

[Aus dem Institut für Infectiouskrankheiten in Berlin.]
(Director: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. R. Koch.)

Untersuchungen über die Anwendung der biologischen Methode zur Ermittlung der Ver- dauung der Eiweisskörper im Magen-Darmcanal.

Von

Dr. med. **S. Jakuschewitsch**
aus Charkow.

Es ist eine bekannte Erscheinung, dass bei Erkrankungen des Magen-darmcanals ein Theil des Eiweisses denselben passiren kann, ohne verdaut und resorbirt zu werden und dann in den Fäces als solches nachgewiesen werden kann.

Auf Anregung des Hrn. Prof. Dr. Wassermann legte ich mir nun die Frage vor, ob es denn nicht möglich wäre, das so in den Fäces un-resorbirt gebliebene Eiweiss mittels biologischer Methoden nachweisen zu können.

Wie nämlich bekannt, giebt das Serum eines mit einem artenfremden Eiweisskörper vorbehandelten Kaninchens beim Mischen mit der entsprechenden Eiweisslösung einen specifischen Niederschlag.

Ohne uns aber hier in theoretische Auseinandersetzungen und Betrachtungen über die Bedeutung und das Zustandekommen der genannten Reaction — mit Hülfe welcher wir den Nachweis und das Vorhandensein unverdauter Eiweisssubstanzen in den Fäces zu führen versuchen werden — einzulassen, wollen wir hier gleich zu unsern einschlägigen Untersuchungen übergehen.

Zu diesem Zwecke wurde eine grosse Anzahl von Kaninchen mit Rinderserum vorbehandelt. Das aseptisch aufgefangene Rinderblut wurde

durch 10 bis 12 Stunden in einem kühlen Orte ruhig stehen gelassen, das ausgepresste Serum in sterilen Kolben gesammelt und in Quantitäten zu 5^{ccm} den Kaninchen subcutan injicirt. Diese Injectionen wurden nach je 4 Tagen, 3 bis 4 Wochen hindurch wiederholt.

Die Kaninchen vertrugen im Allgemeinen diese Einspritzungen schlecht (gegen 50 Procent Verluste) und magerten sichtlich ab; bald nach der ersten Injection entleerten die Kaninchen einen blutigen eiweissreichen Harn; im Verlaufe der folgenden Injectionen ging dieses Blutharnen langsam zurück und wurde nach der 4. bis 5. Injection kaum bemerkt. Die Section der eingegangenen Thiere zeigte eine acute hämorrhagische Nephritis und eine parenchymatöse Degeneration der innern Organe, besonders des Herzmuskels. Das Blut der so behandelten Thiere zeigte eine Abnahme in der Zahl der Erythrocyten, eine bedeutende Herabsetzung des Hb-Gehaltes und gleich vom Anfange an eine exquisite Zunahme in der Zahl der Leukocyten, die, abgesehen von kleinen Schwankungen, während der ganzen Dauer der Behandlung anhielt, dann nach dem Einstellen weiterer Injectionen einigermaassen gleich blieb und 10 bis 14 Tage nach der letzten Injection sichtbar im Absinken begriffen war. Die Vermehrung der Leukocyten geschah auf Rechnung der feingranulirten neutrophilen Mononucleären und polymorphkernigen Leukocyten.

Nach 4 bis 6 Einspritzungen gelang es auf diese Weise ein Serum zu gewinnen, von dem 0.02^{ccm} in 1^{ccm} eines zu 1:800 verdünnten Rinderserums fähig waren, einen deutlichen Niederschlag zu geben.

Dieses specifische Serum zeigte alle in der Litteratur schon des Oefteren beschriebenen Eigenschaften, weshalb ich darüber in aller Kürze nur Folgendes sagen will:

1. Eine Stunde bei 61° C. im Wasserbade erhitzt, zeigte es dieselben Eigenschaften wie das unerwärmt gebliebene Serum, indem es mit dem Rinderserum in obiger Verdünnung einen Niederschlag gab.

2. Eine Stunde bei 72° C. erhitzt, trübte es sich, verlor seine Eigenschaft, mit dem Rinderserum einen Niederschlag zu geben, wurde inactiv und konnte nicht wieder durch Zusatz normalen Kaninchenserums reactivirt werden.

