

Beiträge zur Biochemie der Avitaminosen.

Von

Alexander Palladin.

Nr. 3.

Blutfermente bei experimentellem Skorbut.

Von

P. Normark.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des medizinischen Instituts zu Charkow.)

(Eingegangen am 16. September 1924.)

Im Leben eines jeden Organismus spielen die Fermente eine gewaltige Rolle. Wir wissen, daß verschiedene Veränderungen im Zustande des Organismus von Veränderungen in der Fermenttätigkeit begleitet sind bzw. durch dieselben hervorgerufen werden, und daß wir bereits jetzt in der Lage sind, in einer Reihe von Fällen aus den Veränderungen in der Fermenttätigkeit auf Veränderungen im Zustande des Organismus zu schließen und umgekehrt. Die weitere Aufklärung dieser Wechselbeziehungen wird uns allmählich den Mechanismus dieser oder jener Störungen der normalen Tätigkeit des Organismus aufdecken und die einen oder anderen Fragen der Physiologie und Pathologie beantworten.

Zur Aufklärung dieser Wechselbeziehungen werden sowohl die Fermente verschiedener Organe, als auch die Blutfermente untersucht. Gegenwärtig gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen, die beweisen, daß verschiedene physiologische und pathologische Momente die Blutfermente beeinflussen, und zwar in bestimmter Weise. Derartige Angaben über Veränderungen in der Fermentzusammensetzung des Blutes bei einer Funktionsstörung dieses oder jenes Organs können viel dazu beitragen — und haben dies bereits getan —, die Rolle dieses Organs sowie dessen Wirkungsmechanismus auf die anderen Prozesse im Organismus aufzuklären.

Es ist daher von Interesse, die Blutfermente beim experimentellen Skorbut, bei dem, wie unsere Untersuchungen über den Kohlehydrat- und Kreatinstoffwechsel gezeigt haben, bestimmte Störungen in den Stoffwechselprozessen vorhanden sind, zu studieren.

Das Studium dieser Frage bietet ein um so größeres Interesse, als wir bezüglich eines der Blutfermente, der Amylase, wissen, daß sein Gehalt im Blute mit dem Verlauf der betreffenden Avitaminose in bestimmter Weise sich verändert [*A. Palladin*¹⁾]. Zweifelsohne ist die Fermenttätigkeit beim Skorbut verändert; hierauf weisen die Untersuchungen von *Dutcher*²⁾ hin, der, allerdings bei einer anderen Avitaminose, der Polyneuritis, einen herabgesetzten Katalasegehalt in einer ganzen Reihe von Organen (Leber, Nieren, Pankreas, Herz, Brustmuskeln, Lungen) gefunden hat. Ob nun auch der Gehalt der anderen Blutfermente, außer der Amylase, beim Skorbut sich verändert, dies aufzuklären, war die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung.

Für die quantitative Bestimmung der Blutfermente bei so kleinen Tieren, wie sie die Meerschweinchen sind, konnte man sich der Methoden, die große Blutmengen erfordern, nicht bedienen.

Wenn man sich dieser Methoden bedient und die Bestimmungen oft ausführt, so läuft man Gefahr, den Skorbut durch große Blutverluste zu komplizieren; um dies zu vermeiden, müßte die Blutentnahme selten vorgenommen werden, was wiederum nur drei bis vier Analysen während des ganzen Versuchs möglich machen würde. Daher wählten wir die Bestimmung der *Blutfermentzahlen* nach der Methode von *A. Bach*³⁾. Wir bestimmten nach dieser Methode die Katalase, Protease, Peroxydase und Lipase.

Das Blut wurde den Ohren der Meerschweinchen entnommen. Das Ohrgefäß wurde angeschnitten, an den heraustretenden Blutstropfen die Spitze einer Pipette von 20 cmm Inhalt angelegt und in dieselbe das Blut bis zur Marke eingesogen. Unmittelbar darauf wurde das Blut quantitativ in ein Kölbchen gebracht, das 20 ccm destillierten Wassers enthielt. Von der so erhaltenen Blutlösung wurde für jede Bestimmung je 1 ccm verwandt, was 0,001 ccm Blut entspricht. Wenn wir nach der *Bachschen* Methode arbeiten, so bestimmen wir nicht die absoluten Fermentquantitäten, sondern nur einige relative Größen (*Fermentzahlen*), die auf Grund von streng bestimmten Bedingungen erhalten werden und, wie die Untersuchungen von *Bach* gezeigt haben, der direkte oder indirekte zahlenmäßige Ausdruck der Fermenttätigkeit sind. Wir verzichten auf eine genauere Beschreibung der Methodik und wollen nur darauf hinweisen, daß als *Fermentzahl der Katalase* diejenige, in Milligrammen ausgedrückte, Wasserstoffsperoxyd-

