¹⁾ Kühne, Verhandl. d. naturhist. med. Vereins z. Heidelberg, Bd. 2, S. 1, cit. nach Leo, Pflügers Archiv, Bd. 37, S. 226 (1885).

²⁾ Sahli, Pflügers Archiv, Bd. 36, S. 224 (1885).

³⁾ Gehrig, Pflügers Archiv, Bd. 38, S. 35 (1885).

⁴⁾ Leo, Pflügers Archiv, Bd. 37, S. 223 (1885) und Bd. 39 S. 246 (1886).

⁵⁾ Stadelmann, Zeitschrift für Biologie, Bd. 24, S. 226 (1888).

⁶⁾ Hoffmann, Pflügers Archiv, Bd. 41, S. 148 (1887).

⁷⁾ Fermi u. Pernossi, Zeitschrift f. Hygiene, Bd. 18, S. 121 (1894.)

Trypsin zum Harn zugesetzt, übte dieser in 48 Stunden keine Wirkung auf das Enzym aus. Nach Injektion von einer größeren Menge Trypsin ging dieses in den Harn über. Dieselbe Beobachtung haben auch Dastre und Floresco¹⁾ gemacht.

Die zuverlässigsten Resultate, die bisher erhalten worden sind, gehen also ausschließlich in negativer Richtung. Es dauerte nun lange, bis eine weitere Untersuchung unternommen wurde. Erst im Jahre 1904 wurde eine Abhandlung in der Frage von Cathcart²⁾ veröffentlicht. Er benutzte dieselbe Methode, nach welcher Hedin³⁾ ein in alkalischer Lösung wirksames Enzym im Ochsen Serum gefunden hatte. Zum verdünnten Harn wird Caseinlösung zugesetzt, worauf das Casein durch Zusatz von Essigsäure niedergeschlagen wird. Der Niederschlag wird abfiltriert und in wenig Na_2CO_3 gelöst. Cathcart setzte dann Fibrin zu und ließ die Verdauung bei 37° in Gegenwart von Toluol während 7 Monaten fort dauern. Folgende Spaltungsprodukte wurden isoliert: Histidin, Lysin, Tyrosin, Leucin, Aminovaleriansäure, α -Pyrrolidincarbonsäure, Glutaminsäure, Tryptophan und Ammoniak. Wahrscheinlich waren auch Arginin, Phenylalanin und Alanin zugegen.

Brodzki⁴⁾ führte im Jahre 1907 eine Untersuchung aus, nach welcher er Trypsin in Menschen- und Hundeharn wie, wenn auch in kleinerer Menge, in Kaninchenharn fand. Er setzte zum Harn Casein und NaOH oder Na_2CO_3 zu. Eine Kontrollprobe wurde mit gekochtem Harn hergestellt. Nach der Verdauung wurde unverdautes Casein durch NaCl und Essigsäure ausgefällt und der Stickstoff in einer kleinen Menge des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt. Gegen diese Methode kann wegen einer Beobachtung, die ich gemacht habe, ein Einwand gemacht werden. Ich habe nämlich gefunden, daß das Casein leichter in ungekochtem als in gekochtem Harn durch Essigsäure ausgefällt wird. Bei gleichem Zusatz von Essigsäure werden darum wahrscheinlich ungleiche Mengen

¹⁾ Dastre et Floresco, Soc. biol., Bd. 49, S. 847 (1897).

²⁾ Cathcart, Festschr. f. Salkowski (1904).

³⁾ Hedin, Journal of Physiologie, Bd. 30, S. 195 (1904).

⁴⁾ Brodzki, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 63, S. 537 (1907).

Casein ausgefällt. Auf Fibrin fand Brodzki keine proteolytische Wirkung.

Nach einer Methode von Fuld hat Bamberg¹⁾ kein Trypsin in Menschen- Hund- oder Kaninchenharn finden können. Er untersuchte auch, ob Protrypsin im Harn vorhanden war, erhielt aber ein negatives Resultat. Injiziertes Trypsin erschien im Harn nur nach Injektion einer größeren Menge.

v. Schoenborn²⁾ hat eine Untersuchung hauptsächlich über Hundeharn mit Anwendung von Volhards Methode ausgeführt. Zu 100 ccm Harn wurden 50 ccm der Caseinlösung (5% Casein) zugesetzt. Die Verdauung dauerte 24 Stunden, wonach 10 ccm $n/2$ oder $n\text{-HCl}$ zugesetzt und das Casein durch 100 ccm 20%iges Na_2SO_4 ausgefällt wurde. Vom Filtrat wurden 200 ccm titriert. Kontrollproben wurden folgendermaßen hergestellt: Eine Probe mit ungekochtem Harn, die sogleich gefällt wurde, und 2 Proben mit gekochtem Harn, deren die eine sogleich, die andere nach Verdauung gefällt wurde. v. Schoenborn fand im Hundeharn bei gemischter Nahrung bisweilen Trypsin, aber in sehr kleiner Menge, und Trypsinogen, das auch in oft sehr geringer Menge zugegen war. Um das Trypsinogen zu aktivieren, wandte v. Schoenborn Enterokinase an, die er aus Darmschleimhaut vom Hund bereitet hatte. Bei Fleischnahrung war Trypsinogen im Hundeharn regelmäßig und in relativ großer Menge vorhanden. Nach anhaltendem Hunger war immer aktives Trypsin zugegen und oftmals eine Substanz, die durch Kochen nicht zerstört wurde und die zusammen mit der Enterokinaselösung tryptische Wirkung zeigte. Im Menschenharn fand v. Schoenborn kein Trypsin oder Trypsinogen.

Bei meinen Versuchen habe ich die oben erwähnte Methode von Hedin³⁾ gebraucht. Ich verfuhr dabei folgendermaßen: 100 ccm filtrierter Harn wurde mit destilliertem Wasser zu 500 ccm verdünnt und 100 ccm Caseinlösung (2% Casein in 0,1% Na_2CO_3 aufgelöst) zugesetzt, wonach das Casein durch

¹⁾ Bamberg, Zeitschr. exp. Path., Bd. 5, S. 742 (1909).