3. Solche Niederschläge entstehen ausser in verdünntem Rinderserum auch in Auszügen aus rohem Rindfleisch (5.0^{gramm} Fleisch auf 100.0 physiologische NaCl-Lösung). In solchen Auszügen aus Pferde-, Hammel- und Hühnerfleisch zeigte das specifische Serum keine Wirkung im Sinne der Bildung eines Niederschlages; ebenso war eine solche nicht zugegen in den Auszügen aus gekochtem Rindfleisch, in Pepton- und Albumosenlösungen und bei Zusatz von Kuhmilch.

4. Das spezifische Serum konnte 40 Tage hindurch bei Zimmertemperatur dem Lichte ausgesetzt in einem nicht sorgfältig verschlossenen Gefässe aufbewahrt werden, ohne dadurch merklich an Kraft einzubüssen (statt 0.02 nach 40 Tagen 0.06).¹

5. Zusatz von schwachen Alkali- und Säurelösungen hatte eine bedeutende Abschwächung der spezifischen Eigenschaften des Serums zur Folge, die sich bei Anwendung concentrirter Lösungen bis zur völligen Vernichtung desselben steigerte.

Von den hier angeführten Eigenschaften des Serums ist für mich diejenige als die wichtigste zu nennen, in wässerigen Auszügen aus ungekochtem Rindfleisch einen charakteristischen Niederschlag zu geben, da ich mich eben dieser Eigenschaft bedienen wollte, um jene unresorbirt gebliebenen Eiweissmengen nachzuweisen, die sich in den wässerigen Auszügen aus den Fäkalien kranker Menschen befinden.

Durch freundlichstes Entgegenkommen und Güte der Herren Geheimräthe Prof. Dr. Leyden und Prof. Dr. Ewald wurden mir zu diesen Untersuchungen einige Kranke in liebenswürdigster Weise überlassen, wofür ich an dieser Stelle den genannten Herren meinen verbindlichsten Dank aussprechen wollte.

Die Kranken erhielten 2 Mal täglich 120 bis 150.0^{grm} rohes geschabtes Rindfleisch.

Von Beginn dieses Ernährungsregimes an wurden die Stuhlgänge dieser Kranken gesammelt: jeder Stuhlgang für sich in einem gläsernen hermetisch verschliessbaren Gefäss; nach Zusatz einer ca. 10 fach grösseren Menge physiolog. NaCl-Lösung und Zerstückelung einzelner harter Fäcesbrocken liess man die so erhaltene Mischung durch ca. 2 Stunden stehen, indem man sie dabei öfters schüttelte.

In der Litteratur finden sich Methoden zur Darstellung von Auszügen aus den Fäces angeführt. Da sich aber alle diese Methoden eingreifender chemischer Prozeduren bedienen, wie Abdampfung, Zusatz von Alkohol, Aether u. s. w., konnte ich dieselben für meine Zwecke nicht anwenden in der Annahme, dass dadurch die biologischen Eigenschaften des genuinen Eiweisses event. verändert werden könnten. Deshalb beschränkte ich mich auf den wässerigen Auszug und mechanische Reinigung desselben.

Zu diesem Behufe wurde der nach obiger Methode dargestellte Auszug aus den Fäces durch wiederholte Filtration gereinigt, indem er zuerst durch einen Leinenlappen, dann durch ein 4 faches Papierfilter, dann durch hygroskopische Watte und endlich durch ein 2 fach gefaltetes Papierfilter filtrirt wurde.

¹ Um genaue Resultate zu erhalten, verwendete ich stets frisches actives Serum.

Das so erhaltene Filtrat war in der Mehrzahl der Fälle vollständig klar und von mehr oder weniger dunkelgelber Farbe. In jenen seltenen Fällen, wo die Flüssigkeit durch den letzten Filter nicht klar durchfiltrirte, wurde sie durch weitere mechanische Reinigungsvornahmen gereinigt. Unter allen von mir angewendeten Methoden zeigte sich folgende als die empfehlenswertheste. Die trübe Flüssigkeit wird mit $\frac{1}{6}$ bis $\frac{1}{8}$ ihres Volumens mit BaSO_4 versetzt, in der Schüttelmaschine $1\frac{1}{2}$ Stunde geschüttelt und dann filtrirt. Eingehende Controlversuche überzeugten mich, dass bei Anwendung der beiden angeführten Methoden ein Verlust an Eiweiss nicht stattfindet und, während bei Anwendung der Reinigung durch geglühte Kieselguhr ein theilweiser Verlust an Eiweiss vorhanden ist, ist derselbe sehr gross bei Anwendung der Niederschlagsmethode, wie z. B. durch Zusatz einer Lösung von Chlorcalcium und Natriumcarbonat bezw. Natriumphosphat.

