

# Über proteolytische Enzyme im normalen und pathologischen Harn.

Von  
S. G. Hedin.

---

(Der Redaktion zugegangen am 20. Dezember 1920.)

---

Vor einigen Jahren haben ich und Masai ausführlich über ein im normalen Harn vorhandenes Erepsin berichtet<sup>1)</sup>. Seitdem habe ich meine früher publizierte Untersuchungen über die proteolytischen Enzyme des Blutserums ausgedehnt und über die neuen Ergebnisse berichtet<sup>2)</sup>. Es ergab sich, daß außer einem von mir vorher gefundenen, der Globulinfraction des Serums anhaftenden Enzym auch ein dem Harnenzym in seinen Wirkungen ähnliches Enzym vorhanden ist, das sowohl in der Albuminfraction wie wahrscheinlich auch in der Globulinfraction vorkommt. Da das Globulinenzym und andere ähnliche Enzyme die Eiweißaufspaltung in alkalischer Lösung am besten anzufangen, aber nicht ebenso gut abzuschließen imstande sind, habe ich derartige Enzyme der Kürze wegen primäre Proteasen genannt zum Unterschied von dem Harnenzym und ähnlichen Enzymen, welche eben die Eiweißaufspaltung abzuschließen vermögen und deshalb als sekundäre Proteasen bezeichnet werden könnten.

Das Harnerepsin habe ich bis jetzt nur aus Menschenharn dargestellt. Das Bluterepsin habe ich in Rinds- und Pferdeserum nachweisen können. Das Harnerepsin habe ich in allen von mir untersuchten Harnen, sowohl normalen wie

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 100, S. 263 (1917).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 11 (1918).

pathologischen, gefunden. Beim Sättigen des Harnes mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  fällt dasselbe zusammen mit anderen Substanzen aus und wird beim Dialysieren des Niederschlages in Lösung erhalten. Diese Lösung ergibt, wenn sie zusammen mit dem Globulinenzym des Blutserums auf Casein einwirkt, einen größeren Umsatz als beide Enzyme erzeugen für den Fall, daß sie jedes für sich auf dieselbe Caseinmenge einwirken. Das Harnerepsin wirkt auch auf Wittes Pepton ein, aber die Wirkung des normalen Harnes auf Casein ist meistens sehr gering. Auch haben ich und Masai unentschieden lassen müssen, ob diese Einwirkung von dem Erepsin oder von einem anderen Enzym herrührt.

### Neue Versuche.

Speziell darauf eingerichtete Versuche ergaben, daß das Erepsin des normalen Harnes bei der Sättigung des Harnes mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  lange nicht vollständig ausgefällt wird, und ich habe deshalb einen anderen Weg versucht, um zu einer einigermaßen zuverlässigen Vorstellung von den in dem Harn vorhandenen Enzymmengen zu gelangen.

Zu dem Zwecke wurde der Harn zunächst nach Filtrieren einer 3tägigen Dialyse gegen fließendes Leitungswasser unterworfen. Hierbei werden die dialysierbaren Bestandteile des Harnes entfernt; zur selben Zeit nimmt aber das Volumen etwas zu. Um dabei zu einer gleichmäßigen Zunahme des Harnvolumens zu gelangen und da die Zunahme des Harnvolumens sehr selten  $\frac{1}{4}$  des ursprünglichen Volumens betrug, habe ich in allen Fällen das nach Dialysieren erhaltene Volumen auf  $\frac{5}{4}$  des Anfangsvolumens mit Wasser versetzt. Von der so erhaltenen Enzymlösung habe ich für jede Bestimmung 25 ccm genommen. Die Digestionsversuche, welche ausgeführt worden, sind:

1. Digestion mit Casein in schwach alkalischer Lösung,
2. „ „ Wittes Pepton in schwach alkalischer Lösung,
3. „ „ Casein in ziemlich stark saurer Lösung,

und zwar waren die drei Digestionsgemengen, wo nicht anders angegeben wird, in folgender Weise zusammengesetzt:

1. 25 ccm dial. Harn + 25 ccm Caseinlösung<sup>1)</sup> + 2 ccm 0,1 n-NaOH,
2. 25 ccm „ „ + 25 ccm Peptonlösung<sup>2)</sup> + 2 ccm 0,1 n-NaOH,
3. 25 ccm „ „ + 25 ccm Caseinlösung + 15 ccm 0,2 n-HCl.

Hierzu kamen Kontrollösungen mit  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade erhitztem Harn. In der Gegenwart von Toluol wurde 4 Tage bei  $37^{\circ}$  digeriert, worauf mit 20 ccm Gerbsäurelösung<sup>3)</sup> für die Proben mit Casein und 15 ccm für die mit Pepton gefällt wurde. Bei Versuchen mit Eiweißharnen wurde, um vollständige Ausfällung zu erzielen, mehr Gerbsäure, meistens 30 bzw. 25 ccm, angewandt. Nach 8–12 Stunden wurde filtriert, der Stickstoff in einem Teile des Filtrates bestimmt und die Analyseziffer nach Abzug des Kontrollwertes für das ganze Volumen der Flüssigkeit umgerechnet. Die angeführten Resultate geben die Anzahl ccm 0,1 n-Säure an, welche nach dieser Berechnung zum Neutralisieren des aus dem mit Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoffe gebildeten Ammoniaks gebraucht wurden. Der Kürze wegen werde ich beim Wiedergeben der Analyseziffer die aus den Digestionsversuchen mit Casein in alkalischer Lösung erhaltenen Ergebnisse als „Cas. alk.“, die bei der Digestion von Pepton in alkalischer Lösung als „Pept. alk.“ und die mit Casein in saurer Lösung erhaltenen als „Cas. ac.“ bezeichnen.

In Bezug auf die angegebene Untersuchungsmethode müssen zunächst einige mögliche Fehlerquellen diskutiert werden. Zunächst muß man dafür Sorge tragen, daß die Dialysemembranen dicht sind. Ich habe käufliche Dialyseschläuche gebraucht und dieselben vor dem Gebrauch geprüft. Die Reaktion des Wassers außerhalb des Schlauches (das

<sup>1)</sup> Die Caseinlösung wurde durch Auflösen von 20 g „Casein nach Hammarsten“ in 100 ccm 0,1 n-NaOH + 400 ccm H<sub>2</sub>O unter Erhitzen auf dem Wasserbade erhalten. Das Volumen wird nach Erkalten auf 500 ccm aufgefüllt, die Lösung mit Toluol versetzt und aufbewahrt.

<sup>2)</sup> 20 g Wittes Pepton wird auf dem Wasserbade in 500 ccm H<sub>2</sub>O aufgelöst, mit HCl neutralisiert, 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser dialysiert, aufgeköcht, auf 650 ccm aufgefüllt und filtriert. Die Lösung, welche deutlich alkalisch reagiert, wird mit Toluol versetzt und aufbewahrt.

<sup>3)</sup> Die Gerbsäurelösung enthielt auf 1000 ccm 100 g Gerbsäure, 50 g Natriumacetat, 50 g NaCl und 50 ccm Eisessig.

Leitungswasser in Upsala hat eine sehr schwach alkalische Reaktion) könnte möglicherweise von Bedeutung sein, und ich habe darum die gleiche Harnmenge einerseits gegen oft gewechseltes destilliertes Wasser (A), andererseits gegen gleiche Mengen ebenso oft gewechseltes Leitungswasser (B) dialysiert. Die schließlichen Analyseresultate waren:

	A	B
Cas. alk. . . . .	2,7	2,45
Pept. alk. . . . .	15,1	14,1
Cas. ac. . . . .	7,45	7,45

Es existiert also kein wesentlicher Unterschied und ich habe darum in allen meinen übrigen Versuchen gegen fließendes Leitungswasser dialysiert.

Die Frage, ob bei der Dialyse etwas Enzym durch die Membran passiert oder sonst verloren geht, habe ich in der Weise geprüft, daß ich denselben Harn in einem Falle (A) 3 Tage und in einem anderen (B) 4 Tage dialysieren ließ. Der angewandte Harn rührte von einer gesunden Person her, und da normaler Harn nur in sehr geringem Grade Casein bei alkalischer Reaktion angreift, wurde diese Bestimmung nicht ausgeführt. Die anderen Versuchsergebnisse waren:

	A	B
Pept. alk. . . . .	6,65	6,35
Cas. ac. . . . .	3,05	3,15

Also kein Verlust von Enzym.

Da man sich denken könnte, daß das Material der Dialyseschläuche etwas von den Enzymen adsorbieren, habe ich bereits dialysierten Harn einen Tag hindurch bei gewöhnlicher Temperatur in einem Falle (A) mit der für die Dialyse der Harnmenge gewöhnlich angewandten Schlauchlänge in zerschnittener Form zusammen aufbewahrt und in einem anderen Falle (B) ohne die Gegenwart von Schlauchmaterial. Die Ergebnisse waren:

	A	B
Cas. alk. . . . .	0,9	1,05
Pept. alk. . . . .	4,5	4,4
Cas. ac. . . . .	1,7	1,6

Also keine Adsorption.

