

### 335. O. Emmerling: Die Zersetzung von Fibrin durch Streptococcen.

[Aus dem I. Berliner Universitätslaboratorium.]

(Eingegangen am 24. Juli.)

Bei einer früheren Gelegenheit<sup>1)</sup> habe ich mitgetheilt, dass bei der Zersetzung von Eieralbumin durch einen der bekanntesten Eitererreger, den *Staphylococcus aureus*, neben gasförmigen Producten wesentlich Ammoniak, Amine und fette Säuren entstehen, dass es dagegen nicht gelang, giftige Zersetzungsproducte nachzuweisen. Da die schweren Erscheinungen, welche eine Pyaemie begleiten, jedoch auf die Erzeugung derartiger Körper durch die dabei beteiligten Bacterien hinzudeuten scheinen und im Eiter die *Staphylococcen* meist von *Streptococcen* begleitet zu werden pflegen, so hielt ich es für wünschenswerth, auch mit letzteren Mikroben in gleicher Richtung zu arbeiten. Statt des Eieralbumins wählte ich diesmal Blutfibrin. Ich will nicht unerwähnt lassen, dass bereits Brieger<sup>2)</sup> Fleisch der Einwirkung von *Streptococcen* ausgesetzt hat; giftige Stoffwechselproducte konnte er nicht nachweisen. Brieger hat jedoch sein Augenmerk fast ausschliesslich auf die basischen Körper gerichtet, die übrigen Zersetzungsproducte der Albuminate sind nicht weiter berücksichtigt worden, was insofern einer Ergänzung bedurfte, als die physiologische Wirkung vieler derartiger, nicht basischer Körper noch sehr wenig studirt ist.

Die verwendeten *Streptococcen* waren Reinculturen des *Streptococcus longus* und zwar eine als *Strept. long. Petruschky* bekannte, besonders virulente Form. Das Fibrin wurde aus dem Blute frisch geschlachteter Schweine gewonnen und mit verdünnter Soda und Wasser gewaschen, bis es nur noch röthlich gefärbt war. Vier Kilo feuchtes Fibrin wurden nebst 3 Liter Wasser in geräumiger Flasche 4 Tage nach einander je 2 Stunden bei 100° sterilisirt. Diese Zeit ist erforderlich, weil das Innere der breiigen Masse sich nur langsam bis zur Kochtemperatur des Wassers erwärmt.

Nach viermaligem Sterilisiren erschien der Flascheninhalt bacterienfrei. Er wurde nun mit den Mikroben geimpft, die Luft in der Flasche durch Wasserstoff verdrängt und letztere bei 40° im Thermostaten gehalten. Ohne dass nennbare Gasentwicklung eintrat, war bereits nach einigen Tagen eine Verminderung des Fibrins zu bemerken, nach 3 Wochen bestand der Flascheninhalt aus einer trüben gelblichen Flüssigkeit, welche einen käseartigen, aber durchaus nicht fauligen Geruch entwickelte und schwach alkalisch reagirte. Die Filtration durch Pukallsche Filter war eine langwierige Arbeit und erforderte in vorliegendem

<sup>1)</sup> Diese Berichte 29, 2721.

<sup>2)</sup> Ueber Ptomaine.

Falle wegen des sich an die Filter setzenden Schleimes 5 Tage, wobei ca. 4 Liter filtrirte klare Flüssigkeit gewonnen wurden, welche durchaus bacterienfrei war. Beim Kochen blieb dieselbe klar, gab aber starke Biuretreaction, Zinkchlorid bewirkte schwache Trübung, das dreifache Volum Alkohol macht sie opalisiren. Quecksilberchlorid erzeugte einen starken voluminösen Niederschlag, der sich in heissem Wasser zum grössten Theil löste.

Ein Meerschweinchen, ein Frosch und eine Maus reagirten nicht auf subcutane Einspritzung.

Um die Zerseizungsproducte des Fibrins nachzuweisen resp. zu isoliren, habe ich, da dieselben vielleicht sehr zersetzlicher Natur waren, nicht, wie es beim Nachweis von Ptomainen sonst zu geschehen pflegt, die mit Salzsäure angesäuerte Flüssigkeit auf dem Wasserbade verdampft und dann zunächst mit Alkohol ausgezogen, sondern habe sämtliche Verdampfungen im Vacuum bei einer  $40^{\circ}$  nicht übersteigenden Temperatur vorgenommen.

Die ursprünglich schwach alkalische Flüssigkeit wurde beim Verdampfen sauer, während die Destillate alkalisch reagirten.

