

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen. — Direktor: Geheimrat Kaufmann.)

## Untersuchungen über diastatische Fermente in der Leber, im besonderen bei Phosphorvergiftung.

Von

M. Staemmler.

(Eingegangen am 16. September 1925.)

In einer früheren, im Band 257 dieses Archivs erschienenen Arbeit war die Frage gestellt worden, ob es gelingt, die Verfettung der Leber bei Phosphorvergiftung auf eine Störung von Zellfermenten zurückzuführen. Die Untersuchung der Lipasen mit Hilfe der Methode von *Rona-Michaelis* hatte zu keinem positiven Ergebnis geführt. Eine Hemmung der fettspaltenden Fähigkeit der Leberzellen ließ sich in dem Gewebsextrakt nicht nachweisen. Die Untersuchung der Oxydasen ergab den unerwarteten Befund, daß diese Fermente in der Phosphorleber nicht vermindert waren, wie man hätte erwarten können, sondern daß sich regelmäßig eine Steigerung nachweisen ließ. Da es nicht anständig erschien, diese Steigerung der Oxydasetätigkeit als Ursache der Fettspeicherung anzusehen, wurde sie als ihre Folge gedeutet, etwa in dem Sinne, daß die Zelle auf die abnorme Überschwemmung mit Fett mit einer Steigerung ihrer oxydativen Kräfte antwortet, um auf diese Weise das Fett verbrennen zu können. Daß das Fett trotzdem in den Zellen liegen bleibt, habe ich als Zeichen der ungenügenden Anpassungsfähigkeit der Zellen auffassen zu müssen geglaubt.

Ungeklärt blieb zunächst aber die Frage, warum in so großen Mengen Fett in die Leber hineingeschleppt wird. Seit den Untersuchungen von *Saikowsky* und *Rosenfeld*, die weitgehende Bestätigung gefunden haben, ist man geneigt, die Ursache in einer Störung des Kohlenhydratstoffwechsels zu sehen. Diese zeigt sich besonders deutlich in einem Glykogenschwund der Leber, der in den allermeisten Fällen der Verfettung der Leberzellen vorausgeht.

Die weitere Frage mußte also sein: Ist dieser Glykogenschwund durch eine Fermentstörung bedingt? Und diese Frage hat den im folgenden mitgeteilten Untersuchungen zugrunde gelegen.

Daß der Kohlenhydratstoffwechsel der Wirkung von Fermenten unterliegt, darüber besteht kein Zweifel. Die am meisten untersuchten sind die Diastasen, Fermente, die die Polysaccharide in Monosaccharide

spalten. Sie sind sowohl in Sekreten wie in Organextrakten nachweisbar. Daß auch die Leber Diastasen enthält, ist seit den Untersuchungen von *Wohlgemuth* bekannt.

Bei Untersuchungen von Diastasen sind methodisch zwei Dinge von Wichtigkeit:

1. Die Art der Fermentgewinnung und
2. die Art der Fermentauswertung.

Zu 1. *Wohlgemuth* verwandte durchweg Preßsäfte der Organe. *Holmbergh* hat kürzlich die verschiedenen Möglichkeiten der Fermentgewinnung zusammengestellt. Er unterscheidet in der Hauptsache 4 Arten:

1. Schüttelextrakte aus frischer Leber mit Wasser,
2. Glycerinextrakte aus der frischen Leber,
3. Preßsäfte,
4. Lösungen aus Trockenpräparaten (wie sie z. B. auch von *Tschernorowski* angewandt werden).

Da ich, meinen früheren Untersuchungen entsprechend, an weißen Mäusen zu arbeiten beabsichtigte, also mit kleinen Organmengen rechnen mußte, kamen 3 und 4 für mich kaum in Frage. Ich habe mich daher durchweg der wässerigen Schüttelextrakte bedient. Sie wurden so hergestellt, daß die Leber der Maus unmittelbar nach dem Tode mit der Schere zerkleinert, mit 10 ccm Ringerlösung versetzt und  $\frac{1}{2}$  Stunde mit Glasperlen geschüttelt wurde. Dann wurde die Flüssigkeit abgossen, zentrifugiert und die etwas trübe, obenstehende Flüssigkeit als Extrakt verwandt. Die Herstellung der Lösung geschah also ähnlich wie bei der Lipasegewinnung nach *Rona* und *Michaelis*.

