Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Jena.
(Direktor: Prof. H. Kionka.)

Eine neue Methode zum Nachweis der Abwehrfermente.

(Zugleich zweite Mitteilung zur Frage ihrer Spezifität.)

Von Dr. Paul Hirsch, Assistenten des Instituts.

In Nr. 6 dieser Wochenschrift habe ich über eine Reihe von Tierversuchen berichtet, in denen festgestellt wurde, daß die nach parenteraler Zufuhr von Eiweißkörpern auftretenden Fermente (Abwehrfermente) streng spezifisch sind. Als Methoden wurden bei diesen Untersuchungen das Dialysierverfahren und die „optische Methode“ benutzt.

In der Zwischenzeit habe ich eine quantitative Methode zum Nachweis der Abwehrfermente bzw. der Intensität ihrer Wirkung ausgearbeitet¹⁾ und diese gleichfalls zu Untersuchungen über die Spezifität der Abwehrfermente angewandt. Diese Versuche lehnen sich an die in der ersten Mitteilung angeführten direkt an. Es kann daher von einer Wiederholung der zugrunde liegenden speziellen Fragestellung abgesehen werden.

Die von mir angewandte Methode fußt auf folgenden Überlegungen.

Läßt man z. B. das Serum einer Schwangeren auf Plazenta-eiweiß einwirken, so wird dieses zu Peptonen abgebaut. Da die Peptone

¹⁾ M. m. W. 1914 Nr. 24.

²⁾ Zschr. f. physiol. Chem. 91 1914.

lösliche Körper sind, so gehen sie in dem Serum in Lösung, und dieser Vorgang verursacht im Vergleich zu dem gleichen Serum, das nicht auf Plazentagewebe eingewirkt hatte, eine Konzentrationsänderung. Zur genauesten quantitativen Feststellung von Konzentrationsänderungen besitzen wir in dem Löwe-Zeisschen Flüssigkeitsinterferometer ein sehr geeignetes Instrument.

Die Messungen mit dem Wasserinterferometer beruhen darauf, daß durch den Unterschied der Lichtbrechung bzw. Konzentration einer zu untersuchenden Probe und einer Vergleichslösung Interferenzstreifen wandern, man führt also Differenzmessungen aus. Die Haupt-eigentümlichkeit des Apparates liegt darin, daß durch eine besondere Einrichtung eine unveränderliche, normale Interferenzerscheinung, die als Nullage dient, hervorgerufen wird. Läßt man in dem Interferometer einen Lichtstrahl durch die zur Aufnahme der zu untersuchenden Probe und der Vergleichsprobe dienende Doppelkammer¹⁾ gehen, deren beide Hälften mit der gleichen Substanz gefüllt sind, so hat das Interferenzstreifenbild in bezug auf die oben erwähnte normale, als Nullage dienende Interferenzerscheinung die gleiche Lage. Sind beide Kammern jedoch mit verschiedenen konzentrierten Lösungen gefüllt, d. h. sind durch die Konzentrationsunterschiede die Lichtbrechungen verschieden, so ist durch die dadurch bedingte verschiedene optische Weglänge die Interferenzerscheinung gegen ihre bisherige Lage verschoben. Diese Interferenzerscheinungen bestehen aus einem weißen Bilde, dem sogenannten Maximum nullter Ordnung, und symmetrisch dazu angeordneten Beugungsspektren, die durch sehr schmale schwarze Minimastreifen getrennt sind. (Fraunhofersche Beugungerscheinung.) Durch Drehen der Schraube eines Kompensators kann man die Verschiebung der beiden Interferenzbilder ausgleichen. Man kann leicht die zwei schwarzen Streifen, die das Maximum nullter Ordnung begrenzen, in dem oberen und unteren Bilde auf Koinzidenz einstellen. Durch Ablesung der hierzu notwendig gewesenenen Schrauben- bzw. Trommelumdrehungen kann man die Unterschiede in dem Lichtbrechungsvermögen, und damit in der Konzentration der beiden verglichenen Flüssigkeiten, feststellen.

Das Messen mit dem Kompensator ist dadurch besonders ausgezeichnet, daß es eine sogenannte Nullmethode darstellt, die erfahrungsgemäß bei den verschiedenen Beobachtern durch Ausschaltung jeglichen subjektiven Beobachtungsfehlers zu gleichmäßigen und genauen Resultaten führt.

