

## ÜBER DIE GEWINNUNG VON REINEM KALLIKREIN AUS PANKREAS

von

OTTO RIESSER

*Laboratorium Dr. P. A. Meerburg, Naarden (Niederlande)*

Seitdem im Jahre 1926 K. E. FREY und seine Mitarbeiter erstmalig ein blutdrucksenkendes Prinzip aus dem Harn in relativ reiner Form dargestellt und es wenige Jahre später mit dem aus Pankreas von ihnen selbst, sowie zuvor schon von anderen gewonnenen identifiziert hatten, ist eine sehr grosse Zahl von Untersuchungen über Eigenschaften und Wirkungsweise dieses als Kallikrein bezeichneten und als Kreislaufhormon angesprochenen Stoffes erschienen. An der Erforschung dieses Gebietes ist die FREYSche Schule, besonders durch WERLE<sup>1</sup>, am meisten beteiligt, und es sei auf die zusammenfassende Darstellung des letztgenannten Autors für alles Nähere hingewiesen. Als chemisches Individuum ist das Kallikrein allerdings auch heute noch nicht erkannt, und nicht einmal über die Zugehörigkeit zu irgend einer bestimmten chemischen Gruppe lässt sich etwas aussagen, es sei denn das Negative, dass es kein Eiweisskörper ist. Auch ist die Darstellung des Kallikreins in fester Form nicht gelungen, wenigstens nicht als reine Substanz, und das, was als Trockenpräparat bisher bekannt wurde, besteht grössten Teils aus begleitendem Eiweiss. Die bisher am weitesten geförderte Reinigung führt zu wässrigen, eiweissfreien Lösungen, in denen eine Wirkungseinheit an wenige Gamma feste Substanz gebunden ist. ELLIOT und seine Mitarbeiter, die auf dem Wege der Reinigung des Harnkallikreins am weitesten gekommen zu sein scheinen, haben vielleicht nicht die gleiche Substanz in Händen gehabt wie die deutschen Forscher.

Als Hauptstätte des Kallikreinvorkommens im Tierkörper ist früh das Pankreas erkannt worden, worin es allerdings in einer Vorstufe vorhanden ist. Erst durch Einwirkung verdaulender Fermente wird die aktive Substanz daraus gebildet. Sonst hat man es, außer im Blut und im Harn, nur noch in den Speicheldrüsen feststellen können. Aus dem Pankreas wird denn auch das Kallikrein heute vorzugsweise dargestellt. Das von ELLIOT und NUZUM<sup>2</sup> hierfür angegebene Verfahren, das von sauren alkoholischen Extrakten des Pankreas ausgeht, soll nach den Verfassern eine Modifikation der von GLEY und KISTHINIOS<sup>3</sup> publizierten Methode darstellen, ist aber grundsätzlich davon verschieden. Es hat sich uns bei eingehender Nachprüfung gar nicht bewährt, wie denn überhaupt, angesichts der hohen Empfindlichkeit des Kallikreins gegen saure Reaktion, alle mit saurer Extraktion arbeitenden Verfahren von vornherein wenig Aussicht bieten. Sehr viel besser fundiert ist das von KRAUT, FREY und WERLE<sup>4</sup> beschriebene Vorgehen. Sie gehen von einem wässrigen, bei Zimmertemperatur während 12 Stunden digerierten Extrakt aus und gelangen in einer Reihe von hier nicht näher zu beschreibenden Arbeitsgängen zu relativ ziemlich reinen, wenn auch bestimmt noch nicht eiweissfreien Lösungen. Durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd haben WERLE und MARCUS<sup>5</sup> die Reinigung dann noch weiter treiben können, sodass sie in einem günstigsten Versuch bis auf 33 Gamma pro Einheit kamen. Das von der I. G. Farbenindustrie aus Pankreas

nach eignem Patent-Verfahren hergestellte Handelspräparat Padutin ist praktisch eiweissfrei und enthält pro Einheit ca 300 Gamma feste Substanz.

