

DIE UNLÖSLICHEN SUBSTANZEN DER LYMPHDRÜSE BEI SUKZESSIVER EXTRAKTION.

YASUSHI HAYASHI

Institut für Protein-Chemie, Yamaguchi Medizinische Hochschule, Ube.

(Eingegangen am 6. Juni 1956)

Die sukzessive Extraktion, die zuerst *Nakamura* et al (1,2) studierten, besteht darin, dass man den Gewebsbrei mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel extrahiert und den Niederschlag auf dieselbe Weise weiter extrahiert. Die Extraktionsrate, d. i. das Verhältnis der Konzentration der zu extrahierenden Substanz in einem Extrakt zu der in dem folgenden, lässt sich nach der folgenden Formel berechnen, insofern weder eine Verteilung noch eine Adsorption der Substanz stattfindet:

$$K'_n = 1/(1 + \rho_n),$$

wobei ρ_n die Dichtigkeit des Niederschlags bedeutet.

Durch die sukzessive Extraktion konnten *Nakamura* et al die Konstanz der Extraktionsrate bei den Extraktionen der Leber, Niere, Lunge usw. bestätigen. Aber das Hirn hat die Besonderheit gezeigt, dass es 20% unlösliche Substanzen enthält, um damit die Extraktionsrate kleiner als berechnet ausfallen zu lassen, was der Verfasser (3) schon erörtert hat.

Andererseits verhielt sich die Lymphdrüse auffallend bei der sukzessiven Extraktion, indem sie die Diskontinuität der Extraktionsrate zeigte. Eine Reihe von experimentellen Resultaten wird in der Tabelle 1 gezeigt.

TABELLE 1.

Sukzessive Extraktion des Stickstoffs und des Phosphors der Lymphdrüse

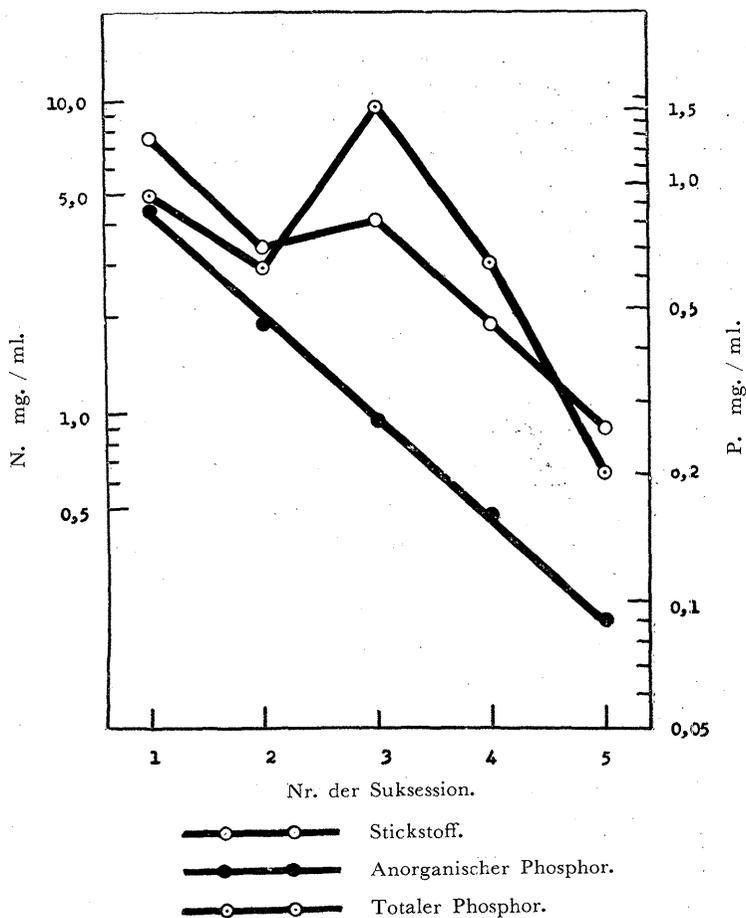
	Nr. der Sukzession				
Stickstoff	1	2	3	4	5
Cn, mg. N/ml.	7,56	3,40	4,10	1,91	0,90
K'_n	0,45	1,21	0,47	0,47	
Anorganischer Phosphor					
Cn, mg. P/ml.	0,86	0,46	0,27	0,16	0,09
K'_n	0,53	0,58	0,60	0,56	
Total-Phosphor					
Cn, mg. P/ml.	0,94	0,61	1,52	0,64	0,20
K'_n	0,65	2,51	0,42	0,31	

Cn : Konzentration der betreffenden Substanz.

