

Aus der Universitäts-Nervenklinik Tübingen  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. KRETSCHMER).

## Untersuchungen über die Leukocytenfermente bei Schizophrenen unter besonderer Berücksichtigung des Leukocytentrypsins I.

Von

G. MALL, H. BINDER und B. GRAETZ.

(Eingegangen am 2. November 1951.)

Über eiweißspaltende Fermente der Leukocyten wurde erstmals etwas bekannt als 1888 FRIEDRICH MÜLLER mitteilte, daß Glycerinauszüge aus Eiterzellen imstande seien, Fibrin und koaguliertes Serum in schwach alkalischem Milieu zu verdauen. 1906 berichteten EDUARD MÜLLER und GEORG JOCHMANN „Über eine einfache Methode zum Nachweis proteolytischer Fermentwirkungen.“ Sie gaben einen Blutstropfen auf eine LÖFFLER-Platte, die aus erstarrtem Blutserum und etwas Traubenzuckerbouillon bestand, und stellten diese für einige Zeit bei 50° in den Thermostaten. Es konnte anschließend an der Stelle, wo der Blutstropfen hingegeben wurde, eine Delle beobachtet werden, die auf einen Abbau des Substrates durch proteolytische Fermente des Blutes zurückgeführt wurde. Etwa zur selben Zeit stellte der Amerikaner OPIE Untersuchungen über proteolytische Fermente in entzündlichen Exsudaten, in Abscessen und im Knochenmark an. Dabei fand er eine Protease, die in saurem Milieu wirkte und von der er annahm, daß sie aus den Monocyten stamme. Außerdem fand er eine Protease, die in alkalischem Milieu wirkte und die er den polymorphkernigen Leukocyten zuordnete. 1918 berichtete DERNBY über Untersuchungen der polymorphkernigen Leukocyten aus dem Aleuronexsudat eines Kaninchens. 1919 untersuchte LORD polymorphkernige Leukocyten aus Pneumonielungen und fand auf LÖFFLER-Platten eine Spaltung bei  $p_H$  6,7—7,3. 1922 fand NYE ebenfalls unter Verwendung von Leukocyten aus Pneumonielungen eine Spaltung gegenüber Fibrin als Substrat optimal bei  $p_H$  8,0. Weiterhin wurden Arbeiten von MANCINI, PARKER, HEDIN und FIESSINGER bekannt. Eine zusammenfassende Darstellung der bis dahin bekannten Untersuchungsergebnisse findet sich in C. OPPENHEIMERS Handbuch „Die Fermente“.

Da die bisherigen Untersuchungsergebnisse zahlreiche Widersprüche aufwiesen, wurde 1929 von RICHARD WILLSTÄTTER, EUGEN BAMANN und MARGARETÉ RHODEWALD eine genaue Analyse der Leukocytenfermente in Angriff genommen. Die Autoren fanden, daß die farblosen Zellen aus

dem Blute mehrerer Tierarten Trypsin enthalten, das in aktiviertem Zustande vorliegt und in seiner Wirkung im Vergleich mit der Pankreasdrüse nur schwach ist. Außerdem konnten sie eine Kathepsinwirkung nachweisen. Als verhältnismäßig stark gaben sie eine ereptische Wirkung an, d. h. eine Wirkung, die auf Peptidasen beruht und die auf das Vorkommen einer Aminopolypeptidase, einer Carboxypolypeptidase und einer Dipeptidase zurückgeführt werden konnte.

HUSFELDT, der 1931 Leukocyten des menschlichen Blutes untersuchte, wobei sein Interesse besonders den granulierten polymorphkernigen Leukocyten galt, bestätigte das Vorhandensein der genannten proteolytischen Fermente. ÖLKERS, der ebenfalls 1931 eine Arbeit über die Fermente der Lymphocyten bei einer lymphatischen Leukämie veröffentlichte, fand, daß diese dieselbe Fermentausrüstung wie die Granulocyten besitzen, wobei jedoch die gefundene Tryptase und das Kathepsin nur sehr schwach wirksam waren. Er konnte in den Lymphocyten auch eine Lipase nachweisen, die auf Äthylbutyrat einwirkte.

Somit war die enzymatische Ausrüstung der Leukocyten in Hinsicht auf ihre proteolytischen Enzyme weitgehend geklärt. Die späteren Untersuchungen von WILLSTÄTTER und seinen Mitarbeitern galten der Darstellung der Leukocytenenzyme möglichst in ihrem natürlichen Zustande. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche methodische Verbesserungen bei den Fermentuntersuchungen eingeführt.