²⁾ v. Schoenborn, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 53, S. 386 (1910).

³⁾ s. S. 2.

Essigsäure ausgefällt wurde. Die Essigsäure wurde dabei in kleinen Portionen unter Umrühren zugesetzt, bis eine gute Ausflockung des Caseins erhalten wurde. Durch Ausfällung des Enzyms wird man von der Einwirkung befreit, die verschiedene Konzentration und Acidität des Harnes auf die Verdauung ausübt, und erhält vergleichbare Resultate in verschiedenen Versuchen. Nachdem der Caseinniederschlag abfiltriert und sorgfältig gewaschen worden war, wurde er zusammen mit dem Filter in eine Flasche gebracht, in wenig Na_2CO_3 gelöst und nach Zusatz von 3 ccm Toluol meistens mit zugesetztem Casein digeriert. Die Verdauung, die bei 37° während 24 Stunden stattfand, wurde durch Zusatz von Gerbsäurelösung abgebrochen (100 g Gerbsäure + 50 g Natriumacetat + 50 ccm Eisessig in 1 l). Nach 12–24 Stunden bei Zimmertemperatur wurde filtriert und der Stickstoff in einer möglichst großen Menge des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt, wobei $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ und NaOH zur Titrierung angewendet wurden.

Versuche mit normalen Harnen.

Der Caseinniederschlag muß sorgfältig gewaschen werden, so daß keine stickstoffhaltigen Bestandteile des Harnes anbeifolgen. Das Auswaschen wurde darum wiederholt, bis das Waschwasser keine Cl-Reaktion mit Silbernitrat gab. In den Kontrollproben wurde der Caseinniederschlag in die für die Verdauung bestimmte Flasche gebracht, die während 30 Minuten in einem siedenden Wasserbade gehalten wurde. Vor der Verdauung wurden in beiden Proben 50 ccm der Caseinlösung und 1,75 ccm 10%ige Na_2CO_3 zugesetzt.

Versuch I.

Die Harnen von 3 Personen wurden während 24 Stunden aufgesammelt. Von jedem Harn wurden 2 Proben à 100 ccm genommen. Nach der Digestion wurden 30 ccm Gerbsäurelösung zugesetzt und der Stickstoff in 35 ccm des Filtrats bestimmt. Wenn wir die Proben mit ungekochtem Caseinniederschlag mit a und die Kontrollproben mit gekochtem Niederschlag mit b

bezeichnen, wurden folgende Werte für die Menge $n/10$ -NaOH, die bei der Titrierung verbraucht wurde, erhalten.

| | | |
|--------------------|----------------|-----------------|
| I. a 0,85 ccm | II. a 1,35 ccm | III. a 0,75 ccm |
| I. b 0,75 > | II. b 0,8 > | III. b 0,75 > |
| Differenz 0,10 ccm | 0,55 ccm | 0,00 ccm |

Versuch II.

Aus den Harnen von 7 Personen wurden Proben genommen und nach derselben Methode behandelt.

| | | | |
|--------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| I. a 0,9 ccm | II. a 0,95 ccm | III. a 0,90 ccm | |
| I. b 0,75 > | II. b 0,8 > | III. b 0,55 > | |
| Differenz 0,15 ccm | 0,15 ccm | 0,35 ccm | |
| IV. a 0,8 ccm | V. a 0,85 ccm | VI. a 0,85 ccm | VII. a 0,75 ccm |
| IV. b 0,5 > | V. b 0,65 > | VI. b 0,65 > | VII. b 0,5 > |
| Differenz 0,3 ccm | 0,20 ccm | 0,20 ccm | 0,25 ccm |

Versuch III.

Der Harn einer Person wurde teils von 2 bis 11 Uhr vormittags (Harn I), teils von 11 Uhr vormittags bis 3 Uhr 45 nachmittags (Harn II) aufgesammelt. Das Frühstück wurde denselben Tag um 11 Uhr vormittags und das Mittagessen um 3 Uhr nachmittags eingenommen. Das Abendessen war vorigen Tag um 9 Uhr nachmittags eingenommen worden.

| | |
|-------------------|----------------|
| I. a 0,8 ccm | II. a 0,75 ccm |
| I. b 0,6 > | II. b 0,5 > |
| Differenz 0,2 ccm | 0,25 ccm |

Die Differenz in diesen drei Versuchen ist eine sehr unbedeutende und in einem Falle gar keine. Wenn Trypsin also im Caseinniederschlage aus diesen 11 Harnen überhaupt zugegen war, muß die Menge eine sehr geringe gewesen sein.

Versuche mit Eiweißharnen.

Im Sommer 1912 war ich in der Lage, eiweißhaltige Harne zu untersuchen, die ich aus der medizinischen Klinik in Upsala durch gütiges Entgegenkommen von Assistenzarzt Dr.

Hedesström erhielt. Es wurden zusammen 6 verschiedene Harne untersucht. Sie können gemäß den Angaben aus der Klinik in der folgenden Tabelle aufgestellt werden:

| Krankheit | Tagesmenge ccm | Eiweiß nach Esbach ‰ | Reaktion |
|--|-------------------|----------------------------|-----------|
| I. Orthostatische Albuminurie . | 700 | 1) | sauer |
| II. Amyloidniere und chronische Nephritis | 1100 | 16,5 | „ |
| III. Amyloidniere | 1100 | 3,5 | „ |
| IV. Schrumpfniere | 1800 | 2,5 | alkalisch |
| V. Stauungsniere | 1700 | Spur | sauer |
| VI. „ | 450 | „ | „ |

Die Proben wurden in derselben Weise wie bei den normalen Harnen angeordnet. 40 ccm Gerbsäurelösung wurden zugesetzt und der Stickstoff in 45 ccm des Filtrats bestimmt.

