XII.

Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie
zu Strassburg.

132 Beiträge zur Chemie der Amyloidentartung.

Von

Dr. N. P. Krawkow (aus St. Petersburg).

I. Ueber das Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure im normalen und pathologischen Organismus des Menschen und der Thiere.

Das von Oddi¹⁾ nachgewiesene Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure in der Amyloidleber forderte zu weiteren Untersuchungen über den Zusammenhang dieser Säure mit der amyloiden Entartung auf.

Zu diesem Zwecke musste man 1. die Beobachtung Oddi's auf Grundlage eines reichlicheren pathologischen Materiales erweitern, 2. ausser der Leber auch andere amyloidentartete Organe auf das Vorhandensein von Chondroitinschwefelsäure untersuchen, 3. solche Untersuchungen auch auf die Organe und Gewebe bei anderen Erkrankungen und in den verschiedensten pathologischen Zuständen des Organismus ausdehnen und endlich 4. die Verbreitung dieser Säure im normalen Organismus verfolgen.

1. Zur Untersuchung auf Chondroitinschwefelsäure benutze ich drei frische, menschliche Amyloidleberpräparate, die ich gleich nach der Section erhalten hatte, und 5 Spirituspräparate. Diese und den grössten Theil des übrigen pathologischen Untersuchungsmateriales stellte mir Herr Prof. von Recklinghausen mit grosser Freundlichkeit zur Verfügung. Ich spreche ihm dafür auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

Das zu untersuchende Organ wurde zerkleinert, von den grösseren Gefässen und von anderen fremden Beimengungen möglichst befreit, bei gewöhnlicher Temperatur mit einer schwachen Ammoniaklösung

1) Archiv f. exper. Pathol. u. Rharmak. Bd. XXXIII, 1894, S. 376.

versetzt, die alkalische Flüssigkeit nach 24 Stunden abgegossen, mit schwacher Kalkmilch versetzt und filtrirt, aus dem Filtrat der Kalk durch Oxalsäure entfernt und dieses sodann auf dem Wasserbade bis auf ein geringes Volumen concentrirt; die concentrirte Lösung von Neuem filtrirt, zu diesem Filtrat eine NaHO-Lösung bis zur schwach alkalischen Reaction zugesetzt, um die Chondroitinschwefelsäure in das Natriumsalz überzuführen, und schliesslich die weiter bei gelinder Wärme concentrirte Lösung mit 2 Volumen 95 procentigen Alkohols versetzt, wobei das chondroitinschwefelsaure Natrium als ein weisser, flockiger Niederschlag ausfällt. Bei Anwendung dieses, von Oddi beschriebenen Verfahrens wird, wie wir weiter unten sehen werden, nicht die ganze Menge der Chondroitinschwefelsäure aus dem Organe ausgezogen, aber ich bediente mich desselben, weil es mir einerseits in diesem Falle nur auf den qualitativen Nachweis dieser Säure ankam, und weil andererseits die nach der Bearbeitung mit Ammoniak zurückbleibende Masse zur Isolirung des Amyloids diene. Wenn letzteres nicht beabsichtigt war, so bediente ich mich zum Nachweis der Chondroitinschwefelsäure der von Schmiedeberg¹⁾ zur Isolirung dieser Säure aus dem Knorpel angewendeten Methode. Das zerkleinerte Organ wurde der Verdauung mit Magensaft unterworfen und die unverdaut gebliebene Masse mit essigsauerm Kupfer und Kalilauge zur Entfernung der Eiweissstoffe behandelt. Nach der Entfernung der letzteren wird die basische Kupferoxydkali-Verbindung der Chondroitinschwefelsäure in Essig- oder Salzsäure gelöst und die kalihaltige Chondroitinschwefelsäure durch Alkohol ausgefällt. Sowohl nach dieser als auch nach der anderen Methode konnte ich in allen von mir untersuchten Amyloidlebern Chondroitinschwefelsäure in beträchtlicher Menge nachweisen. Wenn man nämlich die wässrige Lösung des auf diese Weise erhaltenen Körpers mit etwas BaCl_2 versetzt und sie sodann mit Salzsäure kocht, so entsteht ein reichlicher Niederschlag von Bariumsulfat, und es bildet sich dabei eine in alkalischer Lösung Kupferoxyd reducirende Substanz.

Zum überzeugenden Nachweis der Chondroitinschwefelsäure in der Amyloidleber wandte ich in einem Falle die Chondrosinreaction an.²⁾ Die wässrige Lösung der nach der obenerwähnten Methode erhaltenen Substanz wurde in einem Glaskölbchen mit verdünnter Salpetersäure versetzt, 24 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt

1) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmacol. Bd. XXVIII, 1891, S. 355.

2) Vgl. Schmiedeberg, loc. cit.

und die eingeeengte Lösung mit einem grossen Volumen Alkohol und Aether vermischt. Es bildete sich der charakteristische Chondrosin-niederschlag, der stickstoffhaltig ist, und dessen wässrige Lösung stark Kupfermannitlösung reducirt.

Ausser 8 Fällen von menschlicher Amyloidleber untersuchte ich einmal auch die Amyloidleber eines Pferdes. Dieses Präparat erhielt ich aus dem städtischen Schlachthause zu St. Petersburg im Winter zugeschiedt. Es befand sich in einer verlötheten Blechbüchse, war in Stücke geschnitten und mit einer dicken Schicht käuflichen Kochsalzes bedeckt. Das Organ kam in Strassburg ohne die geringsten Zeichen von Fäulniss an. Makroskopisch hatte das Organ das für die Amyloidleber der Thiere charakteristische Aussehen und die bröckelige oder krümelige, breiartige Beschaffenheit, wie dies von Rabe¹⁾ bei Pferden und von mir²⁾ bei experimentell hervorgerufenem Amyloid beschrieben ist. Die Leber zeigte diffuse Amyloidentartung, gab starke Amyloidreaction mit Methylviolett und Jod. Nach der Herausnahme der Leber aus der Blechbüchse fand sich in letzterer eine blutige Flüssigkeit vor, die mit Kochsalzkrystallen vermischt war. Diese Flüssigkeit wurde filtrirt und mit essigsaurem Kupfer und Kalilauge nach Schmiedeberg's Methode behandelt. Ich erhielt einen Körper, der die charakteristische Reaction auf Chondroitinschwefelsäure gab. Ein Theil des Organes wurde zerkleinert oder richtiger zerquetscht, da die Consistenz desselben eine teigartige war, sodann mit Ammoniak und Kalkmilch, wie oben angegeben, versetzt. Es fand sich in dieser Leber eine beträchtliche Menge Chondroitinschwefelsäure. Um die Frage zu entscheiden, ob sich die Chondroitinschwefelsäure im Parenchym des Organes, also in diesem Falle in der amyloiden Substanz oder in dem Stroma befindet, verfuhr ich auf folgende Weise. Die Hälfte der Pferdeamyloidleber wurde durch ein engmaschiges Nickelnetz gerieben, was infolge ihrer teigartigen Consistenz leicht von statten geht. Das auf dem Netz zurückbleibende Stroma wurde sodann mit Wasser ausgewaschen, wieder auf dem Netz gerieben und nochmals gewaschen.

Unter dem Mikroskope konnte man sich überzeugen, dass dem Stroma zwar noch Amyloid anhaftete, dass aber die Menge des letzteren im Verhältniss zum Stroma nur eine sehr geringe war. Das so gereinigte Stroma wurde der Verdauung durch Magensaft

1) Jahrbr. d. Königl. Thierarzneischule zu Hannover, Ber. XVI, 1883—84.

2) Krawkow, Arch. de médéc. expér. et d'anat. pathol. Nr. 2. S. 106. Paris 1896.

unterworfen, wobei der grösste Theil davon verdaut wurde. In dem unverdauten Rest konnten nach dem Kupfer-Kali-Verfahren nur Spuren von Chondroitinschwefelsäure nachgewiesen werden, die man unbedenklich auf das am Stroma haftengebliebene Amyloid beziehen kann.

Daraus kann man den Schluss ziehen, dass die Chondroitinschwefelsäure hauptsächlich, wenn nicht ausschliesslich, in den amyloidentarteten Theilen des Organes enthalten ist.

Das Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure in der vollkommen teigartigen Amyloidleber des Pferdes spricht dafür, dass diese Säure an und für sich bei der Bildung der harten, knorpelartigen Consistenz des menschlichen Amyloids keine Rolle spielt.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass das Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure in der Amyloidleber ein ganz regelmässiges ist. Diese Thatsache war die Veranlassung, mich mit der Frage zu beschäftigen, ob auch andere amyloidentartete Organe Chondroitinschwefelsäure enthalten, und ob das Vorkommen dieser Säure überhaupt für die amyloide Entartung charakteristisch ist.