Zu 2. Die Prüfung der diastatischen Kraft geschieht am einfachsten durch Einwirkung auf Stärkelösung. Ich bediente mich der *Wohlgemuth*schen Methode, die darin besteht, daß Fermentlösung in wechselnder Verdünnung gleichen Stärkelösungen zugefügt und geprüft wird, bei welcher Verdünnung das Ferment noch imstande ist, die Stärkelösung so vollständig zu zersetzen, daß sie mit Jod keine blaue Farbreaktion mehr gibt. *Wohlgemuth* bezeichnet mit D (diastatische Kraft) diejenige Zahl, welche angibt, wieviel Kubikzentimeter 1proz. Stärkelösung innerhalb 24 St. von 1 ccm Fermentlösung noch völlig zersetzt werden können. Da nach den Ergebnissen von *Wohlgemuth*, *Holmbergh* u. a. der Fermentgehalt der Leber sehr gering ist und ich bei meinen verhältnismäßig dünnen Extrakten mit noch kleineren Werten rechnen mußte, verwandte ich stets  $10_{/00}$  ige Stärkelösung.

Die Versuche wurden also folgendermaßen angesetzt:

Eine Anzahl Reagensgläser wurde mit je 5 ccm  $10_{/00}$  Stärkelösung beschickt. Dazu kamen wechselnde Extraktmengen (1 ccm,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$ ,  $\frac{1}{128}$ ,  $\frac{1}{256}$ ).

Als Kontrollen dienen:

1. ein Röhrchen, das nur verdünnten Extrakt enthielt,
2. ein Röhrchen, das nur Stärkelösung enthielt.

Die Röhrchen bleiben 24 St. bei Zimmertemperatur stehen. Dann werden sie mit Wasser bis nahe dem oberen Rand vollgefüllt und zu jedem Röhrchen 2 Tropfen Jodjodkalilösung zugefügt. Es muß die Kontrolle 1 farblos, die Kontrolle 2 dunkelblau werden. Von den Versuchsröhrchen sind in der Regel die ersten farblos; rote Farbe (Dextrin + Jod) gilt als voll gespalten. Sobald Violett auftritt, ist die Spaltung nicht völlig.

Tritt der violette Farbenton bei 1:32 auf, so liegt bei 1:16 die Grenzverdünnung. Es vermag dann also 1 ccm Extrakt  $16 \times 5 = 80$  ccm einer 1‰ oder 8 ccm einer 1 proz. Stärkelösung zu spalten. D ist also = 8.

Schwierig ist bei den langdauernden Versuchen, sich vor bakteriellen Verunreinigungen zu hüten, die, wie sich leicht aus der 2. Kontrolle ergibt, zu Spaltung der Stärke führen können. Um sie zu vermeiden, habe ich 1. die Stärkekleisterlösung täglich neu gekocht; 2. täglich vor dem Versuche sämtliche Glasgefäße sterilisiert und 3. jeden Versuch mit Toluol überschichtet. So gelingt es, wie die Kontrolle zeigte, bakterielle Verunreinigungen auszuschalten, besonders wenn man nicht bei Brutschrank-, sondern bei Zimmertemperatur arbeitet.

Die bei dieser Versuchsanordnung erhaltenen D-Werte der normalen Mäuseleber schwanken in ziemlich weiten Grenzen. Den Fehler der wechselnden Temperatur, die auf den Ausfall der Reaktion zweifellos von großer Bedeutung ist, habe ich dadurch vermieden, daß ich in den eigentlichen Phosphorversuchen stets gleichzeitig die Phosphorleber und eine normale Vergleichsleber nebeneinander unter absolut gleichen Bedingungen untersuchte.

