Aus der Inneren Abteilung des Krankenhauses Charlottenburg-Westend. (Dirigierender Arzt: Prof. Dr. E. Grawitz †.)

Versuche über die Einwirkung der Leberautolyse auf Tuberkulin.

Von Dr. F. Dittborn und Oberarzt Dr. Werner Schultz.

Gegenüber den zahlreichen Untersuchungen über den Gehalt von tuberkulösen Organen, von normalen und pathologischen Flüssigkeiten des tuberkulösen Organismus an Antituberkulin und Tuberkulinantigen fanden wir in der Literatur keine näher ausgeführten Angaben über die Einwirkung normaler autolisierender Organe auf Tuberkulin.

Dieser Gegenstand besitzt zweifellos theoretisches und auch praktisches Interesse, da die Frage, wie Tuberkulin aus einem Organismus, speziell einem nichttuberkulösen, verschwindet, wohl nicht als gelöst gelten kann.

Wir stellen uns bei unseren Untersuchungen auf den Boden der Anschauung, die Vernon¹⁾ in seiner Einleitung über intrazelluläre Fermente dahin formuliert, daß jedes Enzym, das nach dem Tode einem Gewebe extrahiert werden kann, von funktioneller Bedeutung für das Leben war.

Wir wollen das von uns gewonnene Resultat vorausschicken, das dahin lautet, daß durch 24stündige Leberautolyse eine bemerkenswerte Veränderung des Tuberkulins in seiner Ablenkbarkeit gegenüber spezifischem Tuberkuloseantiserum bewirkt wird, während nach gleich langer Autolysewirkung die Wirkung des veränderten Tuberkulins bei der Prüfung durch Kutanreaktionen auf der menschlichen Haut eine kaum merkliche Abnahme zeigt, die erst im Verlaufe weiterer Tage deutlicher wird.

Da man bei der Isolierung des wirksamen Prinzips im Tuberkulin bisher nicht sehr weit gekommen ist, so lassen sich über den Mechanismus, auf dem die kurz angegebene Veränderung der Ablenkbarkeit des Tuberkulins zustande kommt, nur Vermutungen aufstellen.

Geht man von der Anschauung aus, daß die Albumosen, wenn auch nicht der Giftstoff selbst, so doch Träger der spezifischen Wirkung sind, so kommen in unseren Versuchen solche Enzyme in Frage, welche gegen Proteosen und Peptone gerichtet und für die von Vernon die Ausdrücke „Endoerepsin“ oder „Ereptase“ in Vorschlag gebracht sind.

Gegenüber der bisher mangelnden Präzisierung des Tuberkulinantigens ist es jedoch vorzuziehen, auf eine theoretische Erklärung vorläufig zu verzichten und sich mit der Feststellung des Tatsächlichen zu begnügen, die für sich sehr zahlreiche vergleichende Versuche verlangt, da die Technik gerade der Tuberkulinablenkung diffizil ist und man erst auf Grund umfangreicheren Materials ein Urteil gewinnt. Wir bringen

¹⁾ H. M. Vernon, Ergebnisse der Physiologie 1910, No. 9.

aus unseren Versuchen dasjenige, was schließlich aus einer größeren Anzahl von Versuchen als typisch imponierte.

Die Technik, deren wir uns bedienten, war folgende:

Eine bestimmte Quantität von zur Hälfte mit Aqua destillata verdünntem, nach R. Kochs Vorschrift hergestelltem Alt-Tuberkulin, z. B. 50,0, wurde mit 5,0 Leberbrei gemischt. Die Leber entstammte einem frisch getöteten Kaninchen und wurde steril entnommen, durch Waschen mit Aqua destillata möglichst von Blut befreit und mit Schere und Pinzette zu Brei verarbeitet. Das Gemenge wurde mit 0,5 ccm Chloroform versehen, gut durchgeschüttelt und in den Brutschrank von 37° gebracht. Nach bestimmten Zeitabschnitten, Minuten, Stunden, Tagen wurde ein kleines Quantum entnommen, kurz aufgekocht und durch scharfes Zentrifugieren von korpulären Elementen befreit. Die einzelnen Proben wurden bei Zimmertemperatur oder zum Vergleich im Brutschrank aufbewahrt, um alsdann nebeneinander im Vergleich mit der Ausgangslösung, dem 50%igen Tuberkulin, im Komplementablenkungsversuch oder der Kutanprobe untersucht zu werden.

