

Aus dem physiologischen Institut der Universität Halle a. S. Weiterer Beitrag zur Diagnose der Schwangerschaft mittels der optischen Methode und dem Dialysier- verfahren.

Von Emil Abderhalden.

Auf Grund der Beobachtung, dass zwar arteigene, jedoch blutfremde Stoffe dann, wenn sie in die Blutbahn eindringen, bewirken, dass im Plasma Stoffe (Fermente) in Erscheinung treten, die das fremdartige Material abbauen können, haben wir mit Erfolg versucht, die Schwangerschaft durch Untersuchung des Blutes zu diagnostizieren. Es zeigte sich, dass das Blutplasma resp. -serum von Schwangeren Plazenta-eiweiss und aus diesem bereitetes Pepton abbaut. Es sind bis jetzt von mir zwei Methoden ausgearbeitet worden. Einmal vermischten wir Plazentapepton mit dem Plasma oder Serum und bestimmten dann die Drehung des Gemisches mittels eines guten Polarisationsapparates. Das Polarisationsrohr wurde dann in einen Brutschrank gebracht und von Zeit zu Zeit, z. B. alle 4 Stunden, die Drehung wieder abgelesen. Es ergab sich, dass das Drehungsvermögen sich fast gar nicht oder meistens überhaupt nicht änderte, wenn das Plasma resp. Serum von Nichtschwangeren stammte. Am besten bereitet man sich zu dieser Art der Prüfung eine Standardlösung von Plazentapepton, z. B. eine 10 proz. Lösung. Von dieser verwendet man immer die gleiche Menge, z. B. 1 ccm. Ferner wendet man immer die gleiche Menge Serum resp. Plasma an, z. B. 2 ccm. Das Gemisch stellt man sich in einem kleinen Reagenzglas her, mischt es gut und giesst es dann, wenn es 1. ganz klar und 2. vollständig frei von Blutfarbstoff ist, in ein 2,5 cm langes, von der Firma Schmidt & Haensch, Berlin, für diesen Zweck konstruiertes Polarisationsrohr. Zunächst stellt man durch eine Reihe von Versuchen mit Serum von sicher Nichtschwangeren fest, ein wie grosser Ausschlag sich bei 36 stündiger Beobachtung feststellen lässt. Wir haben z. B. gefunden, dass das von uns verwendete Pepton mit Serum von Nichtschwangeren bei Verwendung von 1 ccm Peptonlösung und 2 ccm Serum Aenderungen im Drehungsvermögen bis zu 0,03° zeigte. Wir haben deshalb die Reaktion erst dann als positiv anerkannt, wenn die Drehung sich um mehr als 0,04° änderte. Trübe Gemische oder hämolytische dürfen unter keinen Umständen verwendet werden. Handelt es sich um Material, das nicht zu ersetzen ist, so kann man leicht getrübe Lösungen durch Filtration oder Zentrifugieren klären. Im allgemeinen ist es besser, ein neues Gemisch herzustellen. Hat man sich bei der Darstellung des Plazentapeptons genau an die Vorschrift gehalten, dann wird man nur äusserst selten Trübungen erhalten. In einzelnen Fällen ist das Serum durch Fetttropfchen getrübt. Man muss dann in solchen Verdünnungen arbeiten, dass man im Polarisationsrohr die Drehung gut ablesen kann.

Die optische Methode hat uns in keinem einzigen Falle im Stiche gelassen. Sie liefert sichere Resultate und ist namentlich in qualitativer Beziehung dem Dialysierverfahren vorzuziehen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei weiterer Ausdehnung der Versuche die Art der Drehungsänderung bestimmte Beziehungen zu pathologischen Erscheinungen ergibt. Ferner lassen sich auch Vergleiche über die Raschheit des Abbaues des Peptons ziehen.