Während der Dialyse war in den Schläuchen reichlich Toluol zugegen und ebenso während der nachfolgenden Digestion. Über die antiseptische Wirkung von Toluol hat Benians Untersuchungen ausgeführt, aus welchen hervorgeht, daß dieselbe in den meisten Fällen ausreicht, um die Bakterien derart zu töten, daß dieselben nachher ohne die Gegenwart von Toluol in einer Nährflüssigkeit nicht wachsen können. Gegenwart von Eiweiß hinderte etwas die Toluolwirkung. Am meisten widerstandskräftig waren Streptococcen und Staphylococcen<sup>1)</sup>. Bei meinen Versuchen war Toluol die ganze Zeit zugegen und die Bedingungen für antiseptische Wirkungen waren also günstiger. Trotzdem habe ich durch besondere Versuche geprüft, ob bei meinen Digestionsversuchen, die im ganzen 96 Stunden bei Körpertemperatur umfaßten, möglicherweise Bakterien auf die Resultate eingewirkt haben können. Zu dem Zwecke wurde bei zwei parallelen Versuchsreihen die eine (A) mit einem Tropfen einer in Leitungswasser aufgeschlemmten frischen Reinkultur einer gegebenen Bakterienart infiziert, während die andere (B) anstatt dessen mit einem Tropfen Wasser versetzt wurde. Beide Reihen wurden wie gewöhnlich mit Toluol versetzt. Im folgenden Versuche mit leukämischem Harn wurde mit *B. coli* infiziert:

	A	B
Cas. alk. . . . .	1,50	1,50
Pept. alk. . . . .	20,65	20,60
Cas. ac. . . . .	6,55	6,55

Im folgenden Versuch wurde Harn mit 1,8% Eiweiß angewandt. *B. coli*.

	A	B
Cas. alk. . . . .	8,2	8,3
Pept. alk. . . . .	20,15	20,15
Cas. ac. . . . .	11,95	12,10.

Folgende zwei Versuche bestehen je aus drei Reihen, von welchen eine (A) mit einer Staphylococcusart, B mit Pneumococcen infiziert waren, während C nicht infiziert wurde.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Chemotherapie Bd. 2, S. 28 (1913).

Leukämischer Harn:

	A	B	C
Cas. alk. . . . .	1,3	1,15	1,15
Pept. alk. . . . .	11,3	11,8	12,0
Cas. ac. . . . .	7,15	7,3	7,3.

Eiweißharn, 1,8% Eiweiß:

	A	B	C
Cas. alk. . . . .	8,1	8,1	8,1
Pept. alk. . . . .	15,7	15,15	15,4
Cas. ac. . . . .	10,05	9,9	9,9.

Nach diesen Versuchen dürfte man wohl annehmen können, daß bei meinen Versuchen Bakterien auf die Versuchsergebnisse keinen Einfluß ausgeübt haben können.

Eine andere Frage, welche wir zur Diskussion aufnehmen müssen, ist folgende: In welchem Verhältnis steht die vorhandene Enzymmenge zu den erhaltenen Analyse-  
ziffern? Es sei sofort gesagt, daß die erhaltenen Ziffern keineswegs den vorhandenen Enzymmengen proportional sind, sondern langsamer steigen als diese, was bei der Wirkung der proteolytischen Enzyme im allgemeinen der Fall ist. Nur bei geringen Enzymmengen fallen die Analyse-  
ziffern den angewandten Enzymmengen nahezu proportional aus. Zur Beleuchtung des Gesagten habe ich in einigen Fällen Reihen mit steigenden Enzymmengen ausgeführt, von welchen je eine für jede Enzymwirkung angeführt werden mag.

Relative Enzymmengen	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
1	1,5	5,15	1,45
2	3,0	8,9	2,7
4	5,25	12,95	4,35
8	8,35	17,95	6,8
12	10,8	20,75	8,6
16	13,35	23,05	10,0
20	15,65	24,85	11,05

Die erste Reihe ist mit einem anderen Harn als die beiden anderen ausgeführt, indem für jede Reihe ein solcher

Harn gewählt wurde, der die betreffende Wirkung besonders kräftig ergab. Aus den Ziffern ist zu ersehen, daß z. B. die Analyseziffer 4 und 8 nicht notwendigerweise Enzymmengen entsprechen, welche wie 1 : 2 sich verhalten, sondern vielleicht wie 1 : 3 o. d.

Es folgt die Frage, ob die angewandten Substrate — die Casein- und Peptonlösungen — von verschiedenen Bereitungen derart ungleich sein können, daß die damit erhaltenen Analyseziffern möglicherweise nicht vergleichbar sind. Es leuchtet sofort ein, daß diese Frage am meisten für die Bestimmung größerer Enzymwirkungen von Bedeutung sein muß, weil geringen Enzymmengen gegenüber das Substrat im Überschuß vorhanden ist und folglich geringe Verschiedenheiten in dessen Menge ohne Bedeutung sein muß. Ferner müssen wir uns erinnern, daß immer Kontrollbestimmungen mit dem Substrat und erhitztem Enzym ausgeführt wurden und folglich der nicht fällbare Stickstoff in Abzug gebracht wurde.

Aber trotzdem dürfte es wohl möglich sein, daß verschiedene Bereitungen der Substratlösungen nach der Einwirkung der Enzyme ein wenig ungleiche Analyseziffern ergeben und besonders dürfte dies beim Pepton der Fall sein, das als ein Gemenge von verschiedenen Spaltungsprodukten des Eiweißes zu betrachten ist. Um die durch Gerbsäure nicht fällbaren Produkte möglichst loszuwerden, habe ich, wie oben angegeben, die Peptonlösungen einer 3tägigen Dialyse unterworfen. Dadurch werden die fraglichen Produkte zwar zum großen Teil entfernt, aber nicht vollständig. Die zurückgebliebene Menge entsprach bei meinen Versuchen rund 12 ccm 0,1 n-Säure für das ganze Volumen der Digestionsflüssigkeit. Infolge der angedeuteten Versuchsfehler habe ich in solchen Fällen, wo mir sehr viel daran lag, eine genaue Vergleichung der Ergebnisse der Enzymwirkungen unter verschiedenen Verhältnissen ausführen zu können, mich derselben Substratlösungen bedient.

Bezüglich der Digestionsversuche ist noch die für die Wirkung der Enzyme günstigste Konzentration der Wasser-

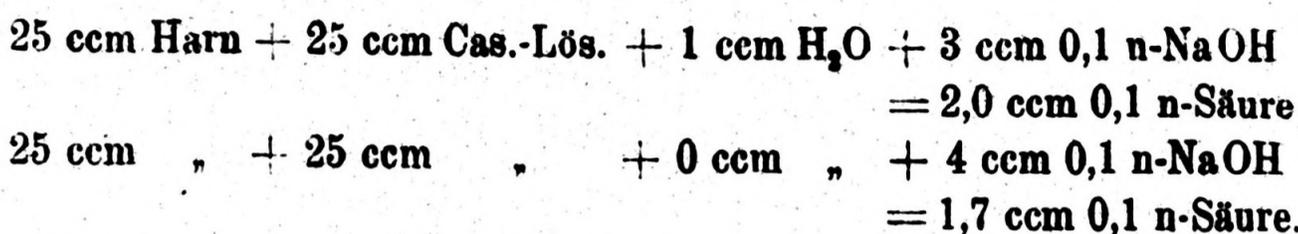
stoffionen zu besprechen. Zunächst sei bemerkt, daß die Einwirkung des Harnes auf genuines Eiweiß zwei Maxima hat, eines in alkalischer und das andere in saurer Lösung. Keines von diesen ist aber scharf begrenzt, weshalb es wohl richtiger sein dürfte, von zwei maximalen Gebieten zu sprechen. Außerdem sind nicht immer beide in demselben Harn nachweisbar. Das alkalische Maximum ist im normalen Harn kaum wahrzunehmen, weil die Wirkung bei alkalischer Reaktion, wenn überhaupt vorhanden, sehr schwach ist, während die Wirkung in saurer Lösung in allen von mir untersuchten Fällen deutlich vorhanden war. Die Wirkung bei alkalischer Reaktion kommt am meisten in gewissen pathologischen Harnen vor. Die Einwirkung auf Eiweiß ist aus folgender Versuchsreihe deutlich zu ersehen, welche mit einem gegen destilliertes Wasser dialysierten Eiweißharn (1,5%) ausgeführt wurde. Als Substrat diente nur das im Harn vorhandene Eiweiß. Die Proben waren folgendermaßen zusammengesetzt:

50 ccm Harn	+ 14 ccm H <sub>2</sub> O	+ 6 ccm 0,1 n-NaOH	= 2,7 ccm 0,1 n-Säure
50 ccm "	+ 16 ccm "	+ 4 ccm 0,1 "	= 7,9 ccm 0,1 "
50 ccm "	+ 18 ccm "	+ 2 ccm 0,1 "	= 6,2 ccm 0,1 "
50 ccm "	+ 20 ccm "	+ —	= 0,9 ccm 0,1 "
50 ccm "	+ 15 ccm "	+ 5 ccm 0,2 n-HCl	= 14,9 ccm 0,1 "
50 ccm "	+ 10 ccm "	+ 10 ccm 0,2 "	= 17,5 ccm 0,1 "
50 ccm "	+ 5 ccm "	+ 15 ccm 0,2 "	= 18,7 ccm 0,1 "
50 ccm "	+ 0 ccm "	+ 20 ccm 0,2 "	= 18,7 ccm 0,1 "

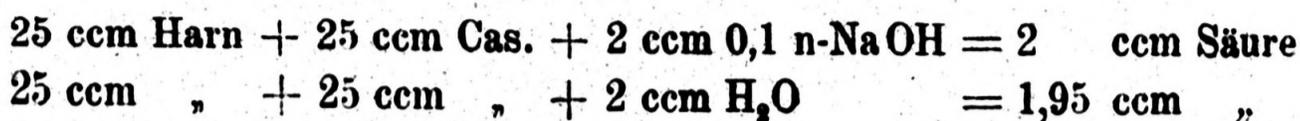
Nach 4 Tagen bei 37° wurde mit 20 ccm Gerbsäurelösung und 50 ccm Filtrat für die Analyse genommen. Das Analyseresultat wurde nach Abzug des Kontrollwertes für das ganze Volumen umgerechnet. Die so erhaltenen Zahlen sind in die Tabelle rechts eingetragen. In diesem Falle sind die zwei Maxima ganz deutlich.

Ein anderer eiweißhaltiger Harn (0,3%) ergab bei alkalischer Reaktion folgende Zahlen:

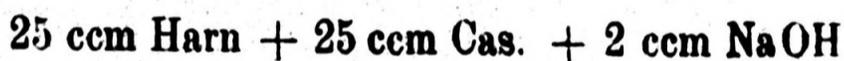
25 ccm Harn	+ 25 ccm Cas.-Lös	+ 4 ccm H <sub>2</sub> O	= 1,05 ccm 0,1 n-Säure
25 ccm "	+ 25 ccm "	+ 3 ccm "	+ 1 ccm 0,1 n-NaOH
			= 1,85 ccm 0,1 n-Säure
25 ccm "	+ 25 ccm "	+ 2 ccm "	+ 2 ccm 0,1 n-NaOH
			= 2,15 ccm 0,1 n-Säure



In diesem Falle wurde in der Probe, welche die größte Analyseziffer ergab (2 ccm NaOH), der Wasserstoffionenexponent  $p_H$  elektrometrisch ermittelt und = 7,77 gefunden. Mit einem normalen Harn wurden folgende Zahlen erhalten:

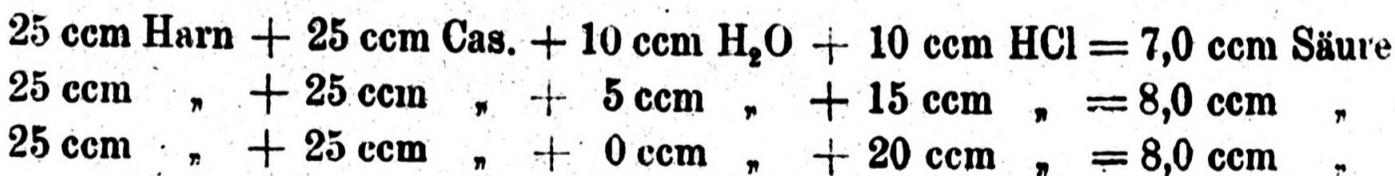


Auch in anderen Fällen habe ich gefunden, daß bei der Untersuchung von Harnenzym mittels der Einwirkung von 25 ccm dialysiertem Harn auf 25 ccm Caseinlösung 2 ccm 0,1 n-NaOH die passende Alkalimenge ausmacht, und ich habe deshalb bei der Bestimmung der Wirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion das Gemenge

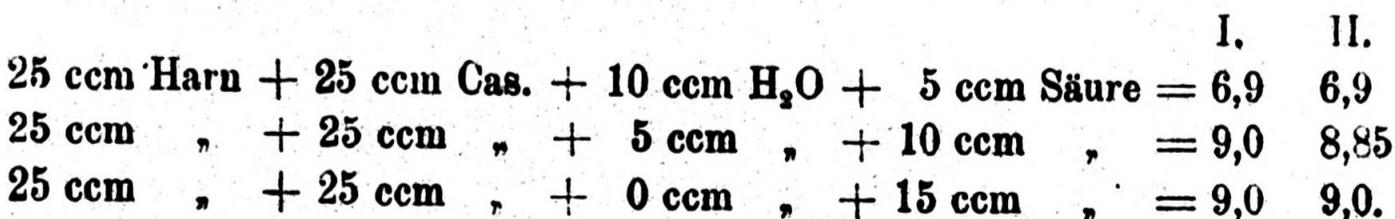


benutzt (siehe oben).

Die Einwirkung auf Casein in saurer Lösung habe ich in der Gegenwart von 15 ccm 0,2 n-HCl vor sich gehen lassen, da diese Säuremenge zwar oft dieselben Analyseresultate ergibt wie 20 ccm Säure, aber meistens etwas mehr als 10 ccm Säure. So wurden in einem Falle von Eiweißharn (1%) folgende Zahlen erhalten:



Zwei eiweißfreie pneumonischen Harne ergaben:



In einem Falle habe ich elektrometrisch das  $p_H$  einer Lösung mit 15 ccm Säure bestimmt und = 1,64 gefunden. Bei diesem Säuregrad ist das durch geringere Säuremengen ausgefällte Casein schon längst aufgelöst, und der Säuregrad entspricht etwa dem, bei welchem das Pepsin am besten wirkt.

Die Einwirkung des Harnes auf Pepton geschieht am besten bei schwach alkalischer Reaktion und die Einwirkung ist mit der Gerbsäuremethode immer leicht nachweisbar. Bei der Anwendung von 25 ccm Harn und 25 ccm in oben beschriebener Weise erhaltener Peptonlösung scheint eine Zugabe von 2 ccm 0,1 n-NaOH die günstigste Wirkung zu ergeben. Indessen scheint immer eine gewisse Wirkung auch bei saurer Reaktion stattzufinden. Ich gebe hier zwei Versuchsreihen wieder. Bei deren Beurteilung muß man sich erinnern, daß die Peptonlösung auch nach dem Dialysieren eine deutlich alkalische Reaktion besitzt.

Der Harn enthielt Bence-jones Eiweiß 0,15 ‰.

25 ccm Harn	+	25 ccm Pept.	+	16 ccm H <sub>2</sub> O	+	4 ccm 0,1 n-NaOH	= 8,0 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	18 ccm „	+	2 ccm 0,1 n-NaOH	= 9,35 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	20 ccm „	+	0 ccm 0,1 n-NaOH	= 9,25 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	15 ccm „	+	5 ccm 0,2 n-HCl	= 6,65 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	10 ccm „	+	10 ccm 0,2 n-HCl	= 6,20 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	5 ccm „	+	15 ccm 0,2 n-HCl	= 6,55 ccm Säure.

Eiweißharn 0,3 ‰.

25 ccm Harn	+	25 ccm Pept.	+	0 ccm H <sub>2</sub> O	+	4 ccm 0,1 n-NaOH	= 6,9 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	1 ccm „	+	3 ccm 0,1 n-NaOH	= 7,05 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	2 ccm „	+	2 ccm 0,1 n-NaOH	= 7,35 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	3 ccm „	+	1 ccm 0,1 n-NaOH	= 7,25 ccm Säure
25 ccm „	+	25 ccm „	+	4 ccm „	+	0 ccm 0,1 ccm n-NaOH	= 6,9 ccm Säure.

In dem letzten Falle wurde in der Probe mit 2 NaOH  $p_H$  elektrometrisch = 7,96 gefunden.

Es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, daß die Einwirkung auf Pepton bei alkalischer Reaktion meistens von dem Harnerepsin herrührt. Dagegen kann es nicht als un-

zweifelhaft betrachtet werden, daß das Erepsin für die Wirkung des Harnes bei saurer Reaktion verantwortlich sei, zumal diese Einwirkung auch bei demjenigen Säuregrad auftritt, der für die Pepsinwirkung am günstigsten ist. Daß dem so ist, habe ich oft beobachtet. Ein normaler Harn ergab nämlich folgende Werte:

$$\begin{array}{l} 25 \text{ ccm Harn} + 25 \text{ ccm Pept.} + 2 \text{ ccm } 0,1 \text{ n-NaOH} = 6,35 \text{ ccm Säure} \\ 25 \text{ ccm } \quad \quad + 25 \text{ ccm } \quad \quad + 15 \text{ ccm } 0,2 \text{ n-HCl} = 3,35 \text{ ccm } \end{array}$$

Möglicherweise wirkt das Pepsin auf mit Gerbsäure fällbare Albumosen derart ein, daß sie nicht gefällt werden.

