

Über die biologische oder klinische Bedeutung einer Amino-peptidasen-Aktivität auf der Hautoberfläche wissen wir noch recht wenig. Ihr Vorkommen dürfte auch für die externe Anwendung von Medikamenten von Interesse sein, die durch solche Enzyme angegriffen werden.

Zusammenfassung. Auf der Hautoberfläche wird das Vorkommen von Material nachgewiesen, das Peptidbindungen spalten kann. Wahrscheinlich handelt es sich um Amino-peptidasen. Die Spaltungsreaktion nimmt in der tieferen Hornschicht zu.

Frau SCHENK danke ich für die Hilfe bei der technischen Ausführung der Arbeiten, Herrn O. SCHULTKA für die makroskopischen Aufnahmen.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Literatur. ^{1a} STEIGLEDER, G. K.: Testmethode auf unspezifischen Esterasen auf der Hautoberfläche. *Klin. Wschr.* **36**, 307–308 (1958). — ^{1b} STEIGLEDER, G. K., u. H. ELSCHNER: Eine neue Methode zum Nachweis von Esterasen auf der Haut. *Klin. Wschr.* **37**, 104–105 (1959). — ² STEIGLEDER, G. K.:

Über den Nachweis der β -Glucuronidase auf der Hautoberfläche. *Klin. Wschr.* **36**, 984–985 (1958). — ³ STEIGLEDER, G. K.: Die Fähigkeit der Hautoberfläche zur Esterspaltung und Esterbildung. III. Mitt. *Arch. klin. exp. Derm.* **209**, 313–326 (1959). — ⁴ STEIGLEDER, G. K., u. W. RAAB: Ribonucleaseaktivität auf der Hautoberfläche. *Klin. Wschr.* **39**, 598–599 (1961). — ⁵ SPIER, H. W., G. PASCHER u. K. MARTIN: Phosphomonoesterasen in der Hautoberfläche. *Dermatologica (Basel)* **111**, 9–13 (1955). — ⁶ PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. Boston: Little, Brown & Comp. 1960. — ⁷ BRAUN-FALCO, O.: Histochemische Amino-peptidase-Darstellung in normaler Haut bei Psoriasis, Dermatitis, Basaliom, spinocellulärem Carcinom und Molluscum sebaceum. *Derm. Wschr.* **134**, 1341–1349 (1956). — ⁸ ADACHI, K., and W. MONTAGNA: Histology and Cytochemistry of human skin XXII. Sites of leucine amino-peptidase. *J. invest. Derm.* **37**, 145–152 (1961). — ⁹ STEIGLEDER, G. K., R. KUDICKE u. Y. KAMEI: Die Lokalisation der Aminosäurepeptidasen-Aktivität in normaler Haut. *Arch. klin. exp. Derm.* (im Druck). — ¹⁰ BALDWIN, A.: *Dynamic aspects of biochemistry*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge Univers. Press 1959. — ¹¹ KIM, Y. P., K. ADACHI and D. COW: Leucine amino-peptidase in candida albicans. *J. invest. Derm.* **38**, 115–116 (1962). — ¹² RÖCKL, H., u. E. MÜLLER: Beitrag zur Lokalisation der Mikroben der Haut. *Arch. klin. exp. Derm.* **209**, 13–29 (1959).

Hexosaminbestimmungen bei experimentellem Lathyrismus*

Von

FRED HARTMANN und KLAUS SEIFERT

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. W. DOERR)

Die generalisierte Mesenchymschädigung bei experimentellem Lathyrismus ist in einer fehlerhaften Zusammensetzung der Grundsubstanz begründet, die Ausdruck einer gestörten Zelltätigkeit sein kann (MENZIES und MILLS 1957; SCHWARTZ 1959; McCALLUM 1961; HARTMANN und SEIFERT 1962). Histochemische und biochemische Untersuchungen (CHURCHILL u. Mitarb. 1955; PYÖRÄLÄ u. Mitarb. 1957; CASTELLANI und CASTELLANI-BISI 1958 u. a.) sowie Isotopenuntersuchungen (KARNOVSKY und KARNOVSKY 1961) weisen auf einen verminderten Gehalt an sauren Mucopolysacchariden in der Knorpelgrundsubstanz hin und machen so eine Störung der Biosynthese der sauren Mucopolysaccharide in den ortständigen Bindegewebszellen durch die Lathyruswirkstoffe wahrscheinlich.

