

Zur Kenntnis der Autolyse des Gehirns.

Von

Friedrich Simon, Berlin.

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

(Der Redaktion zugegangen am 13. Mai 1911.)

In der Reihe der einzelnen Organe, deren autolytische Prozesse genauer erforscht wurden, scheint das Gehirn — was das Studium seiner intracellularen Fermente betrifft — bisher wenig beachtet worden zu sein. Denn die Tatsachen, die ich in der mir zugänglichen Literatur über das Vorkommen, die Art und Wirkungsweise von Fermenten des Zentralnervensystems ermitteln konnte, sind äußerst spärlich.

Was zunächst das Vorkommen proteolytischer Fermente im Gehirn betrifft, so liegen die Angaben dreier Autoren vor. Rosell,¹⁾ der das M. Jacobysche Verfahren zur Isolierung intracellulärer Fermente in vereinfachter Form (Fällung der wässerigen Organextrakte mit Uranylacetat) benutzte, hat verschiedene Organe (vom Rind bzw. Pferd) auf den Gehalt an intracellularen proteolytischen Fermenten untersucht. Es gelang Rosell, mit dieser Methode ein proteolytisches («trypsinoides» bzw. «pepsinoides»), auf frische Fibrinflocken lösend wirkendes Ferment in Pankreas, Speicheldrüsen, Lymphdrüsen, Milz, Knochenmark, Thymus, Milchdrüsen, Muskeln, Lunge, Nebennieren und Hoden nachzuweisen, dagegen weder im Gehirn noch in den Nieren. Dann haben Levene und Stookey²⁾ Untersuchungen über die Autolyse des Gehirns unter wechselnden Bedingungen angestellt und dabei ihre Aufmerksamkeit gerade auf die bei der Autodigestion dieses

¹⁾ Max Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente. Inaug.-Dissert., Straßburg 1901.

²⁾ Levene und Stookey, On the autolysis of brain tissue. The Journal of Medical Research, Boston, Oktober 1903, S. 212.

Organes sich abspielende fermentative Proteolyse gerichtet. Diese Forscher benutzten Hundehirne, die sie 6 Tage lang (in drei getrennten Versuchsreihen) mit physiologischer Kochsalzlösung, mit 0,2%iger Essigsäurelösung und mit 0,5%iger Natriumcarbonatlösung digerierten. In den Versuchsprotokollen habe ich allerdings weder Angaben über die Höhe der Digestionstemperatur, noch über den Zusatz von Chloroform oder anderen Antiseptics finden können. Es wurden ferner zwei Parallelversuche zu den beiden (essigsäuren und sodaalkalischen) Autolysen mit Zusatz von etwas (zuvor erhitzter) Gehirnschubstanz durchgeführt, um den Einfluß des Nervengewebes auf den Verlauf der Gehirnautoolyse zu studieren. Vor Beginn der Auto-digestion, sowie nach 6 Tagen ihrer Dauer wurden bestimmt: Gesamt-N, koagulierbarer N, nicht koagulierbarer N («Albumose-N»), durch Zinksulfat nicht fällbarer N («Pepton- und Amino-N») und der Stickstoff des freien Ammoniaks. Die Versuchsergebnisse lassen sich dahin zusammenfassen, daß in allen Versuchsreihen eine mehr oder weniger beträchtliche Abnahme des koagulierbaren N und entsprechende Zunahme des unkoagulierbaren und durch $ZnSO_4$ nicht fällbaren N nachgewiesen wurden, daß also eine autodigestive Proteolyse des Gehirns festzustellen war, die bei Gegenwart von Essigsäure befördert, bei Gegenwart von Natriumcarbonat gehemmt und bei gleichzeitiger Anwesenheit sterilisierter Gehirnschubstanz im essigsäuren Medium etwas ungünstig beeinflusst wurde. Mit ihrer Beobachtung der hemmenden Wirkung alkalischer Reaktion auf die autodigestive Proteolyse befinden sich übrigens Levene und Stookey im Einklang mit den entsprechenden Feststellungen, die Schwiening,¹⁾ Baer und Loeb,²⁾ v. Drjewecki,³⁾ Preti⁴⁾ für die Autolyse der Leber gemacht haben. Schließlich haben noch Kutscher und Lohmann⁵⁾

¹⁾ Schwiening, Virchows Archiv, Bd. 136, S. 444, 1894.

²⁾ Baer und Loeb, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 53, S. 1, 1905.

³⁾ v. Drjewecki, Biochem. Zeitschrift, Bd. 1, S. 229, 1906.

⁴⁾ Preti, Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 485, 1907.

⁵⁾ Kutscher und Lohmann, Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 317, 1903.

gelegentlich ihrer Untersuchungen über «die Endprodukte der Pankreas- und Hefeselbstverdauung» auch ein Ochsengehirn der Autodigestion unterworfen. «Nachdem die Verdauungsflüssigkeit konstante Drehung» gezeigt hatte, wurde das Filtrat — nach Koagulation der Eiweißkörper — eingeengt und durch Fällung mit Silbernitrat, Baryt und Phosphorwolframsäure auf die Fraktionen der Alloxurbasen, des Arginins, Histidins und Lysins verarbeitet. Hierbei erhielten Kutscher und Lohmann nur in der Argininfraktion eine geringe Fällung und schlossen daraus, daß die proteolytischen Enzyme, die sich «vielleicht» im Gehirn finden, das gelöste Eiweiß nur wenig zu verändern scheinen.