Betreffs der Methode mag schließlich bemerkt werden, daß eine Vergleichung der mit verschiedenen Harnen erhaltenen Ziffern streng genommen nur dann erlaubt ist, wenn *ceteris paribus* auch die Tagesmengen des Harnes einigermaßen die gleichen sind. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß die Enzymmengen in einem gegebenen Harnvolumen gleich wie z. B. die Stickstoffmengen steigen, wenn unter sonst gleichen Verhältnissen die Tagesmenge an Harn abnimmt. Daß dem so ist, geht aus einem Versuch hervor, den ich mit einer gesunden Person angestellt habe. Unter möglichst gleicher Lebensweise wurde 2 Tage der zwischen 8 Uhr abends und 8 Uhr am folgenden Morgen abgesonderte Harn gesammelt. Das eine Mal (A) wurden um 9 Uhr abends 700 ccm Wasser getrunken, während das andere Mal nichts genossen wurde. Die Harnmenge A wurde 870 ccm und B 390 ccm. Der Stickstoff in 5 ccm von A entsprach 28,6 ccm 0,1 n-Säure und der in 5 ccm von B 50,6 ccm 0,1 n-Säure. Gleiche Volumina von A und B wurden dialysiert, auf das gleiche Volumen aufgefüllt und in oben angegebener Weise die Enzymwirkungen bestimmt. Die Ergebnisse waren:

	A	B
Cas. alk. . . . .	0,25	0,5
Pept. alk. . . . .	3,6	6,35
Cas. ac. . . . .	4,1	6,1.

Aus diesem Versuch ist also ersichtlich, daß die Absonderung der Enzyme in den Nieren nicht der Wasserabsonderung parallel geht, sondern wie die Absonderung der stickstoff-

haltigen Bestandteile des Harns von der Wasserabsonderung einigermaßen unabhängig verläuft. Andererseits dürfte aber nicht behauptet werden können, daß die Absonderung der Enzyme von dem Harnwasser vollkommen unabhängig wäre, und es dürfte darum wohl angezeigt sein, nur in solchen Fällen eine Vergleichung der abgesonderten Enzymmengen vorzunehmen, wo die Tagesmengen an Harn nahezu gleich sind. Immerhin dürfte es angemessen sein, nachzusehen, ob nicht eine etwa vorhandene Verschiedenheit in den Enzymmengen in einer Verschiedenheit der Tagesmengen an Harn ihre Ursache haben könnte. Bei den im folgenden angeführten Versuchsergebnissen habe ich meistens die Tagesmengen an Harn sowie auch in den meisten Fällen die Analyseziffern der Stickstoffmenge in 5 ccm Harn angegeben.

#### Proteolytische Enzyme des normalen Menschenharnes.

Die Enzyme, deren Gegenwart im normalen Harn bekannt ist, sind Pepsin, Lab und Erepsin. Daß ein bei saurer Reaktion wirkendes Enzym im Harn vorkommt, wurde zuerst von Brücke nachgewiesen<sup>1)</sup>; daß dieses Enzym Pepsin war, wurde durch Magenexstirpation an Hunden von Matthes<sup>2)</sup> sowie von Frouin und Delezenne dargetan<sup>3)</sup>. Das Lab wurde von Grützner<sup>4)</sup> gefunden und die Gegenwart von Erepsin wurde zunächst von Loeper, Tonnet und Vahram, obwohl, wie es mir scheint, auf nicht überzeugenden Gründen behauptet<sup>5)</sup>, und dann von Hedin und Masai durch umfassende Versuche bewiesen<sup>6)</sup>. Ein in alkalischer Lösung auf genuines Eiweiß wirkendes Enzym ist nicht immer vorhanden, dürfte aber wohl in den meisten Fällen im normalen Menschen-

<sup>1)</sup> Sitzungsber. der Wiener Akad., math.-phys. Kl., II. Abt. Bd. 43, S. 618 (1861).

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. 49, S. 106 (1903).

<sup>3)</sup> Compt. rend. soc. biol. Bd. 56, S. 204 (1904).

<sup>4)</sup> Bresl. ärztl. Zeitschr. Nr. 17 (1882).

<sup>5)</sup> Compt. rend. soc. biol. Bd. 77, S. 391, 436 (1914).

<sup>6)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 100, S. 263 (1917).

harn in sehr geringen Mengen vorkommen. Die mit normalem Harn erhaltenen Ergebnisse sind unten tabellarisch zusammengestellt. Digestionsversuche mit Casein in alkalischer Lösung sind nur in einigen Fällen ausgeführt worden, da dieselben immer sehr geringe Werte ergeben und die Ziffer oft die Versuchsfehler kaum übersteigen, was bereits aus den Versuchen von Hedin und Masai hervorgeht. Die meisten Versuche mit normalem Harn sind von meinem Assistenten cand. med. H. Marcus ausgeführt worden, wofür ich ihm hier meinen besten Dank abstatte. Die Tabelle enthält zunächst zwei Reihen von Beobachtungen an zwei Personen an aufeinander folgenden Tagen und dann isolierte Beobachtungen an verschiedenen Personen. Die Analyseziiffern bedeuten wie oben ccm 0,1 n-Säure. (Siehe nächste Seite.)

Irgend ein Einfluß der Reaktion des Harnes, ob sauer oder alkalisch, ist aus den angeführten Ziffern nicht zu ersehen. Ebenso wenig habe ich eine Einwirkung der Lebensweise, Arbeit oder Ruhe finden können. Die erhaltenen Werte wechseln innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Für Cas. alk. war die größte Ziffer 1,65, für Pept. alk. war der niedrigste Wert 0,8 und der größte 8,7 und für Cas. ac. waren die entsprechenden Ziffern 2,05 bzw. 7,65.

Die erhaltenen Zahlen sind also an sich nur wenig lehrreich, aber anders stellt sich die Sache, wenn wir sie mit den unter gewissen pathologischen Verhältnissen erhaltenen zusammenstellen.

### Pathologische Harne.

Ich habe im Laufe mehrerer mit Fieber verbundener Krankheiten die Wirkungen der Harnenzyme ermittelt und gefunden, daß dieselben im allgemeinen während des Fiebers in größeren Mengen auftreten als im normalen Harne. Da aber sehr oft die Harnmenge im Fieberzustande vermindert ist, könnte man dieses Verhalten für die Zunahme der Enzyme verantwortlich machen. Darum bin ich bestrebt gewesen, die Enzymmengen bei derselben Person einerseits während des Fiebers und andererseits nach demselben in solchen Fällen zu ermitteln, wo die Harnmenge in beiden Fällen etwa

Versuchsperson	Tagesmenge an Harn ccm	Reaktion des Harnes	N in 5 ccm	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
G. H., 58 Jahre	1950	schw, alk.	20,6	—	2,45	3,05
"	1800	"	17,9	—	2,85	2,70
"	1885	"	23,95	—	—	3,35
"	1670	"	30,45	—	3,00	4,00
"	1480	schw. sauer	35,3	—	3,10	4,70
"	1650	"	32,5	—	—	4,25
"	1630	schw. alk.	30,1	—	3,00	4,00
M., 20 Jahre	1950	sauer	23,5	—	3,5	4,25
"	1650	"	23,7	—	3,05	3,75
"	1630	"	22,2	—	3,9	2,55
"	1450	"	33,2	—	4,05	4,95
"	1780	"	19,0	—	2,15	3,75
"	1360	"	37,8	—	4,05	5,25
"	1700	"	30,5	—	3,65	4,95
M., 21 Jahre	1350	"	28,0	—	7,1	2,05
"	1300	"	39,0	—	8,7	3,06
"	1200	"	37,1	—	5,75	4,75
"	1230	alk.	44,2	—	4,15	6,10
M., 20 Jahre	2350	sauer	19,8	—	2,6	3,50
"	1200	"	41,2	—	4,20	6,30
"	2100	"	15,4	—	1,35	3,45
"	1230	"	35,2	—	4,8	4,75
"	1250	"	34,7	—	3,9	6,3
E., 24 Jahre . .	1620	"	19,4	—	3,35	4,6
T., 25 Jahre . .	1430	"	27,5	—	3,75	5,45
E., 20 Jahre . .	1400	alk.	35,1	—	0,8	6,63
L., 60 Jahre . .	1950	sauer	29,0	—	1,9	4,95
"	1800	"	34,4	—	2,95	4,95
"	1800	"	28,7	—	3,75	5,3
"	1900	alk.	19,4	—	4,7	4,95
M., 24 Jahre	1450	"	42,4	—	4,4	7,65
G. H., 58 Jahre	—	—	32,1	0,8	3,85	—
G. H., 41 Jahre	—	—	—	0,5	1,3	—
"	—	—	35,6	1,65	4,45	—
M., 24 Jahre	—	—	15,2	0,3	1,5	—
G. H., 8 Jahre .	—	—	35,5	0,3	3,1	—
"	—	—	—	0,35	1,8	—
"	700	sauer	40,2	—	3,75	3,75
B. H., 6 Jahre .	390	neutr.	43,6	—	4,3	4,95
E., 20 Jahre . .	—	—	—	0,65	4,05	—

die gleiche geblieben war oder zum mindesten im afebrilen Zustande nicht größer war als im febrilen. Für solche Untersuchungen war die croupöse Pneumonie besonders geeignet, zumal der Übergang vom febrilen zum afebrilen Zustande in typischen Fällen sehr rasch verläuft. Eigentlich scheint bei dieser Krankheit die Enzymmenge des Harnes am größten zu sein am Tage unmittelbar nach der Krise, wahrscheinlich aus dem Grunde, daß die überschüssige Enzymmenge dann aus dem Körper entfernt wird.