Die Abgrenzung des Kallikreins als eines, vielleicht hormonalen Stoffes sui generis darf als voll gelungen bezeichnet werden, sodass eine Verwechslung mit den anderen, aus Organextrakten sowie aus Körperflüssigkeiten dargestellten blutdrucksenkenden Substanzen bekannter und unbekannter chemischer Konstitution nicht möglich ist. Charakteristisch sind eine Anzahl von Eigenschaften, die in dieser Konstellation bei keiner der übrigen Substanzen vorkommen. Kallikrein ist nicht diffusibel durch pflanzliche Membranen. Es ist gegen Erhitzen sehr empfindlich (5 Minuten Kochen zerstören es vollständig) und wird bei saurer Reaktion von  $p_H$  4 ab unwirksam. Sehr eigenartig ist die Inaktivierung, welche Kallikrein beim Mischen mit Blut oder Serum erleidet und die durch vorsichtiges Ansäuern des Gemisches rückgängig gemacht werden kann.

Seine Wirkung auf den Blutdruck, die in einer je nach der Dosis verschiedenen starken Blutdrucksenkung von einigen Minuten oder längerer Dauer besteht, zusammen mit einer Vergrösserung der Pulsamplitude, wird durch Atropin weder verhütet noch aufgehoben. Andererseits besteht ein scharfer Antagonismus zwischen Kallikrein und Adrenalin hinsichtlich der Blutdruckwirkung. Die der blutdrucksenkenden Wirkung zugrunde liegende Gefässerweiterung erstreckt sich vornehmlich auf die Gefäße der Haut, der Muskeln und des Koronarsystems am Herzen.

Obwohl das Kallikrein hinsichtlich einer grossen Zahl seiner pharmakologischen Wirkungen (vgl. WERLE<sup>1</sup>) insbes. auch derjenigen auf glattmusklige Organe, auf die Haut und auf die Magensaftsekretion, sowie bezüglich des Typs der Blutdruckwirkung, mit dem Histamin weitgehend übereinstimmt, ist es doch in einer Reihe pharmakologischer und chemischer wie physikalischer Eigenschaften scharf davon unterschieden.

In der Therapie wird das Kallikrein bzw. Padutin, nachdem erstmalig FREY von seinen günstigen Wirkungen berichtete, seit vielen Jahren mit gutem Erfolg bei allen Fällen von peripherem Gefässkrampf angewandt, so insbes. bei RAYNAUD'scher und BÜRGER'scher Krankheit, ferner bei Koronarkrämpfen sowie bei Hochdruck. Auch hierfür verweisen wir auf die Monographien von WERLE<sup>1</sup> sowie von RIEGLER<sup>6</sup>.

Die vorliegende Mitteilung beschäftigt sich lediglich mit demjenigen Teil unserer ausgedehnten Untersuchungen, der die Ausarbeitung eines Darstellungsverfahrens des Kallikreins und die Gewinnung möglichst weitgehend gereinigter Lösungen des Stoffes zum Ziele hatte. Das zu beschreibende Verfahren zeichnet sich durch Einfachheit der Arbeitsgänge, sowie dadurch aus, dass als einziges Reagenz dabei Alkohol gebraucht wird.

Wir gingen davon aus, dass nach den Beobachtungen von KRAUT, FREY und WERLE und den Darlegungen besonders des Letztgenannten, erst durch fermentativen Abbau, wahrscheinlich unter Beteiligung des Trypsins, das Kallikrein aus seinen im Pankreas vorhandenen Vorstufen frei wird. Nachdem die Autolyse bei 37 Grad, wie sie die I.G. zur Herstellung ihrer Padutinpräparate verwendet, unbefriedigende und als Folge wahrscheinlich sekundärer Zerlegungen sehr ungleichmässige Resultate ergeben hatte, machten wir uns die Beobachtung zunutze, dass Pankreasbrei bei mehr-tägiger Behandlung mit schwach alkalischer Extraktionslösung in der Kälte einen sehr gleichmässig wirksamen und an Kallikrein reichen Extrakt liefert. Die Autolyse wird unter diesen Umständen hintenangehalten, während langsam und stetig verlaufende tryptische Verdauung ein schonendes Freimachen des Kallikreins sichert.

## I. DARSTELLUNG

Wir geben im Folgenden den Darstellungsgang wieder, so wie er sich uns aus zahlreichen Versuchen zuletzt am besten bewährte.