Hinsichtlich der Frage, ob intracelluläre Fermente des Gehirns das Protogon zu zersetzen oder chemisch zu verändern vermögen, sei auf eine Beobachtung A. Nolls¹⁾ verwiesen, der in der einen Großhirnhemisphäre eines Ochsen einen Protogongehalt von 19,83% (der trockenen weißen Substanz) und in der entsprechenden anderen Hemisphäre nach 3 tägigem Liegen an der Luft einen solchen von 18,98% ermittelte. Noll scheint auf diese kleine Differenz kein Gewicht zu legen; jedenfalls ist aus dem Ergebnis seines Versuches durchaus nicht auf eine irgendwie erhebliche Wirksamkeit protogonzersetzender Gehirnermente zu schließen.

Es ist auffallend, daß in den zahlreichen Arbeiten, die sich mit der Biochemie der Gehirnphosphatide beschäftigen, die im Zentralnervensystem etwa vorkommenden und wirksamen phosphatidspaltenden Fermente nur geringe Beachtung gefunden haben. Zur Entscheidung dieser Frage stellten Kutscher und Lohmann den oben bereits zitierten Versuch an und suchten, durch Fällungen des Autolysefiltrates mit Silbernitrat, Baryt und Phosphorwolframsäure die einzelnen Fraktionen der Produkte einer Gehirnautolyse darzustellen. Da in der Fraktion der Alloxurbasen sich nur Chlor fand und die Histidin- und Lysinfraktion überhaupt nicht entstanden, so schlossen Kutscher und Lohmann, daß aus dem Lecithin

¹⁾ A. Noll, Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 383, 1899.

des Gehirns kein Cholin frei geworden, also auch kein Lecithin während der Autodigestion zersetzt worden war. Im Gegensatz zu diesem Befunde stehen die Versuchsergebnisse von Coriat,¹⁾ der menschliches Gehirn (von einem Falle von Dementia senilis) einer 3 tägigen Autodigestion bei 38—40° C. unterwarf und dann Cholin als autolytisches Zersetzungsprodukt des Lecithins durch Darstellung seines Platinsalzes zu identifizieren versuchte. Coriat kommt nun zu der bemerkenswerten Feststellung, daß im Gehirn ein Ferment vorhanden ist, das aus Lecithin Cholin bildet. Das Ferment wirkt nicht bei leicht saurer Reaktion, am kräftigsten bei schwach alkalischer und weniger energisch bei neutraler Reaktion. Es wird durch Erhitzen zerstört. Bei Eintritt von Fäulnis wird mehr Cholin gebildet als bei bloßer Autolyse. Stärkere Behandlung mit Antiseptics oder vorherige leichte Erhitzung, die nur einen Teil des Fermentes unwirksam mache, hat geringe Ausbeute an Cholin zur Folge. Coriat war nicht imstande, das Ferment zu isolieren.

Bessere Übereinstimmung der Befunde als über das Vorkommen lecithinspaltender Fermente im Gehirn scheint über seinen Gehalt an Peroxydase zu bestehen. So konnten Battelli und Stern²⁾ zeigen, daß die verschiedenen Gewebe höherer Tiere die Fähigkeit besitzen, in vitro in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd Ameisensäure unter Entwicklung von Kohlensäure zu oxydieren. Diese Fähigkeit, die Battelli und Stern²⁾ einer in den Geweben enthaltenen Peroxydase zuschreiben, konnten sie auch im Hammel- und Hundehirn nachweisen. Sie stellen in bezug auf den Gehalt an Peroxydase folgende absteigende Reihe der Organe auf: Leber, Niere, Milz, Lunge, Pankreas, Lymphdrüsen, Rindermuskeln, Gehirn, Hoden, Hundemuskeln, Thymus, Nebenniere, Schilddrüse, Kaninchenmuskeln. Auch Rosell³⁾ gelang es, mit der

¹⁾ Coriat. The production of Cholin from Lecithin and brain-tissue (The American Journal of Physiology, Bd. 12, S. 353, Boston 1905). Referat in Malys Jahresber., Bd. 34, S. 574.

²⁾ F. Battelli u. L. Stern. Biochem. Zeitschr., Bd. 13, S. 44. 1908.

³⁾ Rosell. l. c.

Uranylacetatmethode aus Rindergehirn Fermente zu isolieren, die Wasserstoffsperoxyd unter lebhafter Gasentwicklung zu zersetzen und andererseits Salicylaldehyd zu oxydieren vermochten.

Wie die vorstehende kurze Literaturübersicht zeigt, sind die Tatsachen, die über das Vorkommen, die Art und Wirkungsweise intracellulärer Gehirnfermente bekannt geworden sind, nicht nur recht spärliche, sondern auch teilweise einander widersprechende. Besonders schien mir die Wirkungsweise der im Gehirn etwa vorkommenden proteolytischen und phosphatidspaltenden Fermente der Autodigestion noch weiterer Untersuchungen zu bedürfen. Diesem Zwecke sollte die vorliegende Arbeit dienen, deren Ausführung Herr Geh.-Rat Salkowski ein stetes freundliches Interesse schenkte. Herrn Geh.-Rat Salkowski sage ich hierfür, auch an dieser Stelle, meinen besten Dank.

I. Versuche über die autodigestive Proteolyse von Gehirnsubstanz.

Als Ausgangsmaterial kam für diese wie alle folgenden Versuche ausschließlich Kalbshirn zur Verwendung, das möglichst frisch vom Schlächter bezogen und sofort verarbeitet wurde. Teile beider Großhirnhemisphären wurden abgehäutet, zunächst mit dem Wiegemesser zerkleinert und dann in der Reibschale bis zur möglichst gleichmäßigen Verteilung der grauen und weißen Substanz verrieben.

Versuch A.

Unmittelbar nach dieser Vorbereitung wird in zwei Proben der frischen Substanz der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt:

1,989 frischer Substanz enthält 1,63% N

1,9974 » » » 1,64% N.