¹⁾ *Alexander Palladin*, Beitr. zur. Biochem. der Avitaminosen, Nr. 1, diese Zeitschr. 1924.

²⁾ *Dutcher*, Journ. of biol. Chem. 36, 63, 1918.

³⁾ *A. Bach* und *S. Zubkova*, diese Zeitschr. 125, 283, 1922.

menge gilt, die unter bestimmten Bedingungen durch 0,001 ccm Blut zersetzt wird, als *Fermentzahl der Protease* die in Milligrammen des Wasserstoffsperoxyds ausgedrückte Aktivitätsverminderung der Katalase¹⁾ unter dem Einfluß von vorhergehendem Stehenlassen der Blutlösung im Thermostat bei 37°; als Fermentzahl der *Peroxydase* diejenige in tausendstel Milligrammteilen ausgedrückte Guajacolmenge, die durch 0,001 ccm Blut unter Mithilfe von Wasserstoffsperoxyd oxydiert wird; als Fermentzahl der *Esterase* diejenige in tausendstel Milligrammteilen ausgedrückte Guajacolmenge, die durch 0,001 ccm Blut vom Guajacolester (Thiocol) abgespalten wird.

Die Fermentbestimmungen im Blute wurden nicht öfter als jeden zweiten Tag und nicht seltener als jeden fünften Tag vorgenommen. Zunächst wurde bei jedem Meerschweinchen die Norm festgestellt, d. i. der Fermentgehalt im Blute bei Fütterung desselben mit Hafer und Rüben. Darauf wurde diese Nahrung durch Hafer allein ersetzt und bei einer solchen Nahrung, in welcher das antiskorbutische Vitamin C fehlte, die Blutuntersuchung auf Fermente bis unmittelbar vor dem Eingehen der Tiere am Skorbut fortgesetzt. In Tabelle I ist das Versuchsprotokoll über ein Meerschweinchen von 680 g Gewicht, das am 27. Skorbuttage einging, angeführt.

Tabelle I.

Datum der Bestimmungen	Gewicht g	Fermentzahlen				Am wievielen Skorbuttag die Bestimmung ausgeführt wurde
		Katalase	Protease	Esterase	Peroxydase	
28. IX.	680	9,24	1,68	0,09	0,052	} Norm
21. X.	640	9,18	1,68	0,09	0,057	
25. X.	650	8,84	1,68	0,08	0,052	
27. X.	640	9,01	1,34	0,09	0,052	
2. XI.	645	9,46	1,79	0,08	0,052	
6. XI.	582	9,29	1,84	0,08	0,057	4.)
9. XI.	570	9,52	1,40	0,09	0,057	7.)
12. XI.	567	9,12	1,96	0,08	0,062	10.)
16. XI.	535	7,89	1,45	0,07	0,062	14.)
20. XI.	530	8,00	1,56	0,05	0,055	18.)
23. XI.	510	8,23	2,29	0,06	0,060	21.)
26. XI.	465	9,88	2,13	0,06	0,060	24.)
28. XI.	405	9,52	2,01	0,06	0,052	27.)
30. XI.	395	—	—	—	—	Exitus

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, daß der Katalasegehalt im Blute beim Skorbut sich fast nicht verändert; die Schwankungen an den einzelnen Tagen sind im allgemeinen die gleichen wie auch bei normaler Nahrung. In einigen Versuchen sehen wir in der ersten Avitaminosewoche (s. Tabelle II) eine leichte Zunahme der Katalase. Die Proteasezahl bleibt in der ersten Zeit (bis zur Mitte oder Ende der dritten Woche) normal, zeigt jedoch später in der letzten Skorbutperiode, der Periode, in der „sichtbare“ Skorbutsymptome auftreten, eine gewisse Steigerung.