In eigenen Arbeiten zum experimentellen Lathyrismus an jungen Schweinen haben wir colorimetrisch nach einer Methode von BLIX (1948, 1960) den Hexosamingehalt des Rippenknorpels und der Aortenwand im Zusammenhang mit histologischen, histochemischen, fluoreszenzoptischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestimmt (HARTMANN und BLEYL 1962; HARTMANN und SEIFERT 1962; SEIFERT und HARTMANN 1962a und 1962b).

In der vorliegenden Mitteilung möchten wir unsere Ergebnisse der Hexosaminmessungen am Rippenknorpel und an der Aorta von jungen Schweinen vorlegen.

Material und Methode

Rippenknorpel und Ringe aus der Brustaorta von je einem Versuchstier [3 g β -Aminopropionitril (BAPN) täglich für 12 Tage] und einem Kontrolltier (wir arbeiteten mit jungen Hausschweinen, sog. deutsches

Landedelschwein, Tiergewicht 20 und 21 kg) wurden entnommen, gründlich von Perichondrium bzw. Adventitia befreit und bis zur Gewichtsgleichheit im Exsiccator bei 100° C getrocknet. Jeweils 15 mg des grob mechanisch zerkleinerten Gewebes wurden in einem Pyrexröhrchen einer drastischen Hydrolyse durch 6 n HCl für 8 Std bei 100° C unterzogen. Nach der Neutralisation mit 4 n NaOH und Zugabe von alkoholischer Bromthymolblaulösung als Indicator füllten wir das Pyrexröhrchen bis zur Marke 5 ml mit Aqua bidest. auf und entnahmen 2 ml zur weiteren Bestimmung. Der Acetylierung nach Vorschrift und einem Erhitzen im Wasserbad bei 96° C über 40 min folgte nach dem Abkühlen die Colorimetrie im Eppendorf-Photometer bei 546 μ in einer 1,00 cm-Küvette.

Mit Hilfe der beschriebenen Bestimmung legten wir für 50, 100 und 150 γ Glucosamin-6-Phosphat als Substrat eine Eichkurve fest.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Hexosaminbestimmung sind tabellarisch zusammengefaßt (Tabelle 1 und 2). Die durchschnittliche Hexosaminmenge im Knorpel beträgt für das Kontrolltier 806 γ , auf 15 mg Einwaage umgerechnet 2015 γ . Die entsprechenden Werte sind für das Versuchstier 727 γ und für 15 mg Substrat 1877 γ Hexosamin. Diese Hexosaminverminderung läßt sich durch die „Drei- σ -Grenze“ statistisch sichern. Für die Aorta haben wir gleichfalls erniedrigte Extinktionswerte beim Versuchstiergewebe messen können. Die Mittelwerte der Hexosaminmenge in γ zeigen mit 121 für das Versuchstier und 124 für die Kontrolle allerdings nur eine geringe Differenz. Umgerechnet auf 15 mg Aortengewebe ergeben sich 302,5 γ und 310 γ . Diese geringgradige Hexosaminverminderung in der Aortenwand der Versuchstiere reicht für eine statistische Sicherung nicht aus.

* Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Tabelle 1. *Rippenknorpel*
(Hexosaminwerte in γ)

Tabelle 2. *Aortenwand*
(Hexosaminwerte in γ)

Kontrolltier	Versuchstier	Kontrolltier	Versuchstier
733	598	114	108
746	668	116	110
758	706	119	114
771	719	119	118
778	720	122	122
779	726	123	123
794	730	125	127
827	750	132	127
843	762	132	132
844	763	135	132
860	775		
934	807		
Mittelwert: $M_K = 806$	Mittelwert: $M_V = 727$	Mittelwert: $M_K = 124$	Mittelwert: $M_V = 121$
Standard- abweichung $= 57,74$	Standard- abweichung $= 54,31$	Standard- abweichung $= 7,219$	Standard- abweichung $= 8,619$
$3 \times \sigma_{\text{Diff.}} < M_K - M_V$ $68,64 < 79$		$3 \times \sigma_{\text{Diff.}} < M_K - M_V$ $10,66 > 3$	

Erörterung der Befunde

Wachsender Knorpel und die wachsende Aortenwand können nicht ohne weiteres als bradytrophes Gewebe angesehen werden. Die biologische Halbwertszeit der Sulfatgruppen und des Kohlenstoffskeletes der sauren Mucopolysaccharide im Knorpel (Ratte) und in der Aorta (Kaninchen) beträgt im Durchschnitt 10–14 Tage (BOSTRÖM 1952; BOSTRÖM und ODEBLAD 1953; ODEBLAD und BOSTRÖM 1953). Mit zunehmendem Alter des Jungtieres steigt die biologische Halbwertszeit schnell an. Ergebnisse von PONSETI und SHEPARD (1954) weisen nach unserer Auffassung daraufhin, daß dieser Anstieg offenbar im Aortengewebe früher einsetzt und schneller vor sich geht als im Knorpel. Die genannten Autoren fanden, daß bei Ratten zwar noch ein ausgeprägter Osteolathyrismus, jedoch kein schwerer Angio-Lathyrismus mit Aortenrupturen zu erzeugen ist, wenn die Tiere bei Versuchsbeginn älter als 7 Wochen sind. Auch eigene, noch unveröffentlichte Lathyrusversuche an Ratten und Kaninchen bestätigen, daß von einem gewissen Grade des Wachstums an nur noch Skeletveränderungen, jedoch keine schweren, zu Aneurysmata und Rupturen führende Gefäßveränderungen zu erzielen sind. Der Zusammenhang eines frühen Applikationszeitpunktes und des Schädigungsschwerpunktes am Gefäßsystem wird auch aus BAPN-Begiftungen an Hühnchenkeimen 50 Std nach dem Bebrütungsbeginn deutlich. Diese Hühnchenkeime zeigten weitgehende Veränderungen und Zerstörungen des Herz- und Gefäßsystems mit tödlichen Rupturblutungen (GOERTLER und HARTMANN 1961).

Unsere jungen Schweine waren bei Versuchsbeginn über 8 Wochen alt, die Versuchsdauer betrug nur 12 Tage. Wir rechneten somit von vornherein bei stärkeren Knorpelschädigungen nur mit relativ geringen Aortenwandveränderungen, die bei unserem Versuchsansatz als eine Vorbedingung für die gleichzeitige Durchführung elektronenmikroskopischer Untersuchungen auch erwünscht waren. In der Tat fanden wir elektronenmikroskopisch nur an wenigen Stellen eine völlige Zerstörung aller Strukturkomponenten der Aortenwand, konnten dagegen häufig Beginn und Ablauf der Zerstörung, charakterisiert