Von dem Gehirnbrei werden sofort zwei Portionen zu je 50 g abgewogen. Die eine Portion (Kontrollversuch) wird mit $\frac{1}{4}$ l Wasser unter Zusatz von 1% Kochsalz und verdünnter Essigsäure aufgekocht und dann unter weiterem Zusatz von 200 ccm Chloroformwasser 3mal 24 Stunden im Thermostaten bei 38–40° C digeriert. Die andere Portion

(Hauptversuch) wird mit 450 ccm Chloroformwasser ebenfalls 72 Stunden bei 38—40° C. digeriert, dann unter Zusatz von 1% Kochsalz und verdünnter Essigsäure aufgeköcht und nach dem Erkalten auf 500 ccm aufgefüllt, schließlich filtriert. Vom Filtrat, das leicht opalesziert, werden 400 ccm auf ein Viertel ihres Volumens eingengt. Je 25 ccm dieser Flüssigkeit werden zur Stickstoffbestimmung genommen. Die Mischung des Kontrollversuches wird nach Beendigung der 72stündigen Digestion in analoger Weise, doch unter Vermeidung nochmaligen Aufköchens verarbeitet.

Das Autolysefiltrat des Hauptversuches enthält in 100 ccm 0,03108 g N.

Das Autolysefiltrat des Kontrollversuches enthält in 100 ccm 0,01645 g N.

Da 100 ccm des Filtrates immer 10 g der frischen Substanz entsprechen, und für jeden Autolyseversuch 50 g der frischen Substanz angesetzt wurden, so waren durch dreitägige Autodigestion in Lösung gegangen:

beim Hauptversuch 0,1554 g N = 19,01% des Gehirnstickstoffs,

beim Kontrollversuch 0,08225 g N = 10,06% des Gehirnstickstoffs.

Versuch B.

Wiederholung des vorigen Versuches mit einem zweiten Gehirn der gleichen Beschaffenheit.

1,9006 frischer Substanz enthält 1,59% N

2,4266 » » » 1,58% N.

Nach 72stündiger Digestion enthält in 100 ccm:

das Autolysefiltrat des Hauptversuches 0,02968 g N

das Filtrat des Kontrollversuches 0,01652 » N.

Es waren also in Lösung gegangen:

beim Hauptversuch 0,1484 g N = 18,72% des Gehirnstickstoffes,

beim Kontrollversuch 0,0826 g N = 10,42% des Gehirnstickstoffes.

Versuch C.

Nochmalige Wiederholung des Versuches A mit einem dritten Gehirn der gleichen Beschaffenheit. Eine Stickstoffbestimmung der frischen Gehirnsubstanz wurde hier nicht mehr gemacht.

Nach 72 stündiger Digestion enthält in 100 cem:
 das Autolysefiltrat des Hauptversuches 0,02912 g N
 das Filtrat des Kontrollversuches 0,01484 g N.

Es waren also in Lösung gegangen:

beim Hauptversuch 0,1456 g N
 » Kontrollversuch 0,0742 » N.

Tabelle 1.

Versuch	Di- gestions- dauer Std.	Gesamt-N in 50 g frischer Substanz g	Gesamtmenge des nicht koagulierb. N		Vom Gehirn-N gingen in Lösung	
			beim Haupt- versuch g	beim Kontroll- versuch g	beim Haupt- versuch %	beim Kontroll- versuch %
A	72	0,8175	0,1554	0,08225	19,01	10,06
B	72	0,7925	0,1484	0,0826	18,72	10,42
C	72	—	0,1456	0,0742	—	—

Zur Epikrise vorstehender Versuche sei zunächst bemerkt, daß der in zwei frischen Kalbshirnen von mir ermittelte Prozentgehalt des Gesamtstickstoffes mit den einzigen, am Kalbshirn ausgeführten N-Bestimmungen, die ich in der Literatur auf finden konnte, annähernde Übereinstimmung zeigt. Diese N-Bestimmungen wurden von Kutanin¹⁾ ausgeführt, der bei drei verschiedenen Kalbshirnen folgende (auf frische Substanz berechnete) Prozentzahlen fand:

- I. 1,536 % und 1,541 % N
 II. 1,488 % » 1,491 % N
 III. 1,468 % » 1,541 % N.

¹⁾ Michael Kutanin, Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Gehirns bei verschiedenen Tieren. Inaug.-Dissert., Berlin 1910.

Was nun das Ergebnis der drei 72stündigen Autodigestionsversuche betrifft, so konnte — in Übereinstimmung mit den von Levene und Stookey¹⁾ am Hundegehirn ausgeführten Untersuchungen — am frischen, nur mit Chloroformwasser digerierten Kalbshirn das Bestehen einer autodigestiven, auf fermentativen Wirkungen beruhenden Proteolyse unzweifelhaft festgestellt werden, und zwar wurden durch 72stündige Digestion vom Gesamtstickstoff des zur Autolyse angesetzten Gehirns beim Hauptversuch durchschnittlich 18,865% und beim Kontrollversuch durchschnittlich 10,24% in unkoagulierbaren übergeführt. Levene und Stookey (l. c.) fanden nach sechstägiger Autodigestion von Hundegehirn (mit physiologischer Kochsalzlösung) folgende Verteilung des Stickstoffes:

«Koagulabler-N»	81,7%	
«Albumose-N»	9,6%	} 18,3%
«Pepton- und Amino-N»	8,7%	

Dieser Befund der amerikanischen Autoren macht die Annahme wahrscheinlich, daß nach dreitägiger Dauer der Autodigestion von Gehirn keine erhebliche Zunahme des unkoagulierbaren Stickstoffes mehr zu erwarten ist.

II. Versuche über die Veränderungen der Phosphorverteilung bei der Gehirnantolyse.

A. Versuche über autolytische Phosphorabspaltung.

Versuch 1.