Bei allen Fermenten beruhen die Methoden der Verfolgung der spezifischen Wirksamkeit entweder auf der Beobachtung der Veränderung des Substrates oder der Messung der gebildeten Spaltprodukte.

In bezug auf die Veränderung des Substrates kommt die Nephelometrie in Anwendung. Sie beruht auf der Feststellung der Trübungsintensität eines kolloidalen Substrates. Da die Substrattrübung unter den gegebenen Versuchsbedingungen direkt proportional der Konzentration ist, vermittelt die Trübungsintensität ein Bild von der enzymatischen Wirkung. Die Nephelometrie ist besonders geeignet für die Erfassung des Anfanges enzymatischer Spaltprozesse. Bei wenig tiefgreifender Hydrolyse mit hochmolekularen Substraten ist die Nephelometrie sogar genauer als die titrimetrische Spaltproduktbestimmung.

In bezug auf die Messung der gebildeten Spaltprodukte kennt man eine ganze Anzahl von Bestimmungsmethoden. Die enzymatische Proteolyse besteht im wesentlichen in einer Aufspaltung der Säure-Amidbindungen, mit denen die einzelnen Aminosäuren in den Peptiden und Proteinen verknüpft sind. Hierbei werden in stets äquivalenten Mengen Karboxyl- und Aminogruppen freigelegt, die mengenmäßig analytisch genau erfaßt werden können.

Man unterscheidet die rein chemischen Bestimmungsmethoden zur Erfassung der sauren oder basischen Gruppen von den physikalisch-chemi-

schen Methoden. Bei den ersteren wird titrimetrisch vorgegangen, zu den letzteren gehören besondere Apparaturen. Die rein chemischen Methoden werden im allgemeinen vorgezogen. Sie sind verhältnismäßig einfach und entsprechen in ihrer Genauigkeit weitgehend den physikalisch-chemischen Methoden. Sie gestatten klare und einfache Aussagen über den chemischen Ablauf des Abbauvorganges und den jeweiligen Stand des Substrates und sind deshalb für große Versuchsserien, bei denen viele Analysen rasch hintereinander durchgeführt werden müssen, besonders geeignet. Andererseits eignen sich die physikalisch-chemischen Methoden sehr gut für die Erfassung der ersten Abbauvorgänge an hochmolekularen Proteinen, bei denen nur eine geringe Anzahl von Amidbindungen gespalten wird. Werden Amidbindungen gespalten, wie es z. B. bei der Hydrolyse von Peptiden der Fall ist, wo selbst bei geringer Enzymwirkung oder kurzer Einwirkungszeit eine starke Zunahme freier Gruppen erfolgt, so sind die rein chemischen oder auch titrimetrischen Methoden angepaßter.

Für die titrimetrischen Methoden ist eine Schwierigkeit aus dem Wege zu räumen, die darin besteht, daß bei gleichzeitigem Vorhandensein der sauren und alkalischen Gruppen die Einzelwirkung der Gruppen kompensiert wird. Die Aminosäuren sind aus diesem Grunde amphoter reagierende Substanzen. Um eine der Gruppen, die saure oder die alkalische zu bestimmen, muß die andere in ihrer Wirksamkeit ausgeschaltet werden. Dies gelingt durch Zusatz geeigneter Mittel. Auf der Wahl dieser Mittel beruhen die verschiedenen alkalimetrischen und azidimetrischen Bestimmungsmethoden.

Am gebräuchlichsten ist die Bestimmung der Carboxylgruppen durch Titration mit Lauge in alkoholischer Lösung, eine Methode, die von WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ ausgearbeitet wurde. In genügend hoher alkoholischer Lösung wird die Ionisation der Aminosäuren so weit zurückgedrängt, daß die Carboxylgruppen ohne Störung durch die gleichzeitig anwesenden Aminogruppen mit Phenolphthalein oder Thymolphthalein als Indicator alkalimetrisch bestimmt werden können. Dabei besteht hinsichtlich der Alkoholkonzentration ein Unterschied in der Bestimmung der Aminosäuren und Peptiden. Die Peptide aus einfachen Aminosäuren können schon in 50% igem Alkohol am besten unter Verwendung von Phenolphthalein mit Kalilauge quantitativ titriert werden. Die Autoren geben an, daß Phenolphthalein hier besser ist als Thymolphthalein, das bei höherer Alkalikonzentration umschlägt und daher einen zu hohen und wenig übereinstimmenden Bruchteil der Aminosäuren erfaßt. Für die freien Aminosäuren, die unter Verwendung von Thymolphthalein titriert werden, das vor allem den Vorzug eines scharfen Umschlages besitzt, ist eine Alkoholkonzentration von mindestens 90% erforderlich. Dieser Unterschied kann zu einer Schätzung des Anteiles an

Aminosäuren und Peptiden in Eiweißabbau gemischen herangezogen werden.