| | | |
|--------------------|----------------|-----------------|
| I. a 5 ccm | II. a 9,75 ccm | III. a 0,95 ccm |
| I. b 0,8 „ | II. b 0,6 „ | III. b 0,55 „ |
| Differenz 4,2 ccm | 9,15 ccm | 0,4 ccm |
| IV. a 1,7 ccm | V. a 0,8 ccm | VI. a 1,3 ccm |
| IV. b 0,75 „ | V. b 0,65 „ | VI. b 0,65 „ |
| Differenz 0,95 ccm | 0,15 ccm | 0,65 ccm |

In Proben I und II hat eine Verdauung des Caseins stattgefunden und möglicherweise ist auch eine unbedeutende solche in IV und VI vorhanden. In Eiweißharnen kann also ein in alkalischer Lösung wirksames Enzym bisweilen vorkommen. Ob es nur bei gewissen Krankheiten in den Harn übergeht, oder ob sein Vorkommen mit dem Eiweißgehalt des Harnes zusammenhängt, muß dahingestellt bleiben.

Versuche mit normalem Harn und Casein zusammen mit Fibrin.

Bei diesen Versuchen wurde zum Caseinniederschlag Fibrin aus Rindsblut zugesetzt. Das Fibrin war in Glycerin aufbewahrt

1) Um 12 Uhr 30 nachm. wurde eine Probe genommen, die 7‰ Eiweiß enthielt. Nach Aufstehen zeigte der Harn um 1 Uhr nachm. 20‰ Eiweiß.

worden. Vor der Anwendung wurde das Glycerin durch Wasser ausgewaschen, das nachher möglichst ausgepreßt wurde. Die Caseinniederschläge aus dem Harn (sie werden im folgenden mit C bezeichnet) wurden auch jetzt, wenn auch nicht so sorgfältig wie in den vorhergehenden Versuchen, gewaschen. Die Kontrollproben zeigen darum jetzt eine etwas größere Stickstoffmenge als vorher. Die Kontrollproben wurden, wenn nicht anders angegeben ist, in der Weise bereitet, daß 100 ccm Harn 5 Minuten über Flamme gekocht und danach wie in den anderen Proben zu 500 ccm verdünnt wurden. Für die Ausfällung des Caseins aus dem gekochten Harn wurde wie oben erwähnt mehr (5—10 ccm) 1% ige Essigsäure als für den ungekochten Harn verbraucht. Die Acidität des Harnes scheint nämlich durch das Kochen etwas vermindert zu werden.

Versuch I.

Die Proben wurden folgendermaßen angeordnet:

| | | | |
|-----------------------|--------------|---------------------------|---|
| 1. C. aus ungek. Harn | + 5 g Fibrin | + 50 ccm H ₂ O | + 2 ccm 10% Na ₂ CO ₃ |
| 2. » » gek. | » + 5 » | » + 50 » | » + 2 » 10% » |
| 3. » » ungek. | » | + 50 » Casein | + 1,75 » 10% » |
| 4. » » gek. | » | + 50 » | + 1,75 » 10% » |

Weil die Caseinlösung etwas alkalisch ist, wurde weniger Na₂CO₃ in 3. und 4. zugesetzt. 3. und 4. wurde durch 30 ccm Gerbsäure + 20 ccm H₂O, 1. und 2. durch 50 ccm Gerbsäure gefällt. Der Stickstoff wurde in 40 ccm des Filtrats bestimmt und die entsprechenden Mengen $\frac{n}{10}$ -NH₃ waren:

| | |
|--------------------|--------------------|
| 1. 8,35 ccm | 3. 1,55 ccm |
| 2. 2,6 » | 4. 1,25 » |
| Differenz 5,75 ccm | Differenz 0,30 ccm |

Ein anderer Harn wurde in derselben Weise untersucht und ergab folgendes Resultat:

| | |
|--------------------|--------------------|
| 1. 12,45 ccm | 3. 1,65 ccm |
| 2. 3,0 » | 4. 1,65 » |
| Differenz 9,45 ccm | Differenz 0,00 ccm |

Wenn ungekochtes Fibrin zugegen ist, wird also eine relativ starke Verdauung durch den Caseinniederschlag erhalten. Aus 2. folgt, daß das Fibrin selbst ein

proteolytisches Enzym enthält. Die Wirkung desselben tritt weniger hervor, wenn kein Casein zugegen ist:

5 g Fibrin + 50 ccm H₂O + 0,5 ccm 10% Na₂CO₃,
10 ccm Gerbsäure wurde nach der Verdauung zugesetzt. 30 ccm Filtrat gab 0,6 ccm $\frac{n}{10}$ -NH₃.

Versuch II.

Dieser Versuch wurde mit dem Harn einer dritten Person ausgeführt.

| | Casein | H ₂ O | 10% Na ₂ CO ₃ |
|------------------------------------|----------|------------------|-------------------------------------|
| 1. C. aus ungek. Harn + 5 g Fibrin | + 50 ccm | + 10 ccm | + 1,5 ccm |
| 2. » » gek. » + 5 » » | + 50 » | + 10 » | + 1,5 » |
| 3. » » ungek. » + 5 » gek. Fibrin | + 50 » | + 10 » | + 1,5 » |
| 4. » » gek. » + 5 » » » | + 50 » | + 10 » | + 1,5 » |

Das Fibrin wurde in derselben Weise wie die Casein-niederschläge in den Kontrollproben der ersten erwähnten Versuche gekocht. Nach der Verdauung wurden 30 ccm Gerbsäure + 20 ccm H₂O zugesetzt und 50 ccm Filtrat analysiert.

| | |
|---------------------|-------------------|
| 1. 15,65 ccm | 3. 1,9 ccm |
| 2. 3,65 » | 4. 1,2 » |
| Differenz 12,00 ccm | Differenz 0,7 ccm |

Auf gekochtes Fibrin hat also der Harn keine, oder jedenfalls eine sehr geringe Wirkung (Differenz = 0,7).