Frisches Kalbshirn wird in der gleichen Weise wie bei Versuchsreihe I zur Autodigestion vorbereitet. In einer Probe der frischen Substanz wird der Phosphorgehalt durch Schmelzen mit Soda und Salpeter, Fällung der gelösten Schmelze mit Molybdänlösung und schließlich des wieder gelösten Ammoniumphosphormolybdatniederschlages mit Chlormagnesiummixtur als Magnesiumpyrophosphat bestimmt:

0,5584 g frischer Substanz liefern 0,0092 $Mg_2P_2O_7$ =
 0,00256 Phosphor =
 0,45% Phosphor.

¹⁾ l. c.

Zwei Portionen zu je 50 g des Gehirnbreies werden dann genau wie bei der Versuchsreihe I 72 Stunden bei 38—40° C. digeriert. Die Verarbeitung des Materials geschieht in der dort beschriebenen Weise. Je 25 ccm des eingeeengten Filtrates werden in der Platinschale zur Trockene eingedampft und mit Salpetermischung geschmolzen.

Nach 72stündiger Autolyse enthält in 100 ccm
das Autolysefiltrat des Hauptversuches 0,01469 g P
das Filtrat des Kontrollversuches 0,00768 g P.

Es waren also in Lösung gegangen:

beim Hauptversuch 0,07345 g P = 32,64% des Gehirnphosphors,

beim Kontrollversuch 0,0384 g P = 17,06 des Gehirnphosphors.

Versuch 2.

Wiederholung des vorigen Versuches mit einem anderen Gehirn der gleichen Beschaffenheit.

1,1902 g frischer Substanz liefern 0,0142 $Mg_2P_2O_7$ = 0,00396 Phosphor = 0,33% Phosphor.

Nach 72stündiger Autodigestion enthält in 100 ccm
das Autolysefiltrat des Hauptversuches 0,01427 g P
das Filtrat des Kontrollversuches 0,00821 g P.

Es waren also in Lösung gegangen:

beim Hauptversuch 0,07135 g P = 43,24% des Gehirnphosphors,

beim Kontrollversuch 0,04105 g P = 24,87% des Gehirnphosphors.

Tabelle 2.

Versuch Nr.	Di- gestions- dauer Std.	Gesamt-P in 50 g frischer Substanz g	Gesamt-P im ganzen Filtrat		Vom Gehirn-P gingen in Lösung	
			beim Haupt- versuch g	beim Kontroll- versuch g	beim- Haupt- versuch %	beim Kontroll- versuch %
1	72	0,225	0,07345	0,0384	32,64	17,06
2	72	0,165	0,07135	0,04105	43,24	24,87

Das Ergebnis der beiden vorstehenden Versuche läßt sich dahin zusammenfassen, daß am frischen, mit Chloroformwasser digerierten Kalbshirn eine autodigestive, auf fermentativen Wirkungen beruhende Phosphorabspaltung nachgewiesen werden konnte; und zwar wurden nach einer 72stündigen Autodigestion bei 38—40° C. vom Gesamtphosphor des zum Versuch verwendeten Gehirns durchschnittlich 37,94% beim Hauptversuch und 20,96% beim Kontrollversuch in einer wasserlöslichen Form aufgefunden.

B. Versuche über autodigestive Umwandlung von organisch gebundenem in anorganischen Phosphor.

Die in den letzten beiden Versuchen nachgewiesene autodigestive Phosphorabspaltung legte die Vermutung nahe, daß es sich bei der durch die Gehirnautoolyse bewirkten Zunahme der wasserlöslichen Phosphorverbindungen um eine autodigestive Umwandlung von organisch (an Eiweißkörper und Phosphatide) gebundenem Phosphor in anorganische Verbindungen handeln könnte. Um diese Frage zu entscheiden, wurden die beiden folgenden Versuche angestellt.

Versuch 1.

Frisches Kalbshirn wird in der schon beschriebenen Weise zur Autodigestion vorbereitet. In einer Probe der frischen Substanz wird nach der bei Versuch 1 der Reihe II A beschriebenen Methode der Gesamtphosphorgehalt bestimmt.

1,658 g frischer Substanz liefern 0,0224 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,00625 Gesamtphosphor = 0,38% Gesamtphosphor.

In einer zweiten Probe der frischen Substanz wird der anorganische Phosphor in der Weise bestimmt, daß 3,5489 g der Substanz im Becherglase mit etwa 150 ccm Wasser (unter Zusatz von 1% Kochsalz und Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion) ausgekocht, durch ein aschefreies kleines Filter filtriert und mit heißem Wasser gut nachgewaschen werden. Filtrat mit Waschwasser werden auf etwa 50 ccm eingengt, mit Essigsäure angesäuert und mit Ammoniumoxalatlösung versetzt. Vom ausgefällten Calciumoxalat wird nach 24 Stunden

abfiltriert, mit essigsauerm Wasser nachgewaschen. Das Filtrat, das mit Waschwasser etwa 100 ccm beträgt, wird mit Salzsäure und 5 g Chlorammonium, dann mit einem Viertel seines Volumens Ammoniak versetzt und schließlich mit Chlor-magnesiummixture gefällt.

3,5489 g frischer Substanz liefern $0,0096 \text{ Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,00268$ anorganischen Phosphor = 0,075 % anorganischen Phosphor.

In der frischen Substanz beträgt das Verhältnis des Gesamtphosphorgehaltes zum Gehalt an anorganischem Phosphor 5,06 : 1.

Bei zwei Portionen des Gehirnbreies zu je 50 g wird eine 72 stündige Autodigestion und die sich anschließende Verarbeitung des Materials in der beschriebenen Weise durchgeführt. In den (eingeeengten) Filtraten des Haupt- und Kontrollversuches werden dann der Gesamtphosphorgehalt und der Gehalt an anorganischem Phosphor nach den oben skizzierten Methoden bestimmt.

