Aus der Irrenanstalt St. Hans Hospital in Kopenhagen.
(Direktor: Dr. A. Wimmer.)

Kritische Bemerkungen zu Abderhaldens Dialysierverfahren.

Von A. Bisgaard und A. Korsbjerg.

Als wir hier im Hospital Ergebnisse²⁾ nachzuprüfen hatten, befolgten wir aus der Versuchsmethodik das von Abderhalden besonders empfohlene Dialysierverfahren.

Ein Fehler, den Abderhalden immer wieder als den häufigst vorkommenden heraushebt, soll darin bestehen, daß die Organe blut- haltig oder von mit Ninhydrin reagierenden Stoffen schlecht befreit sind (durch Auskochen). Wir haben deshalb mit ganz besonderer Aufmerksamkeit alle bezüglichlichen Vorschriften befolgt, beim Auswaschen und Auspressen isotonische NaCl-Lösungen verwendet und sogar ein einzelnes „Organ“ mehr als 50 mal gekocht, auch mit Essigsäure. Die Probe für die Organreinheit, schreibt Abderhalden wie folgt vor: 1 Teil Organ + 5 Teile Wasser werden fünf Minuten gekocht, durch ein gehärtetes Filter filtriert und mit 0,2 ccm der vorgeschriebenen Ninhydrinlösung (1 %) nach den gegebenen Regeln gekocht; wir haben dies ad maximum verschärft, indem wir aus einer Peptonlösung die Menge feststellten, die, auf 10 ccm verdünnt, mit 0,2 ccm Ninhydrin- lösung eben beginnende Färbung beim Kochen ad modum Abder- halden ergab. Diese Peptonmenge wurde jedesmal dem Organabsud hin- zugesetzt und das Organ so oft gekocht, bis die Reaktion hierbei nicht deutlicher erschien als in der Kontrolle mit Pepton und destilliertem Wasser allein. Diese Probe wurde teils bei der ersten Herrichtung der Organe angestellt, teils mit der abgewogenen Menge, die bei den Ver- suchen in den Hülzen zur Verwendung kam. Abderhalden selbst erwähnt, daß man solches tun kann, bezeichnet es aber nicht als not- wendiges Verfahren. Wir wünschten aber trotz der ungeheuren Mühe, die uns durch das Auskochen etc. entstand, ganz sicher zu sein bezüg- lich des Punktes, der als einer der schwächsten für die Neulinge in dieser Technik bezeichnet wurde.

Die „Organreinheiten“ zeigten eine gewisse, ganz unerklärliche Launenhaftigkeit. Ein Organ konnte sich als „unrein“ erweisen, wurde

²⁾ Im Juni-Juli 1913 studierte Bisgaard auf Direktor Wimmers Anregung in Halle die von Abderhalden bei seinen Studien über Proteasen im Blut teils bei Schwangerschaft, teils bei pathologischen Zuständen vorgeschlagene Technik.

dann vielleicht einige zwanzigmal gekocht, bis endlich das Kochwasser nicht mehr reagierte. Am nächsten Tag reagierte es wieder, und wir unternahmen nichts weiteres als das gewöhnliche Auskochen der für die Versuche abgewogenen Teile; am folgenden Tag hörte es dann von selbst zu reagieren auf! Und so bis ins Unendliche.

Ferner zeigte eine frisch bereitete 1% ige Ninhydrinlösung eben beginnende Färbung mit 9,2 ccm Wasser + 0,8 ccm einer 0,2% igen Peptonlösung, eine neu bereitete Ninhydrinportion erforderte 8,50 ccm Wasser + 1,50 ccm derselben Peptonlösung, die beständig klar blieb und übrigens die Standardlösung war, mit der wir die ganze Zeit arbeiteten. Wir fanden also nur ab und zu zwei Ninhydrinportionen, die in gleicher Weise reagierten, nahmen damals an, es beruhe dies auf Unreinheit des Ninhydrins, und berücksichtigten dies bei den Arbeiten.

Auch die in Halle geprüften und u. a. von Fodor gutgeheißenen Hülisen bereiteten uns gleich einige Enttäuschungen.