Zur Ausführung benötigt man eine 0,2 n-Lösung von Kaliumhydroxyd in 90% igem Alkohol und eine 0,5% ige alkoholische Lösung von Thymolphthalein.

Bei der Durchführung der Titration wird im einfachsten Fall das zu bestimmende Gemisch von Polypeptiden und Aminosäuren mit der neunfachen Menge absoluten Alkohols versetzt und nach Zugabe von Thymolphthalein auf schwache aber deutliche Blaufärbung titriert. Handelt es sich um eine genaue Bestimmung, so ist der Alkaliverbrauch des zugesetzten Alkohols festzustellen und in Abzug zu bringen.

Wie bereits eingangs erwähnt, haben vor allem R. WILLSTÄTTER, E. BAMANN und M. RHODEWALD eine eingehende Untersuchung der Leukocyten auf ihre proteolytischen Fermente durchgeführt. Zur Prüfung der tryptischen Wirksamkeit der Leukocyten verwandten sie als Substrat für die Spaltung Casein. Die optimale Wasserstoffzahl wurde durch Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer eingestellt. Die Versuche wurden sämtliche ohne Aktivierung durch Enterokinase durchgeführt, womit bewiesen werden konnte, daß das leukocytaire Trypsin in aktiviertem Zustande vorliegt. Der Spaltungsansatz wurde 24 Std bei 37° im Thermostaten belassen. Der Nachweis der Spaltprodukte geschah durch Titration mit 0,05 n alkoholischer Kalilauge zur Bestimmung der Carboxyle nach der Methode von WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ. Um die in  $\text{cm}^3$  0,05 n alkoholischer Lauge gemessenen Ausschläge in Enzymeinheiten ausdrücken zu können, wurde durch vergleichende Versuche eine Brücke hergestellt zu den früheren Untersuchungen von WILLSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ, DUNATTURRIA und KÜNSTNER zur Bestimmung der tryptischen Wirksamkeit in der Pankreasdrüse. Dort wurde als Trypsineinheit „T.-(e)“ diejenige Enzymmenge bezeichnet, die unter den angegebenen Bedingungen eine Spaltung entsprechend 1,05  $\text{cm}^3$  0,2 n alkoholischer Kalilauge bewirkte. Sie ist in etwa 0,1  $\text{cm}^3$  Glycerinauszug (1:10) aus getrocknetem Pankreas enthalten. Die Trypsineinheit erwies sich jedoch für die Untersuchungen des leukocytären Trypsins als zu groß, weshalb zu 0,001 T.-(e) als „kleiner Trypsineinheit“ gegriffen wurde. Verglichen mit der Wirksamkeit eines Pankreasauszuges ist die tryptische Wirksamkeit der Leukocyten sehr gering. Sie fällt etwa in die Größenordnung der Hefeproteasen.

Die Autoren verwandten im allgemeinen Glycerinauszüge von Leukocyten, die im Pferdeblut nach der Methode von E. HEKMA und H. J. HAMBURGER und im Hundeblut nach der Methode von P. SZILARD isoliert wurden.

Wir haben bei unseren Untersuchungen die genannten Verfahren zur Isolierung der Leukocyten geprüft. Man läßt bei der von E. HEKMA und

H. J. HAMBURGER angegebenen Methode Citratblut mehrere Stunden in der Kälte stehen, wobei die Sedimentierung rascher vor sich geht als bei mittlerer Temperatur. Dann wird das Plasma abgehebert und zentrifugiert. Man findet so ein meist rötlich gefärbtes Sediment, das, um die noch anhaftenden Erythrocyten zu entfernen, mehrere Male in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Gehalt von 0,01% Ammoniumoxalat, 0,02% Kaliumchlorid und 0,02% Natriumbicarbonat ausgewaschen wird. Die Autoren konnten auf diese Weise bei einiger Übung aus 6 Liter Blut 7,5—9 g Leukocytensediment entsprechend 1,5—1,8 g Trockengewicht gewinnen.

Das Verfahren hat anderen Verfahren gegenüber den Vorzug, daß bei seiner Anwendung die Leukocyten am wenigsten geschädigt werden. Es eignet sich besonders gut bei Verwendung von Pferdeblut, wo infolge der Geldrollenbildung der Erythrocyten diese sich rascher absetzen als die Leukocyten und somit eine deutliche Trennung der Zellen zustandekommt.

