

Untersuchungen über die Haltbarkeit der Hypophysenvorderlappenstoffe in Lösungen mit verschiedenem p_H .

Von

Joachim Kämmerer.

Mit 2 Abbildungen.

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. JANSSEN.)

1. Einleitung.

Die Untersuchungen über die Hormone des Hypophysenvorderlappens ergaben sehr häufig die Frage nach der Haltbarkeit der Substrate und Extrakte, die die wirksamen Stoffe enthalten sollten. Nachdem es gelungen war, in dem Azetonrockenpulver¹⁾ eine Form zu finden, in der die wirksamen Stoffe noch nach $1\frac{1}{2}$ Jahren in unverminderter Weise haltbar sind²⁾, mußte es interessieren, wie sich die aus dem Trockenpulver hergestellten Extrakte verhalten. Da die optimale Extraktionsfähigkeit der Hormone sich von dem p_H -Wert der zur Extraktion benutzten Lösung abhängig zeigte³⁾, ergab sich die Frage, ob eine Beziehung zwischen dem p_H der Lösung und der Haltbarkeit der darin wirksamen Stoffe vorliegt. Auch andere Untersuchungen, die als Ausgangsmaterial die frische Drüse oder daraus hergestellte Extrakte wählten, zeigten eine weitgehende Abhängigkeit der Wirksamkeit von dem p_H -Wert der Lösung⁴⁾.

2. Methodik der Untersuchungen für die gonadotrope Substanz.

Von den wirksamen Substanzen des Hypophysenvorderlappens werden lediglich die gonadotropen und die thyreotropen Stoffe auf ihre Wirksamkeit ausgewertet. Um für alle Untersuchungen das

¹⁾ A. LOESER, Arch. f. exper. Path., 148, 377 (1930).

²⁾ A. LOESER, Arch. f. exper. Path., 161, 730 (1931).

³⁾ MÜLLER, Zeitschr. f. Endokrinol. 1934, im Druck.

⁴⁾ LOEB u. BASSET, Proc. Soc. exper. Biol. Med., 27, 490 (1930). — DYKE u. WALLEN-LAWRENCE, J. of Pharm., 47, 163 (1933).

gleiche Material zu haben, wurde eine größere Menge Azeton-trockenpulver, das aus Rinderhypophyse gewonnen war, im Exsikator aufbewahrt und durch mehrere Grundauswertungen standardisiert¹⁾.

10 weiblichen, infantilen Ratten, im Gewicht von 40–50 g wurden in 6 Injektionen an 2 Tagen 40 mg Trockenpulver pro Tier, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, intraperitoneal injiziert. 96–100 Stunden nach erster Injektion wurden die Ovarien der Tiere herausgenommen, in 10%igem Formol fixiert und nach Einbettung in Paraffin in Serienschnitten mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und auf corpora lutea untersucht. Es ergab sich, daß 40 mg des verwendeten Materials bei 50% der Ratten corpora lutea hervorgerufen hatte, und es entsprach daher diese Menge einer Ratteneinheit, da 50% der Tiere als 1 R. E. genommen werden, um die physiologischen Schwankungen auszugleichen.

Nunmehr wurden Extrakte aus dem Trockenpulver hergestellt, indem eine Lösung von $p_H = 8,7$, dem optimalen Extraktionswert für den gonadotropen Wirkstoff, mit einer entsprechenden Menge Trockenpulver — 40 mg pro Tier — 6 Stunden lang in einer Schüttelmaschine bei Zimmertemperatur bewegt wurde. Danach wurde die Aufschwemmung 15 Minuten lang zentrifugiert und die gewonnene klare Lösung in gleichen Teilen in Ampullen eingeschmolzen und bis zur Zeit der Auswertungstermine im Kühlraum bei 0° bis -2° aufbewahrt. Von dem gewonnenen Extrakt wurde sofort nach der Herstellung in der beschriebenen Weise eine Auswertung vorgenommen, weiter in Abständen von 3, 7 und 14 Tagen.

Für die weiteren Versuche wurde wiederum zuerst eine größere Menge Extrakt bei $p_H = 8,7$ hergestellt, dann aber soviel Salzsäure bzw. Natronlauge zugesetzt, wie nötig war, um auf ein p_H von 10,7—12,7—7,2 und 5,2 zu kommen. Die Mengen der zuzusetzenden Säure bzw. Lauge wurden vorher in dem Lösungsmittel, also der wässerigen Lösung von $p_H = 8,7$, ermittelt und für die Menge der gewonnenen Extraktflüssigkeit berechnet. Alle p_H -Bestimmungen erfolgten nach der Indikatormethode nach SÖRENSEN²⁾. Die Auswertungen der gewonnenen Extrakte geschah in derselben Weise zu mindestens 4 Zeitpunkten: sofort nach der Herstellung, nach 3, 7, 14, bzw. 16 und 22 Tagen. Die Ergebnisse zeigt die Abb. 1.