¹⁾ Infolge Zerstörung derselben durch die Protease des Blutes.

Anders verhält es sich mit der Esterase. Ihr Gehalt im Blute bleibt während der ersten zwei Avitaminosewochen in den Grenzen des Normalen, nimmt jedoch dann ab, so daß in der dritten bis vierten Skorbutwoche der Esterasegehalt im Blute, wie aus ihren Fermentzahlen zu ersehen ist, niedriger als normal ist. Umgekehrt zeigt die Peroxydase zu Beginn des Skorbut eine Abweichung von der Norm, und zwar eine Steigerung, während sie darauf fast zur Norm zurückkehrt.

Das gleiche Bild boten im allgemeinen auch die Untersuchungen der Blutfermente der anderen skorbutischen Meerschweinchen dar. In Tabelle II ist z. B. das Versuchsprotokoll eines anderen Meerschweinchens (Nr. 2), von ungefähr 600 g Gewicht, angeführt, bei dem der Skorbut 23 Tage dauerte.

Tabelle II.

Datum der Bestimmungen	Gewicht g	Fermentzahlen				Am wievielten Skorbuttag die Bestimmung ausgeführt wurde
		Katalase	Protease	Esterase	Peroxydase	
23. VIII.	616	9,352	1,808	0,10	0,050	} Norm
24. VIII.	620	8,624	1,572	0,10	0,045	
30. VIII.	602	9,296	1,736	0,10	0,050	
5. IX.	602	8,848	1,680	0,10	0,050	
9. IX.	535	9,352	1,344	0,10	0,055	3.
11. IX.	535	10,080	1,650	0,10	0,068	7.
16. IX.	506	9,184	1,680	0,09	0,065	12.
18. IX.	490	9,352	1,792	0,09	0,057	14.
21. IX.	445	8,848	1,720	0,09	0,060	15.
23. IX.	412	3,352	1,792	0,08	0,052	17.
25. IX.	373	9,968	2,464	0,09	0,057	21.
27. IX.	340	—	—	—	—	23. Exitus

Bei diesem Meerschweinchen finden wir die oben erwähnte leichte Erhöhung des Katalasegehaltes im Blute in den ersten Skorbuttagen; vielleicht läßt sich diese Mengenzunahme der Katalase in Beziehung bringen zu den Angaben von *Bedson*¹⁾, der gefunden hat, daß zu Beginn des Skorbut bei Meerschweinchen der Erythrocytengehalt erhöht ist. Darauf schwankt während der ganzen Zeit der Katalasegehalt im Blute innerhalb der Grenzen des Normalen. Der kurz vor dem Tode auftretende Proteaseanstieg ist bei diesem Meerschweinchen weniger ausgesprochen, vielleicht infolge seines schnellen Todes. Bei den anderen Meerschweinchen war dieser Anstieg stärker ausgeprägt, so z. B. war beim Meerschweinchen Nr. 4, von 465 g Gewicht, die Fermentzahl der Protease in der Norm und zu Beginn des Skorbut = 1,68 bis 1,90, während er in der Zeit vom 17. bis 19. Skorbuttage = 2,91 bis 2,68

¹⁾ *Bedson*, Brit. med. Journ. 1921; zitiert nach Zentralbl. f. inn. Med. Nr. 23, 1922.

war. Auch dieser Versuch zeigt uns eine Herabsetzung des Esterasegehaltes in der zweiten Hälfte der Skorbutperiode (von der dritten Woche an). Bei den anderen Meerschweinchen war sie noch stärker ausgesprochen, so z. B. fiel beim Meerschweinchen Nr. 7, von 495 g Gewicht, die Fermentzahl der Esterase von 0,083 bis 0,087 (in der Norm und zu Beginn des Skorbut) auf 0,069 bis 0,062 (in der Zeit vom 21. bis 26. Skorbuttage).

Der Peroxydasegehalt ist auch hier, wie fast in allen übrigen Versuchen, mehr oder weniger stark erhöht in der ersten Skorbutwoche (von 0,045 bis 0,050 auf 0,068 oder von 0,055 bis 0,068 auf 0,075), um dann fast zur Norm herabzugehen.