Die optische Methode erfordert grosse Übung im Ablesen der Drehung. Die Ablesung muss rasch erfolgen. Das Auge ermüdet ziemlich rasch. Ferner ist nur ein sehr guter Polarisationsapparat verwendbar. Endlich muss die Darstellung des Plazentapeptons mit grosser Sorgfalt genau nach der von mir gegebenen Vorschrift erfolgen¹⁾. Einfacher in der Ausführung und ebenso sicher ist das Dialysierverfahren. Durch dieses lässt sich allerdings nur die Frage entscheiden, ob ein Abbau eingetreten ist oder nicht, dagegen können keine Schlüsse auf die Art des Abbaues gezogen werden.

Das Dialysierverfahren wird am zweckmässigsten, wie folgt, durchgeführt. Eine frische Plazenta vom Menschen wird durch Waschen mit Wasser vollständig von Blut

¹⁾ Ich stelle zur Erlernung der Methodik mein Institut und mich gerne zur Verfügung.

befreit. Am besten bringt man die Plazenta, nachdem man sie in kleine Stücke zerschnitten hat, in eine Schale und lässt Wasser einströmen. Man kann vorher fötalen und mütterlichen Anteil der Plazenta trennen, doch ist es nicht nötig. Unterdessen hat man in einem Emailtopf oder einer Porzellanschale Wasser zum Sieden erhitzt. Es empfiehlt sich, ganz wenig Essigsäure (auf 2 Liter Wasser 2 Tropfen Eisessig) zuzusetzen. In die kochende Flüssigkeit wirft man die Plazentastücke. Das Kochen wird 5 Minuten fortgesetzt. Nun giesst man das Wasser durch ein Koliertuch oder ein Faltenfilter ab, wobei man dafür sorgt, dass die koagulierte Plazenta möglichst im Gefäss bleibt. Man giesst Wasser auf und kocht nochmals 5 Minuten. Eine Probe des Kochwassers wird mit Natronlauge und einer ganz verdünnten Kupfersulfatlösung auf Biuretreaktion geprüft. Sie ist, wenn rasch gearbeitet wurde, immer negativ. Sollte sie positiv sein, dann müsste man das Wasser nochmals erneuern und das Kochen wiederholen. Der ganze Prozess der Darstellung des koagulierten Plazenta-eiweisses soll nicht mehr als 30 Minuten in Anspruch nehmen. Man giesst dann das Kochwasser mitsamt den Plazentarstückchen in eine weithalsige Flasche, giesst eine Schicht Toluol auf das Wasser und verschliesst die Flasche sorgfältig.

Als Dialysierschlauch empfiehlt sich die Diffusionshülse No. 579 der Firma Schleicher & Schuell, Düren (Rheinland). Der einzelne Versuch wird, wie folgt, angestellt. Man gibt in die Diffusionshülse²⁾ 1 g des der Flasche entnommenen koagulierten Plazentagewebes. Man zerzupft dieses beim Hineingeben in die Hülse in kleine, linsenkorn-grosse Stücke. Auf das Gewebe, das nun am Grunde der Hülse sich befindet, giesst man das zu prüfende Serum. Es genügen 2—3 ccm. Nun wird noch ein Tropfen Toluol zugegeben, um Fäulnis vorzubeugen. Jetzt wird die Diffusionshülse mit zwei Fingern am offenen Ende zugehalten und dann unter dem Wasserhahn gründlich abgespült. Diese Vorsichtsmassregel ist unbedingt notwendig. Es kann zu leicht beim Einfüllen des Plazentagewebes und speziell des Serums etwas an der Aussenseite der Hülse haften bleiben. Dadurch würden natürlich Fehler bedingt. Nun gibt man die gespülte Hülse in ein kleines Becherglas oder noch besser in einen kleinen weithalsigen Erlenmeyerkolben, oder man lässt sich besondere Gefässe für diese Versuche anfertigen. Das Gefäss, das zwischen Hülse und Gefässwand keinen grösseren Abstand als höchstens ca. 0,25 cm lassen soll, wird nun mit 15 ccm Wasser beschickt. Dieses wird ebenfalls mit einer dünnen Toluolschicht bedeckt. Nun bringt man das Ganze in den Brutschrank und prüft nach 12—16 Stunden die Aussenflüssigkeit auf Biuretreaktion. Man nimmt 10 ccm des Dialysates und fügt dazu 5 ccm 33 proz. Natronlauge, mischt gut durch und gibt nun aus einer Pipette oder Bürette sorgfältig soviel einer sehr stark verdünnten Kupfersulfatlösung (0,25 proz. Lösung), dass auf der Oberfläche des Gemisches gerade ein ca. 0,25—0,5 cm breiter Ring entsteht. Man beobachte nun genau das Verhalten des blauen Ringes an der Grenze zu der zu prüfenden Lösung hin. Die Reaktion ist dann als positiv anzusehen, wenn an dieser Grenze ein rötlicher Ring sich einstellt. Er hebt sich gegen den oberen blauen Ring besonders deutlich ab. Man verhöhe alles Umschütteln.