1 kg frischer Rinderpankreasbrei wird mit 2 Liter Wasser gründlich verrührt und mit so viel 2-N NaOH unter starkem Umrühen versetzt, bis die Reaktion, gemessen an schwacher Rötung von mit Phenolphthaleinlösung getränktem Papier, etwa  $p_{\text{H}}$  9.0-9.2 entspricht und sich 15 Minuten dabei hält. Man bringt die Mischung nunmehr in die Kältekammer bei plus 2 Grad und prüft zuerst in Abständen von 2 Stunden, im weiteren Verlauf immer seltener, die Reaktion nach. In dem Masse, als sie sich nach der sauren Seite verschiebt, führt man sie mittels NaOH wieder zur alkalischen zurück.

Nach 72-stündigem Stehen in der Kälte (ohne Antisepticum-Zusatz) wird die Masse, die im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Autolyse keine Verflüssigung erlitt, mit 12,5%iger HCl unter starkem Umrühen so lange versetzt, bis die Reaktion einem  $p_{\text{H}}$  von 5.5-6 entspricht. (Prüfung an der schwachen Rötung von Methylrotfärbpapier). Das Volum des Ansatzes beträgt nun 3200 ml.

Um die Hauptmasse von Gewebssubstanz und gelöstem Eiweiss zu beseitigen, versetzt man die schwach saure Aufschwemmung mit der Hälfte ihres Volumens 96% Alkohol, sodass die Endkonzentration ca. 30% beträgt, und erwärmt die Mischung über dem Dampfbad unter stetem Umschwenken vorsichtig auf 42-43 Grad. Es empfiehlt sich, die Reaktion jetzt nochmals nachzuprüfen und, falls nötig, wieder auf  $p_{\text{H}}$  5.5-6 zu bringen. Nach 10 Minuten langem Erwärmen kommt die Mischung wieder in die Kühlkammer für etwa 20 Stunden. Diese Abkühlung ist für die Abscheidung des Eiweiss unbedingt erforderlich.

Man giesst nun die Masse auf Faltenfilter und lässt, am besten wieder in der Kühlkammer, 24 Stunden ablaufen. Das klare, tiefgelbe Filtrat misst dann 3540 ml. Die Filter nebst Inhalt werden nochmals mit ca. 1 Liter 30%igem Alkohol gründlich verrührt und nochmals filtriert. Das Zweitfiltrat, das, gemessen am Trockengehalt, etwa 12% des Erstfiltrats entspricht, wird mit diesem vereinigt.

Die alkoholischen Extrakte werden nunmehr zuerst im Vakuum bei 30 Grad, sodann im warmen Luftstrom am Ventilator bei der gleichen Temperatur vom Alkohol befreit und konzentriert, bis auf 1 Liter, sodass also 1 ml 1 g Pankreas entspricht. Das dunkelolivgelbe Konzentrat scheidet beim Stehen in der Kälte über Nacht eine nicht unbeträchtliche Menge Tyrosin krystallinisch ab, das man, am besten durch Zentrifugieren, entfernt.

1.0 ml des so erhaltenen klaren, tiefgelbbraunlichen Rohkonzentrats liefert im Blutdruckversuch am Kaninchen eine Wirkung, die 10 „biologischen“ Padutineinheiten entspricht, also einer Gesamtwirkung von 10 000 Einheiten pro kg Pankreas. Diese Wirkung geht aber knapp zur Hälfte auf Kallikrein; der Rest kommt auf Rechnung anderer und zwar dialysabler Substanzen.

Um diese zu beseitigen, wird das Rohkonzentrat in Cellophanschläuchen 72 Stunden gegen fliessendes Leitungswasser dialysiert, wobei das Volumen sich verdoppelt. Die filtrierten Dialysate sind nur noch schwach gelb gefärbt. Sie zeigen eine Wirkungsstärke von ca. 2.5 Einh./ml. Das entspricht 5000 Einh./kg Pankreas. Der Trockengehalt beträgt ca. 5 mg/ml, wovon 0.7 mg hitzekoagulierbares Eiweiss.

Der Trockengehalt mit 2 mg/Einheit ist noch zu gross, vor allem muss der Eiweissgehalt auf null reduziert werden. Dies Ziel zu erreichen, hat viel Mühe gekostet, zumal es in allen Arbeiten anderer Autoren ganz übergangen wird. Folgendes Vorgehen führte zunächst zum Ziel.