Das Aufkochen bewirkt gleichzeitig die Aufhebung der Fermentwirkung und die Inaktivierung. Alt-Tuberkulin (50%) wird hierdurch in seinen antigenen Eigenschaften nicht geschädigt.

Was die Technik der Komplementablenkung betrifft, so benutzten wir in jedesmal ausgetrierter Menge die doppelt komplett lösende Komplementdosis von Meerschweinchenserum, die doppelt komplett lösende Dosis Kaninchenhammelblutambozepterserum und als Erythrozyten eine 5%ige gewaschene Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen. Die Bindung geschah eine Stunde bei 37°, der Hämolyse-Versuch wurde nach weiterem zweistündigen Aufenthalt bei 37° als beendet angesehen.

Bemerkt muß werden, daß der Ausfall der Versuche in sehr hohem Grade von der Menge des angewandten Komplements abhängt. Es genügt ein geringer Ueberschuß von Komplement, um die Ablenkung des Autolyseproduktes zum Verschwinden zu bringen (besonders nach längerer Einwirkung der Autolyse), während ein kleines Defizit Additionshemmungen erkennen läßt. Man ist aber berechtigt, auch letztere Untersuchungen zum Teil als beweiskräftig anzusehen, da sie, wenn auch nicht den Grad des definitiven Absinkens des Antigengehaltes, so doch in der stundenweisen Verminderung der Ablenkbarkeit den Dekompositionsvorgang als solchen zur Darstellung zu bringen geeignet sind.

Wir bringen zunächst einen Versuch, welcher die Differenz der Ablenkbarkeit des 50%igen Alt-Tuberkulins gegenüber dem nach 24stündiger Leberautolyseeinwirkung gewonnenen Produkt darstellt:

Versuch vom 17. März 1911. (1.)

Alt-Tuberkulin 50%	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat	Alt-Tub. 50% (n. 24 stünd. Autolyse gekocht)	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat
1 0,1	0,02	0	6 0,1	0,02	kompl. Lösung
2 0,03	0,02	0	7 0,03	0,02	f. kompl. Lösung
3 0,01	0,02	Kuppe	8 0,01	0,02	kl. Kuppe
4 0,003	0,02	f. kompl. Lösung	9 0,003	0,02	f. kompl. Lösung
5 0,001	0,02	kompl. Lösung	10 0,001	0,02	kompl. Lösung

Alt-Tuberkulin 50%	Inaktiviert. Normalpferdeserum	Resultat	Alt-Tub. 50% (n. 24 stünd. Autolyse gekocht)	Inaktiviert. Normalpferdeserum	Resultat
11 0,1	0,02	kompl. Lösung	16 0,1	0,02	kompl. Lösung
12 0,03	0,02	do.	17 0,03	0,02	do.
13 0,01	0,02	do.	18 0,01	0,02	do.
14 0,003	0,02	do.	19 0,003	0,02	do.
15 0,001	0,02	do.	20 0,001	0,02	do.

Alt-Tuberkulin 50%	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat	Alt-Tub. 50% (n. 24 stünd. Autolyse gekocht)	Inaktiviert. Normalpferdeserum	Resultat
21 0,2	—	do.	24 0,2	—	do.
22 0,1	—	do.	25 0,1	—	do.
23 0,03	—	do.	26 0,03	—	do.

Alt-Tuberkulin 50%	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat	Alt-Tub. 50% (n. 24 stünd. Autolyse gekocht)	Inaktiviert. Normalpferdeserum	Resultat
27 —	0,02	kompl. Lösung	29 —	0,02	kompl. Lösung
28 —	0,04	do.	30 —	0,04	do.
			31 System	—	do.

Das Ergebnis des Versuches vom 17. März lautet also:

Die Komplementablenkung des 24 Stunden der Autolyse ausgesetzten und dann gekochten Alt-Tuberkulins ist in allen Verdünnungsgraden ganz erheblich herabgesetzt. 0,1 autolysiertes Alt-Tuberkulin ergibt im Ablenkungsversuch komplette Lösung, statt komplette Hemmung im unveränderten Zustand. Das Maximum der Hemmung liegt bei 0,01, also in der Mitte der angesetzten Verdünnungsskala. Das optimale zur Komplementbindung führende Mengenverhältnis des angewandten Antigens kommt bei kleinerer Antigendosis zustande.

Ein gleiches Resultat erhielten wir nach 22stündiger, zwei-, drei-, vier-, fünf- und sechstägiger Autolyse. Der letzte, nach zehn Tagen unternommene Versuch hatte ebenfalls ein konformes Ergebnis.