Sehr wichtig ist die Behandlung des zu prüfenden Blutes. Es darf nicht geschüttelt werden. Am besten lässt man ca. 10 ccm Blut direkt in ein Zentrifugierrohrchen fliessen. Das geronnene Blut wird zentrifugiert, das klare Serum abgehoben und zu den Versuchen verwendet. Es empfiehlt sich, wenn immer möglich, das Dialysierverfahren und die optische Methode neben einander anzuwenden. Ist Hämolyse eingetreten, dann verwerfe man die Probe. Sie wird nie einwandfreie Resultate geben können. Die eingetretene Hämolyse sagt aus, dass Blutkörperchen untergegangen sind. Bei deren Zerfall sind aus ihnen Fermente ins Serum übergegangen.

²⁾ Da es vorkommt, dass einzelne dieser Hülsen zu dicht sind, empfiehlt es sich, jede mittels eines Peptons z. B. mittels Witte-Peptons auf ihre Durchlässigkeit zu prüfen. Die sorgfältig gewaschenen Hülsen werden am besten unter Wasser, das mit Toluol bedeckt ist, aufbewahrt. Auf keinen Fall sollen die Hülsen trocken zur Verwendung kommen. Sie sind vor dem Gebrauch mit Wasser anzufeuchten.

Von allergrösster Bedeutung sind Kontrollversuche! Man unterlasse es nie, gekochtes Plazentagewebe allein zu dialysieren und Serum für sich der Dialyse zu unterwerfen. Da man doch gewöhnlich ganze Serien untersucht, nehmen diese Kontrollen wenig Zeit weg. Diese Kontrollen sind namentlich dann nötig, wenn man Plazentagewebe verwendet, das schon längere Zeit aufbewahrt worden ist. Wir haben allerdings bis jetzt niemals positive Resultate beim Dialysieren von Serum erhalten und auch das Plazentagewebe erwies sich stets als frei von dialysierbaren, die Biuretreaktion gebenden Körpern.