Man versetzt das Dialysat mit dem gleichen Volumen 96% Alkohol. Die Flüssigkeit trübt sich sofort und nach einigen Minuten setzt sich ein weisser flockiger Niederschlag von Eiweiss ab. Nach 20-stündigem Stehen in der Kälte wird zentrifugiert. Da wir wissen, dass das Kallikrein sehr leicht mit den verschiedensten Eiweissniederschlägen zusammen ausfällt, musste auch bei der Alkoholfällung mit Verlust gerechnet werden, obwohl reines Kallikrein mit Alkohol nicht fällbar ist. Die Aufarbeitung und Prüfung des in Wasser löslichen Niederschlags ergab jedoch einen Kallikrein-Gehalt von nur 15-20% der Gesamtmenge. Es sei besonders hervorgehoben, dass diese günstige Verteilung nur eintritt, wenn

die Lösungen in der geschilderten Weise vorgereinigt und relativ eiweissarm sind. Be merkenswert ist es auch, dass diese Fällung des Eiweiss mit 50% Alkohol nicht eintritt, wenn man statt gegen Leitungswasser gegen reines destilliertes Wasser dialysiert. Die im Leitungswasser vorhandene kleine Calciummenge ist für die Ausflockung notwendig.

Die hellgelben alkoholischen Filtrate werden wiederum teils im Vakuum, teils im warmen Luftstrom bei 30 Grad eingeeigt und zwar auf 500 ml, sodas 1 ml der Lösung 2 g Pankreas entspricht. Der Trockengehalt beläuft sich nun auf ca 10 mg/ml, die Wirkung entspricht 8-9 Einheiten pro ml.

Durch erneute Dialyse während 48 Stunden geht der Trockengehalt bei einer Volumvermehrung um 10% auf ca 4 mg/ml zurück. Die Eiweissreaktion mit Sulfosalicylsäure ist nur noch sehr schwach, ebenso die Biuretreaktion.

Die Beseitigung der letzten Eiweisspuren gelingt durch geeignete Behandlung mit Norit. Die Angabe von WERLE, dass Kallikrein an Kohle adsorbiert werde, dürfte nur für Lösungen gelten, die noch relativ viel Verunreinigungen enthalten. Es lässt sich leicht zeigen, dass reine Kallikreinlösungen, so auch das Padutin in Ampullen, beim Schütteln mit dem Doppelten ihres Trockengewichts (das Padutin wurde vorher durch Dialyse von seinen Zusätzen befreit) an Norit keinerlei Wirkungseinbusse erleiden.

Zur Reinigung der mit 50% Alkohol und nachfolgender Dialyse schon weitgehend vorgereinigten Lösungen schüttelt man mit soviel Noritkohle als dem einfachen Gewicht an Trockensubstanz entspricht und zwar nicht länger als 7-10 Minuten. Durch Zentrifugieren und anschliessende Filtration gelangt man zu einer völlig farblosen, blanken Kallikreinlösung mit einem Gehalt von 8 Einheiten pro cc und einem Trockenrückstand von ca 2.5 mg/ml. Es kommt also auf eine Einheit pro Trockengehalt von 0.3-0.4 mg.

Falls die Lösung mit Sulfosalicylsäure eine nach längerem Stehen erkennbare Trübung gibt, kann man diese letzte Spur von Eiweiss \* durch nochmalige Behandlung mit der halben Menge Norit beseitigen. Auch der Gehalt an Trockenrückstand lässt sich, wenn man will, durch nochmalige Dialyse weiter senken, und schliesslich kann man durch Eindunsten bei niederer Temperatur jede gewünschte Konzentration herstellen. Die Ausbeute an reiner Kallikreinlösung ergibt 3500-4000 Einheiten pro kg Rinderpankreas.

Die Verarbeitung von Schweinepankreas ist nach diesem Verfahren ebenfalls möglich, aber hat nicht immer so gleichmässige Resultate ergeben. Das hängt mit dem Fettgehalt zusammen, der, beim Schweinepankreas bekanntlich recht hoch, im Laufe der Verarbeitung störend und Verlustbedingend wirken kann.