¹⁾ JANSSEN u. LOESER, Arch. f. exper. Path., 151, 188 (1930).

²⁾ MICHAELIS, Praktikum d. physik. Chemie. Berlin 1921.

3. Methodik der Untersuchung für die thyreotrope Substanz.

Die Auswertung des thyreotropen Hormons erfolgt am jungen Meerschweinchen, dessen Schilddrüse auf kleine Gaben des Trockenpulvers mit den deutlichen Symptomen der Basedowfizierung antwortet, wie JANSSEN und LOESER u. a. gezeigt haben ¹⁾.

Es werden zwei Meerschweinchen im Gewicht von 180—220 g an 2 Tagen je 20 mg Trockenpulver, aufgeschwemmt in physiologischer Kochsalzlösung, oder Extrakte, gewonnen durch die Einwirkung von 2,0 ccm Lösungsmittel auf 40 mg Trockenpulver, intraperitoneal injiziert. Am 3. Tage werden die Schilddrüsen entfernt, in Formol gehärtet und histologisch untersucht.

Die Herstellung der Extrakte erfolgte in analoger Weise, wie bereits für das gonadotrope Hormon beschrieben, nur daß hier das Trockenpulver mit einer Lösung von $p_H = 12,7$, dem optimalen Extraktionswert für die thyreotrope Substanz, ausgeschüttelt wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde in gleicher Weise der Extrakt in 5 Teile geteilt, davon einer unverändert gelassen, die anderen auf ein p_H von 10,7, 8,7, 7,2 und 5,2 gebracht. Die Auswertungen erfolgten am 2., 6., 10., 16. und 29. Tag.

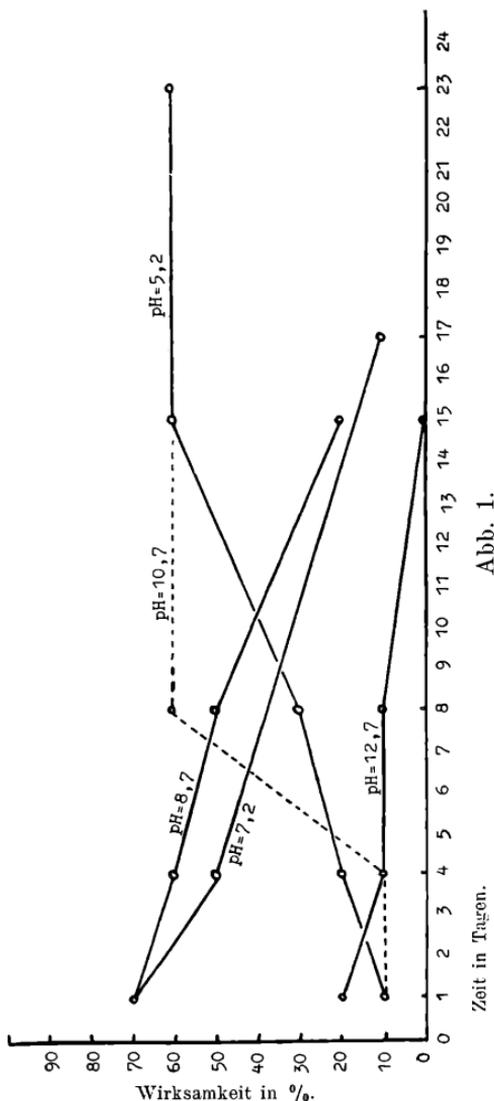


Abb. 1.

¹⁾ JANSSEN u. LOESER, Arch. f. exper. Path., 163, 517 (1932).

4. Ergebnisse der Auswertungen der Extrakte auf den gonadotropen Wirkstoff.

Die Auswertungsergebnisse sind in den Kurven auf Abb. 1 niedergelegt.

Zunächst ergab sich bei Extrakt mit $p_H = 8,7$ eine deutliche Steigerung gegenüber dem in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Trockenpulver, nämlich 70 % statt 50 %, was für eine bessere Aufschließung der Zellen durch die Behandlung mit der Lösung spricht. Die Wirksamkeit dieses Extraktes nimmt dann in 14 Tagen in gleichmäßiger Linie von 70 % auf 20 % ab. Einen ähnlichen Verlauf zeigt der Extrakt, der bei $p_H = 7,2$ aufbewahrt wurde.