Die Ausführung einer derartigen interferometrischen Untersuchung auf Abwehrfermente gestaltet sich wie folgt: Von zwei sorgfältig verschließbaren sterilen Zentrifugiergläsern wird das eine mit Serum, das andere mit Serum plus einer abgewogenen Menge Substrat beschickt. (Ist die Abbaumöglichkeit von verschiedenen Organen zu prüfen, so müssen selbstverständlich entsprechend viele Zentrifugiergläser genommen werden). Beide Röhrchen werden genau 24 Stunden bei Brutschranktemperatur aufgehoben, nach Ablauf dieser Zeit zentrifugiert und dann die beiden klaren Sera interferometrisch untersucht. Enthält das Serum auf das vorgelegte Substrat spezifisch eingestellte Abwehrfermente, so verursachen diese einen Abbau. Die dadurch hervorgerufene Peptonbildung, vielmehr deren Auflösen in dem Serum, verursacht eine Konzentrationsänderung, die mit Hilfe des Interferometers quantitativ bestimmt werden kann.

Enthält das Serum keine spezifischen Abwehrfermente, so erscheinen bei der interferometrischen Untersuchung die beiden Interferenzsysteme nicht verschoben.

Gerade auf diesen Fall möchte ich hier besonders hinweisen. Man wird wohl annehmen müssen, daß das Substrat aus dem Serum Stoffe adsorbiert und diese zurückhält. (Abderhalden²⁾) wies schon auf die Möglichkeit dieser Erscheinung als „Fehlerquelle“ bei dem Dialysierverfahren hin. (Plaut³⁾) schließt aus Versuchen, daß mit dieser Fehlerquelle zu rechnen ist. Gerade die „interferometrische Methode“ scheint nach ihren bisherigen Ergebnissen die Möglichkeit einer derartigen „Fehlerquelle“ auszuschließen. Würden von den Organen Stoffe aus dem Serum adsorbiert, so müßten sich diese in einer entgegengesetzten Verschiebung der Interferenzbilder zeigen, da eine Adsorption eine Konzentrationsverminderung des Serums hervorrufen müßte, wie Marc⁴⁾) für andere kolloidale Substanzen festgestellt hat. Es ist möglich, daß eine „spezifische“ Adsorption bei einem das betreffende Substrat abbauenden Serum ein-

¹⁾ Diese Kammern haben verschiedene Größen, 5, 10, 20 oder 40 mm Länge. Die mit diesen erhaltenen Werte verhalten sich wie 1:2:4:8. — ²⁾ Abwehrfermente etc. (3) S. 190. — ³⁾ M. m. W. 61. 1914. Nr. 5. — ⁴⁾ Chem.-Ztg. 1912 S. 537. Kolloid. Beihefte 5 S. 375 (1914).

treten könnte. Es sind Versuche im Gange, die sich mit einer Klärung dieser Frage beschäftigen.

Die Hauptschwierigkeit der „interferometrischen Methode“ lag darin, die Organe in brauchbarer und haltbarer Form zu erhalten. Es müssen äußerst strenge Anforderungen an diese gestellt werden. Ihre Darstellung ist an sich nicht schwierig, sie wird in kürzester Zeit, sobald sie für eine größere Anzahl der verschiedensten Organe ausprobiert ist, genau veröffentlicht werden. Vorläufig stelle ich im Einverständnis mit Herrn Professor Kionka Interessenten Organproben, soweit vorhanden, zur Verfügung.

Die mit dieser Methode ausgeführten Versuche ergaben, daß die Abwehrfermente streng spezifisch sind. Es seien hier nur die im Anschluß an die bereits zitierte erste Mitteilung angestellten analogen Versuche angeführt¹⁾:

Mit Plazentagewebe behandelte Tiere:

Kaninchen A.			
Röhrchen 1	0,75 ccm Serum + Karzinom		
" 2	0,75 " " + Plazenta		
" 3	0,75 " " allein		
" 4	0,75 " Physiol. Kochsalzlösung + Karzinom		
" 5	0,75 " " " + Plazenta		
" 6	0,75 " " " allein		
Beim Vergleich von			
Röhrchen 3:1	0	Trommelteile-Differenz	
" 3:2	82	" "	
" 6:4	0	" "	
" 6:5	0	" "	