Die reinen wässrigen Kallikreinlösungen sind, wenn man sie zuerst durch Seitzfilter keimfrei macht, unter Zusatz von 0.3% Trikresol sehr lange, wahrscheinlich unbegrenzt haltbar. Nicht keimfreie Lösungen lassen sich schwer auf die Dauer konstant wirksam erhalten, da sie sich schliesslich doch zersetzen.

Die grosse Empfindlichkeit des Kallikreins gegen Infektion und die Unmöglichkeit, eine solche bei den langen Dialysen, trotz Toluolzusatz, immer zu vermeiden, ist einer der Gründe, warum wir die Dialyse gerne einschränken oder ganz vermeiden möchten. Dazu kam die in der damaligen Kriegsperiode bestehende Schwierigkeit der Cellophanbeschaffung. Es scheint, als ob man mittels der *Adsorption* ebenfalls und vielleicht sogar besser, zum Ziele gelangt, als bei Verwendung der Dialyse. Es zeigt sich nämlich, dass wenn man das, am besten aufs doppelte verdünnte, *Rohkonzentrat* durch eine Säule von Aluminiumoxyd gibt ( $\text{pH}$  der aufgegossenen Lösung 6.0), das gesamte Kallikrein und das Eiweiss am Adsorbens bleibt, während die sonstigen Stoffe, also auch gerade die dialysablen, in den Durchlauf gehen. Will man stets bei eiweissfreiem Durchlauf bleiben, dann muss man allerdings ziemlich grosse Adsorbensmengen anwenden, 400 g auf 1 kg Pankreas. Auch mit Bleicherde scheint die Adsorption ebenso zu verlaufen.

Merkwürdigerweise kann man dann das Kallikrein mitsamt dem adsorbierten Eiweiss durch reines destilliertes Wasser eluieren. Aus dem Eluat kann man durch Behandeln zuerst mit 50%igem Alkohol, sodann mit wenig Norit das Eiweiss vollkommen beseitigen. Erste, auf diese Weise gemachte Versuche ergaben eine Reinausbeute von 3500-4000 Einheiten, also ebensoviel wie im oben geschilderten Dialyseverfahren. Selbst wenn man zum Schluss der Adsorptionsmethode noch einmal dialysieren müsste, wäre

\* Da Sulfosalicylsäure auch mit höheren Peptiden eine Trübung gibt, so ist es nicht sicher ob es sich hier überhaupt noch um Eiweiss handelt.

der Vorteil sehr gross. Auch wäre es denkbar, dass Eluierung mit 50% igem Alkohol, statt mit Wasser, sofort ein praktisch eiweissfreies Eluat erhält. Leider haben äussere Umstände eine weitere Ausarbeitung dieses interessanten und einfachen Verfahrens nicht mehr gestattet.

Es besteht auch noch eine andere Möglichkeit um von Rohextrakt ohne Dialyse zu ziemlich reinen Lösungen zu gelangen. Man kann nämlich die bis zur Trockne eingedunsteten Rohextrakte mit 60%igem Alkohol ausziehen, wobei man das ganze Kallikrein neben sehr wenig Eiweiss herausbekommt. Nach Verdunsten des Alkohols muss man dann noch eine Dialyse und die oben beschriebene Beseitigung der letzten Eiweisspuren anschliessen. Die grosse Menge der Beistoffe bleibt bei dieser Extraktion ungelöst im Rückstand. Das Verfahren dürfte aber dem Adsorptionsverfahren unterlegen sein. Wir haben es auch nur erwähnen wollen.

## 2. EICHUNG DES KALLIKREINS IM BLUTDRUCKVERSUCH

Für die Wirkungsbestimmung des Kallikreins steht bisher keine andere Methode zur Verfügung als die des blutigen Blutdruckversuchs am Tier. Die Auswertung am Darm, die eventuell in Kombination mit der antagonistischen Wirkung des Adrenalin in Betracht gezogen wurde, hat sich ebenso wenig bewährt wie der Versuch, die Gegenwirkung zum Adrenalin am Durchströmungspräparat zu diesem Zweck zu verwenden. Die Registrierung des Blutdrucks zeichnet sich überdies dadurch aus, dass sie es gestattet, nicht nur den Grad der Wirkung, sondern auch den Verlauf in seiner besonderen Eigenart genau zu registrieren. Die Feststellung des genau qualitativ gleichen Wirkungsmodus ist aber unerlässlich, wenn es sich darum handelt, eine blutdruckwirksame Substanz einer bestimmten Gruppe derartiger Stoffe zuzuweisen.