Für die Bestimmung des Reststickstoffes in diesen im allgemeinen schwach eiweißhaltigen Harnen wurden 10 ccm Harn mit 20 ccm H<sub>2</sub>O verdünnt und dann mit 10 ccm Gerbsäurelösung gefällt, worauf vom Filtrate 20 ccm (= 5 ccm des urspr. Harnes) für die N-Bestimmung genommen wurden.

	Harn- menge ccm	N in 5 ccm	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
I.					
Tag unmittelbar nach der Krise	1500	72,6	7,15	21,45	6,55
Einen Monat später . . . . .	1375	28,5	1,15	7,57	6,88
Noch einen Monat später . . .	900	42,2	0,3	7,65	6,1
II.					
Fiebertag . . . . .	1500	60,75	3,1	16,0	13,15
Tag unmittelbar nach der Krise	1000	72,1	6,23	20,97	13,8
Eine Woche später . . . . .	1100	42,3	1,06	5,5	7,2
Noch zwei Wochen später . . .	875	41,8	0,75	5,25	9,0
III.					
Fiebertag . . . . .	550	77,2	3,05	17,15	9,0
Einige Tage nach der Krise . .	525	30,55	1,12	6,76	4,67

Das vermehrte Auftreten der Enzyme während des Fiebers und unmittelbar nach demselben bezieht sich am meisten auf die Einwirkung auf Casein und Pepton bei alkalischer Reaktion, welche Wirkungen ganz ausgesprochen vermehrt sind, während die Einwirkung auf Casein bei saurer Reaktion nicht so regelmäßig vermehrt auftritt.

Es gibt aber auch afebrile Krankheiten, bei welchen die

Harnenzyme entschieden vermehrt sind. Zu diesen gehören mindestens gewisse Fälle von Leukämie. Ich habe die Gelegenheit gehabt, einen Fall von myelogener Leukämie wiederholt zu untersuchen. Die Ergebnisse folgen:

Tag der Untersuchung	Harnmenge	N-Menge	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
26. März . . . .	500	52,45	1,95	19,85	11,5
4. April . . . .	1125	45,8	2,0	21,35	11,75
19. April . . . .	1250	43,1	2,85	21,50	12,25
27. April . . . .	1125	32,1	1,0	15,45	8,85
12. Mai . . . .	500	22,85	0,9	12,05	8,25

Der Zustand des Patienten hat sich im Laufe des Aufenthaltes im Krankenhause gebessert und die Enzyme haben ihrer Menge nach schließlich abgenommen.

Ein anderer Fall von myelogener Leukämie, den ich nur einmal untersucht habe, ergab folgende Werte:

Harnmenge	N-Menge	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
1350	22,1	2,8	16,55	8,35

Alle Werte sind höher als die normalen, obwohl nicht in so ausgesprochenem Grade wie einige von den im ersten Leukämiefalle erhaltenen. In beiden Fällen trifft die Zunahme den normalen Werten gegenüber am meisten die Einwirkung auf Pepton in alkalischer Lösung und lange nicht in demselben Grade die zwei übrigen Enzymwirkungen.

Die übrigen von mir untersuchten pathologischen Fälle beziehen sich am meisten auf eiweißhaltige Harn. Der Weg, welchen ich beim Studium der proteolytischen Enzyme der Eiweißharn zunächst eingeschlagen habe, war, wie beim Serum, die fraktionierte Fällung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$ . Bei der Untersuchung des Serums fällt die primäre Protease mit der Globulinfraktion zusammen aus, während die peptonspaltenden Enzyme zum Teil zusammen mit der Globulinfraktion, zum Teil zusammen mit der Albuminfraktion ausgeschieden werden. Letztere Fraktion enthält praktisch keine primäre Protease, wohl aber eine Substanz, welche die Wirkung der primären

Protease auf Casein mehr oder wenig kräftig hemmt. Bei der Anwendung dieser Methode auf Eiweißharn zeigt es sich sehr oft, daß bei  $\frac{1}{3}$  oder sogar bei  $\frac{1}{2}$  Sättigung kein Niederschlag entsteht oder nur allmählich gebildet wird. Immer ist es darum anzuraten, nach der Zugabe von  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  (z. B. 300 g auf 1 l Harn) etwa 12 Stunden abzuwarten. Bekommt man dabei eine Globulinfraction, wird dieselbe durch Auflösen und Wiederausfällen bei  $\frac{1}{2}$  Sättigung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  gereinigt. Das Filtrat von dem ursprünglichen Globulinniederschlag wird auf Albumin verarbeitet, welches zwischen  $\frac{1}{2}$  und voller Sättigung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  ausfällt. Die Eiweißfraktionen werden durch Dialyse von Salz befreit.

Es hat sich nun herausgestellt, daß die Albuminfraktion ein Enzym enthält, das sich in der gleichen Weise verhält, wie das im normalen Harn vorhandene Erepsin, indem dasselbe zusammen mit dem im Blutglobulin vorhandenen Enzym eine viel kräftigere Wirkung ergibt, als beide Enzyme erzeugen, wenn sie jedes für sich auf dieselbe Substratmenge einwirken<sup>1)</sup>. In der Globulinfraction des Harnes kann man dagegen in gewissen Fällen ein Enzym nachweisen, das wie das Enzym in dem Blutglobulin sich verhält, indem dasselbe zusammen mit der Albuminfraktion eine kräftigere Wirkung erzeugt als beide Enzyme für sich. Folglich enthalten die beiden Eiweißfraktionen aus dem Harn Enzyme, welche dieselben Eigenschaften besitzen wie die in den entsprechenden Fraktionen des Blutserums vorhandenen. Ein wesentlicher Unterschied liegt aber in der Tatsache, daß, soviel ich habe finden können, eine Substanz, welche die Enzymwirkung vom Globulinenzym hemmen würde, in den Harnfraktionen nicht vorhanden zu sein scheint, wohl aber im Serum und namentlich in der Albuminfraktion angetroffen wird<sup>2)</sup>.

Harn von L., Nephrosis. 1% Eiweiß (Esbach). Die zwei Eiweißfraktionen wurden hergestellt und werden mit Glob. L. und Alb. L. bezeichnet. Die im folgenden angewandten Blutglobuline waren in so wenig NaOH wie möglich aufgelöst.

<sup>1)</sup> Vgl. diese Zeitschr. Bd. 100, S. 263 (1917).

<sup>2)</sup> Ebenda Bd. 104, S. 11 (1918).

### Pferdeglobulin mit Alb. L.

1. 20 ccm Pf.-Gl. + 50 ccm Alb. L. + 50 ccm Cas. + 2 ccm 0,1 n-NaOH
2. 20 ccm „ + 50 ccm „ erh. + 50 ccm „ + 2 ccm 0,1 „
3. 20 ccm „ erh. + 50 ccm Alb. L. + 50 ccm „ + 2 ccm 0,1 „
4. (20 ccm „ + 50 ccm Alb. L.) erh. + 50 ccm „ + 2 ccm 0,1 „

Nach 4 Tagen bei 37° wurde mit 50 ccm Gerbsäure gefällt und 75 ccm Filtrat für die N-Bestimmung genommen. Die Ergebnisse waren:

Nr. 1	28,7 ; nach Abzug vom Kontrollwert 27,4; Zunahme 17,45.	
Nr. 2	10,55; „ „ „ „	} 9,95
Nr. 3	2,0 ; „ „ „ „	
Nr. 4	1,3.	

Die Summe der zwei Enzymwirkungen, wenn die Enzyme jedes für sich wirkten, war also 9,95, während beide zusammen die Ziffer 27,4 ergaben. Zugleich ist zu ersehen, daß das Alb. L. allein eine sehr unbedeutende Wirkung ergab (0,7) und wir können daraus schließen, daß dasselbe praktisch frei von primärer Protease war.

### Rindsglobulin mit Alb. L.

Der Versuch war in der gleichen Weise angeordnet wie der obige mit Pferdeglobulin und Alb. L. Die Ergebnisse waren:

Nr. 1	14,45; nach Abzug vom Kontrollwert 13,15; Zunahme 11,4	
Nr. 2	2,45; „ „ „ „	} 1,75
Nr. 3	1,9 ; „ „ „ „	
Nr. 4	1,3.	