Der 250 g betragende Rückstand von 4 Liter Flüssigkeit schied beim Stehen an einem kühlen Orte nach mehreren Tagen kugelförmige, kreibige Aggregate ab, welche nach dem Absaugen und Trocknen auf Thon keinen festen Schmelzpunkt zeigten und deshalb aus Ammoniakhaltigem Wasser umkrystallisirt wurden. Die erste Krystallisation bestand aus feinen Nadeln, welche nun constant bei  $235^{\circ}$  schmolzen, sich in kaltem Wasser sehr schwer, etwas besser in heissem, leichter in ammoniakhaltigem und sehr leicht in verdünnter Salzsäure lösten. In Alkohol waren sie unlöslich. Millon'sches Reagenz erzeugte Rothfärbung.

Bei der Analyse wurde gefunden: 7.57 pCt. N.

Es lag Tyrosin  $C_9H_{11}NO_4$  vor, welches 7.6 pCt. N verlangt, und mit dem der Körper in seinen physikalischen Eigenschaften übereinstimmt. Die Menge des entstandenen Tyrosins betrug 0.63 g.

Aus der Mutterlauge des Tyrosins krystallisirten allmählich feine Blättchen aus, deren Menge aber nur 0.09 g betrug. Sie besaßen keinen Schmelzpunkt und zeigten die äusseren Eigenschaften des Leucins. Eine Analyse konnte nicht gemacht werden.

Die ursprüngliche Lösung, aus welcher die beiden Amidosäuren krystallisirt waren, wurde, obschon sie sauer reagirte, mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit Aether erschöpft, bei dessen Verdunsten 29 g flüssige übelriechende Säuren zurückblieben. Nach der genauen Neutralisation mit Natron erzeugte basisches Bleiacetat einen Niederschlag, welcher mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Beim Verdampfen und Reinigen mit Thierkohle wurden 0.36 g reine Bernsteinsäure erhalten vom Schmp.  $185^{\circ}$ .

Analyse: Ber. für  $C_4H_8O_4$ .

Procente: C 40.6, H 5.08.

Gef. » » 40.5, » 5.1.

Das Filtrat vom Bleiniederschlag wurde nun wieder mit Schwefelsäure sauer gemacht und mit Aether ausgeschüttelt. Da bei der fractionirten Destillation genaue Siedepunkte nicht erzielt wurden, so wurden folgende Fractionen gesammelt:

bis 115°: wenige Tropfen

115—130°: 2 g

130—150°: 2.7 g

150—170°: 19.5 g

170—190°: einige Tropfen

190—210°: 3.8 g

Das über 210° Siedende zersetzte sich.

Die einzelnen Fractionen wurden in Baryum- und dann in Silber-Salze übergeführt. Wiederholte Krystallisationen ermöglichten eine genaue Trennung; das vorherige Fractioniren erleichtert dieselbe ganz ausserordentlich. Die wesentlichen Bestandtheile der einzelnen Fractionen waren folgende fette Säuren:

115—130°. Essigsäure.

Analyse: Ber. für  $C_2H_3O_2Ag$ .

Procente: Ag 64.6.

Gef. » » 64.3.

130—150°. Propionsäure.

Analyse: Ber. für  $C_3H_5O_2Ag$ .

Procente; Ag 59.6.

Gef. » » 59.9.

150—170°. Buttersäure.

Analyse: Ber. für  $C_4H_7O_2Ag$ .

Procente: Ag 55.3.

Gef. » » 55.1.

Die Eigenschaften des Kalksalzes documentirten die Säure als normale Buttersäure.

170—190°. Es muss unentschieden bleiben, ob Valeriansäure vorhanden war. Das erhaltene Silbersalz lag in zu geringer Menge vor und gab keine stimmenden Zahlen.

190—210°. Capronsäure.

Analyse: Ber. für  $C_6H_{11}O_2Ag$ .

Procente: Ag 48.4.

Gef. » » 47.9.

Aus den höher siedenden Antheilen liess sich weder durch Fractioniren, noch durch Darstellung von Salzen eine charakteristische Substanz isoliren; durch Silbernitrat entstand in der neutralisirten Flüssigkeit ein brauner, harzartiger Niederschlag.

Mit Bestimmtheit konnten demnach als Zersetzungsproducte des Fibrins nachgewiesen werden die Fettsäuren von der Essigsäure bis

zur Capronsäure, nur die Valeriansäure scheint zu fehlen; als Hauptmenge tritt auch hier, wie bei der Einwirkung des Staphylococcus auf Eieralbumin, die normale Buttersäure auf.