2. Amyloidentartete Milz. Zur Untersuchung stand mir eine frische und eine in Spiritus aufbewahrt gewesene Amyloidmilz zur Verfügung. Beide Präparate wurden, wie oben angegeben, mit Ammoniak behandelt; vom 2. Präparat wurde ausserdem die nach der Behandlung mit Ammoniak zurückbleibende amyloide Masse der Verdauung durch Magensaft 20 Stunden lang unterworfen und dann nach der Schmiedeberg'schen Methode mit Kupfer und Kali behandelt. In beiden Fällen erhielt ich ansehnliche Mengen von Chondroitinschwefelsäure. Bemerkenswerth ist es, dass aus dem Alkoholpräparat in den Ammoniakauszug nur wenig Chondroitinschwefelsäure übergegangen war, während aus dem nach der Schmiedeberg'schen Methode behandelten Rückstande eine beträchtliche Menge dieser Säure gewonnen werden konnte.

3. Amyloidniere. Ein frisches und ein Spirituspräparat wurden zerkleinert und während 24 Stunden der Verdauung durch Magensaft unterworfen. Behandlung nach der Schmiedeberg'schen Methode. Auch hier wird Chondroitinschwefelsäure constatirt.

Wir sehen also, dass das Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure nicht nur für die Amyloidleber, sondern überhaupt für alle amyloidentarteten Organe charakteristisch ist. Dieser Zusammenhang der Chondroitinschwefelsäure mit der Amyloidentartung kann daher kein zufälliger sein, sondern muss für die

Chemie dieses pathologischen Productes irgend eine Bedeutung haben. Wir werden uns mit dieser Frage weiter unten beschäftigen und wenden uns zunächst den Untersuchungen zu, welche ich zu dem Zwecke unternahm, über das Vorkommen dieser Säure bei verschiedenen anderen pathologischen Zuständen des Organismus ins Klare zu kommen. Falls die Chondroitinschwefelsäure auch bei anderen krankhaften Zuständen des Organismus gebildet wird, so muss man schliessen, dass sie mit der Amyloidentartung in keinem genetischen Zusammenhang steht, sondern nur ein Product bestimmter Anomalien des Stoffwechsels ist, die unter anderen auch für die Amyloidentartung die Grundlage bilden.

Die Darstellung der Chondroitinschwefelsäure aus den pathologischen Organen und Geweben wurde, nach vorheriger Verdauung, mittelst Kupfer und Kali ausgeführt.

Leber bei Tuberculosis chronica. Es konnten nicht einmal Spuren einer Substanz nachgewiesen werden, welche beim Kochen mit Salzsäure reducirende Substanz oder Schwefelsäure gab.

Leber bei Peritonitis purulenta. Die wässrige Lösung des erhaltenen Körpers opalisirt, schwache Jodjodkaliumlösung färbt sie braunroth; beim Kochen mit HCl bildet sich reducirende Substanz, aber keine Spur von Schwefelsäure; wir haben es also nur mit Glykogen zu thun.

Leber bei Bronchopneumonie. Nach dem Kochen mit HCl Andeutung von Reduction, aber keine Spur von Schwefelsäure.

Leber bei Nephritis acuta. Weder Chondroitinschwefelsäure, noch Glykogen wurden gefunden.

Leber bei Cirrhosis hepatis atrophica. Spirituspräparate. Es wurde in beträchtlicher Menge ein die charakteristischen Glykogenreactionen gebender Körper erhalten, der beim Kochen mit Salzsäure keine Spur von Schwefelsäure gab.

Von Geschwülsten untersuchte ich folgende:

Carcinoma mammae. Spirituspräparat. Die wässrige Lösung des erhaltenen Körpers opalisirt stark, giebt mit Jod keine Reaction; nach dem Kochen mit Salzsäure Reduction von Kupferoxyd, aber keine Bildung von Schwefelsäure (Glykogen?).

Sarcoma melanoides, rundzellig, aus einer Lymphdrüse. Das Präparat hatte 3—4 Tage in Alkohol gelegen. Der in geringer Menge erhaltene Körper reducirt nach dem Kochen mit Salzsäure Kupferoxyd, bildet dabei aber keine Spur von Schwefelsäure.

Fibroma uteri. Frisches Präparat von einer Operirten. Ich erhielt einen Körper, dessen wässrige Lösung nach dem Kochen

mit Salzsäure deutlich Kupferoxyd reducirte und Schwefelsäure gab. Man kann also annehmen, dass in dieser Geschwulst Chondroitinschwefelsäure enthalten war.

Von normalen Organen und Geweben wurden auf Chondroitinschwefelsäure folgende untersucht.

Die normale Leber eines Pferdes im ungefähren Gewichte von 6 kg, von Gefässen und Bindegewebe möglichst befreit, zerkleinert, während 48 Stunden in schwacher Ammoniaklösung bei häufigem Umrühren liegen gelassen, weitere Behandlung dieses ammoniakalischen Auszuges mit Kalkmilch u. s. w., wie oben angegeben. Es wurde eine beträchtliche Menge einer Substanz erhalten, die alle Glykogenreactionen gab, aber keine Spur von Chondroitinschwefelsäure enthielt. Nach der Extraction mit Ammoniak wurde die Lebermasse der Verdauung unterworfen und mit essigsauerm Kupfer und Kalilauge behandelt. Auch dabei konnte keine Chondroitinschwefelsäure erhalten werden.

Kalbsmilz. Bei Behandlung mit Ammoniak wird keine Chondroitinschwefelsäure gefunden.

Die Magenschleimhaut vom Schwein wurde der Selbstverdauung mit 0,4 Proc. HCl unterworfen. Der unverdaute Rückstand giebt bei der Behandlung mit Kupfer und Kali eine Spur von Chondroitinschwefelsäure.

Der Arcus Aortae und die Aorta descendenz eines Pferdes. Sowohl aus dem Auszug mit Ammoniak, als auch bei der Behandlung mit Kupfer und Kali nach der Schmiedeberg'schen Methode wird eine beträchtliche Menge von Chondroitinschwefelsäure erhalten. Ausser durch die Reduction von Kupferoxyd und die Abspaltung von Schwefelsäure nach dem Kochen mit Salzsäure überzeugte ich mich von dem Vorhandensein der Chondroitinschwefelsäure durch den Nachweis von Chondrosin. Mörner ¹⁾, der diese für die Knorpelgewebe so charakteristische Säure in der Aorta fand, schloss daraus, dass in der Tunica intima der Aorta möglicher Weise eine knorpelartige Substanz vorhanden sei.

Ligamentum nuchae vom Rinde. Nach der Schmiedeberg'schen Methode erhielt ich eine beträchtliche Menge Chondroitinschwefelsäure. In den Sehnen, speciell der Achillessehne, hat Mörner (l. c.) diese Säure nicht gefunden.

Femur des Pferdes. Periost möglichst entfernt, die Diaphyse

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XX, 1895, S. 357.

in kleine Stücke zerschlagen, mit Salzsäure zur Entfernung der Kalksalze behandelt. Der erweichte Knochen wurde zerkleinert und der Verdauung durch Magensaft unterworfen. Der unverdaute Rückstand nach der Schmiedeberg'schen Methode behandelt, enthielt eine geringe Menge Chondroitinschwefelsäure.

Femur von Schaf und Kuh. Die Diaphyse gab gleichfalls Spuren von Chondroitinschwefelsäure.

Die Kämme von 12 Hähnen wurden zerkleinert, mit Wasser gewaschen, 24 Stunden der Verdauung unterworfen, der unverdaute Rückstand mit Kupfer und Kali behandelt. Ich erhielt eine grosse Menge einer Substanz, deren wässrige Lösung stark opalisirte und die mit Jod keine Glykogenreaction gab. Beim Kochen mit Salzsäure entstand eine Kupferoxyd in alkalischer Lösung stark reducirende Substanz; die Abspaltung von Schwefelsäure wurde aber nicht beobachtet. Das erhaltene Kohlehydrat stammt wahrscheinlich aus einer mucinähnlichen Substanz in den Hahnenkämmen. Wenn man zerkleinerte Hahnenkämme durch ein Tuch presst, so erhält man eine klebrige, mucinähnliche Flüssigkeit.

Ich will noch hinzufügen, dass ich auch einen Wirbel eines Knorpelfisches (*Acipenser*) auf Chondroitinschwefelsäure untersucht habe, indem ich das Spirituspräparat nach dem Auswaschen mit Wascher mit Magensaft verdaute und den unverdaut gebliebenen Rückstand mit Kupfer und Kali behandelte. Das Vorhandensein der Chondroitinschwefelsäure, war nicht zweifelhaft, wenn auch die Menge anscheinend nur eine geringe war. Diese Beobachtung entspricht der Angabe Lönnberg's¹⁾, welcher Chondroitsäure (nach der früheren Terminologie) im Knorpel einer Rochenart (*Raja batis*) und einer Haifischart (*Seymnus microcephalus*) gefunden hat.