Auch hier finden wir eine starke Zunahme und eine sehr schwache Wirkung von Alb. L. allein.

### Glob. L. mit Alb. L.

1. 10 ccm Glob. L. + 50 ccm Alb. L. + 50 ccm Cas. + 2 ccm 0,1 n-NaOH
2. 10 ccm „ + 50 ccm „ erh. + 50 ccm „ + 2 ccm 0,1 „
3. 10 ccm „ erh. + 50 ccm Alb. L. + 50 ccm „ + 2 ccm 0,1 „
4. (10 ccm „ + 50 ccm Alb. L.) erh. + 50 ccm „ + 2 ccm 0,1 „

4 Tage bei 37°; 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	13 ; nach Abzug vom Kontrollwert 11,65; Zunahme 4,05	
Nr. 2	8,2 ; „ „ „ „	} 7,6
Nr. 3	2,1 ; „ „ „ „	
Nr. 4	1,35.	

Das Glob. L. (Nr. 2) zeigt allein eine ziemlich starke Wirkung, während das Alb. L. (No. 3) wie vorher nur eine sehr schwache Wirksamkeit besitzt. Beide zusammen (Nr. 1) entwickeln eine viel kräftigere Wirkung als beide, wenn jedes für sich wirkt. Das Harnglobulin enthält also in diesem Falle, wie oben die Blutglobuline, eine primäre Protease.

Ein anderer Harn (von E. S., sekundäre Schrumpfnieren) mit etwa 1% Eiweiß wurde in der gleichen Weise untersucht. Die Eiweißfraktionen werden mit Glob. S. und Alb. S. bezeichnet.

Glob. S. mit Alb. S.

Die Proben waren folgendermaßen zusammengesetzt:

25 ccm Glob. S + 25 ccm Alb. S. + 50 ccm Cas. + 2 ccm NaOH  
und der Versuch wurde wie der eben erwähnte Versuch Glob. L. mit Alb. L. ausgeführt. Die Ergebnisse waren:

Nr. 1	17,1 ; nach Abzug vom Kontrollwert 15,4; Zunahme 3,95	
Nr. 2	12,9 ; " " " "	11,2
Nr. 3	1,95; " " " "	0,25
Nr. 4	1,7.	

} 11,45

In diesem Falle war die Wirkung von dem Albumin besonders gering und auch hier war folglich das Albumin praktisch frei von primärer Protease. Auch sonst waren die Ergebnisse dieselben wie im letzten Versuch mit dem Harn L.

Harn von R., sclerosis renum., Alb. 0,3%. Es wurden die Albuminfraktionen Glob. R. und Alb. R. hergestellt. Um das Globulin so frei wie möglich von Erepsin zu erhalten, habe ich dasselbe 3mal mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  gefällt.

Pferdeglobulin mit Alb. R.

Der Versuch wurde wie oben Pferdeglobulin mit Alb. L. ausgeführt. Die Ergebnisse waren:

Nr. 1	30,6 ; nach Abzug vom Kontrollwert 28,4; Zunahme 9,95	
Nr. 2	19,2 ; " " " "	17,0
Nr. 3	3,65; " " " "	1,45
Nr. 4	2,2.	

} 18,45

Glob. R. + Alb. R.

Der Versuch wurde wie oben der Versuch Glob. L. mit Alb. L. ausgeführt:

Nr. 1	13,65; nach Abzug vom Kontrollwert 12,35; Zunahme 3,35
Nr. 2	8,7 ; " " " " 7,4 } 9,0
Nr. 3	2,9 ; " " " " 1,6 }
Nr. 4	1,3.

Zum Vergleich wurde in diesem Falle Pferdeglobulin mit Glob. R. zusammen untersucht. Die Proben waren also:

1. 10 ccm Pf.-Gl. + 10 ccm Glob. R. + 50 ccm Cas. + 2 NaOH
2. 10 ccm " + 10 ccm " erh. + 50 ccm " + 2 "
3. 10 ccm " erh. + 10 ccm Glob. R. + 50 ccm " + 2 "
4. (10 ccm " + 10 ccm Glob. R.) erh. + 50 ccm " + 2 "

4 Tage bei 37°; 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	26,8; nach Abzug vom Kontrollwert 24,5
Nr. 2	22,7; " " " " 20,4 } 27,7
Nr. 3	9,6; " " " " 7,3 }
Nr. 4	2,3.

Aus dem Versuche Pferdeglobulin mit Alb. R. geht hervor, daß das Alb. R. Erepsin enthält, aber nur wenig primäre Protease; aus dem Versuche Glob. R. mit Alb. R. ergibt sich, daß das Glob. R. primäre Protease enthält, und aus dem Versuche Pferdeglobulin mit Glob. R. kann ersehen werden, daß die Summe der Wirkungen der beiden Enzyme, wenn sie jedes für sich wirken, größer ist als wenn sie zugleich auf dasselbe Substrat wirken. Das Glob. R. ist also nicht wie das Alb. R. imstande, die Wirkung des Pferdeglobulins zu erhöhen, und kann also nicht irgendwelche größere Mengen an Erepsin enthalten.

Bei der Untersuchung der drei eben besprochenen Eiweißharn ist es mir also gelungen, die Gegenwart von sowohl einer primären Protease als von Erepsin nachzuweisen; erstere wird (wahrscheinlich zusammen mit etwas Erepsin) mit der Globulinfraction ausgefällt und letzteres mit der Albuminfraction. Es gelingt aber nicht, in jedem Harn die zwei Enzyme in der Weise voneinander zu scheiden. Die Scheidung wird offenbar schwieriger in demselben Maße, wie die Globulinfraction im Harn gering ist, und wird in der Weise eventuell unmöglich. Ist die Globulinmenge einigermaßen bedeutend, scheint alle primäre Protease mit derselben ausgefällt zu werden und es fällt nicht schwierig, das Erepsin in der Albumin-

fraktion praktisch frei von primärer Protease zu bekommen. Zusammen mit der primären Protease scheint wohl immer etwas Erepsin auszufallen und bei großen Erepsinmengen ist es darum schwierig, die primäre Protease genügend frei von Erepsin zu bekommen.

Da also die Scheidung der beiden Enzyme oft mit Schwierigkeiten verbunden ist und wohl nie vollkommen gelingt, und man außerdem in dieser Weise keine Vorstellung von deren Mengen bekommt, habe ich auch bei Eiweißharnen die Enzymmengen in der gleichen Weise zu ermitteln versucht, wie ich oben für andere Harnen angewandt habe. Ich habe also die Einwirkung des zunächst filtrierten und dann dialysierten Harnes in alkalischer Lösung auf Casein und auf Pepton zu bestimmen versucht und ebenso die Einwirkung auf Casein bei saurer Reaktion. Diese Bestimmungsart kann jetzt etwas eingehender als vorher begründet werden und außerdem muß in Erwägung genommen werden, inwiefern die Gegenwart des Harniweißes auf die Ergebnisse einwirken kann.

Aus den eben beschriebenen Versuchen mit Eiweißharnen geht hervor, daß das Harnerepsin in solcher Reinheit erhalten werden kann, daß es wohl zusammen mit primärer Protease eine sehr kräftige Einwirkung auf Casein ausübt, aber allein nicht imstande ist, das Casein anzugreifen. Durch die Protease etwa gebildete primäre Spaltungsprodukte (Albumosen) können also durch das Erepsin weiter gespalten und in Substanzen überführt werden, welche nicht mit Gerbsäure gefällt werden. Die in Eiweißharnen vorhandenen bedeutenden Erepsinmengen dürften wohl genügen, um die Überführung der gebildeten Albumosen in nicht fällbare zu sichern. In der Weise wird die Caseindigestion in alkalischer Lösung ein ziemlich guter Ausdruck für die Menge der primären Protease und anderer auf Casein einwirkender Enzyme.

Schwieriger scheint die Bestimmung des Erepsins durch dessen Einwirkung auf Wittes Pepton, da es bis jetzt nicht bewiesen ist, daß das Erepsin das einzige Enzym ist, das auf Pepton einwirkt. Man könnte sich wohl denken, daß die primäre Protease oder andere eventuell vorhandene Enzyme

auch imstande wären, in Wittes Pepton etwa vorhandene, durch Gerbsäure fällbare Substanzen in nicht fällbare überzuführen. In der Tat hat es sich auch herausgestellt, daß die Globulinfraction des Blutes, welche primäre Protease enthält, auch auf Wittes Pepton einzuwirken imstande ist. Dies kann in zweierlei Weise gedeutet werden. Entweder wirkt die primäre Protease selbst auf Wittes Pepton ein oder es war in dem genannten Fall durch Erepsin verunreinigt. Die weitere Diskussion dieser Frage muß bis nach dem Bericht über einige neue Versuche mit Eiweißharnen verschoben werden.