Die von den Fettsäuren befreite schwefelsaure Lösung wurde mit Baryumchlorid von der Schwefelsäure befreit und im Vacuum zum Syrup eingedampft. Beim Versetzen mit Alkohol entstand eine klebrige, zähe, unlösliche Masse von Leim, Peptonen und anorganischen Salzen, die alkoholische Lösung schied beim Zusatz von alkoholischem Bleiacetat einen dicken Niederschlag ab, welcher ausser einer kleinen Menge von Bernsteinsäure nur Bleichlorid enthielt; es wurden noch 0.15 g Bernsteinsäure gewonnen, welche früher nicht in den Aether übergegangen war. Das Filtrat vom Bleiniederschlag wurde nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff mit alkoholischem Quecksilberchlorid versetzt. Der sehr reichliche Niederschlag war körnig und löste sich zum Theil in heissem Wasser. Der unlösliche Theil bestand aus Quecksilberverbindungen von Eiweisskörpern, während die Lösung hauptsächlich Amine enthielt. Nach Entfernung des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff und Eindampfen wurde mit absolutem Alkohol behandelt, welcher zunächst Salmiak entfernte, die alkoholische Lösung gab mit Platinchlorid noch eine Fällung von Platinsalmiak. Da beim Eindampfen kein Platindoppelsalz mehr auskrystallisirte, entfernte man das Platin durch Schwefelwasserstoff, dampfte ein und versetzte mit Goldchlorid. Der sehr reichlich entstehende, gelbe, schön krystallisirte Niederschlag bestand aus Trimethylamingoldchlorid.

Analyse: Ber. für  $(\text{CH}_3)_3\text{N} \cdot \text{HCl} \cdot \text{AuCl}_3$ .

Procente: Au 49.36.

Gef. » » 49.43.

Die vom Golddoppelsalz abfiltrirte Mutterlauge enthielt keine basischen Körper mehr.

Es blieb jetzt noch die mit Bleiacetat und Quecksilberchlorid behandelte letzte Mutterlauge zu untersuchen.

Nach Entfernung von gelöstem Quecksilber durch Schwefelwasserstoff wurde wieder eingedampft und mit Alkohol ausgezogen. Die verdünnte alkoholische Lösung gab weder mit Platinchlorid noch mit Goldchlorid Niederschläge; beim Verdunsten des Alkohols hinterblieb eine syrupöse Flüssigkeit, welche auch bei wochenlangem Stehen über Schwefelsäure nicht krystallisirte. Die Substanz roch schwach pyridinartig, doch trat dieser Geruch deutlich beim Versetzen mit Alkali auf. In wenig Wasser gelöst, erzeugte sie mit Goldchlorid eine ölige gelbe Fällung, welche sich sehr schnell durch Reduction des Goldes grün und zuletzt schwärzlich färbte; Platinchlorid gab keine Fällung, doch trat auch hier Reduction ein. Liess man aber platinhaltige Flüssigkeit langsam über Schwefelsäure verdunsten, so hinterblieben

gelbrothe Krystalle, welche mit wenig Alkohol gewaschen und auf Thon getrocknet wurden. Bei der Analyse wurden 30.48 pCt. Platin gefunden.

Auch eine Pikrinsäureverbindung der Base konnte erhalten werden, als die heissen, sehr concentrirten Lösungen gemischt wurden. Der Niederschlag wurde aus Benzol umkrystallisirt und bestand aus feinen gelben Nadeln, welche nicht ganz scharf bei 172—175° schmolzen.

Analyse: Procente C 47.83, H 4.21, N 15.93.

Aus den für das Platindoppelsalz sowohl, wie für die Pikrinsäureverbindung gefundenen Zahlen ergibt sich unzweifelhaft, dass hier eine Base von der Zusammensetzung des Collidins vorliegt.

Analyse: Ber. für  $(C_8H_{11}N \cdot HCl)_2PtCl_4$ .

Procente: Pt 30.2.

Gef. » » 30.48.

Analyse: Ber. für  $C_8H_{11}N \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ .

Procente: C 48.00, H 4.90, N 16.00.

Gef. » » 47.83, » 4.21, » 15.93.