Um unsere Kenntniss über die Verbreitung der Chondroitinschwefelsäure im Organismus und ihre Bedeutung für denselben zu erweitern, war es von grossem Interesse, auch die wirbellosen Thiere auf das Vorkommen dieser Säure zu untersuchen, umsomehr als das Glykosamin, das Hauptzersetzungsproduct des bei den wirbellosen Thieren so sehr verbreiteten Chitins, auch als charakteristische Gruppe der Chondroitinschwefelsäure erscheint, was Schmiedeberg zu der Aeusserung veranlasste, es sei „durch das Glykosamin die Brücke hergestellt, die von dem Chitin der niederen Thiere zum Knorpel der höher organisirten Geschöpfe hinüberleitet.“

Als Material für meine Untersuchung diente der Flusskrebs

1) Cit. nach Möerner loc. cit.

(*Astacus fluviatilis*). Die Kopfbrustschilde von 30 Krebsen wurden mit Wasser abgewaschen, mit essigsauerm Kupfer und Kalilauge behandelt, die Flüssigkeit nach 24 Stunden mit dem sich bildenden Niederschlag von den Schilden abgegossen, der Niederschlag auf dem Filter mit Wasser ausgewaschen, in Essigsäure aufgelöst und von Neuem mit Kalilauge bis zum völligen Verschwinden der Biuret-reaction behandelt. Der letzte Rückstand wurde in Essigsäure aufgelöst; beim Hinzufügen von 95procentigem Alkohol zum Filtrate entstand ein reichlicher weisser, flockiger Niederschlag, der nach dem Auswaschen mit Alkohol die charakteristischen Reactionen des Glykogens zeigte und namentlich beim Kochen mit Salzsäure eine reducirende Substanz, aber keine Schwefelsäure gab.

Ferner wurden zur Feststellung, ob nicht im übrigen Körper Chondroitinschwefelsäure enthalten ist, die Krebse zerkleinert, zur Entfernung der Kalksalze mit Salzsäure behandelt, die Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand nach Schmiedeberg behandelt. Ich erhielt wiederum nur Glykogen, aber keine Chondroitinschwefelsäure. Diese Beobachtung lehrt, dass im Körper der Krebse, und wahrscheinlich auch der anderen wirbellosen Thiere, neben dem Chitin keine Chondroitinschwefelsäure enthalten ist.

Aus den obigen Untersuchungen geht hervor, dass die Chondroitinschwefelsäure ausser im Knorpel noch in denjenigen normalen Geweben vorkommt, die reichliche Mengen elastischer Elemente enthalten. Dahin gehören der Netzknorpel¹⁾, das Ligamentum nuchae, die Aortenwand. Man muss daran festhalten, dass in den kleineren Gefässen im Verhältniss zu ihrem verminderten Gehalt an elastischen Elementen auch die Menge der Chondroitinschwefelsäure abnimmt, sonst hätten wir in allen parenchymatösen Organen, die wir doch niemals von den kleinsten Gefässen befreien können, immer Chondroitinschwefelsäure finden müssen, was nicht der Fall ist. Eine geringe Menge der Säure ist auch in der Grundsubstanz der Knochen enthalten und in den ihr analogen Bildungselementen des Fische skeletts. Das typische, d. h. das aus collagenen Fibrillen bestehende, sowie das adenoide Bindegewebe sind frei von Chondroitinschwefelsäure, z. B. die cirrhotische Leber und die Magenschleimhaut. In amyloiden Organen lässt sich diese Säure ausnahmslos in beträchtlicher Menge nachweisen. Dieser Befund steht mit der allgemeinen pathologischen Beschaffenheit des Organismus in keinem Zusammen-

1) Schmiedeberg, Mörner loc. cit.

hang, da z. B. bei der chronischen Tuberculose, bei der die Amyloidentartung ein häufiges Vorkommniss ist, in der Leber keine Chondroitinschwefelsäure vorkommt und, wie wir gesehen haben, nicht alle pathologischen Neubildungen diese Säure enthalten, sondern nur Geschwülste von bestimmtem Charakter, in unserem Falle das Fibrom. Ob sie in den Fibromen regelmässig vorkommt, müssen weitere Untersuchungen lehren. Sie ist von Mörner (c.l.) auch im Enchondrom gefunden worden, während Schmiedeberg eine solche Geschwulstmasse frei von dieser Säure fand (loc. cit.). Man kann wohl annehmen, dass das Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure nicht an morphologische Verhältnisse gebunden ist, sondern von der chemischen Beschaffenheit der Gewebe abhängt.

II. Kurze Uebersicht über die bisherigen Methoden zur Darstellung der Amyloidsubstanz.

Die ersten Versuche zur Isolirung der Amyloidsubstanz wurden von Friedreich und Kekulé¹⁾ ausgeführt. Das zerkleinerte Amyloidorgan wurde wiederholt mit kaltem und heissem Wasser gewaschen und durch Alkohol und Aether entfettet. Zur Entfernung der Gefässreste wandten die Autoren die Abschlämmung in Aether an. Sie erhielten folgende elementare Zusammensetzung des Amyloids: C = 53,58; H = 7,00; N = 15,04 und schlossen daraus, dass die Amyloidsubstanz aller Wahrscheinlichkeit nach „nur eigenthümlich modificirte und veränderte eiweissartige Materien seien“ (S. 64). Es ist nicht nothwendig, lange auseinanderzusetzen, dass sie ein Gemisch verschiedener Substanzen analysirt haben, da die oben angegebene Behandlung des Amyloids dasselbe nicht von den verschiedenen Eiweisskörpern, Nucleinen etc. befreien und die Abschlämmung im Aether die Gefässreste nicht vollkommen entfernen konnte.

Natürlich lässt sich unter solchen Umständen auch die Natur der gesuchten Substanz nicht erkennen.

C. Schmidt²⁾, der die Amyloidsubstanz analysirte, die er aus der Milz durch Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Aether dargestellt hatte, fand darin 15,56 Proc. N und 2,06 Proc. pyro- und metaphosphorsaure Salze. Da das Amyloid eine grosse Menge Stickstoff enthielt und beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure keine reducirende Substanz gab, so schloss Schmidt daraus, dass es kein Kohlehydrat, sondern ein stickstoffreiches Albuminoid sei. Schon der eine Umstand, dass sich im Amyloid ein so hoher Phos-

1) Virchow's Arch. Bd. XVI, 1859, S. 50.

2) Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. CX, 1859, S. 250.

phorsalzgehalt zeigte, spricht dafür, dass es eine Beimischung von Nucleïnsubstanzen enthielt, wovon weiter unten noch die Rede sein wird.

Am reinsten ist das Amyloid von Kühne und Rudneff¹⁾ dargestellt worden. Ausser den von ihren Vorgängern angewandten Methoden bedienten sie sich zur vollkommenen Entfernung der Eiweissstoffe noch der künstlichen Verdauung durch Magensaft. Die in dieser Weise dargestellte Amyloidsubstanz enthielt, trotzdem sie wiederholt der Verdauung unterworfen war, noch immer die Gefässe und andere unverdauliche Bestandtheile. Jedoch gelang es den Verfassern öfters, durch Abschlämmen auch diese Beimengungen zu entfernen. Kühne und Rudneff thaten in der Reindarstellung des Amyloids noch einen grossen Schritt weiter, indem sie die Substanz in schwacher Ammoniaklösung auflösten. Bis zur Trockene eingedampft, gab die ammoniakalische Amyloidlösung einen Rückstand, der mit Jod eine dunkelrothe Färbung annahm, welche beim Hinzufügen von Schwefelsäure einen „grünbläulichen Schimmer“ erhielt. Für die leider unvollständige Analyse verwandten sie den Körper, der aus der ammoniakalischen Amyloidlösung beim Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure ausfiel. Das bei 120° C getrocknete Präparat gab 15,53 Proc. N; 1,3 Proc. S; und 0,79 Proc. aus Calcium- und Magnesiumphosphaten bestehende Asche. Mit Rücksicht auf das Resultat dieser Analyse und das Verhalten des Amyloids zu verschiedenen Reagenzien kommen die Autoren zu dem Schlusse (p. 72), dass „wenn auch die Gesamtschubstanz des noch nicht gelösten oder nur in Ammoniak gelösten Amyloids einige sehr wesentliche Eigenschaften bekannter, besonders der coagulirten Eiweisskörper theilt, sich doch eine ganze Reihe von Reactionen damit anstellen lassen, welche zeigen, dass dieser Körper in sehr vielen Punkten vom Eiweiss abweicht“, z. B. in Bezug auf die Unverdaulichkeit im Magensaft und die Schwerlöslichkeit in Säuren. So gross der Schritt Kühne's in der Reindarstellung des Amyloids auch ist, so ermöglicht seine Methode doch nicht die Befreiung des Amyloids von den Nucleïnsubstanzen, worauf u. A. das Vorhandensein einer nicht unbeträchtlichen Menge Phosphor in seiner Amyloidschubstanz hinweist. Ausserdem wurde seine Schubstanz nur auf Stickstoff und Schwefel analysirt, was von dem Charakter der Schubstanz keine hinreichende Vorstellung giebt.