Es erübrigt, die Frage nach dem Einfluß des Harn-eiweißes auf die von mir angewandte Bestimmungsweise der Harnenzyme zu erörtern. Ich habe zunächst versucht, dieser Frage in der Weise näherzutreten, daß ich die Harnenzyme einmal auf das Harn-eiweiß allein einwirken ließ und zweitens einen Teil des Eiweißharnes durch Caseinlösung ersetzte. Die Versuche waren folgende:

Harn von G. A., Nephrosis, Eiweiß = 0,9%:

1. 50 ccm Harn + 13 ccm H<sub>2</sub>O + 2 ccm 0,1 n-NaOH
2. 50 ccm „ + 15 ccm H<sub>2</sub>O
3. 50 ccm „ + 15 ccm 0,2 n-HCl
4. 50 ccm „ erhitzt + 15 ccm H<sub>2</sub>O (Kontrolle)
5. 25 ccm „ + 25 ccm Cas. + 13 H<sub>2</sub>O + 2 ccm 0,1 n-NaOH
6. 25 ccm „ + 25 ccm „ + 15 ccm 0,2 n-HCl
7. 25 ccm „ erhitzt + 25 ccm Cas. + 15 ccm H<sub>2</sub>O (Kontrolle).

4 Tage bei 37°; 20 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

Nach Abzug der Kontrollwerte und Umrechnen für die ganze Flüssigkeit waren die erhaltenen Ziffern:

Nr. 1	1,8
Nr. 2	0
Nr. 3	15,8
Nr. 5	16,15
Nr. 6	8,93.

Harn von K. W., Nephrosis, Eiweiß = 1,1%:

1. 50 ccm Harn + 8 ccm H<sub>2</sub>O + 2 ccm 0,1 n-NaOH
2. 50 ccm „ + 10 ccm 0,2 n-HCl

## Kontrolle

3. 25 ccm Harn + 25 ccm Cas. + 8 ccm H<sub>2</sub>O + 2 ccm 0,1 n-NaOH  
 4. 25 ccm „ + 25 ccm „ + 10 ccm 0,2 n-HCl

Die Analysen wurden wie im eben angeführten Versuche ausgeführt. Die Ergebnisse waren:

Nr. 1	3,9
Nr. 2	20,8
Nr. 3	13,35
Nr. 4	9,63.

Es leuchtet sofort ein, daß in den zwei angeführten Versuchen das Harneiweiß mit Säure größere Ziffern ergab als mit Alkali, während in der Gegenwart von Casein ein größerer Umsatz erhalten wurde mit Alkali als mit Säure. Woran diese Verschiedenheit liegt, kann ich einstweilen nicht entscheiden. Man könnte gegen die Ausführung der Versuche einwenden, daß die Konzentration der H-Ionen in den entsprechenden Versuchen ohne und mit Casein vielleicht nicht ganz dieselbe war, aber der Unterschied dürfte jedenfalls nicht groß angeschlagen werden können, und in Anbetracht der Tatsache, daß der Umsatz bei einer geringen Änderung der Alkalinität oder der Acidität sich nur wenig ändert, kann diese Fehlerquelle nur einen geringen Einfluß auf die Ziffern ausgeübt haben. Es muß außerdem die Aufmerksamkeit darauf hingelenkt werden, daß in den Proben mit 50 ccm Harneiweiß die vorhandene Enzymmenge doppelt so groß war wie in den Caseinproben mit 25 ccm Harn. Dies erklärt zum Teil die großen Ziffern bei saurer Reaktion mit Harneiweiß denjenigen mit Casein gegenüber, erklärt aber nicht, warum das Harneiweiß allein in alkalischer Lösung so kleine Werte ergibt. In Anbetracht des beträchtlichen Umsatzes des Harneiweißes in saurer Lösung scheint es wahrscheinlich, daß dieser Umsatz auf die Ziffern einwirken muß, welche bei der Enzymwirkung in saurer Lösung nach meinem Verfahren erhalten werden, und ich bin geneigt anzunehmen, daß dies die Erklärung der Tatsache sein muß, daß die Harne mit viel Eiweiß für Pepsin größere Ziffern ergeben haben als normale Harne.

Das Verhalten des Harneiweißes bei alkalischer Reaktion habe ich in noch zwei anderen Versuchen geprüft, und zwar in der Weise, daß ich eine gegebene Harnmenge einmal allein digeriert habe und dann auch mit Casein zusammen. Diesmal war also in beiden zu vergleichenden Proben dieselbe Harnmenge, aber verschiedene Eiweißmengen vorhanden.

Harn von L., Amyloidniere, Eiweiß = 0,7%:

1. 25 ccm Harn + 25 ccm H<sub>2</sub>O + 1 ccm 0,1 n-NaOH
2. Kontrolle
3. 25 ccm Harn + 25 ccm Cas. + 1 ccm 0,1 n-NaOH
4. Kontrolle.

Nach Abzug der Kontrollwerte und Umrechnen für das ganze Volumen waren die Ziffern:

Nr. 1 0,3  
Nr. 3 14,95.

Der andere Harn (von einem Patienten mit Amyloidniere und 1,2% Eiweiß) wurde in der gleichen Weise ausgeführt und ergab:

Nr. 1 0  
Nr. 3 16.

Die zwei letzten Versuche zeigen noch mehr als die vorher erwähnten, wie schwer angreifbar das Harneiweiß ist in alkalischer Lösung, insbesondere wenn verglichen mit dem Casein, und es scheint ausgeschlossen, daß das Harneiweiß durch eigene Aufspaltung irgendwelchen vermehrenden Einfluß ausüben könne auf die Ziffern, welche die Wirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion wiedergeben. Dagegen wäre es wohl möglich, daß das Harneiweiß durch Bindung eines Teiles der Enzyme die Aufspaltung von Casein gewissermaßen hemme.

Ich gehe jetzt zur Besprechung der einzelnen Fälle von Eiweißharnen über. Zunächst sei bemerkt, daß die Eiweißmengen mit Esbachs Methode bestimmt wurden und daß die nicht als Eiweiß vorhandene N-Menge in der Weise ermittelt wurde, daß 10 ccm Harn zunächst mit 20 ccm Wasser verdünnt und dann mit 10 ccm Gerbsäurelösung gefällt wurde. Vom Filtrate wurden 20 ccm, die 5 ccm des ursprünglichen

Harnes entsprechen, für die N-Bestimmung genommen. Die Harnes mit nur wenig Eiweiß ergeben gewöhnlich Enzymwerte, welche die normalen kaum übersteigen. Ein Ansteigen der Enzymwerte zeigt sich gewöhnlich zunächst bezüglich der Wirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion. Einige Fälle mit verhältnismäßig wenig Eiweiß sind unten tabellarisch zusammengestellt.

Klin. Diagnose	Harn- menge ccm	Alb.- menge %	Rest- N. ccm	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
Glom. nephr. (geheilt) . . .	550	Spuren	19,5	0,6	3,6	4,15
" " mit Blut . . .	2100	0,4	24,55	4,3	9,6	5,85
" " . . . . .	2250	0,15	13,85	1,3	5,35	5,0
" " + Nephrosis . . .	1302	0,4	18,1	1,4	12,65	4,25
Amyloid . . . . .	2000	0,55	13,3	4,5	6,35	6,55

In mehreren Fällen mit viel Eiweiß habe ich versucht, die gesamten Enzyme durch Sättigen des Harnes mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  zusammen mit dem Eiweiß auszufällen, wonach die in den dialysierten Niederschlägen vorhandenen Enzymmengen mit den in dem direkt dialysierten Harnen enthaltenen in oben beschriebener Weise verglichen wurden. Natürlich wurde dafür Sorge getragen, daß die ausgefällte Eiweißmenge nach der Dialyse dasselbe Volumen einnahm wie die entsprechende Menge im direkt dialysierten Harnen. Wenn die Eiweißmengen genügend groß sind, werden zusammen mit dem Eiweiß die gesamten Enzymmengen mitgerissen und man bekommt bei den drei Enzymbestimmungen etwa die gleichen Werte mit dem ausgefällten Eiweiß wie mit dem nach direkter Dialyse analysierten Harnen. Ein Beispiel eines solchen Falles ist folgendes:

#### G. A., Nephrosis:

Harnmenge	Alb.	Rest-N.	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
1200	1,1	27,8 direkt dial.	16,15	19,65	8,93
		Gefällt	16,55	18,25	8,26
		Einen Monat später, neuer Harn			
1500	0,9	19,1 direkt dial.	14,0	16,0	8,85

Dieser Harn ergab nach 3 Wochen im Eisschrank

Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
6,9	16,0	8,4.