$K'_n = C_{n+1}/C_n$: Extraktionsrate der Substanz.

Die extraktionsrate des Stickstoffs waren ungefähr 0,47, die etwas kleiner als die aus ρ_n berechneten ausfielen. Also nach der Theorie von *Nakamura* et al, sind die sukzessiven Extraktionen bloss eine Ausschöpfung der schon gelösten Substanzen. Aber bei der dritten Extraktion erhöht sich die Extraktionsrate plötzlich, indem die Konzentration des Stickstoffs in dem Zentrifugat höher als in demjenigen der vorigen Extraktion ausfällt. Dieses Verhältnis wird in der Abbildung 1 anschaulich dargestellt. Man kann die Diskontinuität der Extraktionsrate als eine Knickung der Kurve leicht beobachten.

Abb. 1. Extraktionskurve des Stickstoffs und des Phosphors der Lymphdrüse.



Merkwürdigerweise läuft die genickte Kurve parallel zu derjenigen, welche imaginär von der ersten Extraktion durch die zweite geradlinig weiter laufen würde. Also kann man die Knickung der Kurve folgendermassen erklären:

Zu dem extrahierbaren, schon gelösten Stickstoff, das von der ersten bis zur zweiten Extraktion extrahiert wurde, kam bei der dritten ein neuer extrahierbarer Stickstoff hinzu. Die wirkliche Extraktionskurve kann man als zusammengezt aus diesen zwei Kurven ansehen.

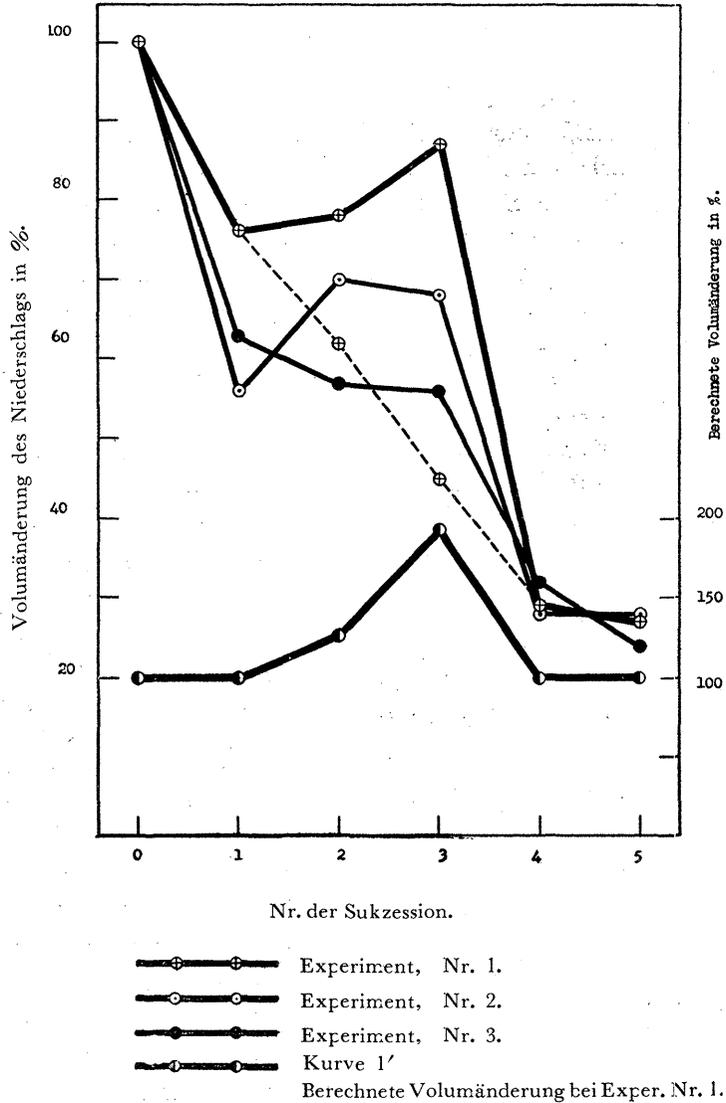
Dieser Umstand wird klarer, wenn man die beiden Extraktionskurven des anorganischen und des totalen Phosphors in Betracht zieht: Die erstere läuft ohne Knickung jedoch parallel mit der des Stickstoffs. Daraus kann man wohl annehmen, dass die Extraktionen der zuerst in die Lösung gekommenen Substanzen ganz normal laufen, dahingegen läuft die Extraktionskurve des totalen Phosphors mit der Knickung an der dritten Stufe wie die des Stickstoffs. Der gebundene Phosphor in dem Extrakt ist wahrscheinlich eiweissgebunden. Daher dürfte er ähnlich wie der Stickstoff extrahiert werden, da dieser auch aus makromolekularen Eiweissstoffen besteht. Also kann man folgendermassen annehmen: Der zweite extrahierbare Stickstoff könnte in einer besonderen Struktur der Zellen enthalten sein und hieraus nicht in die Lösung hineingeraten, weil er makromolekular ist. Er könnte nur durch das Zerstören der Struktur, das erst bei der dritten Extraktionsstufe irgendwie erfolgt, auf einmal in die Lösung gelangen und weiter extrahiert werden. Das Phosphat hingegen könnte durchaus unbehindert in die Struktur hineindringen und mit der Lösung herauskommen, und zwar in der Zeitdauer der Homogenisierung von ungefähr 15 Minuten, welches wohl möglich ist.