*Wohlgemuth* gibt an 2 Stellen Zahlen über die diastatische Kraft von Lebern an. Er erhielt bei Hunden in 4 Versuchen 10–200; bei Kaninchen schwankte sie in der Regel zwischen 5 und 12,5. Doch kamen auch Werte unter 5 vor. Meine Zahlen schwankten zwischen 2 und 64. Am häufigsten lagen sie zwischen 8 und 16. Aus 42 Versuchen am normalen Tier kann ich als Durchschnittswert 13,7 angeben. Die Ergebnisse stimmen also ungefähr mit denen überein, die *Wohlgemuth* hatte. Wie bei anderen fermentativen Prozessen ist es auch hier noch nicht möglich, Normalzahlen anzugeben. Die Zahlen würden ja sicherlich viel höher sein, wenn es gelänge, mit reinen Fermenten zu arbeiten.

Zunächst wurde geprüft, ob es im Reagensglas gelingt, die Wirkung der Diastasen durch Zusatz von Substanzen verschiedener Art zu beeinflussen.

Es wurden also von einem Leberextrakt zwei Versuchsreihen angesetzt. Die erste enthielt den reinen Versuch, wie vorher beschrieben. In die Röhrchen der zweiten wurden verschiedene Stoffe zugefügt.

### 1. *Cyankali.*

Zusatz von je 5 Tropfen einer 1<sup>0</sup>/<sub>00</sub> Lösung.

Versuchs-Nr.	D	
	Normal	C-Zusatz
34	64	8
35	32	4
39	8	4
38	32	0
37	8	0

Das Ergebnis ist in allen Versuchen eindeutig: Cyankali vermag auch in sehr starker Verdünnung die Diastasen in starkem Grade zu hemmen. Es erweist sich damit als Fermentgift im weiteren Grade, lähmt also nicht allein die Oxydasen oder sonstige Atmungsfermente.

Die Versuche scheinen auch deswegen wichtig zu sein, weil sie zeigen, daß das Cyankali nicht allein an der lebenden Zelle angreift, sondern imstande ist, das aus den Zellen ausgezogene Ferment hemmend zu beeinflussen.

### II. *Phosphor.*

Der Zusatz erfolgte in Form einer P-Emulsion. Die Verdünnung schwankte zwischen 1:1000 und 1:10 000.

Versuchs-Nr.	D		
	Normal	P-Zusatz	
46	32	4	1/4 ccm 1 : 1000
31	32	1	
30	16	2	
47	16	0	
48	8	0	1/2 ccm 1 : 10 000
49	8	0	
78	128	4	
79	128	16	
80	32	16	
81	128	8	
82	128	16	
83	8	0	
84	16	4	1/10 ccm 1 : 10 000
85	16	0	
86	4	0	
26	32	16	
27	32	16	
29	16	16	

Es zeigt sich also, daß auch der Phosphor in starkem Grade imstande ist, die Diastasen zu hemmen. Bei Mengen, die zwischen 1/4

und  $\frac{1}{20}$  mg liegen, tritt schon eine fast völlige Lähmung ein. Erst wenn die Verdünnung noch weiter getrieben wird, so daß  $\frac{1}{100}$  mg auf den Versuch kommen, ist die Wirkung ungefähr aufgehoben. Oder es kann wenigstens nur eine leichte Hemmung nachgewiesen werden. Aber selbst bei diesen höchsten Graden der Verdünnung, das scheint für die angeschnittene Frage wichtig, habe ich niemals eine Steigerung der diastatischen Kraft gefunden. Nach diesen Reagensglasversuchen muß es als unwahrscheinlich angenommen werden, daß der Glykogenschwund in der Leber des Phosphortieres durch Steigerung der Wirkung diastatischer Fermente zustandekommt.

In ähnlicher Weise wurde eine Anzahl anderer Stoffe auf ihre Wirkung auf diastatische Fermente untersucht. Es lag nahe, dazu vornehmlich solche Stoffe zu benutzen, die erfahrungsgemäß Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben.