Von den neueren Arbeiten wollen wir die Arbeit Tschermak's²⁾

1) Virchow Arch. Bd. XXXIII, 1865, S. 66.

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XX, 1895, S. 343.

erwähnen, die über die Eigenschaften der Amyloidsubstanz ganz unerwartete Angaben enthält. Entgegen der feststehenden Ansicht von der Schwerverdaulichkeit der Amyloidsubstanz im Magensaft — ich sage „schwerverdaulich“, weil nach Kostjurin und Ludwig¹⁾ das Amyloid zwar schwer, aber doch nicht unverdaulich ist — und von ihrer Schwerlöslichkeit in Säuren zeigt sie sich in den Versuchen von Tschermak nicht nur verdaulich, sondern sogar bei gewöhnlicher Temperatur verhältnissmässig leicht löslich in schwachen anorganischen und organischen Säuren, z. B. in Essig-, Oxal- oder Weinsäure von 5 Proc. Merkwürdig ist dabei die Angabe, dass die Verdauungsproducte des Amyloids in Pankreas- oder Magensaft ebenso wie seine durch Einwirkung von Säuren entstehenden Producte (Acidalbumine, Albumosen und Peptone) mit Jod und Anilinfarbstoffen die gleichen Reactionen geben sollen, wie ihre Muttersubstanz, das Amyloid selbst. Für seine Untersuchungen und Analysen bediente sich der Verfasser des nach der Friedreich-Kekulé'schen Methode dargestellten Amyloids. Die Analyse dieses Körpers ergab folgendes Resultat: C = 53,01; H = 7,00; N = 16,20; S = 1,56; Asche = 0,43; in letzterer waren Ca, Mg, P enthalten. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt Verfasser zu dem Schlusse, dass das Amyloid eine „modificirte Coagulationsform des circulirenden Eiweisses, wahrscheinlich des Serumalbumins, nicht des Fibrins sei“ (p. 353).

Aus den angeführten Untersuchungen geht hervor, dass die Amyloidsubstanz bisher noch nicht isolirt war, und dass daher über ihre Natur nur unsichere Vermuthungen bestanden.

III. Ueber die Darstellung der Amyloidsubstanz.

Das Organ, Leber oder Milz, wird von der Glisson'schen Kapsel und den grösseren Gefässen möglichst befreit, zerkleinert, erst mit kaltem Wasser, dann mit einer schwachen Ammoniaklösung ausgezogen, die Flüssigkeit nach wenigen Stunden abgegossen und der Rückstand auf einem dichten Nickeldrahtnetz zerrieben. Das Zerreiben gelingt leicht, wenn die Amyloidmasse vorher, wie erwähnt, mit schwacher Ammoniaklösung behandelt war. Auf dem Drahtnetz bleiben die grösseren Gefässe und das Bindegewebe zurück. Die zerriebene Amyloidmasse wird so lange mit schwacher Ammoniaklösung ausgewaschen, bis die Waschflüssigkeit fast klar und farblos erscheint. Dabei darf die letzte Waschflüssigkeit keine Chondroitin-

1) Wien. med. Jahrb. 1886. S. 181—183.

schwefelsäure mehr enthalten. Um sich von der Abwesenheit dieser Säure zu überzeugen, wird die Waschflüssigkeit mit Kalkmilch etc., wie oben angegeben, behandelt, oder sie wird bis zu einem geringen Volumen eingedampft, mit verdünnter Salzsäure gekocht und auf die Anwesenheit von Schwefelsäure und reducirender Substanz untersucht.

Die Behandlung des Organbreies mit Ammoniak hat den Zweck, die freie oder nur salzartig gebundene Chondroitinschwefelsäure, sowie möglichst Nucleine, Mucin, Glykogen und Hämatin zu entfernen, während das Amyloid nicht gelöst wird. Selbst wenn die zerkleinerten Amyloidorgane eine Woche und länger mit schwacher Ammoniaklösung behandelt werden, bleibt die Amyloidsubstanz ungelöst und unverändert und bewahrt alle ihre charakteristischen Reactionen. Dies gilt auch für mikroskopische Schnitte der mit verdünntem Ammoniak behandelten Organe. Die Präparate zerfallen zwar leichter, aber das Amyloid zeigt keine Veränderung.

Nach der Ammoniakbehandlung wird die Amyloidmasse mit Wasser ausgewaschen und bei 38° C. 3—4 Tage oder länger der Verdauung durch Magensaft unter öfterem Umrühren unterworfen. Von Zeit zu Zeit wird die Verdauungsflüssigkeit abgegossen und durch frischen Magensaft und Salzsäure von 0,4 Proc. ersetzt. Trotzdem die Amyloidmasse in dieser Weise längere Zeit der Einwirkung sehr kräftiger Verdauungsflüssigkeit ausgesetzt war, konnte ich doch niemals eine Verdauung derselben beobachten. Als Verdauungsflüssigkeit diente in allen Fällen der Auszug der Schleimhaut des Schweinsmagens mit Salzsäure von 0,4 Proc. Die energische Wirkung dieses Magensaftes auf verschiedene Eiweissstoffe, Fibrin, Serumalbumin u. A. wurde besonders festgestellt. Zuweilen findet sich nach der Verdauung ein Theil der Amyloidsubstanz im feinvertheilten Zustande in der Verdauungsflüssigkeit suspendirt, wovon man sich durch Centrifugiren der letzteren überzeugen kann, indem dabei die feinen Theilchen als Bodensatz erhalten werden. Dieses Aufschwimmen der amyloiden Substanz mag wohl zu der Annahme Veranlassung gegeben haben, dass sie theilweise verdaulich sei.

Ich untersuchte auch die Verdauungsproducte des Amyloidorganes, Acidalbumine, Albumosen und Peptone auf die Amyloidreactionen und erhielt ein vollkommen negatives Resultat. Die Beobachtungen Tschermak's in Betreff der Verdaulichkeit des Amyloids sind daher unzutreffend.

Der unverdaute Rückstand des Amyloidorganes wird zuerst mit schwacher Salzsäure und sodann mit Wasser ausgewaschen. Dieser Rückstand giebt stets in ausgesprochener Weise die Amyloid-

reactionen mit Jod und Methylviolett. Unter dem Mikroskop sieht man, dass der Amyloidsubstanz Körper beigemischt sind, die diese Reactionen nicht geben. Die ganze Masse wird sodann mit sehr schwacher Ammoniaklösung behandelt, wobei sich jetzt, nach der Verdauung, der grösste Theil löst.

Der im Ammoniak unlösliche Rückstand besteht hauptsächlich aus kleinen Gefässen, elastischen Fasern und Holzfasern vom Brettchen, auf dem die Zerkleinerung des Amyloidorganes stattfand, und giebt nach dem Auswaschen mit ganz verdünnter Salzsäure und Wasser unter dem Mikroskop nicht die geringste Amyloidreaction.

Der ammoniakalische Auszug wird filtrirt und mit verdünnter Salzsäure versetzt, wobei sich ein reichlicher flockiger, manchmal gallertartiger Niederschlag bildet, der von Neuem 24 Stunden lang der Einwirkung von Magensaft unterworfen wird. Doch konnte in keinem Falle eine weitere Verdauung dieser Substanz beobachtet werden. Nach dem Auswaschen löst man sie abermals in Ammoniak, fällt mit Salzsäure und wäscht den Niederschlag erst durch Decantiren und dann auf einem Filter mit Wasser, Alkohol und Aether gut aus.

Man kann sich leicht davon überzeugen, dass man es mit einer in Ammoniak leicht löslichen Form des Amyloids zu thun hat. Denn erstens bleibt, wie erwähnt, nach der Behandlung des verdauten amyloidarteten Organes nur ein geringer Antheil zurück, der keine Reactionen auf Amyloid mehr giebt; dieses geht also vollständig in Lösung und aus dieser erhält man durch Ansäuern einen Niederschlag, der mit Methylviolett regelmässig, mit Jod zwar nicht immer — worauf wir noch zurückkommen —, aber doch häufig die Amyloidreactionen giebt. Zweitens erhält man aus normalen Lebern und anderen nicht amyloidarteten Organen durch Verdauung, Lösen des unverdauten Rückstandes in Ammoniak und Fällen mit Säuren niemals eine derartige Substanz, sondern nur Nucleïne, wie weiter unten genauer angegeben ist.

Aus den mitgetheilten Thatsachen ergibt sich also, dass das in den Geweben enthaltene, unverdaute Amyloid in Ammoniak und überhaupt in Alkalien unlöslich ist. Auf die Frage nach der Ursache seiner Löslichkeit nach der Verdauung kommen wir weiter unten zurück.