Die eigentlichen Untersuchungen wurden in folgender Weise angestellt: Zu 1^{cem} des obigen wässerigen Auszuges wurde in das erste Reagensgläschen 0.25^{cem} actives Kaninchenserum, in das zweite 0.25^{cem} normales Kaninchenserum, in das dritte 0.25^{cem} NaCl-Lösung (0.85 Proc.) hinzugefügt; das vierte Röhrchen enthielt nur actives Serum ohne irgendwelchen andern Zusatz, während in das fünfte eine Mischung von verdünntem Rinderserum (1:20) mit activem Kaninchenserum (0.25^{cem}) gegeben wurde. Die Röhrchen wurden alsdann in den Brutschrank bei 37° gestellt und nach Verlauf von 2 Stunden die erhaltenen Resultate registrirt. In dieser Weise wurde mit allen Auszügen vorgegangen.

Die sich hierbei ergebenden Resultate finden sich in folgender Tabelle I zusammengestellt.

Im Ganzen wurden 36 Untersuchungen an solchen Fäcesauszügen gemacht und in keinem einzigen Fall erhielt man den für die Präcipitine charakteristischen Niederschlag. Nur ausnahmsweise entstand eine Trübung, die übrigens auch ganz zufällig sein konnte (Anwesenheit einer grossen Menge von Bakterien), da bei wiederholten Untersuchungen der Fäces derselben Patienten keine Trübung entstand.

Auf diese Weise hatte also mein Versuch mit Hülfe der biologischen Methode den Gehalt an unverändertem Eiweiss in den Fäces zu bestimmen, keinen positiven Erfolg gehabt.

Es entstand nun die Frage: Warum gab das im Fäcesauszug bestimmt vorhandene Eiweiss keine typische Reaction mit dem entsprechenden Serum unter Bildung eines specifischen Niederschlages?

Um diese Frage beantworten zu können, wandte ich meine Aufmerksamkeit all' jenen Einflüssen zu, deren Wirkung sich im Sinne einer Verminderung der Fällbarkeit der Eiweisskörper geltend macht.

Tabelle I.

Nummer	Name des Patienten	Alter	Klinische Diagnose	Zahl der Stuhlgang-untersuchung	Im wässrigen Auszug des Fäces das Vorhandensein der chem. Eiweissreact.	dasselbe mit biolog. Reaction	Bemerkungen
1	Dan.	54	Catarrh. intestin., chron. Lues	8	+	0 ¹	Vier Stuhlgänge tägl.
2	Düh.	35	Atonia intestin.	6	—	—	
3	Wür.	31	Catarrh. intestin. anaemia	6	+	—	Bei der mikrosk. Untersuchung des Fäces viel elast. u. Muskelfasern.
4	Olst.	24	Catarrh. ventric. chr.	5	—	—	
5	Wilk.	56	Carcinoma ventriculi	4	+	0 ²	
6	Witz.	40	Catarrh. ventriculi hyperacidit (68)	2	—	—	
7	Tul.	56	Carcinoma ventriculi Metastas in Hepar	3	+	0 ²	Im Magensaft Anacidität.
8	Jahr.	52	Carcinoma ventriculi	1	+	—	desgl.
9	Wets.	46	Carcinoma ventriculi incipiens	1	+	—	Viel Milchsäure.

¹ Unbedeutende Trübung nur in einem Falle. ² Dasselbe in einem der 4 Fälle.

Als solche Einflüsse wären zu nennen:

1. Temperaturen über 70°.
2. Zusatz von 96° Alkohol, Aether und Formalin (10 Procent) in einem Quantum, das mehr als den 10. Theil des gesammten Volumens der Eiweisslösung beträgt.
3. Alkali, Säuren, Pepsin und Trypsin sind ebenfalls im Stande, eine Hemmung im angeführten Sinne zu bewirken.

Unter diesen Einflüssen untersuchte ich speciell die Wirkung des NaOH, NCl, Milchsäure, Pepsin und Trypsin und zwar in solchen Concentrationen, in welchen diese auch im Organismus zur Wirkung gelangen.