Die Entscheidung freilich, als welches der bekannten Propylpyridine die Base anzusprechen ist, scheiterte an der geringen Menge, welche ich in Händen hatte; die ganze Quantität des salzsauren syrupförmigen Salzes betrug nur etwas über 1.3 g. Einige Anhaltspunkte sind aber doch gegeben. Die Beschaffenheit resp. die Löslichkeit des Gold- und Platin-Salzes einerseits und der Schmelzpunkt des Pikrats andererseits unterscheiden die Base sowohl von dem  $\alpha$ -Propylpyridin aus Coniin, wie vom  $\alpha$ -Isopropylpyridin und  $\gamma$ -Isopropylpyridin. Das  $\beta$ -Collidin (Methyläthylpyridin) soll nach Oechsner eine schwer lösliche Quecksilberverbindung geben, was die vorliegende Base auch nicht thut. Die Eigenschaften des  $\alpha$ -Collidins entsprechen, soweit sie bekannt sind, am meisten denen der vorliegenden Substanz. Es liegt hier ein gleicher Fall vor, wie mit der Base, welche Nencki<sup>1)</sup> bei der Fäulniss von Leim und Oechsner beim Faulen des Tintenfisches erhalten haben, über beide Basen ist nichts Näheres bezüglich ihrer Constitution bekannt, wahrscheinlich sind sie identisch. Von ihnen unterscheidet sich diese Base aus Fibrin durch die leichte Löslichkeit des Platinsalzes. Gautier und Etard<sup>2)</sup> konnten aus faulendem Fischfleisch ebenfalls eine Pyridinbase isoliren, welche aber nach ihnen ein Hydrocollidin ist  $C_8H_{13}N$ .

Auch aus der physiologischen Wirkung liess sich kein Schluss auf die Identität mit bekannten gleichzusammengesetzten Basen ziehen, denn meines Wissens sind wohl die wenigsten Pyridinbasen nach

<sup>1)</sup> Nencki: Ueber die Zersetzung der Gelatine und des Eiweisses bei der Fäulniss mit Pankreas.

<sup>2)</sup> Referirt bei Beilstein.

dieser Richtung untersucht. Meine Base zeigte absolut keine toxischen Eigenschaften. Das Versuchthier (Meerschweinchen) reagirte gar nicht darauf.

Das Auftreten solcher collidinähnlicher Basen, welche sonst nur direct bei Fäulnisserscheinungen beobachtet worden sind, ist insofern interessant, als im vorliegenden Falle eine Eiweisszersetzung stattgefunden hat, welche mit eigentlicher Fäulniss nichts zu thun hat, da die dafür so charakteristischen Producte wie Phenole, Oxysäuren und Indol gänzlich fehlen.

Die bei der Zersetzung des Fibrins durch die Streptococcen entstandenen flüchtigen Basen waren zum grossen Theil bei der Destillation der ursprünglichen Flüssigkeit im Vacuum in das Destillat gegangen, welches daher stark alkalisch reagirte. Sie wurden nach den gewöhnlichen Methoden getrennt; ausser viel Ammoniak und etwas Trimethylamin wurde auch Methylamin gefunden, dessen Platinsalz in goldgelben Blättchen erhalten wurde.

Analyse: Ber. für  $(\text{CH}_3 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{HCl})_2 \text{PtCl}_4$ .

Procente: Pt 41.6.

Gef. » » 41.4.

Die früher erwähnten, durch Alkohol aus der eingedampften Lösung abgeschiedenen, peptonartigen Substanzen dienten noch zu einem Thierversuch, da die Giftigkeit solcher Körper bisweilen beobachtet worden ist. Sie wurden mehrmals in Wasser gelöst und durch Alkohol wieder abgeschieden. Zuletzt stellten sie ein bräunliches Pulver dar. 2 ccm einer  $\frac{1}{2}$ -procentigen wässrigen Lösung wurden einem Meerschweinchen subcutan beigebracht. Das Thier zeigte keine Erhöhung der Körpertemperatur, lebte auch noch 3 Tage anscheinend ganz ohne Unbequemlichkeiten. Am 4. Tage magerte es merklich ab, frass nicht mehr und starb am 6. Tage ohne besondere hervortretende Erscheinungen. Die Section zeigte absolut kein Bild einer Pyämie; die Injectionsstelle war nebst den nächstliegenden Theilen geröthet, eitrig Herde in den Organen waren nicht vorhanden.

Die vorliegende Untersuchung hat von Neuem den Beweis geliefert, dass es nicht möglich ist, nach den gebräuchlichen Methoden die bei eitrigen Processen etwa gebildeten giftigen Stoffwechselproducte der Bacterien zu isoliren. Vielleicht ist nur der lebende Organismus im Stande, den in Frage kommenden Mikroorganismen die in ihrer Zelle fest zurückgehaltenen Giftstoffe zu entziehen. Nicht ausgeschlossen bleibt allerdings auch, dass bei den vorbereitenden Operationen, wie z. B. dem lange andauernden Sterilisiren der zu zersetzenden Eiweissstoffe, Veränderungen vor sich gehen, welche auf die Richtung der eintretenden Spaltung von Einfluss sind.