Bei dem von uns angestellten Versuch überließen wir 50 cm<sup>3</sup> Citratblut in der Kälte der Sedimentation, und zwar in einer Bürette. Nach erfolgreichem Absetzen der Erythrocyten wurde die Bürette stufenweise abgelaßen und bei jeder Stufe ein mikroskopisches Ausstrichpräparat angefertigt. Bei 5 Präparaten innerhalb der Erythrocytenschicht wurden stets vereinzelte Leukocyten festgestellt. Sie wurden zahlreicher in den obersten Erythrocytenschichten und zeigten eine außerordentliche Ansammlung in dem weißen Häutchen, das sich auf den sedimentierten Erythrocyten niedergeschlagen hatte.

Es war von vornherein klar, daß im Plasma der geringere Teil der Leukocyten suspendiert sein würde, da die Differenz in der Absetzungsgeschwindigkeit der Erythrocyten und der Leukocyten im menschlichen Blut gering ist. Die Hauptmenge der Leukocyten fand sich, wie zu erwarten war, unmittelbar auf den abgesetzten Erythrocyten und in den obersten Erythrocytenschichten. Die Frage blieb nur die, ob die auf diese Weise isolierbare Leukocytenmenge zu Untersuchungszwecken ausreichen würde, zumal für klinische Untersuchungszwecke mit wesentlich geringeren Ausgangsmengen an Blut, als dies bei dem obigen Versuch der Fall war, gerechnet werden mußte. Wir konnten wiederholt in sedimentierten Blutproben das weiße Grenzhäutchen zwischen dem Plasma und den Erythrocyten isolieren. Dabei wurden mit einer feinen Capillare, die an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, das überstehende Plasma und nach Durchstechen des weißen Grenzhäutchens die darunter befindlichen Erythrocyten abgesaugt, ohne daß dabei das Grenzhäutchen beschädigt wurde. Es stellte sich heraus, daß die auf diese Weise gewonnene Leukocytenmenge für Fermentbestimmungsversuche nicht ausreicht.

Bei dem zweiten Verfahren, das in der Literatur zur Isolierung der Leukocyten angegeben wird, handelt es sich um die fraktionierte Zellauflösung nach P. SZILARD.

SZILARD verwendet im allgemeinen 10 cm<sup>3</sup> defibriniertes Blut, das mit 10 cm<sup>3</sup> eines Gemisches von 8 Teilen 2,5%iger Essigsäure und 2 Teilen 2,0%iger Weinsäure versetzt wird. Dabei erfolgt eine Hämolyse der Erythrocyten, ohne daß die Leukocyten allzusehr geschädigt werden. Das Blut wird nach  $\frac{1}{2}$ —1 min lackrot und man gibt nun sofort eine im Vorversuch ermittelte Menge Alkali (NaOH 2%) zur Neutralisation hinzu. Um die restliche Erythrocyten- und Thrombocytensubstanz aufzulösen, kann man  $\frac{1}{10}$  mehr an Alkali nehmen. Es wird nun zentrifugiert, wonach man im Sediment einen dünnen weißen Belag von Leukocyten findet. Dieser wird mit LOCKE-Lösung (0,9% NaCl mit je 0,02% KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>) ausgewaschen. Die Ausbeute an Leukocyten ist höher als bei dem Verfahren nach HEKMA-HAMBURGER. Aus 1 l Blut konnten z. B. 1,05 g Leukocyten, entsprechend 0,44 g Trockenleukocyten, isoliert werden.

Obwohl wir uns streng an die Vorschrift von SZILARD hielten, gelang es uns nicht, einen dünnen weißen Bodensatz von Leukocyten zu gewinnen. Das Sediment enthielt stets reichlich Erythrocytenstroma und Thrombocytensubstanz, die auch bei vermehrter Zugabe von Alkali nicht zur Auflösung kamen. Hierdurch trat eher ein weiterer Leukocytenverlust ein. Durch wiederholtes Waschen des Sedimentes mit physiologischer Kochsalzlösung konnte dieses von anhaftendem Blutfarbstoff etwas gereinigt werden. Ein farbfreies Sediment konnte jedoch auch dann nicht gewonnen werden. Die darin enthaltenen Frischleukocyten waren an sich für Fermentuntersuchungen brauchbar, waren jedoch mengenmäßig zu gering, um stets sichere Ergebnisse zu erzielen.

Auch RICHARD MERTEN und MARIANNE WINSCHUH berichteten in ihrer Arbeit über die l- und d-Dipeptidasen in den Formelementen des menschlichen Blutes, die 1945 erschien, daß sie bei der Isolierung der Leukocyten nach der Methode von SZILARD nur selten genügend Material für Fermentbestimmungen gewinnen konnten.