Wiederholte Untersuchungen zeigten, dass die Pepsinsalzsäure, Salzsäure und Milchsäure und in geringem Grade auch NaOH sich speciell durch ihre hemmende Wirkung auf die Fällbarkeit des Eiweisses auszeichnen. Bei Zusatz von 0.6^{cem} Pepsinsalzsäure (0.2 Procent); 0.75^{cem} Salzsäure (0.25 Procent), 0.4^{cem} Milchsäure (0.1 Procent) zu 1^{cem} Rinderserum (1:20), dem gleichzeitig 0.25^{cem} actives Kaninchenserum zugesetzt waren, entstand selbst nach 24 Stunden kein Niederschlag. Werden diese Stoffe in geringeren Quantitäten zugesetzt, so erfolgt entweder eine Trübung oder ein Niederschlag, je nach der Menge des zugesetzten Agens.

Bei der so gestellten Versuchsanordnung musste nun aber folgende Frage erhoben werden:

Worauf wirkt die zugesetzte Säure, auf den präcipitablen Eiweissbestandtheil des Rinderserums, oder auf die präcipitirende Substanz des activen Kaninchenserums?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Versuchsanordnung in folgender Weise umgeändert: Nach Zusatz der drei obigen Säuren in den daselbst angeführten Mengen und Concentrationen zum Rinderserum (1:20) stellte ich die Mischung auf 1 Stunde in den Brutschrank und nachdem dieselbe nachher durch Natronlauge vorsichtig neutralisirt wurde, setzte ich actives Kaninchenserum (0.25) dazu. Es bildete sich kein Niederschlag.

Durch die in geschilderter Weise wiederholt vorgenommenen Untersuchungen glaube ich zu der Behauptung berechtigt zu sein, dass unter dem Einflusse dieser Stoffe im Rinderserum speciell jener präcipitable Antheil des Rinderserumeiweisses zerstört wird, welcher absolut nothwendig ist, um mit der präcipitirenden Substanz des activen Kaninchenserums einen Niederschlag entstehen zu lassen. Es erübrigt noch zu zeigen, ob der Magensaft, der die oben angeführten Säuren in derselben Concentration enthalten kann, in gleicher Weise die Reaction beeinflusst? Die diesbezüglichen Versuche wurden in ähnlicher Weise ausgeführt: dem Rinderserum wurde Magensaft in verschiedenen Quantitäten hinzugefügt, die Mischung stehen gelassen, neutralisirt und mit Kaninchenserum versetzt.

Es zeigte sich nun, dass in jenen Reagensröhrchen, die eine genügende Menge Magensaft enthielten — kein Niederschlag entstanden war, woraus sich die Folgerung ergibt, dass der Magensaft ebenfalls im Stande ist, die präcipitable Substanz des Rinderserumeiweisses zu zerstören.

Tabelle II.

Nr. des Magensaft.	Gesamt- Acidität	Reaction auf HCl	Reaction auf Milch	Die zur Hemmung der Entstehung des Niederschlags nöthige Dose in 1 ^{cem} Rinder- serum	Anmerkungen
1	55	+	—	0.8	Ulcus ventriculi
2	35	+	Spuren	1.25	Catarrh. ventr. chr. Carcinom (?)
3	60	+	—	0.6	Catarrh. ventr. chr.
4	85	—	viel	0.6	Carcin. ventr., Metastas in Hegar
5	58	+	—	0.75	Catarrh. ventriculi
6	14	—	Spuren	1.75	Carcinoma ventriculi
7	54	+	—	0.6	gesund
8	48	+	—	0.75	gesund
9	32	+	Spuren	1.5	gesund, viel Wasser i. Mageninhalt
10	70	—	viel	1.0	Carcinoma ventriculi

Aus obiger Tabelle ist weiter ersichtlich, dass in den Fällen vollständiger Abwesenheit der Salzsäure der Magensaft allein noch eine hemmende Wirkung auf das Rinderserumeiweiss auszuüben vermochte, wahrscheinlich durch den Gehalt an Milchsäure.

Was die Schnelligkeit der hemmenden Wirkung des Magensaftes auf das Rinderëiweiss anbelangt, so ergaben die zu diesem Zwecke angestellten Versuche Folgendes: Bei Vornahme der Neutralisation nach je $\frac{1}{4}$ Stunde zeigte sich, dass die erste Portion eine leichte, die folgenden keine Trübung mehr ergaben und vollständig klar geblieben waren, woraus geschlossen werden muss, dass die Wirkung des Magensaftes schon nach $\frac{1}{4}$ Stunde eingetreten war.