Versuch III.

Der Harn war zu verschiedenen Zeiten des Tages aufgesammelt worden.

A. Harn von 12 Uhr mitternachts bis 11 Uhr vormittags, während welcher Zeit keine Nahrung aufgenommen worden war.

| |
|---|
| 1. C. aus ungek. Harn + 5 g Fibrin + 50 ccm H ₂ O + 1,75 ccm 10% Na ₂ CO ₃ |
| 2. » » » » + 50 » Casein + 1,75 » 10% » |
| 3. » » » » + 50 » » + 1,75 » 10% » |

Die Kontrolle 3. ohne Fibrin wurde sogleich, ohne verdaut zu werden, durch 20 ccm Gerbsäure + 30 ccm H₂O gefällt. Nach der Verdauung wurde 1. durch 50 ccm Gerbsäure und 2. durch 20 ccm Gerbsäure + 30 ccm H₂O gefällt, 40 ccm Filtrat.

| | | |
|------------|-------------|------------|
| 1. 9,6 ccm | 2. 1,55 ccm | 3. 0,6 ccm |
|------------|-------------|------------|

B. Harn vom Mittagessen um 4,15 Uhr nachmittags bis 8,30 Uhr nachmittags. Die Proben wurden wie in A. angeordnet.

1. 9,85 ccm 2. 1,5 ccm 3. 1,55 ccm

Der Harn hat also zusammen mit Fibrin (1.) dieselbe Wirkung in A und B gehabt.

Versuch IV.

Wenn der Harn während 24 Stunden aufbewahrt wird, wird seine Wirkung zusammen mit Fibrin nicht erwähnenswert vermindert:

| | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------|-------------------------------------|
| | | | | 10% Na ₂ CO ₃ |
| 1. C. aus frischem Harn | + 5 g Fibrin | + 50 ccm H ₂ O | + 1,75 ccm | |
| 2. » » aufbewahrt Harn | + 5 » » | + 50 » » | + 1,75 » | |
| | 50 ccm Gerbsäure; 40 ccm Filtrat. | | | |
| | 1. 9,6 ccm | | 2. 8,85 ccm | |

Bei der Verdauung in Gegenwart von Fibrin wird außer dem Fibrin auch Casein digeriert. Dies geht daraus hervor, daß bei Zusatz von mehr Casein die Verdauung bedeutend vermehrt wird. (Versuch V—VII.) Daß andererseits auch das Fibrin digeriert wird, erleuchtet aus dem Umstand, daß dasselbe in den meisten Fällen vollständig aufgelöst wird.

Versuch V.

| | | | |
|-----------------------|--------------|-------------------------|--|
| 1. C. aus ungek. Harn | + 5 g Fibrin | + 50 ccm Casein | + 1,75 ccm 10% Na ₂ CO ₃ |
| 2. » » » » | + 5 » » | + 50 » H ₂ O | + 1,75 » 10% » |
| 3. » » gek. » | + 5 » » | + 50 » » | + 1,75 » 10% » |
| 4. » » ungek. » | + 5 » » | + 50 » Casein | + 1,75 » 10% » |

Probe 4 wurde sogleich, ohne bei 37° gehalten zu werden, durch 30 ccm Gerbsäure + 20 ccm H₂O gefällt. Nach der Verdauung: 1. und 2. 50 ccm Gerbsäure; 3. 30 ccm Gerbsäure + 20 ccm H₂O. 50 ccm Filtrat.

| | | |
|-------------|---|----------------------|
| 1. 23,2 ccm | } | Differenz = 5,65 ccm |
| 2. 17,55 » | | |
| 3. 5,2 » | | |
| 4. 1,8 » | | |

Versuch VI.

Harn (A) von derselben Person wie im vorhergehenden Versuche.

1. C. aus ungek. Harn + 5 g Fibrin + 50 ccm Casein + 1,75 ccm 10% Na_2CO_3 ,
2. „ „ „ „ + 5 „ „ + 50 „ H_2O + 1,75 „ 10% „
3. „ „ „ „ + 5 „ „ + 50 „ Casein + 1,75 „ 10% „
4. „ „ gek. „ + 5 „ „ + 50 „ „ + 1,75 „ 10% „

1. und 2. 50 ccm Gerbsäure; 3. und 4. 40 ccm Gerbsäure + 10 ccm H_2O . Das Filtrat von 1. gab bei Zusatz von mehr Gerbsäure einen Niederschlag, der jedoch im Überschuß gelöst wurde. 40 ccm Filtrat.

Nach derselben Methode sind die Harne (B und C) zwei anderer Personen untersucht worden. Zu 1. und 2. wurde jetzt 50 ccm Gerbsäure, zu 3. und 4. 30 ccm Gerbsäure + 20 ccm H_2O zugesetzt. 50 ccm Filtrat.

| A. | B. | C. |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1. 16,1 ccm } Differenz | 1. 25,4 ccm } Differenz | 1. 21,5 ccm } Differenz |
| 2. 8,2 „ } = 7,9 | 2. 18,5 „ } = 6,9 | 2. 13,8 „ } = 7,7 |
| 3. 1,5 „ | 3. 2,2 „ | 3. 2 „ |
| 4. 1,3 „ | 4. 2,7 „ | 4. 1,7 „ |

Die Versuche zeigen, daß bei Zusatz von Casein (1) eine ausgiebigere Digestion erhalten wird als ohne dasselbe (2) und daß folglich auch das zugesetzte Casein neben dem Fibrin verdaut wird. Dasselbe geht auch aus dem folgenden Versuch hervor, aus welchem auch zu ersehen ist, daß die Verdauung, welche von dem proteolytischen Enzyme des Fibrins herrührt, ebenfalls, wenn auch unbedeutend, bei Zusatz von Casein vermehrt wird. (Differenz 0,8.)