### Eigene Versuche und Methoden.

Wir beschränkten in der Folge für unsere Fermentversuche einen grundsätzlich anderen Weg, indem wir auf eine strenge Isolierung der Leukocyten verzichteten. Bekanntlich enthalten die Erythrocyten nachweisbar keine Proteinase; jedenfalls wurde bis heute hierüber nichts bekannt. EMIL ABDERHALDEN und H. DEETJEN berichteten 1907 über den Abbau einiger Polypeptide durch die roten Blutkörperchen und Blutplättchen des Pferdeblutes. Die Autoren gewannen die Erythrocyten durch Wattefiltration. Später berichteten E. ABDERHALDEN und W. MANWARING über dieselben Untersuchungen unter Verwendung von Rinderblut. 1945 berichteten R. MERTEN und M. WINSCHUH über Dipeptidasen in den menschlichen Erythrocyten. Von wesentlicher Bedeutung

erschien uns jedoch die Abtrennung des Plasmas. W. GRASSMANN und W. HEYDE konnten im Blutserum eine deutliche Peptidasenwirkung nachweisen. E. ABDERHALDEN hat auf dem Nachweis von spezifischen proteolytischen Abwehrfermenten im Serum seine Abwehrfermentreaktion begründet.

Der Versuch, die Wirksamkeit der Leucozytenfermente unter Verwendung eines Blutzellgemisches einschließlich der Erythrocyten zu prüfen, ist in der Literatur nicht unbekannt. COOK veröffentlichte 1932 in Amerika eine Arbeit über die eiweißspaltenden Leukocytenfermente bei Leukämien, wobei er das Hämoglobin des Blutes als Substrat für die Leukocytenproteasen verwandte.

Als Ausgangsmenge für seine Bestimmungen nahm er 10 cm<sup>3</sup> Blut und weniger. Vor der Verwendung der Blutzellen für den Spaltungsansatz trennte er das Plasma ab und wusch die Zellen wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung, um sie von den letzten Spuren Plasma zu reinigen. Den Ansatz ließ er unter Toluol zur Verhinderung von Mikroorganismenwachstum 5 Tage lang bei 37° im Thermostaten stehen. Nach Abschluß der Bebrütung wurde der Nichteisstickstoff (non-protein-Stickstoff) by acid digestion and nesslerization bestimmt.

Die Arbeit von COOK kam uns erst in die Hände, als wir bereits in ähnlicher Weise wie COOK bei unseren Versuchen vorgegangen waren.

Wir verwandten als Ausgangsblutmenge anfänglich 36 cm<sup>3</sup> Citratblut. Nach Abtrennen des Plasmas wurden die Blutzellen noch zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um sie von dem anhaftenden Plasma zu reinigen. Für die Spaltung wurden ein Hauptversuch und ein Kontrollversuch angesetzt. Im Hauptversuch wurden 0,15 g Handelsgelatine in gelöster Form als Substrat hinzugefügt. Im Kontrollversuch erfolgte kein Substratzusatz, es wurde statt dessen eine entsprechende Menge destilliertes Wasser dazugegeben. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration von pH 7,4 wurde durch m/15 Phosphatpuffer eingestellt. Zur Verhinderung von Mikroorganismenwachstum erfolgte zum Ansatz die Zugabe einiger Tropfen Toluol. Die Bebrütung wurde über 16 Std bei 37° im Thermostaten durchgeführt.

Die Messung der Spaltprodukte geschah titrimetrisch nach der Methode von WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ. Da es sich bei den Titrationsproben um gefärbte Lösungen handelte, mußten diese für die Titration entfärbt werden. Dies geschah auf folgende Weise: Zu der frisch entnommenen Titrationsprobe aus dem Ansatz wurde die 9fache Menge heißen Alkohols hinzugefügt. Hierdurch kam es zu einer raschen und gründlichen Fällung der Eiweißsubstanzen. Später wurde zentrifugiert, wobei die überstehende Flüssigkeit in der Regel noch einen gelblichen Farbton aufwies. Schüttelte man nun die Titrationslösung mit Tierkohle durch und filtrierte sie durch ein mittelhartes Papierfilter, so wurde sie völlig farbfrei. Von der so gewonnenen Lösung wurde ein aliquoter Teil für die Titration verwandt. Die Differenz des Aciditätszuwachses im Haupt- und Kontrollversuch ergab den gesuchten Wert für die enzymatische Spaltung gegenüber Gelatine als Substrat.