Wenn die obige Annahme zutreffen sollte, so ist die nächste Frage, was diese Struktur sein kann. Die Homogenisierung wurde mit dem Homogenisator (blade homogeniser) ausgeführt. Dadurch wurden die Zellkerne auch zerkleinert. Also würde es nicht einfach um die Zellkerne, sondern um eine noch kleinere Struktur handeln. In diesem Zusammenhang ist die Volumzunahme des Niederschlags merkwürdig. Wenn der Organbrei extrahiert wird, gehen die löslichen Substanzen in die Lösung hinein und infolgedessen muss das Volumen des Breis oder des Niederschlags nach und nach abnehmen.

In der Abbildung 2, zeigt die Kurve 1 eine Volumänderung des Niederschlags in einer Reihe sukzessiver Extraktionen. Wie man sieht, nahm das Volumen des zweiten und des dritten Niederschlags nicht ab, sondern blieb fast dasselbe. Da aber die löslichen Substanzen nach und nach extrahiert wurden und das Volumen des Niederschlags in der vierten Extraktion auf 30% des Originalbreis absank, müsste das Volumen des zweiten und des dritten Niederschlags dementsprechend so abnehmen, dass die punktierte Kurve bestände. Kurve 1' stellt den Prozentsatz des wirklichen Volumens in Bezug auf das Volumen, dargestellt nach der punktierten Kurve, wie es ohne Aufquellung sein könnte, dar. Wie aus der Abbildung ersichtlich, nahm das Volumen des Niederschlags unter den jetzigen experimentellen Bedingungen fast immer bei der ersten

Extraktion ab und bei der zweiten und der dritten zu, um wieder bei der veirten stürmisch abzunehmen. Leider sind die Resultate wie aus Tabelle 2 ersichtlich, nicht gut reproduzierbar, weil es hierbei wahrscheinlich um eine biologische Erscheinung, wie das Zerstören irgendeiner Struktur in den Zellen, handelt. Diese Erscheinung scheint dem Aufquellen und Platzen der Erytrozyten in einer hypotonischen Lösung zu gleichen. Aber der zweite extrahierbare Stickstoff trat

Abb. 2. Volumänderung des Niederschlags bei der sukzessiven Extraktion der Lymphdrüse.



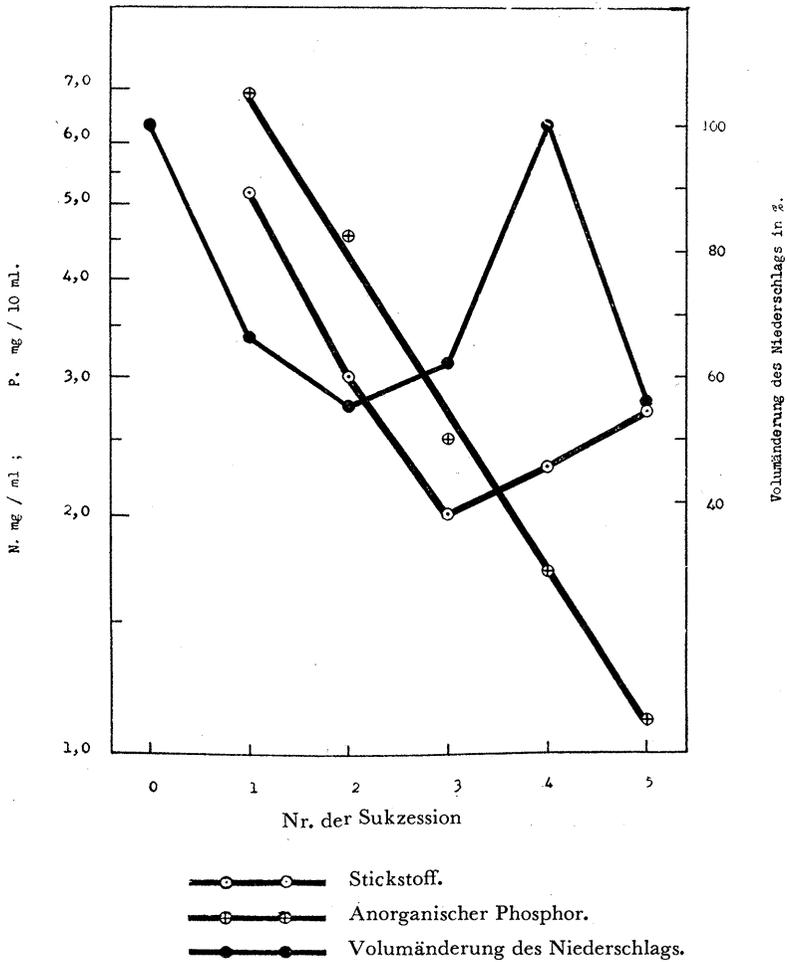
nicht mit der stürmischen Abnahme, sondern mit der Zunahme des Niederschlagvolumens in die Lösung hinein.