Versuch VII.

1. C. aus ungek. Harn + 5 g Fibrin + 50 ccm Casein + 1,75 ccm 10% Na_2CO_3 ,
2. „ „ „ „ + 5 „ „ + 50 „ H_2O + 2 „ 10% „
3. „ „ gek. „ + 5 „ „ + 50 „ Casein + 1,75 „ 10% „
4. „ „ „ „ + 5 „ „ + 50 „ H_2O + 2 „ 10% „

50 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

| | |
|-------------|------------------------|
| 1. 20,9 ccm | } Differenz = 7,5 ccm |
| 2. 13,4 „ | |
| 3. 4,05 „ | } Differenz = 0,85 ccm |
| 4. 3,2 „ | |

Aus meinen bisher erwähnten Versuchen geht also hervor, daß

1. normaler Menschenharn kein zusammen mit Casein fällbares in alkalischer Lösung wirkendes proteolytisches Enzym enthält oder nur winzige Mengen davon;

2. normaler Menschenharn enthält dagegen eine zusammen mit Casein fällbare Substanz, welche in der Gegenwart von Fibrin proteolytische Wirkung bei alkalischer Reaktion erzeugt (Versuche I—VII). Dabei wird sowohl das Fibrin wie zugesetztes Casein angegriffen (Versuche V—VII).

Da es von Interesse sein könnte zu erfahren, ob die Wirkung von Pankreastrypsin durch Fibrin gesteigert wird, habe ich folgenden Versuch ausgeführt, aus welchem keine solche Wirkung zu ersehen war.

Versuch VIII.

Das Trypsin war aus Pankreassubstanz bereitet. Zur Kontrolle wurden Proben mit auf dem Wasserbade gekochter Trypsinlösung angeordnet (2. und 4.).

1. 0,5 ccm ungek. Trypsin + 5 g ungek. Fibrin + 50 ccm Casein + 10 ccm H₂O
 2. 0,5 » gek. » + 5 » » » + 50 » » + 10 » »
 3. 0,5 » ungek. » + 5 » gek. » + 50 » » + 10 » »
 4. 0,5 » gek. » + 5 » » » + 50 » » + 10 » »

30 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

1. 3,4 ccm

3. 1,95 ccm

2. 3,7 »

4. 0,85 »

Differenz — 0,3 ccm

Differenz 1,10 ccm

In den beiden folgenden Versuchen wurde untersucht, ob auch das Fibrin die wirksame Substanz aus dem Harn aufnehmen kann. Nachdem das Fibrin während zwei Stunden bei Zimmertemperatur im Harn gelegen hatte, wurde es herausgenommen und sorgfältig gewaschen.

Versuch IX.

8 g Fibrin wurde in I. 100 ccm Harn, II. 100 ccm Harn + 100 ccm destilliertes Wasser, III. destilliertes Wasser gelegt. Die Fibrinproben wurden nach der Waschung in Flaschen gelegt;

50 ccm Caseinlösung und 0,5 ccm 10%iges Na_2CO_3 wurde zu jeder zugesetzt und wie gewöhnlich während 24 Stunden bei 37° digeriert. 40 ccm Gerbsäure; 45 ccm Filtrat.

I. 8,45 ccm

II. 11,4 ccm

III. 9 ccm.

Möglicherweise ist aus dem verdünnten Harn (II) etwas von der wirksamen Substanz durch das Fibrin aufgenommen worden. Aus dem nicht verdünnten Harn (I) wurde nichts aufgenommen.

Versuch X.

In diesem Versuche wurden zwei verschiedene Harne angewendet (A und B). Vom Harn A wurden 4 Proben, vom Harn B 2 Proben à 100 ccm abgemessen. Zur Kontrolle wurden 2 Proben vom Harn A (2. und 4.) und eine vom Harn B (2.) gekocht. Alle Proben wurden zu 300 ccm verdünnt und 5 g Fibrin in jede gelegt. Die Fibrinproben wurden nachdem folgendermaßen angeordnet:

| | | |
|----|---|--|
| A. | { | 1. Fibrin + 50 ccm H_2O + 0,5 ccm 10% Na_2CO_3 |
| | | 2. „ + 50 „ „ + 0,5 „ 10% „ |
| | | 3. „ + 50 „ Casein + 0,5 „ 10% „ |
| | | 4. „ + 50 „ „ + 0,5 „ 10% „ |
| B. | { | 1. „ + 50 „ „ + 0,5 „ 10% „ |
| | | 2. „ + 50 „ „ + 0,5 „ 10% „ |

40 ccm Gerbsäure; 45 ccm Filtrat.

A. { 1. 0,6 ccm
2. 0,5 „

A. { 3. 4,15 ccm
4. 2,45 „

B. { 1. 4,8 ccm
2. 3,65 „

Differenz 0,1 ccm

Differenz 1,70 ccm

Differenz 1,15 ccm

Nur in der Gegenwart von Casein entsteht also eine bemerkbare Differenz, welche möglicherweise auf eine Aufnahme seitens des Fibrins von winzigen Mengen der wirksamen Substanz aus dem Harne hindeuten könnte. Überhaupt scheint die wirksame Substanz auf das Fibrin nicht in bestimmt nachweisbaren Mengen fixiert werden zu können.

Versuche mit Fibrinextrakt.

Das Fibrin wurde einerseits mit NaCl -Lösung (Versuch I) und andererseits mit Caseinlösung (Versuch II) extrahiert.

Versuch I.