In 100 ccm enthält das Filtrat

beim Hauptversuch	0,01407 g	} Gesamtphosphor.
» Kontrollversuch	0,00768 »	

In 100 ccm enthält das Filtrat

beim Hauptversuch	0,01335 g	} anorganischen Phosphor.
» Kontrollversuch	0,00553 »	

Es beträgt das Verhältnis $\frac{\text{Gesamtphosphor}}{\text{anorganischer Phosphor}}$

beim Hauptversuch 1,05 : 1

» Kontrollversuch 1,38 : 1.

Es waren also in Lösung gegangen

beim Hauptversuch:

0,07035 g Gesamt-P = 37,03 % des GehirnP

0,06675 g anorganischer P = 35,13 % » » »

beim Kontrollversuch:

0,03840 g Gesamt-P = 20,21 % des GehirnP

0,02765 g anorganischer P = 14,55 % » » »

Versuch 2.

Wiederholung des vorigen Versuches mit einem anderen Gehirn der gleichen Beschaffenheit.

1,9925 g frischer Substanz liefern 0,0212 $Mg_2P_2O_7$
 = 0,00592 Gesamt-P
 = 0,297% Gesamt-P.

5,264 g frischer Substanz liefern 0,0129 $Mg_2P_2O_7$
 = 0,0036 anorgan. Phosphor
 = 0,068% anorgan. Phosphor.

In der frischen Substanz beträgt das Verhältnis

$\frac{\text{Gesamtphosphor}}{\text{anorganischer Phosphor}}$ 4,36 : 1.

Nach 72 stündiger Autolyse enthält das Filtrat in 100 ccm
 beim Hauptversuch 0,01229 g } Gesamtphosphor,
 » Kontrollversuch 0,00757 » }
 beim Hauptversuch 0,01134 g } anorganischen Phosphor.
 » Kontrollversuch 0,00614 » }

Es beträgt das Verhältnis $\frac{\text{Gesamtphosphor}}{\text{anorganischer Phosphor}}$

beim Hauptversuch 1,08 : 1

» Kontrollversuch 1,23 : 1.

Es waren also in Lösung gegangen

beim Hauptversuch:

0,06145 g Gesamt-P = 41,38% des Gehirn-P

0,05670 g anorganischer P = 38,18% » »

beim Kontrollversuch:

0,03785 g Gesamt-P = 25,48% des Gehirn-P

0,03070 g anorganischer P = 20,67% » »

Tabelle 3a.

Hauptversuche (Digestionsdauer: 72 Stunden).

Ver- such	Menge des Gesamt-P		Menge des anorganischen P		Gesamt-P : Anorganischer P		Vom Gehirn-P gingen in Lösung	
	in der frischen Substanz g	im Filtrat g	in der frischen Substanz g	im Filtrat g	in der frischen Substanz	im Filtrat	im ganzen %	als anorg. %
1	0.19	0.07035	0.0375	0.06675	5.06 : 1	1.05 : 1	37.03	35.13
2	0.1485	0.06145	0.034	0.0567	4.36 : 1	1.08 : 1	41.38	38.18

Tabelle 3b.

Kontrollversuche (Digestionsdauer: 72 Stunden).

Ver- such	Menge des Gesamt-P		Menge des anorganischen P		Gesamt-P : An- organischer P		Vom Gehirn-P gingen in Lösung	
	in der frischen Substanz g	im Filtrat g	in der frischen Substanz g	im Filtrat g	in der frischen Substanz	im Filtrat	im ganzen %	als anorg. P %
1	0,19	0,0384	0,0375	0,02765	5,06 : 1	1,38 : 1	20,21	14,55
2	0,1485	0,03785	0,034	0,0307	4,36 : 1	1,23 : 1	25,48	20,67

Zu den vorstehenden Versuchen der Reihe B möchte ich zunächst bemerken, daß ich über den Gehalt des Gehirns an anorganischen Phosphorverbindungen nur die Angaben von Geoghegan¹⁾ und Baumstark²⁾ auffinden konnte. Die Analysenzahlen von Geoghegan können wegen seiner von der meinigen völlig abweichenden Methodik nicht zum Vergleich herangezogen werden. Nach den Analysen Baumstarks kommen vom Gesamtposphorgehalt des Pferdegehirns 77% auf das Ätherextrakt, 15—16% auf die Asche, 5—6% auf das Protogon und 1,5—2% auf das «Nuclein».

Über den Gesamtposphorgehalt der frischen Gehirns-Substanz liegen Angaben von Kossel³⁾ für das Schafsgehirn, von Baumstark⁴⁾ für das Pferdegehirn, von v. Moraczewski⁵⁾ für menschliches Gehirn vor. Sehr ausgedehnte Untersuchungen über den Phosphorgehalt des Gehirns bei verschiedenen Tieren hat Kutanin⁶⁾ angestellt, von dessen zahlreichen Analysen jedoch hier nur die auf Kalbshirn bezüglichen angeführt werden mögen. Kutanin arbeitete nach der Neumannschen Methode und fand bei zwei verschiedenen Kalbshirnen folgende Prozentzahlen für den Gesamtposphorgehalt der frischen Substanz:

¹⁾ Geoghegan, Diese Zeitschrift, Bd. 1, S. 330, 1877—78.

²⁾ Baumstark, Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 210, 1885.

³⁾ Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 7, 1882—83.

⁴⁾ Baumstark, Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 210, 1885.

⁵⁾ v. Moraczewski, Diese Zeitschrift, Bd. 23, S. 483, 1897.