Das Vermögen, auf Casein bei alkalischer Reaktion einzuwirken, hatte also während des Aufbewahrens des dialysierten Harnes abgenommen; die zwei anderen Enzymwirkungen waren dagegen ungeschwächt vorhanden. In diesem Falle ist also ein Enzym zerstört worden, das bei alkalischer Reaktion auf Casein, aber nicht auf Pepton einzuwirken imstande war. In diesem Harn waren die in den drei Weisen bestimmten Enzymwirkungen etwa die gleichen, gleichgültig, ob die Enzyme zunächst zusammen mit dem Eiweiß ausgefällt wurden oder nicht. In den meisten von mir in dieser Weise untersuchten Fällen stellt sich aber die Sache so, daß nach Ausfällen mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  die Einwirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion kräftiger war als ohne Ausfällen. Außerdem stellt es sich heraus, daß wie im eben beschriebenen Falle die Einwirkung bei alkalischer Reaktion auf Casein beim Aufbewahren des Harnes im allgemeinen abnimmt, während die beiden anderen untersuchten Enzymwirkungen praktisch unverändert blieben.

### Beispiele.

#### I. F. P., Hg-Nephrosis.

Harnmenge	Alb.	Rest-N.	Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
440	1,8	52,1 direkt dial.	2,85	18,4	12,35
		Gefällt	15,8	16,3	11,4

Letztere Harnprobe wurde 3 Wochen später wieder untersucht:

7,9	15,4	9,9.
-----	------	------

Anderer Harn von demselben Patienten ergab:

625	1,5	— direkt dial.	5,50	21,25	12,9
		Gefällt	13,6	20,95	12,15

#### II. N. A., Nephrosis + Glom. nephr.

875	0,65	21,2 direkt dial.	7,2	13,55	8,75
-----	------	-------------------	-----	-------	------

Nach 7 Wochen im Eisschrank:

3,6	13,65	8,0.
-----	-------	------

## III. W., Nephrosis.

Harnmenge	Alb.	Rest-N.		Cas. alk.	Pept. alk.	Cas. ac.
1500	1,4	—	direkt dial.	13,35	19,02	9,63
			Gefällt	21,3	23,1	8,46.

## IV. J. P., Glom. neph. + Nephrosis.

1125	1,6	16,1	direkt dial.	11	12,7	—
			Gefällt	17,75	13,6	—

## V. G. A., Glom. neph.

1000	0,7	30,7	direkt dial.	4,3	13,05	—
			Gefällt	11,2	12,05	—

## VI. Amyloid. renum.

450	2,0	68,7	direkt dial.	44,35	29,25	7,8.
-----	-----	------	--------------	-------	-------	------

Nach 14tägigem Aufbewahren ergab derselbe Harn:

				54,8	21,85	8,15
--	--	--	--	------	-------	------

und nach neuen 14 Tagen:

				52,8	13,7	7,03.
--	--	--	--	------	------	-------

Es ergibt sich also aus den angeführten Versuchen mit viel Eiweiß enthaltenden Harnen, daß die drei untersuchten Enzymwirkungen Ziffern ergeben haben, welche im allgemeinen größer sind und meistens viel größer sind als die normalen. Diese Zunahme trifft am meisten die Einwirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion und am wenigsten die Einwirkung auf Casein bei saurer Reaktion. Die größten Ziffern, welche ich für die Wirkung auf Casein und auf Pepton bei alkalischer Reaktion erhalten habe, sind die mit Harn VI erhaltenen.

Auffallend ist es, daß die Wirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion fast unabhängig von den anderen Enzymen variiert, indem dieselbe einerseits beim Fällen des Eiweißes mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  an Wirkungsvermögen oft zunimmt, andererseits beim Aufbewahren meistens abnimmt. Dies beweist, daß die Einwirkung auf Casein mindestens zum Teil von einem Enzym herrührt, das nicht auf Wittes Pepton einwirkt. Daß die ganze Einwirkung auf Casein durch ein solches Enzym herbeigeführt werde, geht doch aus diesen Versuchen nicht hervor.

Wie die Zunahme der Enzymwirkung bei der Ausfällung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  zustande kommt, darüber kann ich gegenwärtig keine Ansicht aussprechen. Hier dürfte es genügen, daran

zu erinnern, daß eine gleiche Erscheinung beim Blutserum zutage tritt. Wie ich in meiner Mitteilung über die proteolytischen Enzyme des Serums dargetan habe, wirkt das Serum von Pferd und Rind nicht direkt auf Casein ein, wohl aber bekommt man eine solche Wirkung, wenn man mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  die Globulinfraction ausfällt und deren Einwirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion untersucht.

Die stärkere Einwirkung, welche mit Eiweißharnen auf Casein und Pepton erhalten wird, kann nicht an dem Gehalt der Harnen an Eiweiß liegen. Dieses Eiweiß ist nämlich in alkalischer Lösung gegen die Harnenzyme sehr resistent, was aus den oben (S. 273—275) angeführten Versuchen hervorgeht.

Unter den von mir untersuchten Harnen ergaben die Eiweißharnen die verhältnismäßig stärkste Wirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion, obwohl auch die Wirkung auf Pepton bedeutend war. Der leukämische Harn (S. 267) ergab dagegen eine verhältnismäßig starke Wirkung auf Pepton, aber eine sehr geringe auf Casein. Es war deshalb zu vermuten, daß die proteolytischen Enzyme der beiden Arten von Harn einander ergänzen würden, und ich habe folglich geprüft, ob möglicherweise beide Harnen zusammen eine größere Wirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion ergeben als die Summe beider Wirkungen, wenn sie unter den gleichen Bedingungen jedes für sich wirken. Zu dem Zwecke habe ich dieselbe Methode angewandt wie vorher, wenn ich und Masai die Gegenwart von Erepsin im normalen Harn nachwiesen. Der Eiweißharn war der Harn von G. A. (Harn V, S. 278) und der leukämische Harn war der S. 267 zuerst besprochene:

1. 25 ccm Eiw.harn. + 10 ccm leuk. Harn + 25 ccm Cas.-Lös. + 2 ccm NaOH
2. 25 ccm „ + 10 ccm „ „ erh. + 25 ccm „ + 2 ccm „
3. 25 ccm „ erh. + 10 ccm „ „ + 25 ccm „ + 2 ccm „
4. (25 ccm „ + 10 ccm „ „) erh. + 25 ccm „ + 2 ccm „

Nach 4 Tagen bei  $37^\circ$  wurde mit 30 ccm Gerbsäurelösung gefällt und 50 ccm Filtrat für die Analyse genommen. Nach Abzug des Kontrollwertes waren die Analyseziffern:

Nr. 1	20,15	
Nr. 2	14,15	} 16,10.
Nr. 3	1,95	

Der Überschuß von Nr. 1 über Nr. 2 + Nr. 3 war zwar nicht groß, aber doch vollkommen beweisend; dasselbe würde größer ausgefallen sein, wenn der Eiweißharn weniger Erepsin enthalten hätte.

### Schlußworte.

Der Frage nach den proteolytischen Enzymen des normalen und pathologischen Harnes habe ich in der Weise näherzutreten versucht, daß ich mit dem dialysierten Harn folgende Bestimmungen ausgeführt habe:

1. Einwirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion;  $p_H$  rund = 8,
2. Einwirkung auf Wittes Pepton bei alkalischer Reaktion;  $p_H$  etwa = 8,
3. Einwirkung auf Casein bei ziemlich stark salzsaurer Reaktion;  $p_H$  etwa = 1,6.

Die Einwirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion ist im normalen Harn entweder keine oder nur eine sehr geringe. In gewissen pathologischen Fällen, z. B. im Fieberstadium der croupösen Pneumonie, ist sie entschieden vermehrt und in Harnen mit viel Eiweiß ist sie am größten, obwohl die Enzymmenge auch in solchen Fällen stark wechseln kann.

Die Aufspaltung von Wittes Pepton in alkalischer Lösung ist bereits im normalen Harn immer deutlich nachweisbar; bei der Pneumonie ist sie im Fieberstadium deutlich vermehrt und in den untersuchten Fällen von Leukämie ist sie auch vermehrt, ohne daß die Einwirkung auf Casein irgendwelche ausgesprochene Zunahme erfahren hat. In Harnen mit viel Eiweiß ist die Einwirkung auf Pepton meistens stark vermehrt.

Die Einwirkung auf Casein bei saurer Reaktion, die bereits im normalen Harn sehr deutlich ausgesprochen ist, hat keine regelmäßige Zunahme gezeigt; in Eiweißharnen ist sie ziemlich groß, was indessen aus der Einwirkung des Enzyms auf das Harnweiß erklärt werden kann.

Daß im Harn ein Enzym vorhanden sein kann, das Pepton angreift, aber nicht auf Casein einwirkt, geht bereits

daraus hervor, daß normaler Harn immer Pepton spaltet, aber nicht immer Casein. Auch habe ich aus Eiweißharnen Lösungen bereitet, welche wohl Pepton, aber nicht Casein angreifen (S. 269—270). Andererseits deuten verschiedene Beobachtungen an Eiweißharnen darauf hin, daß in solchen Harnen ein Enzym vorhanden sein kann, das Casein aufspaltet, aber nicht Pepton. Indessen scheint es nicht ausgeschlossen, daß außerdem noch Enzyme vorhanden sein können, welche sowohl auf Casein wie auf Pepton einwirken.

Die Arbeiten werden in meinem Laboratorium fortgesetzt.