Es unterliegt keinem Zweifel, dass die Ausführung und speziell die Erkennung der Biuretreaktion einige Übung erfordert. Ich habe deshalb versucht, eine Methode ausfindig zu machen, die in der Hand eines jeden klare Resultate geben muss. Ich versuchte zunächst alle bekannten Farbreaktionen auf Peptone. Sie erwiesen sich alle als nicht ganz zuverlässig. Schliesslich verwendete ich das schon früher von mir erprobte Triketohydrindendehydrat, dessen Darstellung wir Ruhemann verdanken. Diese Verbindung, die von den Höchster Farbwerken in den Handel gebracht werden soll, gibt mit Verbindungen, die eine COOH-Gruppe und eine Aminogruppe in α -Stellung enthalten, eine intensive violettblaue Farbe. Eiweisskörper, Peptone, Polypeptide und Aminosäuren geben diese Reaktion. Man kann somit mit Hilfe des Triketohydrindendehydrats die genannten Verbindungen nicht unterscheiden. Wird Blut enteiweiss, dann gibt das Filtrat bei genügender Konzentration auch eine Blaufärbung mit dem Reagens. Dialysiert man normales Blut längere Zeit gegen Wasser, dann erhält man im Dialysat nach erfolgter starker Konzentration ebenfalls Blaufärbung.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass man das Triketohydrindendehydrat nur unter ganz besonderen Kautelen anwenden kann. Das Reagens hat in seiner Empfindlichkeit seine Grenzen und diese Eigenschaft ist nun zu benützen, um es zum Nachweis von Abbauprodukten im Dialysat zu verwenden. Man verwendet auch hier die Diffusionshülsen von Schleicher & Schuell, gibt in diese 1 g (0,5 g genügen auch!) des gekochten Plazentagewebes und dazu 2—3 ccm Serum. Nun wird die Hülse, wie oben beschrieben, abgespült und in 15 ccm Wasser eingestellt. Nach Zugabe von wenig Toluol zum Wasser und zum Hülseninhalt dialysiert man 16 Stunden bei 37°. Nun entnimmt man mit einer Pipette 10 ccm des Dialysates — es muss klar sein — und gibt diese in ein grosses Reagenzglas. Zu dieser Lösung fügt man genau 0,2 ccm einer 1 proz. wässrigen Lösung von Triketohydrindendehydrat. Die Lösung bleibt farblos. Jetzt erhitzt man rasch zum Kochen und kocht dann 1 Minute ununterbrochen³⁾. Nach kurzer Zeit tritt, falls die Reaktion eine positive ist, eine prachtvolle Violettblaufärbung ein. Ist die Reaktion negativ, dann bleibt die Lösung entweder ganz farblos oder sie nimmt einen gelben Ton an.

Die Reaktion ist so scharf, dass eine Unsicherheit in der Auslegung des Resultates unmöglich ist. Bis jetzt erhielten wir in keinem einzigen Falle eine positive Reaktion bei Nichtvorhandensein einer Schwangerschaft. War Schwangerschaft vorhanden, dann fiel die Reaktion stets positiv aus. Sie ist verschieden stark. Man könnte den Grad der Färbung gut kolorimetrisch feststellen.

Wir haben seit der letzten Mitteilung eine grössere Anzahl von Schwangerschaften mit stets positivem Erfolge untersucht. Vor allem interessierten uns schwierig festzustellende Schwangerschaften, wie Tubargravidität. Ferner untersuchten wir Fälle von Blasenmole, von Plazentaretention, von Hyperemesis gravidarum, von Schwangerschaftsdermatose usw. Endlich wurde auch die Eklampsie weiter studiert. Ueber die erhaltenen Resultate soll an anderer Stelle berichtet werden.

Die genannten Methoden sind ohne Zweifel noch für viele andere Probleme verwertbar. Ich habe begonnen, die Zerebrospinalflüssigkeit bei verschiedenen Krankheiten (metasyphilitischen Prozessen, Epilepsie usw.) zu studieren und

³⁾ Die Flüssigkeit muss möglichst frei von Toluol sein, weil sonst leicht Ueberkochen eintritt. Man entnehme deshalb die Dialysinflüssigkeit mittels einer unter die Toluolschicht geführten Pipette und koche unter Verwendung eines Siedestäbchens.