In einer Flasche von 100 ccm Inhalt wurde Fibrin gepackt und etwa 50 ccm 1% ige NaCl-Lösung zugesetzt. Nach 20 Stunden bei Zimmertemperatur wurde das Extrakt abgepreßt, filtriert und zum folgenden Versuch zusammen mit sorgfältig gewaschenen Caseinniederschlägen aus einem Harne angewendet.

| | |
|--|-------------------------------------|
| | 10% Na ₂ CO ₃ |
| 1. Ungek. C. + 5 ccm ungek. Extrakt + 50 ccm Casein + 1,75 ccm | |
| 2. Gek. > + 5 > > > + 50 > > + 1,75 > | |
| 3. Ungek. > + 5 > gek. > + 50 > > + 1,75 > | |
| 4. Gek. > + 5 > > > + 50 > > + 1,75 > | |

40 ccm Gerbsäure; 45 ccm Filtrat.

| | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|
| 1. 2,95 ccm | 2. 2,95 ccm | 3. 1,3 ccm | 4. 1,3 ccm. |
| 1. 2,95 ccm | | 3. 1,3 ccm | 2. 2,95 ccm |
| 2. 2,95 > | | 4. 1,3 > | 4. 1,3 > |

Differenz 0,00 ccm Differenz 0,0 ccm Differenz 1,65 ccm

Der ungekochte Salzextrakt ergab also eine schwache Verdauung (Differenz 1,65), aber diese wurde nicht durch den Caseinniederschlag verstärkt, und die NaCl-Lösung hatte folglich von dem auf dem Fibrin befindlichen, zusammen mit dem Caseinniederschlage aus dem Harn wirksamen Stoffe, nichts ausgezogen.

Versuch II.

400 ccm der Caseinlösung wurde in eine Flasche von 550 ccm Inhalt gegossen und die Flasche mit Fibrin angefüllt. Die Extraktion dauerte 15 Stunden bei Zimmertemperatur.

| | |
|---|--|
| 1. Ungek. C. + 50 ccm ungek. Extrakt + 1,75 ccm 10% Na ₂ CO ₃ | |
| 2. Gek. > + 50 > > > + 1,75 > 10% > | |
| 3. Ungek. > + 50 > gek. > + 1,75 > 10% > | |
| 4. Gek. > + 50 > > > + 1,75 > 10% > | |

1. und 2. 50 ccm Gerbsäure; 3. und 4. 40 ccm Gerbsäure + 10 ccm H₂O.

| | | | |
|------------|------------|-------------|--------------|
| 1. 8,3 ccm | 2. 7,5 ccm | 3. 3,75 ccm | 4. 3,35 ccm. |
| 1. 8,3 ccm | | 3. 3,75 ccm | 2. 7,5 ccm |
| 2. 7,5 > | | 4. 3,35 > | 4. 3,35 > |

Differenz 0,8 ccm Differenz 0,40 ccm Differenz 4,15 ccm

Das Casein hatte also aus dem Fibrin ein proteolytisches Enzym extrahiert (Differenz 4,15), dessen Wirkung aber durch den Caseinniederschlag nur unbedeutend verstärkt wurde (Differenz 0,8).

Versuche mit Blutserum und mit Leukozyten.

Mit Ochsen Serum wurde ein Versuch ausgeführt, wobei keine Verdauung erhalten wurde. Der Harn war während 40 Stunden dialysiert und in allen Proben ungekocht.

- | | | | |
|-------|-----------------------|---------------------------|--|
| 1. C. | + 20 ccm ungek. Serum | + 30 ccm H ₂ O | + 1,75 ccm 10% Na ₂ CO ₃ |
| 2. » | + 20 » gek. | + 30 » » | + 1,75 » 10% » |
| 3. » | | + 50 » » | + 1,75 » 10% » |

30 ccm Gerbsäure; 30 ccm Filtrat.

- | | | |
|-------------|------------|--------------|
| 1. 0,95 ccm | 2. 0,8 ccm | 3. 0,55 ccm. |
|-------------|------------|--------------|

Die Wirkung des Fibrins könnte aus Leukozyten direkt herrühren, deren Reste dem Fibrin anhaften könnten. Ein Versuch ist darum mit Leukozyten aus Rindsblut gemacht worden. Durch ein erstes Zentrifugieren des Blutes, das durch Zusatz von Kaliumoxalat am Gerinnen verhindert worden war, wurden die roten Blutkörperchen vom Serum mit darin aufgeschlämmten Leukozyten getrennt. Das Serum wurde abpipetiert und von neuem zentrifugiert, wobei ein Bodensatz von roten und farblosen Blutkörperchen erhalten wurde. Nachdem das Serum abgossen worden war, wurden die Blutkörperchen durch möglichst wenig Wasser in einer Flasche niedergewaschen. Aus etwa 700 ccm Blut wurden 10 ccm mit Blutkörperchen erhalten.

- | | | | |
|-----------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------------|
| | | | 10% Na ₂ CO ₃ |
| 1. C. aus ungek. Harn | + 2 ccm Blutkörp. | + 50 ccm Casein | + 1,75 ccm |
| 2. » » gek. | + 2 » » | + 50 » » | + 1,75 » |
| 3. » » ungek. | + 2 » gek. | + 50 » » | + 1,75 » |
| 4. » » gek. | + 2 » » | + 50 » » | + 1,75 » |

30 ccm Gerbsäure; 40 ccm Filtrat.

- | | | | |
|----------|------------|------------|-------------|
| 1. 4 ccm | 2. 4,5 ccm | 3. 3,7 ccm | 4. 3,3 ccm. |
|----------|------------|------------|-------------|

1. 4 ccm

2. 4,5 ccm

2. 4,5 »

4. 3,3 »

Differenz — 0,5 ccm

Differenz 1,2 ccm

Die Leukozyten zeigten also in diesem Falle keine Wirkung zusammen mit dem Harn-caseinniederschlag.

Versuche, etwaiges Trypsinogen im Harn nachzuweisen.

Bamberg und v. Schoenborn haben, wie erwähnt, kein Trypsinogen im Menschenharn gefunden. Dasselbe Ergebnis

ist in den beiden folgenden Versuchen erhalten worden. Die proteolytische Wirkung des Harns zusammen mit Fibrin kann also nicht auf einer Eigenschaft des Fibrins, Trypsinogen aktivieren zu können, beruhen. Nach Delezenne¹⁾ hat das Fibrin diese Eigenschaft, die er dem Gehalt des Fibrins an Leukozyten zuschreibt.