Die Methode befriedigte in der genannten Ausführung nicht ganz, da die gewonnenen Werte teilweise innerhalb der Fehlerbreite lagen. Eine Enzymwirkung konnte jedoch auf alle Fälle als gesichert angenommen

werden. Zum Beweis wurden Parallelversuche mit inaktivierten Enzymlösungen, die zur Inaktivierung 2—4 Std bei 57° in den Thermostaten gestellt wurden, durchgeführt. Letztere Enzymlösungen ergaben nie einen sicheren Aziditätszuwachs.

In der Folgezeit konnten wir unsere Methodedahingehend modifizieren, daß einwandfreie Fermentbestimmungen unter Verwendung eines Blutzellgemisches nunmehr durchführbar sind. Wir danken dies insbesondere der freundlichen Unterstützung durch Herrn Prof. BUTENANDT, dem Direktor des hiesigen physiologisch-chemischen Institutes und des Max-Planck-Institutes für Biochemie, sowie dessen Mitarbeiter Herrn Dr. Dr. WEIDEL.

Die methodischen Veränderungen bestanden im wesentlichen darin, daß

1. mengenmäßig größere Proben für die Titration entnommen wurden. Diese Proben wurden wie bisher mit der 9fachen Menge heißen absoluten Alkohols versetzt und nach dem Abkühlen zentrifugiert. Ein Ausschütteln mit Tierkohle und Filtrieren wurde nicht mehr vorgenommen, da anzunehmen ist, daß aromatische Aminosäuren durch die Tierkohle festgehalten werden. Bei aliphatischen Aminosäuren scheint diese Gefahr weniger zu bestehen, wie wir an Hand einer Alaninlösung nachweisen konnten;

2. statt einer n/20 alkoholischen Kalilauge eine n/10 Lauge verwendet wurde, um bei der Titration mit Thymolphthalein als Indicator in der schwach gelben Lösung den Farbumschlag beim Neutralisationspunkt deutlicher erkennen zu können;

3. zum Zwecke der größeren Genauigkeit jeder Titrationswert 3fach bestimmt wurde und hiervon der Mittelwert berechnet;

4. auf eine Kontrollbestimmung ohne Substratzusatz verzichtet wurde, da sich herausgestellt hatte, daß der Eigenproteinabbau wesentlich stärker ins Gewicht fällt als die Hydrolyse der Gelatine. Gelatine wurde jedoch als zusätzliches Substrat für die Spaltung weiterhin hinzugefügt, um auf alle Fälle genügend Substrat im Ansatz zur Verfügung zu haben;

5. an Stelle von Gelatine als Substrat Casein verwandt wurde, das noch leichter spaltbar ist;

6. die Bebrütungszeit im Thermostaten von 16 Std auf 24 Std erhöht wurde.

### Vorläufige Ergebnisse.

Mit dieser Methode haben wir bei Schizophrenen und bei Nichtschizophrenen laufende Untersuchungen angestellt, die weiterhin fortgesetzt werden. Wir möchten absichtlich noch kein endgültiges Resultat formulieren.

Bis jetzt scheint es, daß bei Schizophrenen in der akuten Krankheitsphase eine Verminderung der tryptischen Wirksamkeit der Leukocyten vorliegt, während bei Gesunden eine stärkere Wirksamkeit vorhanden zu sein scheint. Bei remittierten Schizophrenen konnte teilweise ein Anstieg der proteolytischen Wirksamkeit beobachtet werden. Die Leukocytenzahl sowie das Differentialblutbild wurden bei jeder einzelnen Fermentbestimmung mit berücksichtigt. Wir beobachteten Fälle, wo die



Patienten mit akuter Schizophrenie eine weitaus höhere Leukocytenzahl aufwiesen als dem normalen Durchschnittswert entspricht. Trotzdem war die proteolytische Wirksamkeit des Blutes vermindert.

Cook konnte seinerzeit bei seinen Untersuchungen über die proteolytischen Fermente der Leukocyten bei Leukämien beobachten, daß die proteolytische Wirksamkeit der Leukocyten nicht allein von der Leukocytenzahl abhängig war. So fand er auffallend niedrige Werte trotz hoher Leukocytenzahl in Schlußphasen der Erkrankung an lymphatischer Leukämie, bei Fieber, Hämorrhagien und bei Intoxikationen. Auch wir konnten bei Leukämien, die wir vor einiger Zeit in Zusammenarbeit mit der medizinischen Klinik Tübingen untersuchten, feststellen, daß die proteolytische Wirksamkeit der Leukocyten mit der Leukocytenzahl häufig nicht korrespondiert. Die Werte lagen bei Leukämien im allgemeinen höher als bei Normalblut. Gemessen an der Zahl der Leukocyten, die bei einer myeloischen Leukämie in einem Falle z. B. 443400 Zellen betrug, mußte die durchschnittliche proteolytische Wirksamkeit jedoch als wesentlich vermindert angesehen werden.