### III. Phloridzin.

*Wohlgemuth* und *Benzur* fanden durch Phloridzin stets eine Steigerung der Diastasewirkung der Nieren, in der Hälfte der Fälle auch in der Leber. Meine Versuche, in denen zu jedem Reagensglas 0,1 ccm einer 1 proz. Ph-Lösung zugesetzt wurde, hatten folgendes Ergebnis:

Versuchs-Nr.	D	
	Normal	Phloridzin
60	64	128
77	4	8
61	32	32
62	64	64
63	64	64
74	4	4
75	4	4
76	4	4
78	2	2

Man kann wohl hieraus den Schluß ziehen, daß ein irgendwie regelmäßiger Einfluß des Phloridzins auf die Leberdiastasen nicht nachweisbar ist. Durchaus ähnliche Ergebnisse mit anderen Methoden hatte *Bang*. Auch der Durchströmungsversuch zeigte bei Phloridzin-Zusatz keinen anderen Ausfall (*Kira*).

Ebenso waren die Ergebnisse mit

### IV. Pituglandol.

Versuchs-Nr.	D	
	Normal	Pituglandol
50	32	32
51	64	32
56	16	16
60	64	64
61	32	32

Obwohl die verhältnismäßig große Menge von 0,1 ccm des käuflichen Pituglandols zugesetzt wurde, war ein Einfluß auf die diasta-

tischen Fermente nicht nachweisbar. Diese Versuche zeigen zugleich, daß die Methode der Prüfung der Fermentwirkung leidlich zuverlässig ist, da ja gleichzeitig mit dem gleichen Extrakt angesetzte Versuche auch zu den gleichen Ergebnissen führen.

Etwas anders waren die Ergebnisse mit *Adrenalin*. Im allgemeinen wurde 0,1 ccm der 1<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Lösung von Suprarenin-Merck zugefügt, in 2 Fällen 0,25.

#### V. *Adrenalin*.

Versuchs-Nr.	D	
	Normal	Adrenalin
32	32	64 (0,25)
34	64	128
37	8	16
38	32	64 (0,25)
39	8	16
41	4	8
42	8	16
43	4	8
44	8	16
35	32	32
40	16	16
45	16	16

Das Adrenalin bewirkt also fast regelmäßig eine, wenn auch meist nur geringe, Steigerung der Diastase-Wirkung.

Dieses Ergebnis stimmt mit denen der Durchströmungsversuche von *Kira* überein, der bei Adrenalinzusatz eine regelmäßige Aktivierung der Leberdiastasen nachweisen konnte.

#### VI. *Insulin*.

Es wurde zunächst das Insulin Tetewop in Mengen von 0,1 ccm je Versuch benützt.

Versuchs-Nr.	D	
	Normal	Insulin
23	4	2
27	32	16
40	16	8
42	8	2
43	4	2
44	8	4
45	16	8
64	16	8
65	8	4
41	4	4
66	8	8
67	8	8
29	16	16 (0,05)

Das Ergebnis dieser Versuche scheint also in dem Sinne zu sprechen, daß Insulin eine Hemmung der diastatischen Wirkung in der Leber

verursacht. Man könnte geneigt sein, hieraus Schlüsse auf das Wesen der Insulinwirkung zu ziehen. Doch glaube ich, daß man mit solchen Schlüssen sehr vorsichtig sein muß, solange nicht eine ähnliche Hemmung der Diastasen in der Leber in Tierversuchen nachgewiesen ist. Diese Vorsicht scheint mir um so mehr geboten, als Versuche mit anderen Insulinarten, so dem von *Schering*, ein weniger regelmäßiges Ergebnis hatten.

Versuchs-Nr.	Normal	D Insulin-Schering
64	16	16
65	8	4
66	8	8
67	8	8
70	16	8
71	8	16

Ist der durchschnittliche diastatische Index in den Versuchen mit Insulin Tetewop 7,0 gegen 11,4 in den Vergleichsversuchen, so bleibt er beim Insulin *Schering* mit 10,0 gegen 10,7 nur ganz unwesentlich hinter der insulinfreien Kontrolle zurück.

Versuche mit *Lecithin* endlich, ähnlich denen bei Prüfung seiner Einwirkung auf Oxydasen, zeigten nie eine Steigerung, eher eine gewisse Neigung zur Abschwächung der Fermentwirkung. Doch sind die Ergebnisse ungleichmäßig.