Als Prüftier ist von der FREY'schen Schule ausschliesslich der Hund benutzt worden, während ELLIOT das Kaninchen verwendet. WEESE<sup>7</sup> hat bei der Auswertung des Kallikreingehalts von Harn darauf aufmerksam gemacht, dass der Hund auf Kallikrein sehr gut anspricht, schlecht oder garnicht aber auf die sonstigen blutdruckwirksamen Stoffe, die im Harn vorkommen, während die Katze umgekehrt gerade auf diese Stoffe sehr stark, auf Kallikrein aber schwach reagiert. Vom Kaninchen als Prüftier rät er entschieden ab. Es reagiere sehr ungleichmässig und verriere im Lauf des Versuchs schnell die Ansprechbarkeit auf Kallikrein. In der Tat sieht eine von ihm wiedergegeben Kurve von einem Eichversuch am Kaninchenblutdruck sehr wenig ermutigend aus.

Da es für uns unmöglich war, die zahlreichen erforderlichen Eichungen an Hunden auszuführen, haben wir uns von Anfang an bemüht, den Kaninchenversuch brauchbar zu gestalten, was uns denn auch nach vielen Vorversuchen zur vollen Befriedigung gelungen ist. Die Hauptsache dabei ist, dass man mit möglichst niedrigen Dosen arbeitet. Höhere schädigen das Tier schnell und führen zu Misserfolgen, wie sie WEESE<sup>7</sup> hatte. Bei richtiger Führung kann man dagegen an einem einzigen Tier eine grössere Zahl (bis zu 20 und mehr) von gut miteinander übereinstimmenden Eichungen vornehmen.

Es kommen allerdings hin und wieder, wenn auch selten, Tiere zum Versuch, die fast unempfindlich gegen Kallikrein sind. Wenig empfindliche Tiere erfordern etwas höhere Dosen, bleiben aber noch immer gut geeignet.

Als Vergleichsstandard diente uns das käufliche Padutin in Ampullen der I.G.-Farbenindustrie, das recht gleichmässig eingestellt ist und von dem 1 ml 4 „biologische Einheiten“ enthält. Als Einheit haben FREY und Mitarbeiter ursprünglich ein von ihnen aus Harn bereitetes Präparat benutzt. WERLE u. KORSTEN haben später die Einheit definiert als diejenige Wirkung, die man mit 5 ml dialysierten Harns aus einer Mischprobe von 50 Litern normalen Urins erhält. ELLIOT, der am Kaninchen eichte, bezeichnet als Einheit diejenige Dosis, die eben eine Wirkung insbes. eine Amplitudenvergrösserung erkennen lässt und meint, dass diese seine Einheit etwa 1/10-1/28 FREYScher Einheit gleichkomme. Nach unseren zahlreichen Beobachtungen ist beim Kaninchen etwa 0.02 „biologische Padutin-Einheit“ eben wirksam, was einem Verhältnis von ELLIOTS-Einheit zu Padutin-Einheit von 1 : 50 entspricht. In den Patentschriften der I.G. werden die Wirkungen in „Kallikrein-Einheiten“ ausgedrückt. Wir haben Anlass zu der Annahme, dass die *biologische Einheit* der Padutinampullen gleich 10 FREYS'chen oder Kallikrein-

Einheiten genommen ist. In unseren eigenen folgenden Versuchen sind alle Wirkungen in „biologischen“ *Padutin-Einheiten* ausgedrückt.

Wir erwähnten schon, dass für das Gelingen der Eichung am Kaninchen die Dosierung von ausschlaggebender Bedeutung ist. 0.5—1 Einheit, wie wir sie anfangs anwandten, erwiesen sich als erheblich zu hoch und schädigten die Tiere so schnell, dass kaum zwei bis drei Eichungen am gleichen Präparat möglich sind. Hält man sich dagegen innerhalb der Grenzen von 0.05 bis 0.1, höchstens 0.2 Einheiten und wahrt man ferner streng 10 Minuten Pause zwischen je zwei Proben, so bleiben die Tiere stundenlang gut ansprechbar, und die Empfindlichkeit nimmt nur langsam ab.