Anders verhält sich der Extrakt von $p_H = 12,7$. Hier scheint die Alkalität der Lösung die wirksame Substanz sehr stark anzugreifen, so daß nach 14 Tagen bereits alles zerstört ist. Denn selbst mit der doppelten Dosis Extrakt konnte zu diesem Zeitpunkt keine Wirkung mehr erzielt werden.

Besonders auffallendes Verhalten zeigen die Extrakte mit $p_H = 5,2$ und $p_H = 10,7$. Hier ist die Wirksamkeit anfangs sehr stark herabgesetzt. Nach 3 bzw. 7 Tagen zeigt sich aber eine deutliche Zunahme der Wirksamkeit, die von Extrakt mit $p_H = 10,7$ schneller und in steilerem Anstieg erreicht wird wie bei der allmählich zunehmenden Wirksamkeit von Extrakt mit $p_H = 5,2$. Nach 14 Tagen zeigen beide Extrakte eine Wirksamkeit von 60 %, die also die Ausgangsbasis wieder fast erreicht hat. Eine weitere Auswertung nach 22 Tagen ergab wiederum einen Wert von 60 % für den Extrakt mit $p_H = 5,2$. Ferner ließ sich äußerlich an dem Extrakt eine etwa nach 7 Tagen deutlich werdende sehr feinflockige Trübung beobachten, was bei den anderen Extrakten nicht festgestellt werden konnte. Ob die zunehmende Wirksamkeit in Zusammenhang mit dem Auftreten dieses Niederschlages steht, ist ohne weiteres nicht zu entscheiden. Doch ist an dieser Stelle bemerkenswert, daß EVANS bei $p_H = 5,2-5,6$ aus Extrakten von frischen oder durch Gefrieren haltbar gemachten Drüsen die spezifisch wirksame Substanz ausgefällt hat und als solche auch hat identifizieren können¹⁾.

Eine mögliche Erklärung für die Zunahme an Wirksamkeit ließe sich durch die Tatsache ableiten, daß in dem vorliegenden mehr-

¹⁾ EVANS und Mitarbeiter, Monographie der Hypophysenvorderlappenhormone in Memoirs of the University of California, Bd. 11 (1933).

phasigen Gemisch verschiedener kolloidaler Eiweißkörper bei der Umwandlung von dem Sol- in den Gelzustand, der nur bei bestimmter H-Ionenkonzentration eintritt, eine resistenter Form der spezifischen Substanz erreicht wird. Es käme aber auch in Frage, daß hemmende Einflüsse seitens der anderen in dem Gemisch vorhandenen chemischen Körper in ihrer Wirkung auf die spezifische Substanz bei bestimmten Wasserstoffzahlen ausgeschaltet werden.

Es bedarf noch weiterer Untersuchungen zur Aufklärung dieser interessanten Erscheinungen.

5. Ergebnisse der Auswertungen der Extrakte auf den thyreotropen Wirkstoff.

Die verhältnismäßig starke Alkalität von $pH=12,7$ ermöglicht einen weitgehenden Aufschluß des Zellmaterials, so daß nach der 6 stündigen Behandlung des Trockenpulvers mit der Lösung nur ein geringer Rückstand bleibt, und eine homogene, etwas zähflüssige Lösung resultiert. Nach Zusatz der entsprechenden Mengen Salzsäure fällt sofort ein flockiger, weißer Niederschlag aus, der in allen Extrakten etwa gleich stark ist. Die erste Auswertung am Tage nach der Herstellung ergibt das in den Kurven niedergelegte Bild (Abb. 2).