Fassen wir die Ergebnisse dieser Reagensglasversuche zusammen, so zeigt sich, daß Cyankali und Phosphor auch in sehr kleinen Mengen eine deutlich hemmende Wirkung auf die diastatischen Fermente ausüben, die bis zur völligen Aufhebung der Fermentwirkung gehen kann. Einen ähnlichen Erfolg, doch in viel schwächerem Grade, kann Insulin haben, während Adrenalin in der Regel eine gewisse Verstärkung der Diastasen bedingt.

Die zweite Frage war nun, ob Phosphor, dessen Wirkung ja vornehmlich untersucht werden sollte, auch im Tierkörper die Leberdiastasen beeinflusst. Zur Prüfung wurden jeweils 2 Parallelversuche angesetzt. Von 2 gleichschweren Mäusen wurde die eine durch Einspritzung von 0,5 mg Phosphor vergiftet. Nach 24 St. wurde sie getötet und aus ihrer Leber mit 10 ccm Ringerlösung ein Schüttelextrakt hergestellt. Ein Vergleichsextrakt wurde aus der Leber der gleich schweren, nicht vergifteten Maus genommen und nun die Wirkung beider Extrakte verglichen. Da ja nun an sich die diastatische Kraft in den Lebern der verschiedenen Tiere nicht gleich hoch ist, konnte man nicht erwarten, immer in einzelnen eindeutige Ergebnisse zu bekommen. Bei einer größeren Versuchsreihe aber mußten sich diese Fehler ausgleichen, und die durchschnittliche diastatische Kraft der Phosphorleber Unterschiede gegen die der normalen aufweisen.

Neben diesen Fermentprüfungen wurden regelmäßig die Lebern auf ihren Glykogen- und Fettgehalt und ihr sonstiges Verhalten mikroskopisch untersucht und bei den Phosphortieren mit völliger Regelmäßigkeit Schwund des Glykogens und mehr oder weniger starke Verfettung bei guterhaltenen Zellen und Kernen festgestellt.

Die Ergebnisse der Fermentuntersuchungen zeigt Tab. 7.

Tabelle 7.

Versuchs-Nr.	Normaltier	Phosphortier
1/3	8	2
9/10	8	2
11/12	32	16
13/14	64	32
27/28	32	2
29/30	64	2
39/40	32	4
43/44	16	2
55/56	8	0
64/65	16	8
81/82	8	4
7/8	16	16
17/18	16	16
41/42	2	2
47/48	16	16
72/73	4	4
2/4	8	16
5/6	8	64
35/36	2	16
57/58	4	8
66/67	4	16
68/69	8	32
70/69	8	32
75/76	8	32
71/73	4	8

Die Tabelle ergibt:

11 mal geringere Diastasewirkung beim Phosphortier,

9 mal stärkere Diastasewirkung beim Phosphortier,

5 mal gleiche Befunde bei beiden Tieren.

Schon dieses Ergebnis läßt eine starke Wirkung des Phosphors nicht erkennen. Berechnet man jetzt die durchschnittliche diastatische Kraft, so beträgt sie in der Phosphorleber 14,1, in der Leber des normalen Tieres 15,8. Der Unterschied scheint mir zu klein zu sein, als daß daraus wesentliche Schlüsse gezogen werden könnten. Das eine steht jedenfalls fest, daß eine Verstärkung der diastatischen Kraft der Leber, die zu einem Glykogenschwund führen könnte, auch im Tierversuch nicht nachweisbar ist.

Nun ließe sich noch ein Einwand erheben: Der Glykogenschwund geht der Verfettung voraus. Es könnte die Steigerung der diastatischen



Fähigkeiten auf ein erstes Stadium beschränkt sein, diese Steigerung aber mit stärkerer Zellschädigung wieder verschwinden.

Es mußte also auch geprüft werden, ob vielleicht in einem früheren Stadium der Phosphorvergiftung, wenn die Verfettung der Zellen noch nicht so hochgradig ist, eine Diastase-Vermehrung nachweisbar ist.