⁶⁾ Kutanin, Inaug.-Dissert., Berlin 1910.

I. 0,2822 resp. 0,2820 ‰

II. 0,3245 „ 0,3266 ‰

also durchschnittlich 0,3038 ‰.

Meine Analysenzahlen (aus den Versuchsreihen A und B) sind:

0,45 ‰ — 0,33 ‰ — 0,38 ‰ — 0,297 ‰, also durchschnittlich 0,3642 ‰.

Meine regelmäßig etwas höheren Analysenwerte lassen sich — abgesehen von der Verschiedenheit der Methodik — vielleicht durch das abweichende Verfahren meiner Vorbereitung des Materials (protrahierte Verreibung in offener Schale, größere Möglichkeit der Wasserverdunstung) erklären.

Versucht man nun aus den beiden Tabellen 3a und 3b eine Antwort auf die der letzten Versuchsreihe zugrunde liegende Fragestellung abzulesen, so ergibt sich zunächst, daß sowohl beim Haupt- als auch beim Kontrollversuch ein Übergang beträchtlicher Mengen anorganischer Phosphorverbindungen in das Filtrat stattfindet. Daß dieser Prozeß nicht allein auf die Digestionstemperatur oder auf sonstige Manipulationen, die auch beim Kontrollversuch ausgeführt werden müssen, sondern zu einem nicht geringen Teil auf die aktive Beteiligung autodigestiver Fermentwirkungen zurückzuführen ist, geht schon aus dem Verhältnis der Prozentzahlen in der letzten Spalte beider Tabellen hervor. Während nämlich bei den Kontrollversuchen durchschnittlich 17,61 ‰ des Gehirnphosphors in Form anorganischer Verbindungen im Filtrat aufgefunden wurden, gingen bei den eigentlichen Autolyseversuchen durchschnittlich 36,65 ‰ des Gehirnphosphors als anorganische Verbindungen in Lösung. Man kann also annehmen, daß etwa 19 ‰ des Gesamtphosphors, der in dem zur Autolyse angesetzten Gehirnbrei enthalten war, während einer 72stündigen Autodigestion nur vermöge der Wirkung intracellulärer (autolytischer) Gehirnfermente als anorganische Phosphorverbindungen in Lösung gebracht wurden. Wie man sich den Ablauf dieser Fermentwirkungen in seinen Einzelheiten vorstellen müßte, soll hier nicht erörtert werden. Doch man wird die Vermutung aus-

sprechen dürfen, daß es bei diesen fermentativen Vorgängen sich um eine autodigestive Umwandlung von organisch gebundenem Phosphor in anorganischen, also wohl um eine Sprengung des Moleküls komplexer, phosphorhaltiger Verbindungen handeln könnte.

C. Versuche über die Beteiligung einzelner Gehirnbestandteile an der autolytischen Abspaltung anorganischen Phosphors.

Durch die folgenden Versuche sollte die Frage beantwortet werden, welche Gehirnbestandteile oder welche Gruppen einzelner Gehirnbestandteile von der in der vorigen Versuchsreihe festgestellten, autolytischen Abspaltung anorganischen Phosphors betroffen werden. Bei der Unsicherheit und technischen Schwierigkeit, die gegenwärtig noch in der Darstellung einzelner chemischer Gehirnbestandteile herrscht, habe ich darauf verzichtet, Phosphorbestimmungen an isolierten chemischen Verbindungen (wie Lecithin, Protagon, Nucleoproteid usw.) zu machen. Ich habe mich vielmehr darauf beschränkt, aus frischem, bezw. autolysiertem Kalbshirn drei verschiedene Gruppen chemischer Bestandteile darzustellen und ihren Phosphorgehalt summarisch zu bestimmen. So konnte ich auf Grund meiner (gleich zu beschreibenden) Methodik drei Fraktionen chemischer Gehirnbestandteile unterscheiden:

Fraktion A (alle in kaltem Alkohol und in Äther löslichen Stoffe),

Fraktion B (alle nur in heißem Alkohol löslichen Stoffe),

Fraktion C (Rest: Alle Stoffe, die weder in Alkohol noch Äther löslich waren).

Versuch 1.

100 g frisches Kalbshirn werden (abgehäutet, gehackt und gut verrieben) mit etwa 800 ccm Alkohol absol. eine Stunde lang im Kolben mit aufgesetztem Rückflußkühler auf dem Wasserbade gekocht. Dann wird noch heiß filtriert und auch während der ganzen Filtration für dauernde Erwärmung der Mischung gesorgt. Beim Erkalten des Filtrates bildet sich ein (an Menge schnell zunehmender) weißer Niederschlag. Rückstand und Filter