bis jetzt gefunden, dass in manchen Fällen Nervengewebe von ihr abgebaut wird. Ich verdanke das Material der grossen Güte des Herrn Geh.-Rat Anton-Halle a. S. Die Versuche werden fortgesetzt. Ferner versuche ich Einblicke in das Verhalten des Serums bei Karzinom zu erhalten. Ein einheitliches Resultat scheint nach den bisherigen Erfahrungen nicht erhalten zu sein. Es ist denkbar, dass der eine Organismus dann, wenn von einem primären Karzinom Zellen abgerissen und der Lymph- resp. Blutbahn zugeführt werden, imstande ist, gegen diese blutfremden Elemente Fermente mobil zu machen, während ein anderer den Abbau nicht vornehmen kann. Beim letzteren waren dann die Bedingungen zu Metastasen gegeben, im ersteren Falle dagegen wäre eine erfolgreiche Abwehr gegen die Verpflanzung von Krebszellen wohl möglich. Ein einheitliches Bild ist somit kaum zu erwarten. Es wäre denkbar, dass man auf dem folgenden Wege für die Diagnose und event. in gewissem Sinne für die Prognose Anhaltspunkte erhalten könnte. Spritzt man einem normalen Tier aus Krebsgewebe bereitetes Pepton in die Blutbahn ein, dann findet man nach 2—3 Tagen im Blutserum Fermente, die das gespritzte Pepton abbauen. Ebenso wird ohne Zweifel der Mensch reagieren, sofern er kein Karzinom besitzt. Ist ein solches vorhanden, dann ist nach den Untersuchungen von Freund, Kaminer und Neuberg zu erwarten, dass in manchen Fällen ein Abbau ausbleibt. Es wären dies die prognostisch ungünstigen Fälle, weil der Metastase keine Grenzen gezogen sind. Ein derartiger Organismus hat eine wichtige Schutzmassregel eingebüsst. Er vermag das Lymph- und Blutfremde nicht mehr durch Abbau zu zerstören. Es wird sich bei jeder einzelnen Fragestellung darum handeln, dasjenige Substrat ausfindig zu machen, das dem Abbau unterliegt. Man wird auch das resp. die Fermente am richtigen Orte suchen müssen. Ich habe die bestimmte Hoffnung, dass Methoden geschaffen sind, die der Pathologie und damit auch der Physiologie von Nutzen sein werden.

Um Missverständnissen vorzubeugen, sei auch an dieser Stelle betont, dass die Annahme, wonach die bei der Schwangerschaft beobachtete Reaktion — Abbau von Plazentaeiweiss durch das Blutserum — auf das Uebertreten von blutfremden Chorionzottenzellen bedingt ist, vorläufig nur eine Hypothese darstellt. Sie gab den Anlass zur Prüfung auf die beobachteten abbauenden Stoffe. Da die Reaktion schon im ersten Monat der Schwangerschaft positiv ausfällt, ist sie vielleicht auf einen Austausch allgemeinerer Natur zwischen Fötus und Mutter zurückzuführen⁴⁾. Hervorgehoben werden muss ferner, dass der Nachweis der proteolytischen Fermente im Serum der Mutter nur einen Teil des ganzen Problems umfasst. Man wird auch nach einer Vermehrung resp. einem Auftreten der übrigen Fermente im Blutplasma resp. -serum suchen müssen.

Die optische Methode und das Dialysierverfahren sind nicht nur mit Erfolg bei der Diagnose Schwangerschaft beim Menschen verwendet worden, sondern auch bei Kühen, Hunden, Meerschweinchen und Kaninchen. Es sollen auch Pferde usw. untersucht werden. Es ist zu hoffen, dass die erwähnten Methoden hier von praktischem Nutzen sein werden.

Literatur.

Vgl. die Darstellung des Plazentapeptons, die Grundlagen der ganzen Methodik und die theoretischen Ueberlegungen in: Emil Abderhalden: Schutzfermente des tierischen Organismus. Ein Beitrag zur Kenntnis der Abwehrmassregeln des tierischen Organismus gegen körper-, blut- und zellfremde Stoffe. J. Springer, Berlin, 1912. — Ferner: Emil Abderhalden: Diagnose der Schwangerschaft mit Hilfe der optischen Methode und des Dialysierverfahrens. Münch. med. Wochenschr. 1912, No. 24.

⁴⁾ Allerdings sind nach den Beobachtungen von H. Peters (Die Einbettung des menschlichen Eies. Franz Deuticke, Leipzig-Wien, 1899), von H. Strahl und R. Beneke (Ein junger menschlicher Embryo. J. F. Bergmann, Wiesbaden, 1910) und ferner von Thomas H. Bryce und John H. Teacher (Contributions to the study of the early development and imbedding of the human ovum. James Maclehose and Sons, Glasgow, 1908) bereits im ersten Monat Chorionzotten vorhanden, doch fragt es sich, ob bereits ein Ablösen von Zellen stattfindet.