Wir haben diese Hülisen viermal mit 2,5 ccm unserer Peptonlösung bei 37° zur Dialysierung hingestellt, das Dialysat in gewöhnlicher Weise (10 ccm) mit Ninhydrin 0,2 ccm gekocht und die dadurch entstandenen Färbungsintensitäten mit einer Farbenskala von Peptonlösungen verschiedener Stärke ebenfalls mit Ninhydrin gekocht, verglichen. Es fiel uns auf, daß dabei das Durchlassungsvermögen der Hülisen hin und her schwankte. Dies konnte schwerlich an den Hülisen liegen, sondern mußte auf anderen Verhältnissen beruhen, die uns nicht ganz klar waren und die wir erst später entdeckten.

Ferner probierten wir einige Sera. Besonders wurde hierbei auf die Sterilität Gewicht gelegt und übrigens die Technik in allen vorgeschriebenen Einzelheiten befolgt, die Hülisen sorgfältig gereinigt und ausgewässert, darauf kaum eine halbe Minute gekocht und mit Chloroform und Toluol aufbewahrt; von dem letzteren war bei der Herausnahme aus dem Thermostat immer noch genug über den Flüssigkeitsschichten vorhanden. Die Siedestäbe waren gründlich ausgekocht und wurden mit Pinzetten genommen. Das Kochen erfolgte nach der Sekundenuhr.

Gleichzeitig mit Serum + Organ wurden folgende Kontrollen angewendet:

1. Serum allein; 2. inaktiviertes Serum + Organ und zuweilen als Hülisenkontrolle Serum + Organ zweimal.

Bindegewebe wurde bisweilen zu „Serum allein“ hinzugesetzt verwendet, um die Möglichkeit auszuschließen, daß die stark ausgepreßten Organe nur auf Grund ihrer Stützsubstanz reagierten.

Oeller und Stephan¹⁾ haben u. a. darauf hingewiesen, daß die sogenannten „Organe“ nach der gründlichen Behandlung nur aus Bindegewebe und — Blut bestehen. Das letztere allein konnte wenigstens die nachfolgenden Ergebnisse nicht bedingen.

Sowohl für Hirn als für Testis und Ovarium kamen verschiedene, gesondert präparierte Organe zur Verwendung, sodaß eine „Einstellung“ der Organe, wie sie von Abderhalden gefordert wird, wohl keine große praktische Bedeutung haben konnte, wenn, wie es sich zeigte, alle Organe versagten. Positive Ninhydrinreaktion ist mit + bezeichnet, negative mit —, sonst sind die Bezeichnungen in Uebereinstimmung mit Kafka²⁾ gehalten. 24 Sera wurden untersucht, davon 6 Sera weggeschüttet, weil Serum allein positiv war, und hämolytische Sera wurden nicht berücksichtigt.

Vor allem fiel uns auf, daß (von einem Falle abgesehen) Hirn nicht reagierte. Ferner, daß sorgfältig ausgewählte Fälle von manisch-depressiven Psychosen ebenso kräftig mit Genitalglandeln reagierten wie die aus der Dementia praecox-Gruppe. Auch hier wurden möglichst unzweideutige Fälle gewählt. Wir konnten demnach keine Resultate erzielen, die denen Fausers auch nur entfernt entsprächen. Da aber zugleich so paradoxe Reaktionen auftraten, wo Serum und Bindegewebe + ergaben, Testis aber in einer Probe +, in einer anderen —, oder bei Nr. 12, wo Thyreoidea in aktivem Serum —, in inaktivem +? ergab, oder endlich in Fällen, wo sich überall Reaktion zeigte, so begannen wir, unsere Aufmerksamkeit den Hülisen zuzuwenden. Es hatte gleich den Anschein, als könne nur eine sehr verschiedene „spezifische Durchlässigkeit“ dies erklären.