Kaninchen B.			
Röhrchen 1	1,5 ccm Serum + Plazenta		
" 2	1,5 " " + Karzinom		
" 5	1,5 " " allein		
" 6	1,5 " Physiol. Kochsalzlösung + Plazenta		
" 8	1,5 " " " + Karzinom		
" 10	1,5 " " " allein		
Beim Vergleich von			
Röhrchen 5:1	60	Trommelteile-Differenz	
" 5:2	0	" "	
" 10:6	0	" "	
" 10:8	0	" "	

Mit Karzinomgewebe behandelte Tiere:

Kaninchen C.			
Röhrchen 1	2,5 ccm Serum + Plazenta		
" 2	2,5 " " + Karzinom		
" 3	2,5 " " allein		
" 4	2,5 " Physiol. Kochsalzlösung + Plazenta		
" 5	2,5 " " " + Karzinom		
" 6	2,5 " " " allein		
Beim Vergleich von			
Röhrchen 3:2	28	Trommelteile-Differenz	
" 3:1	0	" "	
" 6:5	0	" "	
" 6:4	0	" "	

Hund D.			
Röhrchen 1	2,5 ccm Serum + Karzinom		
" 2	2,5 " " + Plazenta		
" 3	2,5 " " + Plazenta		
" 4	2,5 " " allein		
" 5	2,5 " Physiol. Kochsalzlösung + Karzinom		
" 6	2,5 " " " + Plazenta		
" 7	2,5 " " " allein		
Beim Vergleich von			
Röhrchen 4:1	145	Trommelteile-Differenz	
" 4:2	0	" "	
" 4:3	0	" "	
" 7:5	0	" "	
" 7:6	0	" "	

Es haben also auch die mit der „interferometrischen Methode“ untersuchten Sera von gespritzten Tieren ergeben, daß nach parenteraler Zufuhr von Plazenta- bzw. Karzinomgewebe Abwehrfermente auftreten, die auf die zugeführten Organe streng spezifisch eingestellt sind.

Im Anschluß sei auch hier ein mit Karzinom gespritztes Tier angeführt, bei dem sich größere, zum Teil resorbierte Blutungen vorfanden:

Röhrchen 1	1,0 ccm Serum allein		
" 2	1,0 " " + Karzinom		
" 3	1,0 " " + Plazenta		
" 4	1,0 " " + Lunge		
" 5	1,0 " " + Leber		
" 6	1,0 " " + Niere		
" 7	1,0 " " + Muskel		
" 8	1,0 " " + Hirn		
" 9	1,0 " Physiol. Kochsalzlösung + allein		
" 10	1,0 " " + Karzinom		
" 11	1,0 " " + Plazenta		
" 12	1,0 " " + Lunge		
" 13	1,0 " " + Leber		
" 14	1,0 " " + Niere		
" 15	1,0 " " + Muskel		
" 16	1,0 " " + Hirn		

¹⁾ Zu sämtlichen Versuchen wurde die 5 mm-Kammer benutzt.

Beim Vergleich von		115 Trommelteile-Differenz
Röhrchen 1 : 2	1 : 3	0
" 1 : 4	1 : 5	0
" 1 : 5	1 : 6	0
" 1 : 6	1 : 7	0
" 1 : 7	1 : 8	0

Die Substratkontrollen zeigten keine Differenz beim Vergleich gegen physiologische Kochsalzlösung. Auch die „interferometrische Methode“ zeitigte in diesem Falle keinerlei Abbau von arteigenem Gewebe im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen von Heilner und Petri sowie von Singer.

Michaelis und v. Langermarck¹⁾ behaupten, nie einen Einfluß des nachträglichen Zerzupfens der Organe festgestellt zu haben. Wie ich schon in der früheren Mitteilung erwähnt habe, ist in dem Durchschneiden oder Zerdrücken der Organe nach dem Auskochen eine große Fehlerquelle zu suchen, da im Innern der Organe immer noch Stellen vorhanden sind, die durch das Kochwasser nicht vollständig extrahiert sind. Mit der „interferometrischen Methode“ läßt sich die Größe dieser Fehler quantitativ verfolgen. Es wurde Karzinom resp. Plazenta sorgfältig ausgekocht, vor Anstellung des Versuches wurden die Stückchen in zwei möglichst gleich große Teile zerschnitten und die korrespondierenden Stücke (bezeichnet mit Plazenta bzw. Karzinom X) mit Serum bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung angesetzt. Zum Versuche diente Serum von dem mit Plazentagewebe behandelten Kaninchen B. (siehe oben).