Welche Bedeutung der qualitativen Veränderung in der proteolytischen Wirksamkeit der Leukocyten bei der Schizophrenie zukommt, ist noch nicht bekannt. Es wäre jedoch denkbar, daß Störungen im intermediären Eiweißstoffwechsel nicht zuletzt hiermit zusammenhängen. Bekanntlich hat GJESSING derartige Störungen bei periodischen Kationen nachweisen können.

### Versuchsteil.

1. Die präparative Gewinnung der Leukocyten: Auf eine strenge Isolierung der Leukocyten aus dem menschlichen Blut wurde mangels geeigneter Methoden verzichtet. Verwendet werden die gesamten Blutzellen nach Abtrennung des Plasmas durch Zentrifugieren. Die Zellen werden anschließend mindestens 2mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Daraufhin wird bis zum ursprünglichen Volumen (20 cm<sup>3</sup>) der zu untersuchenden Blutmenge mit physiologischer Kochsalzlösung wieder aufgefüllt.

2. Versuchsansatz: Der Aufschwemmung der Blutzellen in physiologischer Kochsalzlösung werden 2 cm<sup>3</sup> einer 2,5%igen Caseinlösung als Substrat hinzugefügt. Die optimale Wasserstoffzahl von pH 7,4 wird mit m/15 prim./sec. Phosphatpuffer eingestellt. An Pufferlösung kommt soviel hinzu, bis der Gesamtansatz 30 cm<sup>3</sup> beträgt. Zur Verhinderung von Mikroorganismenwachstum werden einige Tropfen Toluol hinzugefügt. Der Ansatz verbleibt zur Spaltung 24 Std im Thermostaten bei 37°.

3. Bestimmung der Spaltprodukte: Die Bestimmung der Spaltprodukte erfolgt alkalimetrisch in alkoholischer Lösung unter Verwendung von Thymolphthalein als Indicator nach der Methode von WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ. Hierzu werden vor und nach der Spaltung bei 37° im Thermostaten je 15 cm<sup>3</sup> zur Probe aus dem Ansatz entnommen. Zu den einzelnen Probeentnahmen wird die 9fache Menge (135 cm<sup>3</sup>) heißen absoluten Alkohols hinzugefügt, wodurch die Eiweißsubstanzen gefällt werden. Nach dem Abkühlen des Alkohols wird zentrifugiert und die überstehende leicht gelbliche Flüssigkeit in 3 Proben zu je 40 cm<sup>3</sup>

aufgeteilt. Die Proben à 40 cm<sup>3</sup> werden titriert. Als Umschlagspunkt gilt ein gräulicher Farbton, der nach Hinzufügen weiterer Kalilauge rasch dunkler wird. Der Mittelwert von 3 Bestimmungen derselben Probe wird als eigentlicher Titrationswert notiert. Die Differenz der Titrationswerte vor und nach der Spaltung entspricht dem Aciditätszuwachs, ausgedrückt in n/10 verbrauchter alkoholischer Kalilauge.

### Zusammenfassung.

Es wurde über eine Methode zur Bestimmung der proteolytischen Wirksamkeit der Leukocyten, insbesondere des Leukocytentrypsins bei Schizophrenen berichtet. Für den Versuchsansatz werden die gesamten Zellelemente des Blutes einschließlich der Erythrocyten verwandt. Das Blutplasma wird abgetrennt. Die Proteolyse beruht auf Eigenproteinabbau, wozu das Hämoglobin der Erythrocyten in reichem Maße zur Verfügung steht, und auf dem Abbau von Casein, das als weiteres Substrat dem Spaltungsansatz hinzugefügt wird. Die Bestimmung der Eiweißspaltprodukte erfolgt alkalimetrisch nach der Methode von WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ.

Die noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen an Patienten ergaben öfters eine geringere proteolytische Wirksamkeit der Leukocyten bei akuten Schizophrenien, während Gesunde durchschnittlich höhere Werte aufzuweisen schienen; remittierte Schizophrene zeigten manchmal höhere Werte, die von der Norm kaum mehr abwichen. Wir können hier zunächst nur die Probleme aufzeigen; endgültiges läßt sich erst nach Gewinnung größerer Untersuchungsserien sagen.