Die einzelnen gelungenen Versuche stehen sich in ihrem Aussehen so nahe, daß für sie das angegebene vom 17. März als typisch gelten kann. In einigen liegt das Optimum der Hemmung bei 0,03.

Der Versuch vom 7. März ergibt mit 22 Stunden autolysiertem Tuberkulin bei sonst identischen Verhältnissen mit Versuch vom 17. März folgende Reihe:

Alt-Tuberkulin 50% (22 Std. autolysiert)	Inaktiviertes Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat
0,1	0,02	f. komplette Lösung
0,03	0,02	— kl. Kuppe
0,01	0,02	— " "
0,003	0,02	— " "
0,001	0,02	komplette Lösung

Es erheben sich nun eine Reihe von Einwänden, die einzeln zu besprechen sind.

Es könnte die ungenügende Hemmung auf eigenlösenden Eigenschaften der gekochten Tuberkulin-Leberautolyse-mischung beruhen. Daß dies nicht der Fall ist, besagt folgendes Protokoll:

Alt-Tuberk. 50% + Leber (nach 24stünd. Autolyse gekocht)	Hammelblut 5% gewaschen, unambozeptiert	Resultat	Alt-Tuberk. 50% + Leber (nach 24stünd. Autolyse gekocht)	Hammelblut 5% gewaschen, unambozeptiert	Resultat
1 0,2	1,0	0	7 0,028	1,0	0
2 0,1	1,0	0	8 0,022	1,0	0
3 0,08	1,0	0	9 0,017	1,0	0
4 0,06	1,0	0	10 0,013	1,0	0
5 0,045	1,0	0	11 0,01	1,0	0
6 0,035	1,0	0			

Das gleiche Resultat erhielt ich mit ungekochtem Alt-Tuberkulin-Leberautolysegemisch, das nach 42stündigem Aufenthalt bei 37° und dreitägigem Stehen bei Zimmertemperatur untersucht wurde.

Ein weiterer Einwand wäre die Annahme, daß das Antigen durch Adsorption von seiten der Leberbreiaufschwemmung verändert würde, ferner könnten beim Kochen durch das ausfallende Kaninchenlebereiweiß Tuberkulinbestandteile mitgerissen werden, oder es könnte das vorher kochbeständige Tuberkulin seine Resistenz gegen diesen Eingriff verloren haben.

Die Antwort auf die letztere Frage ergibt ein Versuch, in welchem neben unverändertem Tuberkulin zugleich gekochtes und ungekochtes Produkt einer 42stündigen Leberautolyse angesetzt wurde.

Versuch vom 17. März. (2.) (Die im Versuch sämtlich gelösten Kontrollen mit Normalserum werden hier fortgelassen.)

Alt-Tuberkulin 50%	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat	Alt-Tub. 50% (gekocht n. 42 stünd. Autolyse)	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat
1 0,1	0,02	0	6 0,1	0,02	kompl. gelöst
2 0,03	0,02	0	7 0,03	0,02	f. kompl. Lösung
3 0,01	0,02	Kuppe	8 0,01	0,02	kl. Kuppe
4 0,003	0,02	f. kompl. Lösung	9 0,003	0,02	f. kompl. Lösung
5 0,001	0,02	kompl. Lösung	10 0,001	0,02	kompl. Lösung

Alt-Tub. 50% (n. 42 stünd. Autolyse ungekocht)	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat	Alt-Tub. 50% (n. 42 stünd. Autolyse gekocht)	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat
11 0,1	0,02	f. kompl. Lösung	19 0,2	—	kompl. Lösung
12 0,03	0,02	Kuppe	20 0,1	—	do.
13 0,01	0,02	Kuppe	21 0,03	—	do.
14 0,003	0,02	f. kompl. Lösung	(n. 42 stünd. Autolyse ungekocht)		
15 0,001	0,02	kompl. Lösung	22 0,2	—	do.

Alt-Tuberkulin 50%	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat	Alt-Tub. 50% (n. 42 stünd. Autolyse gekocht)	Inaktiviert. Pferde-Tbc.-Antiserum	Resultat
16 0,2	—	do.	23 0,1	—	do.
17 0,1	—	do.	24 0,3	—	do.
18 0,03	—	do.	25 —	0,02	do.
			26 —	0,04	do.
			27 System	—	do.

Der Versuch zeigt in der Tat, daß ein winziger Teil des Antigens nach 42stündiger Autolyse beim Kochen des Gemisches verloren geht. Die erzielte Differenz ist jedoch entfernt nicht so groß wie die durch Autolyse erzeugte.