Die in der beschriebenen Weise gewonnene Amyloidsubstanz ist leicht löslich in schwachen Alkalien, schwer löslich in concentrirteren Säuren. Sie enthält eine nicht unbedeutende Menge von Phosphor. Wir sahen oben, dass das von C. Schmidt und von Kühne analysirte Amyloid gleichfalls Phosphor enthielt. Die Analyse der

von mir dargestellten Substanz gab nach dem Trocken im Vacuum bei 100° C. folgende Zahlen:

$$C = 46,92$$

$$H = 6,60$$

$$N = 14,16$$

$$P = 1,16$$

Alle obenerwähnten Eigenschaften und besonders der hohe Phosphorgehalt des Amyloids liessen auf den ersten Blick vermuthen, dass diese Substanz zu der Gruppe der sogenannten Nucleoproteide gehört. Morochowetz¹⁾ fand in dem nach der Kühne-Rudneffschen Methode dargestellten Amyloid einen noch höheren Phosphorgehalt, nämlich 3,1 Proc., was ihn veranlasste, das Amyloid den Nucleinen zuzuzählen. Wenn aber das Amyloid wirklich ein Nucleoproteid wäre, dann müsste ein amyloidhaltiges Organ phosphorreicher sein als ein amyloidfreies.

Zur Untersuchung dieser Frage führte ich vergleichende Phosphorbestimmungen von amyloidentarteten und verschiedenen anderen Lebern aus. Um besonders das Parenchym auf seinen Phosphorgehalt zu untersuchen, verrieb ich die Organe (Spirituspräparate) auf einem dichten Nickeldrahtnetz. Das durch das letztere gesiebte Parenchym wurde sorgfältig mit Alkohol und Aether ausgewaschen. Die Bestimmung des Phosphors geschah nach dem Verbrennen der Substanz mit Soda und Salpeter, nach der von Miescher²⁾ angewandten Methode. Die Resultate sind, auf Trockensubstanz berechnet, folgende:

Präparat I.				
Leber (Stauungsatrophie)	0,2435	Substanz gaben	0,0050	$Mg_2P_2O_7 = 1,31 \text{ Proc. } P_2O_5$
Präparat II.				
Amyloidleber . . .	0,2555	Substanz gaben	0,0064	= = 1,60 = =
Präparat III.				
Parench. Hepatitis .	0,2695	Substanz gaben	0,0074	= = 1,75 = =
Präparat IV.				
Amyloidleber . . .	0,2565	Substanz gaben	0,0062	= = 1,54 = =
Präparat V.				
Leber (Stauungsatrophie)	0,3010	Substanz gaben	0,0105	= = 2,23 = =
Präparat VI.				
Amyloidleber . . .	0,2715	Substanz gaben	0,0050	= = 1,17 = =

Aus diesen Analysen ersehen wir, dass ein Unterschied zwischen dem Phosphorgehalt der amyloidhaltigen und der amyloidfreien Lebern nicht besteht. Es war daher

1) Petersb. medic. Wochenschr. Nr. 10. 1878.

2) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol. Bd. XXXVII, 1896, S. 100.

die Annahme gerechtfertigt, dass der Phosphorgehalt des Amyloids durch beigemengte Nucleïne bedingt ist.

Um das Amyloid von diesen Nucleïnen zu befreien, benutzte ich die Unlöslichkeit derselben in Barytwasser, in welchem das Amyloid leicht löslich ist. Zu diesem Zwecke stellt man sich einen aus der ammoniakalischen Lösung frisch gefällten Niederschlag des phosphorhaltigen Amyloids dar, den man sorgfältig durch Decantiren mit Wasser auswäscht und sodann mit einer Barytlösung im Ueberschuss behandelt. Nicht so leicht gelingt die Auflösung der Amyloidsubstanz in Barytwasser, wenn man mit dem letzteren die getrocknete Substanz statt des frisch gefällten Niederschlages aufzulösen versucht.

Die Barytlösung des Amyloids wird filtrirt, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert, wobei sich ein reichlicher Niederschlag bildet, der nach dem Auswaschen die Amyloidreaction giebt.

Der im Baryt unlösliche Rückstand, mit Wasser und schwacher Säure zur Entfernung des Baryts ausgewaschen, giebt keine Amyloidreaction und enthält eine nicht unbeträchtliche Menge Phosphor, der wahrscheinlich Nucleoalbuminen angehört. Die Amyloidsubstanz wird auf diese Weise vollkommen phosphorfrei erhalten, wie die weiter unten aufgeführten Analysen darthun.

Die folgenden Versuche zeigen, dass die Nucleïne auch nach der Verdauung in Barytwasser ganz unlöslich sind.

Versuch I. Paranucleïn, aus dem Caseïn der Milch durch Verdauung mit Magensaft erhalten, wurde in schwachem Ammoniak aufgelöst, durch Ansäuern ausgefällt, mit Wasser ausgewaschen und mit Baryt behandelt. Die abfiltrirte alkalische Flüssigkeit giebt mit Salzsäure auch nach längerem Stehen keinen Niederschlag. Das Paranucleïn ist also vom Baryt nicht aufgelöst worden.

Versuch II. Eine normale Pferdeleber wurde zerkleinert und einige Tage lang mit Ammoniak behandelt. Der Rückstand wurde 5 Tage lang der Verdauung durch Magensaft unter mehrmaliger Erneuerung des letzteren unterworfen. Ich erhielt einen beträchtlichen, dunkelbraunen, wahrscheinlich melaninhaltigen, unverdauten Rückstand, der Phosphor enthielt und in Ammoniak leicht löslich war. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung entstand ein beträchtlicher Niederschlag. Letzterer wurde mit Baryt behandelt und das Filtrat angesäuert. Dabei entstand aber kein Niederschlag, so dass also von den Nucleïnsubstanzen nichts gelöst war.

Versuch III Kalbsmilz. Die Pulpa wurde ausgeschabt, mit Wasser und sodann mit schwachem Ammoniak gewaschen, dann mit

Magensaft verdaut, der unverdaut gebliebene Rückstand in Ammoniak aufgelöst, aus der filtrirten Flüssigkeit durch Ansäuern ausgefällt und der Niederschlag mit Baryt behandelt. Das alkalische Filtrat gab beim Ansäuern keinen Niederschlag.

Diese Untersuchungen beweisen erstens die vollkommene Unlöslichkeit der Nucleïne im Barytwasser und zeigen zweitens, dass durch die Verdauung mit Magensaft und durch das Auflösen des unverdaut gebliebenen Rückstandes in Ammoniak eine vollkommene Isolirung des Amyloids nicht erreicht wird. Auch geht drittens aus ihnen hervor, dass im Parenchym der normalen Organe keine amyloidähnlichen Substanzen enthalten sind.

Wir sagen „im Parenchym“, da hinsichtlich der normalen Gefässwandungen und der elastischen Elemente dieser Satz eine gewisse Einschränkung erleidet, wie wir weiter unten sehen werden.

IV. Ueber die Farbenreactionen der Amyloidsubstanz.

Wie bekannt, gelten bei den pathologischen Anatomen die Reactionen der Amyloidsubstanz auf Jod und Anilinfarbstoffe als äusserst beweisend, als klassisch. Wenn ein unter dem Mikroskop dem Amyloid ähnlicher Körper durch Jod und Anilinfarbstoffe nicht die charakteristische Färbung annimmt, so schliesst man daraus, dass es kein Amyloid ist, und rechnet ihn zuweilen zu den sogenannten Hyalinen, die von manchen Autoren, wie v. Recklinghausen, Raehlmann, Klebs, Litten, Stilling u. A., als Vorstufe des Amyloids angesehen werden. Hinsichtlich der Frage indess, welche von diesen beiden Reactionen für die Gegenwart des Amyloids die beweiskräftigste sei, die mit Jod oder mit dem Anilinfarbstoffe, herrscht zwischen den Autoren noch keine Uebereinstimmung. Indem ich den Leser auf eine frühere Arbeit von mir¹⁾ verweise, in der die Literatur über diese Frage ausführlich berücksichtigt ist, will ich hier nur darauf hindeuten, worauf hauptsächlich die Verschiedenheit dieser Ansichten beruht. Bekanntlich nehmen die sogenannten Corpora amylacea bei der Behandlung mit Jod manchmal eine sehr deutliche, zuweilen aber nur eine geringe oder gar keine Färbung an. Zuweilen erhält man in den centralen Schichten dieser Körper eine Amyloidreaction, in den peripheren keine (Jürgens). Dasselbe trifft oft bei der Amyloidentartung zu, wo einzelne entartete Partien eine deutliche Jodreaction geben, andere daneben liegende und optisch

1) Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol. Nr. 2, S. 106. Paris 1897.