Kaninchen von 2-2.5 kg Gewicht wurden verwendet. Narkose mit Urethan und zwar intravenös und subkutan je 5 ml 10%iger Urethanlösung in 0.9% NaCl pro kg Körpergewicht. Blutdruckmessung von der *Carotis* aus mit dem LUDWIG'schen Hg-Manometer und Zufuhr der Prüflösungen durch eine in die *Vena jugularis* eingebundene Kanüle. Alle Lösungen wurden mit 0.9% NaCl auf 0.5 ml gebracht; Nachspülen der Kanüle mit 0.5 ml Kochsalzlösung.

Man beginnt, bei dem gewöhnlichen Blutdruck von 100-110 mm Hg mit einer Injektion von 0.05 Padutineinheiten. Der Verlauf ist typisch mit kleineren Varianten bei den verschiedenen Tieren. Er beginnt mit einem steilen und sofortigen Abfall um etwa 20 mm Hg. Meist folgt dann ein kurzer, aber nur teilweiser Anstieg, den ein erneuter langsamer Abfall ablöst. Diesem mehr oder weniger ausgeprägten, aber nicht immer vorhandenen Bogen nach unten folgt dann der langsame Wiederanstieg bis zur Ausgangshöhe des Blutdrucks. Der Verlauf, für einzelne Tiere etwas wechselnd, ist für das gleiche Tier völlig konstant und wird von jedem Kallikreinpräparat in genau derselben Form wiederholt.

Bei den kleinen Dosen ist nach 5 Minuten meist das Ausgangsniveau wieder erreicht. Man stoppt den Kymographionlauf weitere 5 Minuten und schliesst sodann die nächste Eichung an. Bei den Proben mit unbekanntem Gehalt wähle man lieber eine zuerst unzureichende Menge als eine zu grosse und wiederhole notfalls mit einer grösseren Gabe. Die 3te Probe macht man wieder mit Padutin. Meist ist der erste Ausschlag höher als die folgenden mit gleicher Dose gemachten. Von da ab bleibt er konstant oder nimmt langsam ab. Durch Hin- und Herproben zwischen Padutin und zu prüfender Lösung lässt sich der Gehalt der Unbekannten sehr gut bestimmen. Im zweiten Teil des Versuchs wird man, die abnehmende Empfindlichkeit berücksichtigend, meist mit den grösseren Dosen von 0.1 bis 0.2 Einheiten arbeiten. ABB gibt ein Beispiel solcher Eichung an 2 Tieren mit den gleichen Lösungen.

Abweichungen von 0.025 Einheiten lassen sich gut schätzen. Bei einer durchschnittlichen Messdosis von 0.15 Einheiten bedeutet das eine Fehlerbreite von 15-20%.

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser beschreibt die Darstellung von Kallikrein aus Rinder- und Schweinepankreas sowie die Eichung dieses Stoffes im Blutdruckversuch bei Kaninchen.

## SUMMARY

The writer describes the preparation of callicrein from the pancreas of cattle or pigs, and the inoculation of rabbits with this substance for the purpose of blood pressure research.

## RÉSUMÉ

L'auteur décrit la préparation de la callicréine du pancréas des bovins et du porc ainsi que l'étalonnage de ce corps dans l'épreuve de la tension artérielle sur les lapins.

## LITERATUR

- 1 E. WERLE, *Handb. d. normal. u. pathol. Physiol.*
- 2 A. H. ELLIOT, F. R. NUZUM, *J. Pharmacol.*, **43** (1931) 463.
- 3 P. GLEY, N. KISTHINIOS, *Presse méd.*, **37** (1929) 1279.
- 4 H. KRAUT, E. K. FREY u. E. WERLE, *Z. physiol. Chem.*, **189** (1930) 97.
- 5 E. WERLE, A. MARCUS, *Biochem. Z.*, **296** (1938) 275.
- 6 R. RIEGLER, *Handb. d. experim. Pharmakol.*
- 7 H. WEESE, *Arch. f. exptl. Pathol. Pharmakol.*, **173** (1933) 36.

Eingegangen den 26. März 1946.