Die Tab. 8 gibt eine Zusammenstellung der Ergebnisse einer Anzahl von Versuchen, in denen die Phosphortiere schon nach 5—7 St. getötet wurden. Die Lebern zeigten erst die ersten Anfänge von Verfettung.

*Tabelle 8.*

Versuchs-Nr.	Normaltier	Phosphortier
45/46	4	2
80/82	8	4
83/85	32	8
84/85	32	4
86/88	8	2
87/88	8	4
89/91	16	8
90/91	16	2
49/50	4	4
53/54	8	8
74/76	8	8
15/16	8	16
33/34	4	32
37/38	2	8
51/52	2	4
59/60	2	8
63/65	16	32

Das Ergebnis ist also das gleiche:

8mal geringere Diastasewirkung beim Phosphortier,

6mal stärkere Diastasewirkung beim Phosphortier,

3mal gleiche Befunde bei beiden Tieren.

Im Durchschnitt beträgt der diastatische Index beim Phosphortier 9,1 gegen 10,5 beim Normaltier. Auch hier läßt sich höchstens eine geringfügige Abnahme der Diastasen feststellen.

Wie ist dieser Befund nun mit den Erscheinungen der Phosphorvergiftung in Einklang zu bringen? Der Glykogenschwund in der Leber könnte zwei Ursachen haben: Einmal gesteigerte Abgabe, zweitens ungenügenden Aufbau aus den mit dem Blute angebotenen Monosacchariden. Beides kann durch Fermentstörung bedingt sein. Nach den neueren Untersuchungen über Fermente im allgemeinen liegt es nahe, anzunehmen, daß Glykogenabbau und -aufbau durch die gleichen Fermente verursacht werden, deren Wirkung ja im allgemeinen als reversibel angesehen wird. Läßt sich nun im Reagensglas und in geringerem Grade auch im Tierkörper eine Hemmung der diastatischen Fermente durch Phosphor nachweisen, so besteht die Möglichkeit, daß

diese Hemmung im Tierkörper vorzugsweise die synthetisierende Funktion betrifft, und daß auf diese Weise eine Verarmung der Leber an Glykogen eintritt. (Und daß tatsächlich die Glykogensynthese in der Leber bei der P-Vergiftung gestört ist, haben die Untersuchungen von *Rosenfeld* ergeben.)

Ähnliche Verminderungen der Amylasen in der Leber fanden *Bang* und *Zegla* bei Pankreasdiabetes. Auch sonst liegen ja hierbei ähnliche Verhältnisse in der Leber vor wie bei P-Vergiftung, insofern als akuter Glykogenschwund von starker Verfettung gefolgt wird.

Fassen wir die Ergebnisse der mitgeteilten Untersuchungen kurz zusammen, so kommen wir zu folgenden Schlüssen:

1. Im Reagensglas hemmt der Phosphor, auch in starker Verdünnung, die diastatischen Fermente der Leber.
2. Im Tierversuch ist eine ähnliche Hemmung nur in sehr geringem Grade nachweisbar.
3. Der Glykogenschwund in der Leber bei Phosphorvergiftung ist nicht durch eine Steigerung der diastatischen Fermente und dadurch bedingten vermehrten Glykogenabbau zu erklären.

Eher besteht die Möglichkeit, daß eine Fermentschädigung mangelhafte Glykogensynthese zur Folge hat.

#### Literaturverzeichnis.

*Wohlgemuth*, Biochem. Zeitschr. **9**. 1908 und **21**. 1909. — *Holmbergh*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **134**. 1924. — *Tschernorowski*, Biochem. Zeitschr. **36**. 1911. — *Wohlgemuth* und *Benzur*, Biochem. Zeitschr. **21**. 1909. — *Bang*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **9** und **10**. 1907. — *Kira*, bei *Oppenheimer*, Fermente. Lieferung 5, S. 729. 1925. — *Zegla*, Biochem. Zeitschr. **16**. 1909. — *Staemmler*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **257**. 1925. — *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen. 1924—1925.