ganz ähnliche dagegen gar keine (Cohnheim, Cornil, Jürgens, Ziegler, Raehlmann, Litten u. A.). Den deutlichsten Beweis für das unregelmässige Eintreten der Jodreaction giebt ein vor kurzem von Hansemann¹⁾ beschriebener Fall von Amyloidentartung bei Syphilis. Degenerirt waren Milz, Leber, Nieren, Darmkanal, Glandula thyreoidea, zahlreiche Lymphdrüsen und das Herz. Eine Jodreaction gaben nur Nieren, der Darmkanal, die Glandula thyreoidea und die grossen Herzgefässe, an den übrigen Organen blieb die Reaction aus, obgleich die amyloide Degeneration dieser Organe nicht nur mikro-, sondern auch makroskopisch festgestellt werden konnte. Die Färbung mit Methylviolett trat jedoch bei allen diesen Organen ein. Eine ähnliche Beobachtung machte ich bei einer Amyloidniere vom Menschen (siehe meine Arbeit). Ueberdies ist es bekannt, dass deutliche Amyloidreactionen, besonders mit Jod, im Allgemeinen nur frische oder höchstens nur kurze Zeit in Alkohol, Chromsäure oder Müller'scher Flüssigkeit aufbewahrte Präparate zeigen. Die Jodreaction verschwindet auch sehr leicht, wenn man das amyloide Gewebe vorher mit Kali- oder Natronlösung von 0,5 Proc. behandelt und sodann neutralisirt und sorgfältig mit Wasser auswäscht (Dickinson, Semljanizin).²⁾ Von der äusserst geringen Beständigkeit der Jodreaction konnte ich mich auch bei der von mir an Thieren experimentell hervorgerufenen Amyloiddegeneration überzeugen. Diese Reaction gelingt nur in den am weitesten fortgeschrittenen Fällen von Amyloidentartung, besonders an frischen, mit Alkohol und Müller'scher Flüssigkeit nicht behandelten Präparaten. Präparate, die in frischem Zustande deutliche Jodreaction gaben, verloren oft diese Fähigkeit schon nach 24stündiger Aufbewahrung in Alkohol. Die Anfangsstadien des Amyloids geben nur mit Anilinfarbstoffen eine Färbung. Aber auch von dieser Färbung durch Anilinfarbstoffe kann man sagen, dass sie, obgleich sie in allen Fällen gelingt, nach der Behandlung mit Alkohol oder Müller'scher Flüssigkeit in der Regel sehr an Deutlichkeit verliert. Anschliessend hieran sei noch bemerkt, dass sowohl das experimentelle Amyloid, als auch die von den Pathologen bei Thieren beobachteten Fälle keinen Zweifel mehr lassen, dass die Amyloidreactionen mit Anilinfarbstoffen constanter und daher beweisender sind, als die mit Jod. Wie verhält sich nun die von uns isolirte Amyloidsubstanz diesen Reactionen gegenüber,

1) Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anatomie, 1893, S. 855.

2) Cit. nach Pachutine. Cours d. allg. u. experim. Pathol. Bd. I, 1885, S. 132 (russisch).

und wovon können die oben angeführten Launen der Amyloidreactionen abhängen?

Wir müssen zur Beantwortung dieser Fragen Schritt für Schritt die Farbenreactionen des Amyloids in den verschiedenen Stadien seiner Reindarstellung verfolgen. Im Nachstehenden betrachten wir in dieser Richtung die Präparate, von denen weiter unten die Analysenergebnisse mitgetheilt sind.

Präparat I. Die frische Leber giebt makroskopisch sowie mikroskopisch deutliche Reaction mit Jod und Methylviolett. Nach dem Auswaschen mit Wasser und mit schwacher Ammoniaklösung und nach der Einwirkung von Magensaft zeigt die unverdaut gebliebene Masse gleichfalls deutliche Amyloidreaction. Darauf wird sie mit schwacher Ammoniaklösung behandelt, die Lösung abfiltrirt, das Amyloid durch Ansäuern mit Salzsäure in flockigem Zustande ausgefällt, in Baryt gelöst und von neuem durch Ansäuern ausgefällt.

Dieser Niederschlag giebt keine Jod-, aber eine deutliche Methylviolettreaction. Wird diese Substanz in schwacher Ammoniakflüssigkeit aufgelöst und die Lösung langsam eingedampft, so giebt das dabei sich bildende glasige Häutchen eine deutliche Reaction mit Jod, die aber ungleich schwächer ist, als die ursprüngliche.

Präparat II. Leber, Spirituspräparat, giebt deutliche Amyloidreactionen. Es wird ganz wie das vorige behandelt. Beim Ansäuern der nach der Verdauung erhaltenen ammoniakalischen Lösung fiel ein gallertiger Niederschlag aus. Niederschlag aus der Barytlösung gab eine deutliche Reaction mit Jod und Methylviolett.

Präparat III. Frische Milz. Starke, diffuse Amyloidartung (Speckmilz); Jod färbt mit rother, Jod und Schwefelsäure mit dunkel grünblauer Farbe. Nach der Verdauung mit Magensaft blieb die Jodreaction unverändert, mit Jod und Schwefelsäure zeigte sich aber nicht mehr der frühere blaue Schimmer, sondern nur eine intensivere Rothfärbung. Nach der Auflösung in Ammoniak und nach dem Ausfällen aus dieser Lösung färbte sich die Substanz deutlich mit Methylviolett, aber nur schwach mit Jod. Nach dem Trocknen trat die Färbung mit Jod deutlicher hervor.

Präparat IV. Leber. Spirituspräparat. Gab deutliche Amyloidreactionen. Nach der Verdauung und Auflösung in Barytwasser, ohne vorherige Behandlung mit Ammoniak, wobei nur wenig Substanz in Lösung ging, trat nur mit Methylviolett, nicht aber mit Jod eine Färbung ein.

Die übrigen von mir nach dieser Richtung untersuchten Präparate gaben theils deutliche Reaction mit Jod, theils blieb diese

fast völlig aus. Mit Methylviolett gelang die Reaction immer. Ein Präparat von Pferdeamyloidleber verlor schon nach der Verdauung in hohem Grade die Fähigkeit, sich durch Jod zu färben. Nach seiner Auflösung in Ammoniak und Baryt gab es gar keine Reaction mehr¹⁾.

Das isolirte Amyloid giebt also stets die Färbung mit Methylviolett, aber durchaus nicht immer die Reaction mit Jod. Aus den vorstehend mitgetheilten Thatsachen kann man daher mit vollem Rechte schliessen, dass die Reaction mit Jod nicht von der chemischen Natur des Amyloids, sondern von seiner physikalischen Beschaffenheit abhängt. Dafür spricht besonders der Umstand, dass die Reaction verschwindet, sobald die Substanz in den gelösten Zustand übergeht, und dass sie gelingt, wenn das Präparat, wie oben erwähnt, beim Eindampfen eine glasige Beschaffenheit, wie in den Geweben, angenommen hat.

Maroschowitz sprach sich schon längst in diesem Sinne aus, indem er die Jodreaction nicht für charakteristisch hält und darauf hinweist, dass je weniger feucht das Amyloid ist, umso besser sich die Substanz mit dem Jod imprägnirt (*loc. cit.* p. 313). Auch nach Leber²⁾ hängt die Amyloidreaction mit Jod hauptsächlich von bestimmten physikalischen Eigenschaften und von dem Aggregatzustand seiner Moleküle, aber nicht von seiner chemischen Zusammensetzung ab. Wir müssen daher bekennen, dass die Färbung des Amyloids durch Jod analog ist denjenigen physikalischen Vorgängen, die in der Färberei eine so wichtige Rolle spielen, indem zur Fixirung bestimmter Farbstoffe eine vorherige Veränderung der Oberfläche der zu färbenden Gewebe durch die sogenannten Beizen nothwendig ist.

V. Die elementare Zusammensetzung der Amyloidsubstanz.

Aus frischen Amyloidorganen erhält man das Amyloid ganz farblos, aus Spirituspräparaten mit einem Stich ins Gelbliche. Zur Analyse wurde die Substanz im Vacuum über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur bis zum constanten Gewicht getrocknet.

Dazu waren gewöhnlich 1—2 Wochen erforderlich. Auf die Gegenwart von Phosphor wurde jedesmal sorgfältig untersucht und dabei so verfahren, als ob es sich um eine quantitative Bestimmung nach dem von Miescher (*loc. cit.*) angegebenen Verfahren handelte.

1) Das Amyloid vom Pferde konnte ich nicht analysiren, da es beim Trocknen aus unbekannten Gründen ganz dunkelbraun wurde.

2) Arch. f. Ophthalmol. Bd. XXV, 1879, S. 257.

Nur in einem Falle konnte seine Menge quantitativ bestimmt werden, zwei andere Präparate enthielten nur unwägbare Spuren davon.

Die Stickstoffbestimmung geschah nach Kjeldahl; die Verbrennung wurde im Schiffchen mit vorgelegtem Bleichromat ausgeführt. Die nachstehenden Zahlen sind auf aschefreie Substanz berechnet. Die Menge der Asche betrug bei Präparat I: 0,08 Proc., bei Präparat II: 1,16 Proc., bei Präparat III: 0,4 Proc.