TABELLE 2.
Volumänderung des Niederschlags.

Nr. der Experimente	Nr. der Sukzession					
	0*)	1	2	3	4	5
1	100	76	78	87	29	27
2	100	56	70	68	28	28
3	100	63	57	56	32	24

*)Volumen des Originalbreis.

Abb. 3. Die Volumänderung des Niederschlags bei der abgekürzten Homogenisierung und die Extraktion des Stickstoffs und des Phosphors.

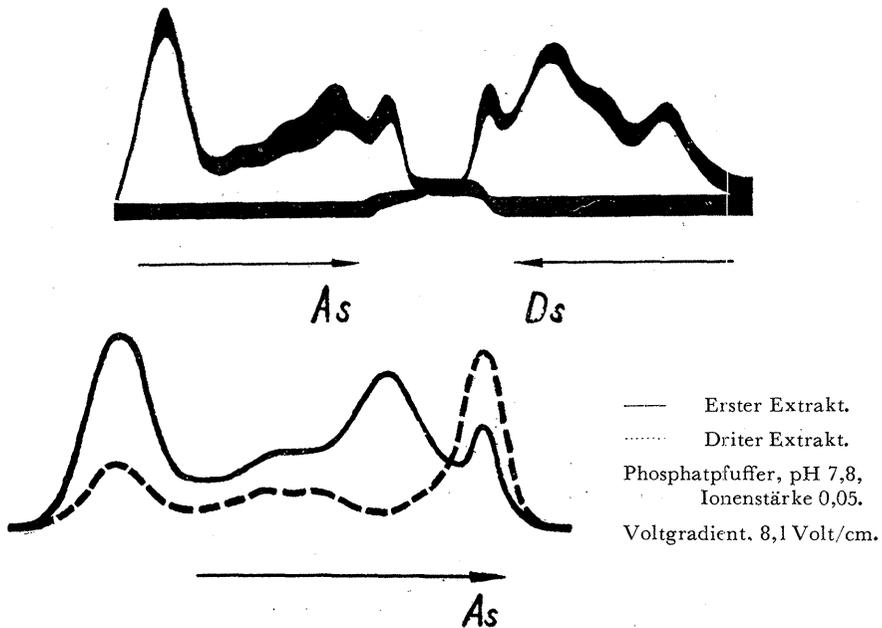


Aber wenn man die Homogenisierungszeit abkürzte, so wurde diese Beziehung nicht immer erhalten. In der Abbildung 3 ist eine Reihe von Extraktionen dargestellt: Die Homogenisierung wurde nur eine Minute ausgeführt. Der zweite Stickstoff ging nicht auf einmal, sondern allmählich in der dritten, vierten und fünften Stufe in die Lösung ein, obwohl der anorganische Phosphor ganz normal extrahiert wurde. Das Volumen des Niederschlags nahm bis zur vierten Extraktion zu, um erst in der fünften abzunehmen. Also stand das Erscheinen des zweiten Stickstoffs nicht immer in derselben Beziehung mit der Volumänderung des Niederschlags.

Andererseits trat die Zunahme des Niederschlagvolumens mit dem Gelatinieren der niedergeschlagenen Masse auf, was als eine Aufquellung der Nukleinsäure angesehen werden kann. Aber wie diese Volumänderung des Niederschlags mit der Aufquellung der Nukleinsäure zusammenhängt, konnte der Verfasser noch nicht näher beobachten. Es könnte vielleicht auf der stetigen Spaltung der Nukleinsäure beruhen, dass die Extraktionsrate des anorganischen Phosphors etwas grösser als erwartet ist.