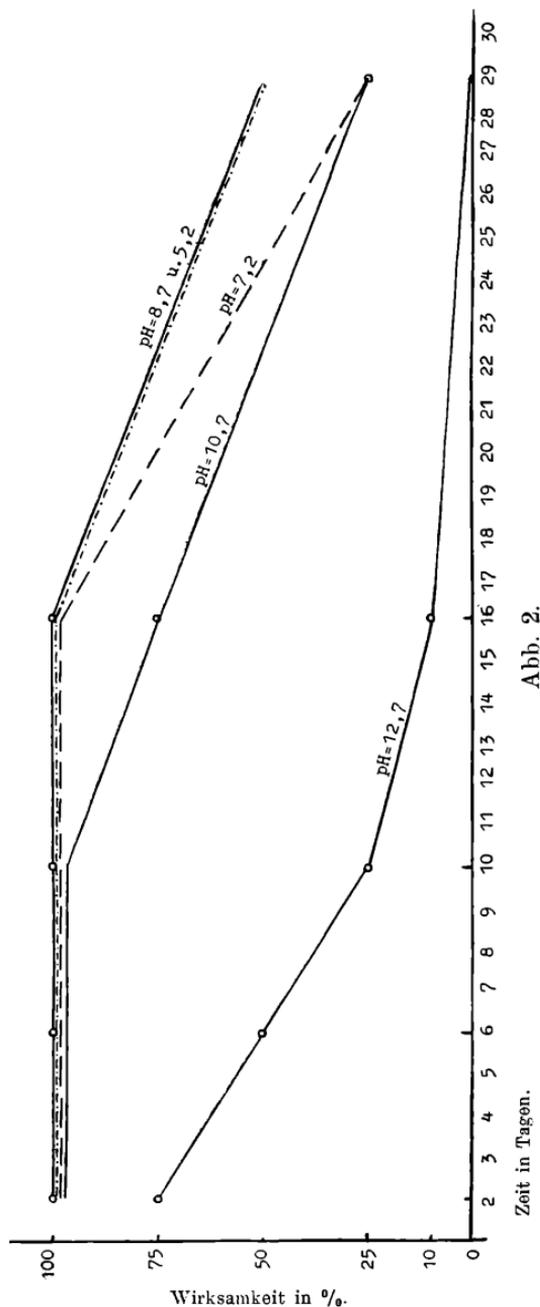


Abb. 2.

Zeit in Tagen.

Wirksamkeit in %.

Niederschlag aus, der in allen Extrakten etwa gleich stark ist. Die erste Auswertung am Tage nach der Herstellung ergibt das in den Kurven niedergelegte Bild (Abb. 2).

Die starke Alkalität der zur Extraktion benutzten Lösung von $p_H = 12,7$ hat die Wirksamkeit des Hormons bereits herabgesetzt auf 75 %, während die durch Säure abgeschwächten bzw. über den Neutralpunkt hinaus angesäuerten Extrakte höchste Wirksamkeit zeigen, d. h. völligen Kolloidschwund der Schilddrüse und maximale Zellproliferation der Drüsenepithelien in das Lumen der Follikel, so daß kaum noch hinter dem histologischen Bild die Schilddrüsenstruktur erkennbar ist.

Die folgenden 3 Auswertungen zeigen etwas veränderte Verhältnisse: Der Extrakt mit $p_H = 12,7$ verliert schnell an Wirksamkeit, Extrakt mit $p_H = 10,7$ ist nach 16 Tagen auf 75 % heruntergegangen, die übrigen lassen noch keine Veränderungen erkennen. Erst bei der 5. Auswertung am 29. Tag zeigt sich, daß bei $p_H = 12,7$ nichts mehr an wirksamer Substanz vorhanden ist. Auch bei $p_H = 10,7$ ist eine merkliche Abnahme auf 25 % eingetreten. Dagegen finden sich noch 2 Extrakte mit wenig veränderter Wirksamkeit: bei $p_H = 8,7$ und $p_H = 5,2$, zwischen beiden liegt der ebenfalls auf 25 % abgeschwächte Wert des Extraktes um den Neutralpunkt. Somit ergeben sich zwei optimale p_H -Werte für die Haltbarkeit, einer im sauren und einer im alkalischen Bereich.

Diese Ergebnisse weisen einen gewissen Parallelismus auf zu dem Verhalten der gonadotropen Substanz: Für beide lassen sich zwei optimale Werte der Wasserstoffzahl feststellen, bei denen eine über mindestens 3 Wochen nachgewiesene Wirksamkeit sich erzielen läßt. Auffallend ist die Tatsache, daß die Werte auf die saure und alkalische Seite verteilt sind, und zwar für die thyreotrope Substanz etwa 1,8 oberhalb und unterhalb des Neutralpunktes.

6. Zusammenfassung.

1. Es werden aus Azetontrockenpulver des Hypophysenvorderlappens wässrige Extrakte hergestellt, bei verschiedener Wasserstoffzahl aufbewahrt und auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich des gonadotropen und thyreotropen Hormons in bestimmten Zeitabständen geprüft.

2. Für die gonadotrope Substanz sind die Verhältnisse in den Kurven auf Abb. 1 niedergelegt. Das Optimum der Haltbarkeit liegt bei $p_H = 10,7$ und $p_H = 5,2$.

3. Für die thyreotrope Substanz sind die Verhältnisse in den Kurven auf Abb. 2 niedergelegt. Das Optimum der Haltbarkeit liegt bei $p_H = 8,7$ und $5,2$.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der naturforschenden Gesellschaft zu Freiburg im Breisgau](#)

Jahr/Year: 1936

Band/Volume: [35](#)

Autor(en)/Author(s): Kämmerer Joachim

Artikel/Article: [Untersuchungen über die Haltbarkeit der Hypophysenvorderlappenstoffe in Lösungen mit verschiedenem pH. 103-108](#)