werden mit siedendem Alkohol so lange nachgewaschen, bis Proben des Filtrates beim Abkühlen keine Trübung mehr geben. Der Filterrückstand wird dann mit Äther zu den im Kolben befindlichen Rückständen gespült. Die vereinigten Rückstände werden dann mit etwa 800 ccm Äther eine Stunde lang im Kolben mit aufgesetztem Rückflußkühler auf dem Wasserbade im Sieden erhalten. Am nächsten Tage wird filtriert und Rückstand wie Filter so lange mit Äther nachgewaschen, bis Proben des Filtrates nach dem freiwilligen Verdunsten auf dem Uhrglas nur noch einen minimalen Rückstand hinterlassen. Alle festen Rückstände, die also die in Alkohol und Äther unlöslichen Gehirnbestandteile darstellen, werden in einer Reibschale vereinigt und sofort bis zur völligen Verdunstung des anhaftenden Äthers verrieben. Diese Rückstände repräsentieren in ihrer Gesamtheit die Fraktion C. Die vereinigten Ätherextrakte werden abdestilliert. Der verbleibende Rückstand wird mit Alkohol aufgenommen und mit den gesammelten alkoholischen Gehirnextrakten vereinigt. In dem alkoholischen Gehirnextrakt hatte sich inzwischen (innerhalb etwa 48 Stunden) ein voluminöser amorpher weißer Niederschlag abgesetzt. Von diesem Niederschlage werden die vereinigten Alkohol- und Ätherauszüge abfiltriert. Nach gründlichem Nachwaschen des Niederschlages und Filters mit kaltem Alkohol werden Filtrat und Waschalkohol eingeeengt, dann in einen Meßkolben von 250 ccm übergeführt und mit einer Mischung von Alkohol, Äther und etwas Wasser nachgespült, schließlich mit der gleichen Mischung bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Flüssigkeit, die in ihrer Gesamtheit die Fraktion A repräsentiert, wird sofort der zehnte Teil (25 ccm) abgenommen, in eine Platinschale übergeführt und zur Trockene verdampft. Der trockene Rückstand wird mit Salpetermischung geschmolzen. In der Lösung der Schmelze wird der Phosphor nach der schon beschriebenen Methode bestimmt. 25 ccm der Fraktion A lieferten $0,0674 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,01882 \text{ g}$ Phosphor. Die ganze Fraktion enthält also $0,1882 \text{ g}$ Phosphor.

Der zuvor (nach dem Abfiltrieren der kalten alkoholischen und ätherischen Auszüge) zurückgebliebene weiße Niederschlag

wird in heißem Alkohol gelöst, mit heißem wässerigen Alkohol in einen erwärmten Meßkolben von 250 ccm übergeführt. Nachdem diese Flüssigkeit mit heißem Alkohol bis zur Marke aufgefüllt ist, wird sofort der zehnte Teil in einen erwärmten Meßzylinder abgefüllt und dann in einer Platinschale zur Trockene verdampft. Der trockene Rückstand wird mit Salpetermischung geschmolzen. In der Lösung der Schmelze wird der Phosphor in der üblichen Art bestimmt. 25 ccm der Fraktion B liefern $0,0165 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,00461 \text{ g}$ Phosphor. Die ganze Fraktion B enthält also $0,0461 \text{ g}$ Phosphor.

Von der Fraktion C, deren Ausbeute im lufttrockenen Zustande etwa $9,8 \text{ g}$ beträgt, werden zwei Proben bei 105 bis 107° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. In der einen Probe wird der Phosphorgehalt durch Schmelzen mit Soda und Salpeter in der bekannten Weise bestimmt. $1,9323 \text{ g}$ der trockenen Substanz enthalten $0,01765 \text{ g}$ Phosphor. Der Gesamtphosphorgehalt der Fraktion C beträgt also $0,91\%$ ¹⁾ der trockenen Substanz. In der zweiten Probe wird der Gehalt an anorganischem Phosphor in der folgenden Weise bestimmt: $1,0706 \text{ g}$ trockener Substanz werden im Becherglase mit verdünnter Salzsäure (1 Volumen Salzsäure von 25% HCl + 2 Vol. Aqu.) übergossen. Nach 24 Stunden wird abfiltriert und mit verdünnter Salzsäure nachgewaschen. Das Filtrat wird mit Ammoniak neutralisiert, dann mit Essigsäure angesäuert und mit Ammoniumoxalatlösung versetzt. Am nächsten Tage wird vom ausgefallenen Calciumoxalat abfiltriert und mit verdünnter Essigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wird auf 100 ccm eingeengt und mit Ammoniak und Chlormagnesiummischung versetzt. $1,0706 \text{ g}$ trockener Substanz liefern $0,00517 \text{ g}$ anorganischen Phosphor. Der Gehalt der Fraktion C an anorganischem Phosphor beträgt also $0,48\%$ der trockenen Substanz.

¹⁾ Eine Berechnung der absoluten Gesamtphosphormenge erschien hier wie in den noch folgenden analogen Bestimmungen nicht angebracht, da die Ausbeute der Fraktion C nur annähernd quantitativ ausfiel.

Versuch 2.

Zwei Portionen eines frischen (zuvor abgehäuteten, gehackten und gut verriebenen) Kalbshirns zu je 75 g werden als Haupt- und Kontrollversuch mit Chloroformwasser zur Autolyse angesetzt. Nach 72 stündiger Digestion (bei 38—40°) werden beide Mischungen auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Aus den trockenen Rückständen werden (genau nach der im vorigen Versuch beschriebenen Methodik) die drei Fraktionen A, B und C dargestellt und deren Phosphorgehalt bestimmt.

Beim Hauptversuch enthielten Fraktion A 0,1265 g Gesamt-P (auf 100 g frischen Gehirnbreies berechnet: 0,1682 g), Fraktion B 0,0324 g Gesamt-P (auf 100 g frischen Gehirns berechnet: 0,04309 g) und Fraktion C (Ausbeute: ca. 7,5 g) 1,28 % Gesamtphosphor, sowie 1,02 % anorganischen Phosphor (berechnet auf trockene Substanz).

Beim Kontrollversuch enthielten Fraktion A 0,1447 g Gesamt-P (auf 100 g frischen Gehirns berechnet: 0,1924 g), Fraktion B 0,0318 g Gesamt-P (auf 100 g frischen Gehirns berechnet: 0,04229 g) und Fraktion C (Ausbeute: ca. 7,7 g) 0,89 % Gesamtphosphor, sowie 0,60 % anorganischen Phosphor (berechnet auf trockene Substanz).

Tabelle 4.