Versuch I.

CaCl₂ wurde zu etwa 0,2% zugesetzt.

| | |
|---|-------------------------------------|
| | 10% Na ₂ CO ₃ |
| 1. C. aus ungek. Harn + 50 ccm Casein + 5,5 ccm 2% CaCl ₂ + 1,75 ccm | |
| 2. » » » » + 50 » » + 5,5 » H ₂ O + 1,75 » | |
| 40 ccm Gerbsäure; 35 ccm Filtrat. | |
| 1. 2,4 ccm | 2. 2,6 ccm. |

Ein etwaiges Zymogen wird also nicht durch CaCl₂ aktiviert.

Versuch II.

Von Kalbsduodenum wurden 1 1/2 dm genommen und zusammen mit Sand zerrieben. 60 ccm Wasser wurden zugesetzt und der Extrakt nach Filtrierung zum folgenden Versuch angewendet:

| | | | |
|---|-------------------------------------|------------|-----------|
| | 10% Na ₂ CO ₃ | | |
| 1. C. aus ungek. Harn + 50 ccm Casein + 5 ccm Kinase + 1,75 ccm | | | |
| 2. » » gek. » + 50 » » + 5 » » + 1,75 » | | | |
| 3. » » ungek. » + 50 » » + 5 » H ₂ O + 1,75 » | | | |
| 4. » » gek. » + 50 » » + 5 » » + 1,75 » | | | |
| 40 ccm Gerbsäure; 35 ccm Filtrat. | | | |
| 1. 1,3 ccm | 2. 1,5 ccm | 3. 1,3 ccm | 4. 1 ccm. |

Enterokinase hat also keinen Einfluß auf die Harnsubstanz. Versuche über die Einwirkung von Ammoniak und von Essigsäure auf die wirksame Substanz in dem Harn.

Versuch I.

Zu 100 ccm Harn wurden 100 ccm ²/₁₀-n-NH₃ zugesetzt. Nach 3 Stunden bei Zimmertemperatur wurde mit 200 ccm ⁿ/₁₀-H₂SO₄ neutralisiert (Probe A). Eine Kontrollprobe wurde

¹⁾ Delezenne, Soc. biol., Bd. 54, S. 590 (1902) und Bd. 56, S. 166 (1904).

aus 100 ccm Harn und der entsprechenden Menge $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ zubereitet (Probe B). Beide Proben wurden zu 500 ccm verdünnt und mit Casein versetzt.

1. C. aus A + 50 ccm Casein + 1,75 ccm 10% Na_2CO_3
 2. „ „ B + 50 „ „ + 1,75 „ 10% „
- 40 ccm Gerbsäure; 35 ccm Filtrat.
1. 2 ccm
 2. 1,75 ccm.

Versuch II.

Zwei Proben à 100 ccm Harn wurden wie im vorhergehenden Versuche angeordnet. Das Ammoniak wurde in A nach $5\frac{1}{2}$ Stunden neutralisiert. Eine dritte Probe desselben Harnes wurde gekocht (Probe C).

1. C. aus A + 5 g Fibrin + 50 ccm H_2O + 2 ccm 10% Na_2CO_3
 2. „ „ B + 5 „ „ + 50 „ „ + 2 „ 10% „
 3. „ „ C + 5 „ „ + 50 „ „ + 2 „ 10% „
- 50 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.
1. 11,4 ccm
 2. 12,7 ccm
 3. 3,9 ccm.

Versuch III.

Zu zwei Proben à 100 ccm Harn wurden 25 bzw. 11 ccm 1%iger Essigsäure zugesetzt (Probe A und C resp.) Nach 3 Stunden bei Zimmertemperatur wurde die Essigsäure mit vorher bestimmten Mengen $n/10$ -NaOH neutralisiert. Zwei andere Proben wurden mit den entsprechenden Mengen Natriumacetat angeordnet (Probe B und D resp.). Alle Proben wurden zu 500 ccm verdünnt.

1. C. aus A + 5 g Fibrin + 50 ccm H_2O + 1,75 ccm 10% Na_2CO_3
 2. „ „ B + 5 „ „ + 50 „ „ + 1,75 „ 10% „
 3. „ „ C + 5 „ „ + 50 „ „ + 1,75 „ 10% „
 4. „ „ D + 5 „ „ + 50 „ „ + 1,75 „ 10% „
- 50 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.
1. 9,5 ccm
 2. 14,4 ccm
 3. 11,8 ccm
 4. 13,3 ccm.

Bei den gewählten Versuchsbedingungen üben also Ammoniak und Essigsäure keine oder nur eine unbedeutende Einwirkung auf den Harn aus. Möglicherweise wird die wirksame Substanz des Harns durch Säure etwas geschädigt.

Versuche mit Rindsharn.

Versuch I.

1. C. aus ungek. Harn + 5 g Fibrin + 50 ccm H₂O + 2 ccm 10% Na₂CO₃
 2. „ „ gek. „ + 5 „ „ + 50 „ „ + 2 „ 10% „
 3. „ „ ungek. „ + 50 „ Casein + 1,75 „ 10% „
 4. „ „ gek. „ + 50 „ „ + 1,75 „ 10% „

1. und 2. 50 ccm Gerbsäure, 3. und 4. 30 ccm Gerbsäure + 20 ccm H₂O; 50 ccm Filtrat.

| | |
|--------------------|--------------------|
| 1. 12,6 ccm | 3. 1,65 ccm |
| 2. 3,55 „ | 4. 1 „ |
| Differenz 9,05 ccm | Differenz 0,65 ccm |

Versuch II.