vor allem durch eine Auflösung der elastischen Lamellen, beobachten. Histologisch waren die Veränderungen der Aortenwand im Vergleich zum Knorpel gering ausgeprägt. Die histochemischen Befunde waren an der Aortenwand im Gegensatz zum Befund am Knorpel uncharakteristisch; zwar erkennt man an Stellen stärkeren Gewebeerfalles mit Mikrodissektionen und sog. Ödempfützten in der Media der Aorta eine mäßig starke Alcianblaufärbung. Hieraus aber auf eine Vermehrung der sauren Mucopolysaccharide in der Aortenwand von lathyrusvergifteten Tieren zu schließen, wie es CHURCHILL u. Mitarb. (1955) und PYÖRÄLÄ u. Mitarb. (1957) getan haben, ist unseres Erachtens in Übereinstimmung mit KARNOVSKY und KARNOVSKY (1961) nicht ganz richtig, da biochemische und Isotopenuntersuchungen eine deutliche Verminderung der Bausteine der sauren Mucopolysaccharide ergeben haben. Wahrscheinlich werden durch den Gewebeerfall anionische Gruppen frei, die Alcianblau binden. Unsere an demselben Material durchgeführten fluoreszenzoptischen Untersuchungen weisen eine elektive Verminderung der sauren Mucopolysaccharide speziell in den Ödempfützten der verbreiterten interlamellären Räume der Lathyrusaorta nach (HARTMANN und BLEYL 1962).

Wir waren bestrebt, in unseren Untersuchungen zu begründen, daß die Lathyrusvergiftungen primär zu einer Verarmung der Grundsubstanz an sauren Mucopolysacchariden führt, und daß sich alle weitergehenden morphologisch erkennbaren Veränderungen als Folgen dieser Grundsubstanzstörung einstellen. Wir sehen die Ursache für die Verminderung des Gehaltes an sauren Mucopolysacchariden in der Intercellularsubstanz in einer Hemmung der Hexosaminsynthese durch das lathyrogene Prinzip. Der Grad der Grundsubstanzveränderungen muß demnach einmal von der Dosierung des lathyrigen Agens und der Dauer eines Versuches, zum anderen von der Umsatzrate der Grundsubstanzbausteine abhängig, d. h. um so höher sein, je größer die Giftmenge und je stärker der Stoffumsatz an sauren Mucopolysacchariden ist. Die hier mitgeteilten Ergebnisse der colorimetrischen Untersuchungen lassen sich sowohl mit dieser Deutung als auch mit den Ergebnissen der licht-, fluoreszenz- und elektronenoptischen sowie histochemischen Untersuchungen vorzüglich zur Deckung bringen. So bestätigen sie, daß es auch in der Aorta beim Lathyrismus nicht nur nicht zu einer Vermehrung von sauren Mucopolysacchariden kommt, sondern zu einer, wenn auch geringgradigen, Verminderung. Unter Berücksichtigung der im Verhältnis zum Tieralter kurzen Versuchsdauer stimmen die am Rippenknorpel gewonnenen Ergebnisse mit den von CASTELLANI und CASTELLANI-BISI gewonnenen überein. Die auch bei der Hexosaminbestimmung deutlichen Unterschiede im Grad der Schädigung von Aorten- und Knorpelgewebe bestätigen das unterschiedlich schnelle Ansteigen der biologischen Halbwertszeit der sauren Mucopolysaccharide in diesen beiden Gewebearten mit der Alterung der Tiere und damit ganz allgemein die Bedeutung der Stoffwechselumsatzrate in der Grundsubstanz für den Grad der lathyrigen Schädigung.

Zusammenfassung. Bei dem durch BAPN erzeugten Osteo-Angio-Lathyrismus an jungen Schweinen

mit relativ kurzer Versuchsdauer wird mit einer colorimetrischen Methode nach BLIX eine deutliche Verminderung des Hexosamingehaltes im Knorpel, jedoch eine nur geringe im Aortengewebe nachgewiesen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit dem Grad der histologischen, histochemischen, fluoreszenzoptischen und elektronenmikroskopischen Veränderungen und stützt die Auffassung von einer Störung der Zusammensetzung der Intercellularsubstanz und ihrer faserigen Differenzierungen, der Skleroproteide, durch eine Hemmung der Synthese der sauren Mucopolysaccharide infolge der BAPN-Applikation.