Die Hülisen waren die allgemein üblichen von Schleicher und Schüll. Zuerst wurden alle erneut in der von Abderhalden angegebenen Weise auf ihre Durchlässigkeit für Hühnereiweiß geprüft. Jedoch verwarfen wir die Büretprobe, die ja schon bei ziemlich wesentlichen Eiweißmengen versagt. Wir befolgten die Merkurichloridprobe (Spiegler's Reagens) ad modum Heller und bekamen glatt negative Reaktion im Dialysierwasser von allen Hülisen mit Ausnahme einer, wo nach Entfernung des Toluols die Reaktion ebenfalls negativ wurde.

Dr. Christiansen³⁾ machte mir indes in liebenswürdiger Weise Mitteilungen, nach denen ich vorzog, in Uebereinstimmung mit einigen seiner (noch unveröffentlichten) Arbeiten die Durchlässigkeit der Hülisen in einem Wasser-Osmometer zu bestimmen. Dessen Ein-

richtung soll nur kurz angedeutet werden. Die Hülse wurde an einem in einen Konus endenden Glasrohr angebracht, mit einem Kautschukring befestigt, darüber ein dicht schließender Glasring. Dieser ganze Apparat wurde mit filtriertem, destilliertem Wasser gefüllt und durch einen zweifach perforierten Gummistöpsel in eine passende Flasche mit ähnlichem Wasser gebracht, sodaß Hülse und Verschluß ganz unter der Oberfläche des Wassers waren, in das Wasser frei hineinragend, das sich dann in konstanter Höhe befand. Aus einem Glasrohr in der anderen Perforation wurde die Luft ausgesogen, bis der Manometer einen Unterdruck von etwa 380 mm Quecksilber zeigte. Darauf wurde er mit einem Klemmhahn geschlossen, und das Quecksilber im Manometer hielt sich nun mehrere Stunden lang in konstanter Höhe. Das durch die Osmose durch die Hülse bedingte Sinken der Wassersäule in dem senkrecht stehenden Glasrohr wurde in konstanter Höhe durch ein Teleskopmikroskop mit Okular-Mikrometerskala abgelesen. Mit Rücksicht auf den Einfluß der Temperatur war der ganze Apparat in 25 Liter Wasser versenkt, sodaß nur der obere Teil des senkrechten Glasrohres hervorragte, und die Temperatur dieses umgebenden Wassers wurde bei jeder Ablesung bis auf $\frac{1}{10}^{\circ}$ genau bestimmt.

Für jede Hülse wurde nun festgestellt: die Zeit in Sekunden, in der eine Wassersäule in einem Glasrohr mit innerem Durchmesser von 6 mm um 0,1 mm sank, bei 20° und einem Druck von 1 Atmosphäre.

Es zeigte sich, daß diese Werte, berechnet für alle Hülisen, auch die früher kassierten, zwischen 6,6—60,0 schwankten. Aber auch bei den täglich verwendeten Hülisen fanden sich Unterschiede von bis zu 100%.

Vorausgesetzt, daß diese Hülisen, unter denen nur eine passende Anzahl mit ähnlichen osmotischen Werten ausgewählt wurde, überhaupt solche Stoffe durchließen, die abgebauten Proteinmolekülen entstammten, durfte man vorläufig erwarten, daß das Verhältnis zwischen diffundierendem Wasser einerseits und z. B. Aminosäuremolekülen andererseits konstant wäre, solange die Durchlässigkeit für Wasser konstant bliebe, und das letztere konnte man nun jederzeit untersuchen. Ob dagegen die erwähnte Konstante für alle Hülisen gleich war, mußte erst geprüft werden.

Die Hülisen erwiesen sich nun sämtlich als durchlässig für Eiweißspaltprodukte. Dies wurde mittels Dialysierung der üblichen Peptonlösungen (ausgeführt, wie von Abderhalden vorgeschrieben) ausprobiert. In dem Dialysierwasser wurde der Stickstoff nach einem mikrochemischen Verfahren bestimmt, das in einer folgenden Arbeit ausführlicher dargelegt werden wird.

Aber auch die für Wasser festgestellten verschiedenen osmotischen Werte konnten direkt auf die entsprechenden Werte für N-haltige Spaltprodukte angewandt werden, wie sich aus dem Folgenden ergibt.