1. C. aus ungek. Harn + 50 ccm Casein + 1,75 ccm 10% Na₂CO₃
 2. „ „ gek. „ + 50 „ „ + 1,75 „ 10% „

30 ccm Gerbsäure + 20 ccm H₂O; 40 ccm Filtrat.

| | |
|-------------|-------------|
| 1. 0,85 ccm | 2. 0,8 ccm. |
|-------------|-------------|

Die Rindsharne in diesen beiden Versuchen haben sich also wie Menschenharn verhalten.

Versuche mit Pferdeharn.

Der Pferdeharn enthält einen reichlichen Niederschlag, der möglicherweise wirksame Substanzen aus dem Harne aufnehmen könnte. Darum sind Versuche teils mit filtriertem Harn (Versuch I u. II), teils mit dem Niederschlag (Versuch III) und teils mit Harn, in welchem der Niederschlag aufgelöst worden war (Versuch IV), gemacht worden.

Versuch I.

1. C. aus ungek. Harn + 5 g Fibrin + 50 ccm H₂O + 2 ccm 10% Na₂CO₃
 2. „ „ „ „ + 5 „ „ + 50 „ „ + 2 „ 10% „

50 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

| |
|------------|
| 1. 3,7 ccm |
| 2. 2,8 „ |

Differenz 0,9 ccm

Versuch II.

Mit einem andern Harn wurden dieselben Proben hergestellt:

30 ccm Gerbsäure; 45 ccm Filtrat.

1. 4,1 ccm

2. 3,2 "

Differenz 0,9 ccm

Der filtrierte Harn zeigte also in diesen Versuchen eine sehr unbedeutende Wirkung zusammen mit Fibrin.

Versuch III.

Der Niederschlag (N) wurde durch Dekantieren gewaschen, ehe er auf das Filter genommen wurde. Die Kontrollproben (2 und 4) wurden in derselben Weise wie Fibrin während 30 Minuten gekocht.

1. Ungek. N + 5 g Fibrin + 50 ccm Casein

2. Gek. " + 5 " " + 50 " "

3. Ungek. " + 5 " gek. " + 50 " "

4. Gek. " + 5 " " + 50 " "

40 ccm Gerbsäure; 40 ccm Filtrat.

1. 9 ccm 2. 7,1 ccm 3. 1,1 ccm 4. 0,9 ccm.

1. 9 ccm 3. 1,1 ccm 2. 7,1 ccm

2. 7,1 " 4. 0,9 " 4. 0,9 "

Differenz 1,9 ccm

Differenz 0,2 ccm

Differenz 6,2 ccm

Die Wirkung des Fibrins ist vielleicht durch den Niederschlag etwas vermehrt worden.

Versuch IV.

Nachdem der Niederschlag durch Zusatz zum Harne von Essigsäure zu schwach saurer Reaktion aufgelöst worden war, wurde der Harn in gewöhnlicher Weise behandelt.

10% Na₂CO₃

1. C. aus ungek. Harn + 5 g ungek. Fibrin + 50 ccm Casein + 1,75 ccm

2. " " gek. " + 5 " " + 50 " " + 1,75 "

3. " " ungek. " + 5 " gek. " + 50 " " + 1,75 "

4. " " gek. " + 5 " " + 50 " " + 1,75 "

50 ccm Gerbsäure; 40 ccm Filtrat.

1. 11,3 ccm 2. 7,8 ccm 3. 3,1 ccm 4. 1,9 ccm.

1. 11,3 ccm 3. 3,1 ccm 2. 7,8 ccm

2. 7,8 " 4. 1,9 " 4. 1,9 "

Differenz 3,5 ccm

Differenz 1,2 ccm

Differenz 5,9 ccm

Die proteolytische Wirkung des Fibrins (Differenz 5,9) ist durch den Harn in diesem Falle etwas verstärkt worden (Differenz 3,5).

Versuch V.

Mit Pferdeserum und filtriertem Pferdeharn wurde auch ein Versuch gemacht, der negatives Resultat gab.

| | 10% Na ₂ CO ₃ |
|---|-------------------------------------|
| 1. C. aus ungek. Harn + 5 ccm Serum + 50 ccm Casein | + 1,75 ccm |
| 2. „ „ „ „ + 5 „ H ₂ O + 50 „ „ | + 1,75 „ |
| 3. „ „ gek. „ + 5 „ „ + 50 „ „ | + 1,75 „ |
| 40 ccm Gerbsäure; 35 ccm Filtrat. | |
| 1. 1,05 ccm | 2. 1,9 ccm |
| | 3. 1,15 ccm. |

Zusammenfassung.

Im normalen Menschenharn, wie im Rinds- und Pferdeharn, habe ich kein mit Casein fällbares in alkalischer Lösung wirksames proteolytisches Enzym mit Sicherheit finden können. In Eiweißharnen kommt dagegen ein solches bisweilen vor.

Bei der Ausfällung des Caseins aus dem Harn wird vom Casein eine Substanz mitgerissen, die in alkalischer Lösung zusammen mit Fibrin aus Rindsblut proteolytische Wirkung ausübt. Eine ähnliche Substanz kommt auch in Rindsharn vor und in sehr geringer Menge möglicherweise im Pferdeharn. Mit Rindsserum anstatt Fibrin wurde dagegen keine proteolytische Wirkung erhalten.

Trypsinogen ist nicht im Harn gefunden worden.

Die beiden sich komplettierenden Substanzen auf dem Fibrin einerseits und im Harn andererseits sind durch Kochen zerstörbar und infolgedessen wahrscheinlich enzymatischer Natur. Möglicherweise ist die eine dieser Substanzen als eine Kinase zu betrachten, welche die andere aktiviert. Welcher der beiden Stoffe in dem Falle das eigentliche Zymogen ausmacht, geht aus meinen Versuchen nicht hervor. Meine Ergebnisse erklären in ungezwungener Weise, warum Cathcart mit Fibrin als Substrat eine starke proteolytische Wirkung mit dem Casein-niederschlag aus Menschenharn erhielt.