Abbildung 4 zeigt die Elektrophoresediagramme der Lymphdrüsenextrakte. Wie leicht ersichtlich, sind die des ersten und des dritten Extrakts verschieden, m.a.W. die beiden Extrakte zeigen nicht die gleichen relativen Konzentrationen der elektrophoretischen Bestandteile.

Abb. 4. Elektrophoresediagramme der Lymphdrüsenextrakte.



Aus der Diskontinuität der Extraktionskurve, wie oben erwähnt, konnte man auf eine neue Auflösung des zweiten extrahierbaren Stickstoffs, der aus Eiweissstoffen besteht, schliessen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der erste und der zweite extrahierbare Stickstoff aus verschiedenen Eiweissen besteht. Also stimmt die Ungleichheit der relativen Konzentrationen der elektrophoretischen Bestandteile mit der Diskontinuität der Extraktionskurve überein. Leider konnte man noch keine quantitativ befriedigenden Resultate bekommen, wahrscheinlich auf Grund der Schwierigkeit des Konstanterhaltens der Homogenisierung usw., die die Zerstörung der Zellstruktur und damit die Auflösung des zweiten Stickstoffs beeinflussen. Die Elektrophoresediagramme der Lymphdrüsenextrakte wurden bereits von einigen Forschern (5–8) beobachtet. Die Verschiedenheit der Diagramme nach diesen Autoren könnte auch auf dem oben erwähnten Grund beruhen.

ZUR METHODIK

Die experimentelle Methode ist der von *Nakamura* et al (2) und dem Verfasser (3) angegebenen ähnlich.

Verfahren der sukzessiven Extraktion: Die mesenterialen Lymphdrüsen des Rindes wurden mit physiologischer NaCl-Lösung zwei- bis dreimal gewaschen, zerschnitten, dann 10 Minuten mit dem gekühlten Homogenisator homogenisiert. Der Gewebsbrei wurde mit einer gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung versetzt und nochmals homogenisiert. (Die Zeitdauer der Homogenisierung wurde unter Umständen für den besonderen Zweck gekürzt.) Das Homogenat wurde abgewogen und 30 Minuten lang bei 3,000 T.p.M. zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit der gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung homogenisiert, abzentrifugiert usw.

Die Bestimmung des gesamten Stickstoffs wurde nach der gewöhnlichen Halbmikro-Kjeldahl-Methode ausgeführt. Die des Phosphors nach Allen (4) und zwar die des totalen nach dem Digerieren mit Perchlorsäure und Wasserstoff-superoxyd.

Die Elektrophorese wurde mit einem *Tiselius*'schen Apparat (*Hitachi* Medium type) ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die "Extraktionsrate" des Stickstoffs bei der Lymphdrüse stimmt ungefähr mit der aus der Dichtigkeit des Niederschlags erwarteten überein.
2. Aber sie zeigt gewöhnlich auf der dritten Stufe die Diskontinuität, während diejenige des anorganischen Phosphors ohne Diskontinuität bleibt.
3. Die Volumänderung des Niederschlags wurde im Zusammenhang mit

dieser Diskontinuität erörtert.

4. Elektrophoresediagramme der Lypndrüsenextrakte wurden angegeben.

Es ist meine angenehme Pflicht, hier Herrn Prof. Dr. S. Nakamura meinen besten Dank für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit auszusprechen.

LITERATUR

- 1) NAKAMURA, S., HAYASHI, Y., TAKAHASHI, M. UND ZAIZEN, T.: *J. Biochem.*, (Japan), **41**, 1, 1954.
- 2) NAKAMURA, S., HAYASHI, Y. UND TANAKA, K.: *ibid*, **41**, 13, 1954.
- 3) HAYASHI, Y.: *Bull. Yanaguchi Med. School*, **1**, 141, 1953.
- 4) ALLEN, R. J. L.: *Biochem. J.*, **34**, II, 858, 1940.
- 5) WHITE, A. UND DOUGHERTY, T. F.: *Endocrinology*, **36**, 207, 1945.
- 6) ABRAMS, A. B. UND COHEN, P. P.: *J. Biol. Chem.*, **177**, 439, 1949.
- 7) ROBERTS, S. UND WHITE, A.: *J. Biol. Chem.* **178**, 151, 1949.
- 8) ABRAMS, A. B., COHEN, P. P. UND MEYER, O. O.: *J. Biol. Chem.*, **181**, 237, 1949.