Analysirt wurden 4 Präparate (I—IV).

	I	II	II	III	IV
C	49,94 Proc.	49,06 Proc.	48,86 Proc.	48,94 Proc.	50,38 Proc.
H	6,65 "	6,75 "	6,76 "	7,02 "	6,80 "
N	13,79 "	13,87 "	— "	14,07 "	13,94 "
S	2,89 "	2,65 "	— "	2,83 "	— "
P	0,10 "	Spuren "	— "	Spuren "	— "

Wie wir sehen, giebt das von mir isolirte Amyloid ganz andere Zahlen als die bisher analysirten Präparate. Besonders bemerkenswerth ist der hohe Schwefel- und der verhältnissmässig geringe Stickstoffgehalt des Amyloids. Die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen machen es aber wahrscheinlich, dass die amyloide Substanz nicht in allen Fällen die ganz gleiche Zusammensetzung hat.

VI. Die Chondroitinschwefelsäure als Zersetzungsproduct des Amyloids.

Es musste nun vor allen Dingen untersucht werden, ob nicht in dem von mir isolirten Amyloid eine charakteristische eiweissfreie Gruppe enthalten ist, ähnlich wie eine solche in den Mucinen und den meisten Nucleoalbuminen sich findet. Zur Aufsuchung einer solchen Atomgruppe liess sich die Behandlung mit essigsäurem Kupfer und Kalilauge vortheilhaft verwenden. Dabei wurde in der bekannten, weiter oben angegebenen Weise verfahren. Aus der Auflösung der erhaltenen eiweissfreien Kupferverbindung in Essigsäure fällte Alkohol eine weisse, flockige Masse, die sich bei der genaueren Untersuchung als Chondroitinschwefelsäure erwies.

Die nach der obigen Behandlung von dem chondroitinschwefelsäurem Kupfer getrennte violette alkalische Flüssigkeit wurde mit schwacher Essigsäure angesäuert, wobei sich ein reichlicher weisser, flockiger Niederschlag bildete, der aus der Kupferverbindung eines Eiweissstoffes bestand, der weder mit Jod, noch mit Methylviolett eine charakteristische Reaction gab. Das Amyloid zerfällt also bei dieser Behandlung in einen Eiweissstoff und in Chondroitinschwefelsäure.

Nach diesem Ergebniss erschien es von vornherein sehr wahrscheinlich, dass die Färbungen des Amyloids mit Jod und mit Methylviolett seinen Chondroitinschwefelsäure-Componenten zuzuschreiben

sind. Versetzt man eine Lösung von chondroitinschwefelsaurem Natrium mit Methylviolett, so entsteht ein Niederschlag, der nach dem Auswaschen mit Wasser eine rosarothte Farbe annahm, ähnlich wie das Amyloid selbst. Die Behandlung des Methylvioletts mit Essig- oder Salzsäure ergiebt kein ähnliches Resultat. Die Reaction mit Jod anzustellen, ist nicht bequem, da die Chondroitinschwefelsäure mit schwacher Jodjodkaliumlösung keinen Niederschlag giebt, und die Lösung selbst nur die braune Jodfarbe zeigt. Man kann daher auf Grund des angegebenen Verhaltens mit Sicherheit annehmen, dass die charakteristische Färbung des Amyloids durch Anilinfarbstoffe von der Chondroitinschwefelsäure abhängig ist.

Nach den Untersuchungen von Schmiedeberg (c. l.) sind die Verbindungen der Chondroitinschwefelsäure mit eiweissartigen Stoffen den Verbindungen der letzteren mit den Gerbsäuren analog. Doch ist die Bindung derselben mit den genannten Stoffen eine sehr verschiedene, bald eine sehr lockere, wie mit dem eigentlichen Eiweiss, bald eine sehr feste, wie mit dem Collagen, worauf bekanntlich die Lederfabrikation beruht. In den im Knorpel vorkommenden und den künstlich dargestellten Verbindungen der Chondroitinschwefelsäure ist die letztere nur sehr locker mit dem Eiweiss und den eiweissartigen Stoffen verbunden. Es fragt sich nun, ob die Chondroitinschwefelsäure in dem Amyloid auch nur locker salzartig gebunden ist, oder ob das letztere in dieser Beziehung mit dem Leder zu vergleichen ist? Es ist oben angegeben, dass bei der Darstellung des Amyloids das zerkleinerte Organ so lange sorgfältig mit verdünnter Ammoniaklösung ausgewaschen wurde, bis die Waschflüssigkeit keine nachweisbare Menge von Chondroitinschwefelsäure mehr aufnahm.

Soweit die letztere bloß locker salzartig gebunden ist, wird sie bei dieser Behandlung vollständig entfernt. Man kann also annehmen, dass in den amyloidhaltigen Organen zwar auch locker gebundene Chondroitinschwefelsäure vorkommt, die durch Ausziehen mit Ammoniak entfernt wird, dass aber diese Säure in dem Amyloid in festerer Bindung mit dem Eiweiss sich findet, etwa wie die Gerbsäure im Leder. Diese Ansicht wird auch durch folgende Beobachtung bestätigt. Wenn man das aus der ammoniakalischen Lösung gefällte Gemenge von Amyloid und Nucleoalbuminen mit Barytwasser extrahirt hat, so lässt sich in dem Rückstand mittelst Kupfer und Kali nach der Schmiedeberg'schen Methode dennoch Chondroitinschwefelsäure nachweisen. Da die Letztere in Barytwasser leicht löslich ist, so könnte sie sich nicht in dem Rückstand finden, wenn sie hier im

locker gebundenen, salzartigen Zustände enthalten wäre. Das Amyloid ist in Barytwasser nicht so leicht löslich wie die freie Chondroitinschwefelsäure, und es ist daher von demselben noch ein Rest neben dem Nucleoalbumin in dem Rückstand zurückgeblieben. Bei der Behandlung mit Kupfer und Kali wird dann die Chondroitinschwefelsäure — vielleicht durch Verseifung — frei gemacht. Eine solche Spaltung wird wohl auch durch stärkere Säuren herbeigeführt. So erklärt sich dann auch die längst gemachte Angabe, dass das Amyloid bei der Einwirkung von stärkeren Säuren und Alkalien in gewöhnliche Eiweissformen — Alkali- und Acidalbumin — übergeht. Die Chondroitinschwefelsäure hat man dabei einfach übersehen. Interessant ist die Beobachtung von Morochowetz (l. c.), der in dem nach Kühne isolirten Amyloid beim Kochen mit Schwefelsäure eine Kupferoxyd in alkalischer Lösung reducirende Substanz fand, die aber nicht Zucker war, — was ihn veranlasste, das Amyloid mit dem Mucin zu indentificiren.

Um festzustellen, ob auch im Knorpel eine amyloid-ähnliche, festere Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit einer eiweissartigen Substanz enthalten ist, behandelte ich zerkleinerte Nasenknorpel des Schweines in der bei der Verarbeitung der Amyloidleber angegebenen Weise, indem ich sie mit Ammoniak extrahirte, dann der Verdauung unterwarf und hierauf aus dem unverdauten Rückstand Amyloid darzustellen suchte. Ich erhielt schliesslich nur eine sehr geringe Menge einer Substanz, die Chondroitinschwefelsäure enthielt und Aehnlichkeit mit dem Amyloid hatte. Es ist daher die im Knorpel in reichlicher Menge enthaltene Chondroitinschwefelsäure vollständig oder nahezu vollständig in der lockeren, salzartigen Verbindung enthalten, wie sie von Schmiedeberg beschrieben ist. Dass bei dieser Untersuchung des Knorpels nicht nennenswerthe Mengen amyloidähnlicher Substanz gefunden wurden, ist eine weitere Stütze für die Annahme, dass in dem Amyloid die Chondroitinschwefelsäure sich in fester Bindung findet.

Auch aus der künstlich dargestellten Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit Eiweiss lässt sich die erstere durch Alkalien leicht entfernen. Ich brachte durch Salzfällung gereinigtes und hierauf durch Erhitzen coagulirtes Serumalbumin in eine schwach angesäuerte Lösung von chondroitinschwefelsaurem Natrium, das ich mir nach dem von Oddi (l. c.) beschriebenen Verfahren dargestellt hatte, und liess die Masse einige Stunden lang bei mässiger Temperatur auf dem Wasserbade stehen. Hierauf behandelte ich die Eiweisscoagula mit schwacher Ammoniakflüssigkeit, wusch sie mit

Wasser aus und untersuchte sie mittelst Kupfer und Kali auf Chondroitinschwefelsäure. Doch fand sich von der letzteren keine Spur darin; sie war also vollständig durch das Extrahiren mit Ammoniakflüssigkeit entfernt. Auch wurde das extrahirte Eiweiss bei der Verdauung mit Magensaft vollständig gelöst, ohne einen Rückstand zu hinterlassen.