Röhrchen 3	1,5 ccm Serum + Plazenta X
" 4	1,5 " + Karzinom X
" 7	1,5 " Physiol. Kochsalzlösung + Plazenta X
" 9	1,5 " " + Karzinom X

Beim Vergleich von		100 Trommelteile-Differenz
Röhrchen 5 : 3	5 : 4	36
" 10 : 7	10 : 9	40
" 10 : 9		42

Vergleicht man diese Zahlen mit den oben angeführten, so ergibt sich eine sehr gute Uebereinstimmung in Hinsicht auf die Summation. Das Serum des Kaninchens baute von einwandfreier Plazenta eine 60 Trommelteilen-Differenz entsprechende Menge ab. Von nachträglich durchschnittener Plazenta wurde die 100 Trommelteilen-Differenz entsprechende Menge abgebaut. Das korrespondierende Stück dieser Plazenta gab die 40 Trommelteilen-Differenz entsprechende Menge lösliche Produkte (Peptone) ab. Die entsprechenden Zahlen, die sich bei Benutzung von nachträglich durchschnittenem Karzinom ergaben, verhalten sich, abgesehen von einem kleinen Meßfehler von 6 Trommelteilen, ebenfalls übereinstimmend.²⁾

Was die Genauigkeit der beschriebenen Methode betrifft, so illustrieren sie am besten einige Zahlenbeispiele.

Eine 0,005% ige Plazentapeptonlösung z. B. ergab bei Benutzung einer 20 mm-Kammer 12 Trommelteile-Differenz, bei Benutzung einer 5 mm Kammer 3 Trommelteile-Differenz. Es lassen sich also mittels der 20 mm-Kammer Konzentrationsänderungen von 0,001 %, bei Benutzung der 5 mm-Kammer solche von 0,005 % feststellen. Da der Inhalt der 20 mm-Kammer 2 ccm beträgt, so lassen sich also 0,02 mg, da der Inhalt der 5 mm Kammer 0,5 ccm beträgt, mithin 0,1 mg Pepton feststellen. Ordnet man die Ausschläge in Trommelteilen, die durch verschiedene Peptonkonzentrationen verursacht werden, graphisch in einem Koordinatensystem an, so verläuft die Kurve in einer geraden Linie. Man kann diese Kurve als Eichkurve benutzen, da sie für jede Anzahl von Trommelteilen die dazu gehörige Peptonkonzentration, mithin also auch die durch die Tätigkeit der Abwehrfermente gebildete Menge Pepton angibt.

Außer diesen Versuchen wurden noch eine große Anzahl von Sera von Normalen, Schwangeren sowie Karzinomatösen untersucht. Auch diese Versuche ergaben eine völlige Spezifität der Abwehrfermente. Normalserum baute nie irgend ein Substrat ab. Auch nicht die geringste Verschiebung der Interferenzbilder war je zu konstatieren! Die Untersuchung von Schwangerenserum ergab bis zu 2184 Trommelteilen-Differenz bei Benutzung von Plazenta als Substrat. Andere Organe wurden von solchem Serum nie abgebaut.

Zusammenfassung. Es wird eine Methode zur quantitativen Verfolgung der Abwehrfermentwirkung beschrieben, die darauf beruht, daß die durch den Abbau eines bestimmten

Substrates durch spezifische Fermente bewirkte Peptonbildung in einem Serum eine Konzentrationsänderung verursacht, die durch Vergleich mit einer unter gleichen Bedingungen aufgehobenen Probe desselben Serums ohne Substrat mit Hilfe des Löwe-Zeisschen Interferometers quantitativ bestimmt werden kann. Diese Untersuchungen ergaben eine völlige Spezifität der Abwehrfermente.

¹⁾ D. m. W. Nr. 7. — ²⁾ Auf die u. a. auch von den gleichen Autoren angeschnittene Frage der Autolyse des Serums komme ich in Kürze an Hand eingehender Versuche zurück.