Die hier angeführten Thatsachen werden durch folgenden Fall illustriert und bestätigt: Bei einem fast vollständig gesunden Individuum trat 40 Minuten nach Genuss von geschabtem Fleische Erbrechen auf; der wässerige Auszug des Magendjectes war von saurerer Reaction, gab die Salzsäurereaction, keine Milchsäurereaction und war reich an Eiweiss. Auf sein biologisches Verhalten geprüft (nach Neutralisation), d. h. bei Zusatz von activem präcipirenden Kaninchenserum bildete sich nicht nur kein Niederschlag, sondern auch keine Trübung mehr. Dieses Verhalten ist nur so zu erklären, dass im Verlaufe der 40 Minuten der Magensaft so auf die Eiweisssubstanz einwirkte, dass sie unfähig war die typische Reaction zu geben.

Zum Schlusse erschien mir von Interesse, folgende Frage aufzustellen:

Ist die Ursache im angeführten Verhalten des Magensaftes einzig und allein in der Wirkung der Salzsäure zu suchen, oder befinden sich im Magensaft etwa von Hause aus antipräcipitirende Körper?

Auf diese Frage lässt sich nur eine verneinende Antwort geben und zwar folgt dieselbe aus folgenden Versuchen:

1. Durch das Erwärmen des Magensaftes im Wasserbade 1 Stunde hindurch bei 70° wurde derselbe seiner hemmenden Eigenschaften nicht beraubt.

2. Die Neutralisation des Magensaftes beraubte denselben aller seiner hemmenden Eigenschaften in Bezug auf die Bildung von Niederschlägen.

3. Die der gesammten Acidität des Magens entsprechend zusammengesetzte Salzsäurelösung hatte gleiche hemmende Eigenschaften, wie der Magensaft selber.

Ob andere Fermente des Verdauungstractes eine dem Magensaft ähnliche Wirkung entfalten, wurde nicht festgestellt.

Aus meiner verhältnissmässig geringen Anzahl von Versuchen glaube ich folgende Schlüsse ziehen zu dürfen:

1. Die biologische Methode zur Ermittlung der Verdauungsfähigkeit des Darmcanals auf die Eiweisssubstanzen ergab ein negatives Resultat.

2. Die Ursache des negativen Ergebnisses dieser Methode ist wahrscheinlich darin zu suchen, dass die Eiweisssubstanzen selbst in jenen Fällen, wo sie unresorbirt bleiben, durch ihr Verweilen im Verdauungstractus so in ihrer moleculären Constitution beeinflusst werden, dass sie ihre Eigenschaft, mit dem entsprechenden specifischen Serum einen Niederschlag zu bilden, eingebüsst haben.

3. Es ist im höchsten Grade wahrscheinlich, dass diese Beeinflussung des Eiweisses durch die Wirkung des Magensaftes, speciell der Pepsinsalzsäure und im Falle der Abwesenheit der letztern durch die Milchsäure hervorgerufen wird.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, Hrn. Prof. Dr. Wassermann, auf dessen Initiative und in dessen Laboratorium ich diese Arbeit ausgeführt, für die mir gewährte Hülfe und Rath meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Litteratur-Verzeichniss.

1. Olaf Hammarsten, *Lehrbuch der physiol. Chemie.* 1904.
 2. L. Michaelis und C. Oppenheimer, *Ueber Immunität gegen Eiweisskörper.* 1902.
 3. Boas, Ueber das Vorkommen und diagnostische Bedeutung der Milchsäure im Mageninhalt. *Münchener med. Wochenschrift.* 1893. Nr. 43.
 4. Albu und Calvo, Ueber die Ausscheidung von gelösten Eiweisskörpern in den Fäces und ihre Verwerthung u. s. w. *Zeitschrift für klin. Medicin.* Bd. LII.
 5. Oscar Simon, Ueber das Vorkommen und den Nachweis gelöster Eiweisskörper in den Fäces. *Archiv für Verdauungskrankheiten.* Bd. X.
 6. Limissier et Lemoine, *Sur les substances precipitantes des Albumines contenues dans certains serum specifique.* *Compt. rend. de Soc. Biolog.* p. 276, 369, 413.
 7. Hamburger, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1904. Nr. 23.
 8. Nuttall, *Blood Immunity.* Cambridge 1904.
-