Wir sehen also, daß die von uns untersuchten Blutfermente Veränderungen beim Skorbut erfahren. Diese Veränderungen sind zwar nicht sehr stark ausgesprochen, wiederholen sich aber bei sämtlichen Versuchstieren. Am *konstantesten* erweist sich die *Katalase*; ihre Fermentzahlen verändern sich nur in sehr geringem Grade.

Diese unsere Resultate können denjenigen von *Kolzow* und *Elisarowa*¹⁾ parallel gestellt werden, welche gefunden haben, daß der Katalasegehalt im Blute der Meerschweinchen durch eine außerordentliche Konstanz sich auszeichnet. Diese Autoren halten es für zweckmäßig, sämtliche Meerschweinchen nach ihrem Katalasegehalt im Blute in mehrere Gruppen (vier) einzuteilen. Unsere Meerschweinchen würden also derjenigen Gruppe zuzuzählen sein, die den höchsten Katalasegehalt aufweist. Nach den Angaben von *Kolzow* „läßt sich durch keine äußere Einflüsse oder Erkrankungen eine auch nur irgendwie bedeutende Veränderung des Katalasegehaltes hervorrufen“. Auch der Skorbut ist anscheinend nicht imstande, bedeutende Veränderungen des Katalaseindikators hervorzurufen.

Gleichzeitig mit der Katalase tritt zu Beginn des Skorbut auch eine Erhöhung des Peroxydasegehaltes auf. *Groebbels*²⁾ fand bei einer anderen Avitaminoseform, der Polyneuritis der Mäuse, daß im Anfang der Avitaminose der Gasaustausch erhöht ist (die Oxydationsprozesse sind verstärkt), um dann unter die Norm zu sinken.

Entsprechend den Angaben von *Dutcher* über eine starke Herabsetzung des Katalasegehaltes in den Organen bei der Polyneuritis könnte man auch bei unserer Avitaminose ein ebensolches starkes Sinken der Blutkatalase am Ende des Skorbut erwarten. Dem ist jedoch nicht so. Ob nun die Ursache hiervon in dem Unterschied zwischen der Polyneuritis und dem Skorbut oder darin zu suchen ist, daß die Meerschweinchen durch eine Konstanz ihrer Blutkatalase von

¹⁾ *Kolzow*, *Priroda* 1921 (russisch).

²⁾ *Groebbels*, *Hoppe-Seylers Zeitschr.* 122, 108, 1922.

anderen Tieren, bei denen viele Untersucher (z. B. *Burge*) starke Veränderungen im Katalasegehalt des Blutes unter dem Einfluß verschiedener Momente gefunden haben, sich unterscheiden, hierauf läßt sich vorläufig keine bestimmte Antwort geben.

Am konstantesten ist beim Skorbut die Erhöhung der Esterase, und zwar gegen Ende des Skorbutts, wo bereits klinisch Skorbutsymptome auftreten, wo infolge davon, daß die Zellen immer mehr und mehr die Fähigkeit verlieren, das für sie nötige Material, in erster Reihe die Kohlehydrate, auszunutzen, das gesamte Vorratsmaterial aufgebraucht ist und der Organismus zu hungern anfängt.

In eben dieser letzten Skorbutperiode, wo zu der eigentlichen Avitaminose noch das Hungern hinzutritt (unter anderem infolge der verminderten Nahrungsaufnahme) *ist der Proteasegehalt im Blute erhöht*. Diese Zunahme des Proteasegehaltes läßt sich in Beziehung bringen zu den Angaben über vermehrte proteolytische Kraft des Blutserums im vorgerückten Hungerstadium¹⁾ [vgl. *Heilner* und *Poensgen*²⁾, sowie *Jobling* und *Peterson*³⁾]. Von allen Blutfermenten aber ist die Amylase dasjenige, auf welches der Skorbut den größten Einfluß ausübt, da der Kohlehydratumsatz beim Fehlen des „Vitamins C“ in erster Reihe beeinträchtigt wird.

¹⁾ Bei vollkommenem Nahrungsmangel.

²⁾ *Heilner* und *Poensgen*, Münch. med. Wochenschr. **61**, 402, 1914.

³⁾ *Jobling* und *Peterson*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Ther. **24**, 219, 1915.