Versuchsmaterial (100 g)	Fraktion A	Fraktion B	Fraktion C	
	Gesamt-P g	Gesamt-P g	Gesamt-P %	anorgan. P %
Frisches Gehirn	0,1882	0,0461	0,91	0,48
Gekochtes und dann 72 Stunden mit Chloroform- wasser digeriertes Gehirn	0,1924	0,04229	0,89	0,60
72 Stunden mit Chloroform- wasser autolysiertes Gehirn	0,1682	0,04309	1,28	1,02

Vergleicht man zunächst die Resultate, die sich aus den Versuchen mit den beiden nicht autolysierten Gehirnen

ergaben, so muß sofort eine Verschiebung der Analysenzahlen in den Fraktionen A und B auffallen. Bei dem Gehirn des Kontrollversuches findet sich nämlich in der Fraktion A ein Plus von 0,0042 g Phosphor und in der Fraktion B ein Minus von 0,00381 g Phosphor gegenüber den entsprechenden Werten des frischen Gehirns. Diese Verschiebung ist — abgesehen von der verschiedenen Herkunft der beiden Gehirne — vielleicht durch die beim Gehirn des Kontrollversuches vorgenommene Erhitzung und dreitägige Digestion im Thermostaten zu erklären. Es dürfte sich deshalb empfehlen, bei der folgenden Betrachtung diese Differenzen der Fraktionen A und B nicht zu berücksichtigen und vielmehr nur die Summe der beiden Fraktionen (d. i. also die Gesamtheit aller in Alkohol und Äther löslichen Gehirnbestandteile) der Fraktion C (d. i. also die Gesamtheit aller in Alkohol und Äther nicht löslichen Stoffe) gegenüberzustellen.

Befolgt man diesen Grundsatz, so ergibt sich als Phosphorgehalt aller in Alkohol und Äther löslichen Stoffe (A + B)

bei dem frischen Gehirn	0,2343 g
» » Gehirn des Kontrollversuches	0,23469 »

Es zeigt sich also befriedigende Übereinstimmung: auch die Analysenzahlen für den Gesamtphosphorgehalt der Fraktionen C bei den nicht autolysierten Gehirnen differieren nur wenig (0,91 bzw. 0,89%).

Dagegen übertrifft der Gehalt an anorganischem Phosphor in der Fraktion C des Kontrollversuchehirnes den entsprechenden Gehalt in der gleichen Fraktion des frischen Gehirnes nicht unbedeutend (0,60% gegenüber 0,48%). Dieses Plus an anorganischem Phosphor, das die Fraktion C des Kontrollversuchehirnes aufweist, glaube ich durch folgende 3 Momente erklären zu können: 1. die verschiedene Herkunft der beiden Gehirne, 2. die mangelnde Exaktheit der analytischen Methodik (Extraktion mit Salzsäure usw.), 3. die Möglichkeit, daß bei dem Kontrollversuchehirn schon allein durch die Erhitzung und die dreitägige Digestion eine (wenn auch nur relativ geringe) Aufschließung organisch gebundenen Phosphors eintreten konnte.

Um aber die der letzten Versuchsreihe zugrunde liegende Frage beantworten zu können, nämlich die, welche chemischen Gehirnbestandteile von der autolytischen Abspaltung anorganischen Phosphors mehr oder weniger betroffen werden, muß man die Analysenwerte des Versuches 2 gegeneinander abwägen. Hierbei zeigt sich dann zunächst, daß die Fraktionen A + B, d. h. die Gesamtheit aller in Alkohol und Äther löslichen Bestandteile durch die 72 stündige Gehirnaulyse 0,0234 g Phosphor eingebüßt haben. Dieser Verlust, von dem übrigens nur die in kaltem Alkohol und Äther löslichen Stoffe betroffen werden, wird aber ausgeglichen durch einen nicht unbedeutlichen Phosphorüberschuß, den die Fraktion C des Hauptversuches der des Kontrollversuches gegenüber aufweist. Dieser Überschuß an Gesamtphosphor beträgt 0,39%, der entsprechende Überschuß an anorganischem Phosphor 0,42%. Man darf also annehmen, daß der Überschuß der Fraktion C des Hauptversuches an Phosphor überhaupt auf einer Zunahme des anorganischen Phosphors beruht. Man wird so als erstes Ergebnis der letzten Versuchsreihe feststellen können, daß die in kaltem Alkohol und Äther löslichen Gehirnbestandteile eine autodigestive Spaltung unter Umwandlung ihres organisch gebundenen Phosphors in anorganischen erleiden.

Aus dem Verhältnis des lufttrockenen Rückstandes C zum Gewicht des frischen Gehirns (etwa 1 : 10) und zum Gewicht des bis zur Konstanz getrockneten Materials (etwa 115 : 100 bzw. 119 : 100) läßt sich (mit annähernder Genauigkeit) berechnen, daß in der ganzen Fraktion C an anorganischem Phosphor enthalten sind

beim Hauptversuch 0,08869 g (= 1,02%)

» Kontrollversuch 0,05042 » (= 0,60%).

Der gesamte Überschuß an anorganischem Phosphor beim Hauptversuch würde also 0,03827 g betragen. Da aber von diesem (durch die Autolyse gewissermaßen neugebildeten) anorganischen Phosphor nur 0,0234 g aus den in Alkohol und Äther löslichen Stoffen stammen, so müssen 0,01487 g anorganischen Phosphors aus den in Alkohol und Äther unlöslichen

Bestandteilen abgespalten worden sein. Als zweites Ergebnis läßt sich also feststellen, daß auch die in Alkohol und Äther unlöslichen Gehirnbestandteile eine Abspaltung von anorganischem Phosphor bei der Autolyse erfahren. An der autodigestiven Umwandlung organisch gebundenen Phosphors in anorganischen sind beteiligt:

die in Alkohol und Äther löslichen Stoffe mit ca. 61 %
» » » » » unlöslichen » » » 39 %.