Schließlich haben wir uns überzeugt, daß ein 24stündiger Brutschrankaufenthalt bei 37° mit vorher gekochter Leberautolyse bei Herstellung identischer Mengenverhältnisse nicht die charakteristische Umänderung des Antigens hervorruft.

Die sich ergebende Differenz des unveränderten Alt-Tuberkulins (50%) gegenüber dem mit vorher gekochter Leberautolyse zu gleichen Teilen versetzten Alt-Tuberkulins

ist so gering und der Fehlergrenze naheliegend, daß für die Erklärung der Ablenkungsveränderung nach 24stündiger Autolyse Antigenminderung durch einfache Absorption nicht in Frage kommt.

Schließlich sei erwähnt, daß es auch gelingt, in Abständen von Stunden die Autolyse zu unterbrechen und in Fraktionen nebeneinander den Uebergang von dem normalen Ablenkungstypus zu dem schließlich eintretenden und eingangs dargestellten zu erhalten.

Die Dekomposition des Tuberkulins findet also zweifellos auf katalytischem Wege statt.

Von den Tuberkulinautolysen wurden zahlreiche Proben entnommen, um ihre Wirksamkeit auf die menschliche Haut zu prüfen.

Es wurden immer je zwei, drei oder vier Patienten geimpft und die Größe der Quaddel des 50 %igen Alt-Tuberkulins mit derjenigen des jeweils entnommenen Autolyseproduktes verglichen.

Nach ein- bis zweitägiger Autolyse ist die Größe der Impfquaddel von derjenigen der Kontrolle nicht wesentlich unterschieden. Im Laufe der folgenden Tage nimmt ihre Größe ab, und man findet am dritten und vierten Tage auch negative Reaktion neben positivem Ausfall der Kontrolle. Die Größe und Zahl der positiven Impffresultate sinkt dann ganz allmählich in der folgenden Zeit ab. Es konnte jedoch noch am 22. Tage bei einem skrofulösen Kinde eine zwar schwache, aber immerhin noch deutliche und durch das Auftreten von Knötchen als skrofulös gekennzeichnete Reaktion festgestellt werden. In weiteren Zeitabständen wurden Reaktionen nicht angestellt. Den Abfall der Wirkung des durch Leberautolyse veränderten Tuberkulins auf die äußere Haut nach der Größe der Quaddeln graphisch darzustellen, ist wegen der Verschiedenheit der individuellen kutanen Empfindlichkeit nicht möglich. Die Kurve würde nach dem hierüber gewonnenen Eindruck langsamer abfallen, als die Hemmungskraft im Ablenkungsversuch sinkt. Es würde von Interesse sein, der Frage einer voraussichtlich bestehenden Inkongruenz der Komplementablenkung und physiologischen Wirkung mit Hilfe des Giftwertversuches nachzugehen.

Bezüglich der Resultate mit Kutanimpfungen ist zu bemerken, daß Pfeiffer und Persch¹⁾ ähnliche Ergebnisse hatten mit Erepsin, das aus Katzendarm gewonnen wurde. Nach ein- bis zweitägiger Einwirkung fand sich nur geringfügige Veränderung des Tuberkulins, dagegen starke Minderung in der Wirkung auf die Haut nach neun Tagen.

In einer neueren Arbeit fanden Pfeiffer und Trunk²⁾, daß Pepsinlösungen auch bei neutraler Reaktion Tuberkulin abzuschwächen imstande sind. Sie neigen der Ansicht zu, daß die Handelspepsine eine auch bei neutraler Reaktion wirkende Protease enthalten („Pseudopepsin“ Glaessner), „wenn nicht überhaupt der Lehrsatz von der Notwendigkeit saurer Reaktion für die Pepsinverdauung einer Revision bedarf“.

Nach unseren Ergebnissen halten wir es für wahrscheinlich, daß auch bei diesen Versuchen Endoenzymwirkung im Spiele war.

Zusammenfassung. Durch 24stündige Leberautolyseeinwirkung wird Tuberkulin in seiner Ablenkbarkeit gegenüber spezifischem Antiserum stark verändert.

Eine Abschwächung des Tuberkulins in der Wirkung auf die tuberkulinempfindliche menschliche Haut wird erst im Laufe von Tagen deutlich und geht so langsam vor sich, daß noch nach drei Wochen eine positive Kutanprobe erzielt werden konnte.

¹⁾ Wiener klinische Wochenschrift 1909, No. 33, S. 1149.

²⁾ Wiener klinische Wochenschrift 1911, S. 379.