Setzte man nämlich den osmotischen Wert (bestimmt, wie oben angegeben) einer „Normalhülse“ auf „20“ an, so müßte in diesem Falle eine Korrektur der für die anderen Hülisen gefundenen, in einer bestimmten Zeit diffundablen Mengen überall die gleiche Zahl ergeben.

Das war auch genau der Fall, wogegen die gleichzeitig angestellte Ninhydrinreaktion ganz willkürlich hin und her schwankte.

Da die Hülisen also anscheinend nicht schuld sein konnten an den vielen sich widersprechenden Resultaten, wandten wir unsere Aufmerksamkeit der Ninhydrinreaktion zu, und zwar um so mehr, als wir eben durch unsere N-Bestimmungen nachweisen konnten, daß die Organe im Thermostat nie nachweisbare Mengen von N abgaben, außer wenn die Flüssigkeiten infiziert wurden.

Wir kochten deshalb 10 ganz gleiche und gleich starke Peptonproben auf die übliche, von Abderhalden vorgeschriebene Weise (Rauminhalt 10 ccm + 0,2 ccm derselben 1% igen Ninhydrinlösung). Die Stäbchen wurden nicht mit den Händen berührt und waren sorgfältig ausgekocht. Die Zeit wurde nach der Sekundenuhr bemessen. Es ergab sich nun folgendes:

Nr. 1 +	Nr. 6 +
2 ++	7 +
3 +	8 +++
4 -	9 ++++
5 +++	10 -

Die Vorzeichen sollen, hoffentlich auf leicht verständliche Weise, die Stärke der Reaktion angeben.

Acht ähnliche Proben, mit genauen Pipetten ausgemessen, wurden dann in sorgfältig gereinigten Gläsern, mit Kautschukappen verschlossen, im Zentrum eines großen Blechkastens unbedeckt hingestellt, an dessen Boden sich eine etwa 4 cm tiefe Lage Wasser befand. Dieses Wasser wurde eine Stunde lang siedend erhalten. Ein zwischen den Gläsern angebrachtes Thermometer zeigte während dieser Zeit konstant 98,5°. Nach dieser Erwärmung in strömenden Wasserdämpfen wurde festgestellt, daß der Rauminhalt all der Flüssigkeiten unverändert geblieben war. Drei Kautschukappen waren abgesprungen.

Das Resultat war folgendes:

1. + ?	5. ÷
2. +++	6. -
3. + ?	7. -
4. ++	8. kolossal starke Reaktion.

Ein ähnlicher Versuch mit acht anderen Proben ergab dasselbe

¹⁾ D. m. W. 1913 S. 2505. — ²⁾ Zschr. f. d. ges. Neurol. 18. 1913. S. 341. — ³⁾ vom Carlsberg Laboratorium.

Resultat, drei waren positiv, die übrigen negativ, keine zwei Proben waren gleich.

Es ist daher anzunehmen, daß Zufälligkeiten, wie etwa Staubpartikeln, Unebenheiten oder Ähnliches auf die Größe oder Art der molekularen Partikeln, welche die Ninhydrinverbindung ausmachen, Einfluß haben und somit die verschiedene Strahlenabsorption bedingen können. Als Standardmethode bei genaueren Bestimmungen von Proteinspaltprodukten sollte die Ninhydrinmethode gewiß nicht angewandt werden.

Mittels unserer Stickstoffbestimmungen ist es uns bisher nicht gelungen, wie Fauser enzymatische Prozesse im Blut Irrsinniger nachzuweisen, wo Laboratoriuminfektion mit Sicherheit als ausgeschlossen gelten konnte. Das Toluol scheint in dieser Beziehung kein verlässliches Antiseptikum zu sein.

(Weitere Mitteilungen über diese Untersuchungen werden später folgen.)

Zusammenfassung. 1. Wir haben die von Fauser mittels der A.R. ermittelten Resultate nicht bestätigen können.

2. Zur Feststellung der Proteasenwirkung scheint die Ninhydrinmethode nicht fein genug.

3. Wir haben bis jetzt nach neuen Methoden keine Fermentwirkung im Blute von Geisteskranken entdecken können.