Es kann daher keinem Zweifel unterliegen, dass das genuine, in den entarteten Organen enthaltene Amyloid eine feste, vielleicht esterartige, in schwachen Alkalien unlösliche Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit einer Eiweisssubstanz ist.

Das durch die Verdauung mit Magensaft in Alkalien löslich gewordene, oben beschriebene und analysirte Product ist ein modificirtes Amyloid, in welchem wahrscheinlich an Stelle des Albumins eine Albumose getreten ist.

Ob bei der durch die Verdauung bewirkten Umwandlung das ursprünglich mit der Chondroitinschwefelsäure verbundene Eiweiss bloß in Albumosen umgewandelt ist, und diese vollständig mit der Säure in der früheren festen Verbindung geblieben sind, oder ob ein Theil des Eiweiss abgespalten und der Rest als Albumose mit der Chondroitinschwefelsäure verbunden geblieben ist, und ob dieses verdaute Amyloid eine feste oder salzartige Verbindung bildet, lässt sich zur Zeit mit einiger Sicherheit nicht entscheiden. Dass die salzartige Natur desselben nicht ausgeschlossen ist, dafür spricht der Umstand, dass es gelingt, ganz ähnliche Verbindungen auch künstlich darzustellen.

Ich unterwarf das oben erwähnte coagulirte, mit Chondroitinschwefelsäure behandelte und dann nur mit Wasser — nicht mit Ammoniak — ausgewaschene Serumalbumin der Verdauung mit Magensaft, und es blieb jetzt ein unverdauter Rückstand zurück, aus welchem ich durch Extrahiren mit Ammoniak und Barytwasser in der bei der Darstellung des verdauten Amyloids angegebenen Weise eine chondroitinschwefelsäurehaltige Substanz gewann, welche in ihren Eigenschaften, namentlich hinsichtlich ihrer Löslichkeit in Ammoniak und Barytwasser im Wesentlichen mit dem Amyloid übereinstimmte. Sie enthielt 2,39 Proc. Schwefel, gab aber mit Jod keine, mit Methylviolettlösung nur eine unvollkommene Amyloidreaction. Es handelt sich hier offenbar um eine salzartige, in freiem Zustande in Wasser unlösliche Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit einer Albumose, mit der das verdaute Amyloid nicht völlig übereinstimmt, so dass also die festere Bindung der beiden Componenten in dem letzteren nicht ausgeschlossen ist.

VII. Ueber das Vorkommen amyloider Substanzen in normalen Organen.

Es ist bereits oben angegeben, dass in der Wandung der Aorta nicht unbeträchtliche Mengen von Chondroitinschwefelsäure enthalten sind. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob nicht auch in diesem Gebilde Amyloid oder eine dem Amyloid analoge Substanz vorkommt. Dieses Gewebe giebt zwar im normalen Zustande keine Amyloidreaction, wir haben aber gesehen, wie die chemische Beschaffenheit dieser Substanz unabhängig von diesen Reactionen ist. Bei der Untersuchung verfuhr ich in der oben angegebenen Weise.

Die normale Aortenwandung vom Pferd wurde von den sie umgebenden Geweben befreit, mit Wasser abgewaschen, in der Fleischhackmaschine zerkleinert, erschöpfend mit Ammoniak extrahirt und mit Magensaft verdaut. Selbst nach intensiver, 5—7 Tage und noch länger dauernder Verdauung und bei öfterem Erneuern des Magensaftes blieb immer ein beträchtlicher Theil unverdaut, der völlig weiss war, eine feinflockige Beschaffenheit hatte und gegen Ammoniak und Barytwasser sich genau wie das verdaute Amyloid verhielt. Der aus der ammoniakalischen Lösung gefällte Niederschlag enthielt stets Phosphor, während der in Barytwasser lösliche Antheil phosphorfrei war.

Methylviolett und bisweilen auch Jod geben an einzelnen Theilchen Amyloidreaction, an anderen nicht. Durch die Behandlung mit Kupfer und Kali wurde Chondroitinschwefelsäure gewonnen.

Bei der Analyse zweier gesondert dargestellter, im Vacuum über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur getrockneter Präparate wurden folgende, auf aschefreie Substanz berechnete Zahlen erhalten.

	I	II	III
C	50,34	50,73	50,48
H	7,15	7,28	7,30
N	13,97	—	13,71
S	2,36	—	2,67
P	Spuren		Spuren

Wir haben es also sowohl hinsichtlich der Eigenschaften als auch nach der Zusammensetzung unzweifelhaft, wenn nicht mit wahren Amyloid, so doch mit einer dem letzteren ganz analogen Substanz zu thun. Sie ist in der Arterienwandung wie das Amyloid, in einer, in schwächeren Alkalien unlöslichen Form, als festere, nicht salzartige Chondroitinschwefelsäure-Verbindung enthalten und wird wie jenes bei der Verdauung mit Magensaft in Alkalien, selbst in Barytwasser leicht löslich. Wahrscheinlich unterscheidet sie sich nur dadurch von dem pathologischen Amyloid, dass in ihr der Eiweisscomponent anders beschaffen ist, als in jenem.

Der Nachweis einer amyloidartigen Substanz in der Arterienwandung erhält eine besondere Bedeutung durch den Umstand, dass bekanntlich die Amyloidentartung häufig das Gefäßsystem, besonders die kleineren Arterien, also die Elemente betrifft, die auch im normalen Zustande Chondroitinschwefelsäure enthalten.

Auch das Knorpelgewebe macht in dieser Beziehung keine Ausnahme, da bekanntlich viele Knorpel, z. B. am Becken, an der Wirbelsäule, am Sternoclaviculargelenk, insbesondere in senilem Zustande, sehr oft mit Jod und Anilinfarbstoffen Amyloidreactionen geben. Die Pathologen bezweifeln zwar, dass man es hier mit einer Amyloidentartung zu thun hat, da, wie Virchow¹⁾ bemerkt, der die Amyloidreaction gebende Theil des Knorpelgewebes sich im Aussehen durch nichts von den benachbarten Theilen unterscheidet. Aber bei dem Auftreten von Amyloid braucht es sich gar nicht um eine morphologische Veränderung des Knorpelgewebes zu handeln, sondern es geht dabei bloß eine oder die andere der in diesem Gewebe in reichlicher Menge enthaltenen salzartigen Chondroitinschwefelsäure-Verbindung in die festere, amyloidartige Verbindung über.

Auch aus anderen normalen Geweben erhielt ich nach der Er schöpfung mit Ammoniak und nach der Verdauung derartige Chondroitinschwefelsäure-Verbindungen, obgleich stets nur in sehr geringer Menge, so aus dem Nackenband vom Rind, aus dem Stroma der Kalbsmilz und auch Spuren aus der Schleimhaut des Schweinsmagens. Da, wie oben angegeben ist, das Parenchym der normalen Unterleibsorgane stets frei von Chondroitinschwefelsäure ist, so kann man annehmen, dass die geringen Mengen amyloidähnlicher Substanz, die ich in den genannten Fällen fand, den Wandungen der kleineren Arterien entstammen.

Bekanntlich sind alle durch pathologische Processe erzeugten chemischen Producte, wie Fett, Kohlehydrate, Mucine, verschiedene Eiweisskörper, Pigmente u. A. bereits immer im normalen Organismus enthalten. Es besteht hinsichtlich des Vorkommens dieser Körper in normalen und pathologischen Fällen nur ein quantitativer, kein qualitativer Unterschied. Nur das Amyloid schien in dieser Hinsicht bisher eine Ausnahme zu bilden als ein dem normalen Organismus ganz fremdartiger Körper. Seine Eigenschaften, besonders seine Farbenreactionen, stellten es als solchen hin.

1) Cit. nach Pachutine loc. cit.

Jetzt aber sehen wir, dass dem Amyloid analoge Körper auch im normalen Organismus vorkommen und anscheinend ziemlich verbreitet sind, und dass das Amyloid nur eine eigenartige Verbindung von Eiweiss und Chondroitinschwefelsäure ist, zweier durchaus normaler Körperbestandtheile. Wir haben es also bei der Amyloidentartung mit dem Auftreten einer mit einem normalen Körperbestandtheil wenigstens dem Wesen nach übereinstimmenden Substanz an einem Orte zu thun, wo sie nicht hingehört. Das Gesetz, dass pathologische Vorgänge und Producte ihre physiologischen Vorbilder haben, findet also auch hier seine Bestätigung. Nur ist in der Arterienwand die amyloidartige Substanz gleichmässig diffus verbreitet, also gleichsam verdünnt und giebt deshalb keine Farbenreactionen, während sich das Amyloid in den entarteten Organen mehr zusammengehäuft findet und infolge dessen mehr oder weniger leicht sichtbar und durch Reagenzien nachweisbar geworden ist.

Strassburg, Juni 1897.