Literatur. BLIX, G.: The determinations of hexosamines according to ELSON and MORGAN. *Acta chem. scand.* **2**, 467 (1948). — BLIX, G., u. S. GARDELL: Mucopolysaccharide und Glykoproteide. In: *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bausteine des Tierkörpers II*, Bd. IV/1, S. 700. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960. BOSTRÖM, H.: On the metabolism of the sulfate group of chondroitinsulfuric acid. *J. biol. Chem.* **196**, 477 (1952). — BOSTRÖM, H., and B. MANSSON: Exchange of the acetyl group of chondroitinsulfuric acid in slices of cartilage. *Acta chem. scand.* **6**, 1559 (1952). — BOSTRÖM, H., and E. ODEBLAD: The influence of cortison upon the sulphate exchange of chondroitin sulphuric acid. *Ark. Kemi* **6**, 39 (1953). — CASTELLANI, A. A., and C. CASTELLANI-BISI: Decrease in hexosamine content of epiphyseal plates in experimental lathyrism. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **98**, 318 (1958). — CHURCHILL, D. W., S. GELFANT, J. J. LALICH and D. M.

ANGEVINE: Alterations in polysaccharides and elastic fibres in the aortas of rats fed toxic lathyrus factor. *Lab. Invest.* **4**, 1 (1955). — GOERTTLER, KL., u. F. HARTMANN: Histopathologische Befunde am Hühnerkeim nach Applikation von β -Aminopropionitril (BAPN; Lathyrusfaktor). *Klin. Wschr.* **39**, 1077 (1961). — HARTMANN, F., u. U. BLEYL: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lathyruswirkung an der Aorta des Hausschweines. *Beitr. path. Anat.* **126**, 49 (1962). HARTMANN, F., u. K. SEIFERT: Experimenteller Lathyrismus. Modell einer generalisierenden Mesenchymschädigung. (In Vorbereitung.) — KARNOVSKY, M. J., and M. I. KARNOVSKY: Metabolic effects of lathyrogenic agents on cartilage in vivo and in vitro. *J. exp. Med.* **113**, 381 (1961). — MENZIES, D. W., and K. W. MILLS: The aortic and skeletal lesions of lathyrism in rats on a diet of sweet pea. *J. Path. Bact.* **73**, 223 (1957). — ODEBLAD, E., and H. BOSTRÖM: A quantitative autoradiographic study on the uptake of labelled sulphate in the aorta of the rabbit. *Acta chem. scand.* **7**, 233 (1953). — PONSETI, I. V., and R. S. SHEPARD: Lesions of the skeleton and other mesodermal tissues in rats fed sweet pea (*Lathyrus odoratus*) seeds. *J. Bone Jt Surg.* **36 A**, 1031 (1954). — PYÖRÄLÄ, K., S. PUNSAAR, T. SEPPÄLÄ and K. KARLSSON: Mucopolysaccharides of the aorta and epiphyseal cartilage in lathyrus growing rats and rat fetuses. *Acta path. microbiol. scand.* **41**, 497 (1957). — SCHWARTZ, C. J.: The nature of the substance changes in experimental lathyrism and their effect on atherogenesis in cholesterol fed rabbits. *Brit. J. exp. Path.* **40**, 44 (1959). — SEIFERT, K., u. F. HARTMANN: Lathyrismus beim Schwein. Jahrestag der Nord- und Westdeutschen Pathologen, Bremen 1961. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **103**, 566 (1962); — Die Feinstruktur der Schweineaorta beim experimentellen Lathyrismus. (In Vorbereitung.)