Über die Bedeutung dieser Fermentschwäche bei manchen akuten Schizophrenien können sichere Angaben noch nicht gemacht werden. Es ist denkbar, daß Störungen im intermediären Eiweißstoffwechsel, wie sie u. a. von GJESSING bei periodischen Katatonien nachgewiesen wurden, mit Störungen im Fermenthaushalt der Leukocyten in Zusammenhang stehen.

### Literatur.

- ABDERHALDEN, E., u. Mitarb.: Z. physik. Chem. **51** (1907); **53**, 280, 294, 309 (1907); **55**, 371, 377 (1908); **75**, 30 (1911). — Fermentforschg S. 2091. — BAMANN, E.: Fermentforschg S. 1410. — BERGMANN, M., u. L. ZERVAS: Z. physik. Chem. **224**, 11, 45 (1934). — COOK, J.: Arch. int. Med. **1932**, 49. — DERNBY, K. G.: J. of Biol. Chem. **35**, 179 (1918). — EDELBACHER, S., E. GOLDSCHMIDT u. V. SCHLAPPI: Z. physik. Chem. **227**, 118 (1933). — FIESSINGER, N.: Les ferments des leukocytes en physiologie, pathologie et thérapeutiques générales (Paris 1923). — GRASSMANN, W., u. Mitarb.: Z. physik. Chem. **167**, 202 (1927); **179**, 41 (1928); **183**, 32 (1929); **186**, 183 (1929); **188**, 69 (1930); **194** (1931). — Fermentforschg S. 1096 u. S. 1107. — HEDIN, S. G., u. Mitarb.: Z. physik. Chem. **32**, 341, 531 (1901); **122**, 307 (1922); **125**, 289 (1923); **207** (1932). — J. of biol. Chem. **54**, 177 (1922). — HUSFELDT, E.: Z. physik. Chem. **194**, 137 (1931). — KRIJGSMANN, B.: Fermentforschg S. 910. — KRAUT, H., u. Ä. WEISCHER: Fermentforschg S. 1163. — LEHNARTZ, E.: Einführung in die chemische Physiologie, Berlin: Springer 1940. — LINDERSTROM, u. LANG: Z. physik. Chem. **173**, 32 (1927); **182**, 151 (1929);

188, 48 (1930). — MOMMSEN, H.: Z. exper. Med. **65**, 19 (1929). — MAYER, K.: Fermentforschg S. 1991. — MANCINI, St.: Biochem. Z. **26**, 140 (1910). — MASCHMANN, E., u. E. HELMERT: Z. physik. Chem. **216**, 141 (1932); **219**, 99 (1932). — MERTEN, R., u. M. WINSCHUH: Fermentforschg **1945**. — MÜLLER, E., u. G. JOCHMANN: Münch. med. Wschr. **29** (1906); **31**, 1507 (1906); **41**, 2002 (1906); **8**, 354 (1907). — MYRBAEK, K.: Fermentforschg S. 2016. — NIES, J. RHODIN (Upsala): Z. physik. Chem. **75**, 197 (1911). — OPIE: Jbid. p. 379; Jbid. **8**, 410 (1906). — OELKERS, H. A.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **161**, 344 (1931). — Klin. Wschr. **10**, 205 (1931). — Untersuchungen über Fermente der Leukocyten **1931**. — PARKER, J. T., and E. FRANKE: J. Metabol. Res. **37**, 345 (1917). — SALKOWSKI: Z. klin. Med. **17** Suppl., 77 (1890). — SCHMITZ, A.: Z. physik. Chem. **250**, 37 (1937); **255**, 234 (1938). — STERN, K. G.: Z. physik. Chem. **198/199** (1931); **204**, 259 (1931). — STOLL, W.: Fermentforschg S. 1329. — SZILARD, P.: Hdb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. 4, T. 4, S. 1475. — TSCHERNORUZKI, M.: Z. physik. Chem. **75**, 216 (1911). — WALDSCHMIDT-LEITZ u. Mitarb.: Z. physik. Chem. **147**, 286 (1925); **167**, 285 (1927); **188**, 17 (1930); **228**, 224 (1934). — WILLSTÄTTER, R., u. Mitarb.: Z. physik. Chem. **153**, 250 (1926); **180**, 127 (1929); **185**, 267 (1929); **186**, 85 (1929); **188**, 69, 107 (1930); **203**, 189 (1931); **208**, 258 (1932); **218**, 77 (1933); **221**, 13 (1933); **229**, 241 (1934); **247**, 115 (1937).

Professor Dr. Dr. G. MALL, (22b) Klingenmüster, Heil- und Pflegeanstalt.  
 Dr. H. BINDER, Göppingen, Privatklinik Christophsbad.  
 Dr. B. GRAETZ, Bristol-Fishponds, Mental Hospital.