Über den Einfluß vegetativ wirksamer Pharmaka auf die Folgen der Injektion von Thiopental in die Arteria femoralis der Ratte

Von

K. H. WEIS und F. FISCHER

Aus dem Institut für Anaesthesiologie (Direktor: Prof. Dr. R. FREY) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einleitung

Die Ursachen der Schädigung nach intraarterieller Injektion von Thiopental wurden bisher unterschiedlich erklärt (BURN u. RAND, BURN u. HOBBS, BURN u. MACDOUGAL, KINMONTH u. SHEPHERD, WILLIAMS u. MONTGOMERY, BÖHMER u. RÜGHEIMER, MEYER u. THEOBALD). Aus Ergebnissen von Versuchen mit Reserpin-Vorbehandlung folgerten BURN u. Mitarb., daß der Freisetzung von Noradrenalin aus den Gefäßwänden durch intraarteriell injiziertes Thiopental und einem dadurch ausgelösten Gefäßspasmus besondere Bedeutung zukomme. Diese Auffassung ließ sich auf Grund eigener Untersuchungen nach entsprechender Reserpin-Vorbehandlung und Injektion von Thiopental sowie anderen intravenösen Narkosemitteln in die Femoralarterie bei der Ratte nicht bestätigen [WEIS u. FISCHER (a), (b)].

Reserpin bewirkt über die Entleerung der peripheren Noradrenalin-Depots eine weitgehende Ausschaltung des Sympathicus. Es wurde deshalb in vorliegender Arbeit der Einfluß auf das sympathische und parasympathische System wirkender Pharmaka auf die Folgen einer intraarteriellen Injektion von Thiopental untersucht.

Methodik

Die Untersuchungen wurden an 150 Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 200 und 320 g durchgeführt. Die Tiere wurden unter gleichen Stallbedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Die Femoralarterie eines Beines wurde in Äthernarkose dargestellt und mit einem Faden angeschlossen. Die Arterie wurde mit einer Kanüle Nr. 20 unterhalb des Lig. inguinale

punktiert und 25 mg Thiopental/kg Gewicht in einer 2,5%igen Lösung in Richtung des Blutstromes injiziert.

Auf eine Kontrolle durch Injektion physiologischer Kochsalzlösung in die Femoralarterie des kontralateralen Beines konnte auf Grund der Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen verzichtet werden. Nach der Injektion wurde die Arterie zur Erreichung sicherer Blutstillung vorübergehend mit dem vorher gelegten Faden gedrosselt. Danach wurde die Haut vernäht.

Die Folgen der intraarteriellen Thiopental-Injektion äußerten sich in einer motorischen Funktionsschädigung und Schwellung des Beines. Die Funktionsschädigung wurde wie folgt bewertet: Fehlendes Spreizen der Zehen bei erhaltener Dorsal- und Plantarflexion = Wert 1, völlig schlaffe Lähmung der Pfote = Wert 2, nicht veränderte Funktion = Wert 0.

Der Beinumfang wurde oberhalb des Kniegelenkes gemessen und die Änderung gegenüber dem nicht behandelten Hinterlauf in Prozenten errechnet.

Aus den Ergebnissen an Tieren einer Gruppe (in der Regel 10) wurden der Mittelwert \bar{x} und der mittlere Fehler des Mittelwertes $s\bar{x}$ bestimmt. Für den Vergleich der Mittelwerte verschiedener Gruppen wurde t nach dem Student-Test errechnet.

Die Registrierungen erfolgten erstmals 4, dann alle 24 Std nach der Thiopental-Injektion und wurden 7 Tage lang durchgeführt. Es wurde der Einfluß folgender Substanzen auf die Folgen der intraarteriellen Injektion von Thiopental untersucht:

1. Reserpin (Serpasil, Ciba); 0,5 mg/kg Gewicht intra-peritoneal an 2 der intraarteriellen Injektion vorausgegangenen Tagen.

2. Guanethidin (Ismelin, Ciba); 15 mg/kg Gewicht intra-peritoneal an 2 der intraarteriellen Injektion vorausgegangenen Tagen.

3. Chlorisondamin (Ecolid, Ciba); 5 mg/kg Gewicht intra-peritoneal; a) einmalig 1 Std vor der intraarteriellen Injektion; b) wie a) sowie 8stündlich 5mal nach der intraarteriellen Injektion.