

Eine einfache Methode der Diastasebestimmung
des Blutes u. ihre klinisch-physiol. Bedeutung

Prof. Dr. H. Löhr

 Springer

ISBN 978-3-662-27349-4 ISBN 978-3-662-28836-8 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-28836-8

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Kiel)
[Direktor: Prof. Dr. H. Löhr].

Eine einfache Methode der Diastasebestimmung des Blutes u. ihre klinisch-physiol. Bedeutung.

Dissertation von Fr. Erlemann.

I. Mitteilung.

Über eine einfache Diastasebestimmung im Blut.

In der sehr ausgedehnten Literatur über Blutdiastasebestimmungen finden sich die divergentesten Ergebnisse. Das hat offenbar darin seinen Grund, daß die methodischen Schwierigkeiten noch nicht überwunden sind. KUHN hat im Handbuch der Fermente einmal gesagt, daß die Blutdiastasewerte solange unbefriedigend und unbrauchbar seien, bis man dazu übergegangen sei, sämtliche Ansätze im optimalen Reaktionsmilieu der Diastase in gepufferten Systemen anzusetzen. Die bisher in der Literatur festgelegten Zahlen für Blutdiastase bestätigen die Ansicht KUHNs.

Daß Diastase im Blut vorkommt, ist seit MAGENDIE (1846) bekannt. Im Blut von Neugeborenen und Tierfeten konnte BIAL¹ nur Spuren von Diastase feststellen. NOBÉCOURT und SEVIN² fanden bei kleinen Kindern geringe Menge Diastase, während sie im ersten Monat fast ganz fehlte. Ob Beziehungen zwischen dem Diastasegehalt des Blutes und der Ernährungsform bestehen, ist nach Untersuchungen verschiedener Autoren ungewiß (MACLEOD, WOHLGEMUTH³ und NOGUCHI⁴ beim Hund).

Nach Angaben von MOECKEL und WOHLGEMUTH hat das Blut im Körper überall denselben Diastasegehalt, so daß wir Blut ganz gleich welchen Punktionsortes zum Versuch benutzen können.

Überblickt man die große Literatur über Blutdiastase beim Gesunden und bei verschiedenen Krankheiten (s. u.), so stellt man eine völlige Regellosigkeit der Ergebnisse fest. Man geht wohl nicht fehl in der Annahme, daß die Unterschiede der einzelnen Autoren auf die abweichenden und in sich ungenauen Bestimmungsmethoden zurückzuführen sind. Bei KATSCH⁵ lagen die Normalwerte zwischen 120—220 mg% (= Reduktionszuwachs berechnet als Glucose in 2 Stunden Reaktionszeit). Er zieht die Normalgrenze weiter als OTTENSTEIN, der für seine Versuche 130—170 mg% angibt. Bei SCHULER, DREIER und JONAS⁶ ergeben sich Diastasenüchternwerte zwischen 50 und 406 mg% und zeigen beim gleichen Individuum von Tag zu Tag erhebliche Schwankungen. BRINK⁷ gibt 120 bis 220 mg%, SCHNEIDER und ZAHN⁸ 135 mg% und BALTZER⁹ 200 bis 300 mg%, bei Eigenreduktionswert des Glykogens von 110 bis 125 mg%, als Normalwert an.

Vielleicht mußten sich diese Unterschiede ergeben, weil bei den ganzen Arbeiten über Diastasebestimmung des Blutes eines immer unberücksichtigt gelassen war, nämlich die Garantierung eines bestimmten p_H -Wertes durch einen geeigneten Puffer, und unzureichende Ausgleichsaktivierung des Fermentes durch NaCl, denn die Diastasewirkung wird vielleicht noch mehr als die anderer Fermente beeinflußt von allen möglichen Faktoren, wie Anwesenheit von Elektrolyten, vor allem NaCl und nach SHERMAN¹⁰ vor allem vom p_H . Jede der verschiedenen Amylasen besitzt ein engumgrenztes p_H -Reaktionsoptimum. Das Wirkungsoptimum der Blutdiastase liegt nach ENGELHARDT und GERTSCHUK¹¹ zwischen p_H 6,3—6,8, SCHAEFFER¹² gibt 6,7, SHERMAN¹⁰ und WILLSTÄTTER¹³ 6,8 als Optimum an.

Die bekanntesten Methoden der Blutdiastasebestimmung sind die von WOHLGEMUTH¹⁴, URBAN OLSSON¹⁵ und LINDNER-SOLLIED¹⁶ angegebenen. Diese Methoden haben nur praktischen Zweck, da sie nur einen Teilprozeß der Diastasewirkung, und noch nicht einmal den wichtigsten, die Depolymerisation, erfassen.

Weiter sind zu nennen die Methoden, die auf der Bestimmung der Reduktionsänderung der Fermentansätze beruhen; sie ermitteln quantitativ nach einem der üblichen Verfahren der Zuckerbestimmung die unter bestimmten Bedingungen aus der Stärke oder Glykogen entstandenen reduzierenden Abbauprodukte. Von den vielen Modifikationen sollen hier nur zwei Verfahren als Typen herausgegriffen und etwas ausführlicher erläutert werden: zunächst das Verfahren der Diastasebestimmung von OTTENSTEIN, das KATSCH für seine Versuche anwandte. Ein kleines Quantum Blut wird in 0,3proz. Glykogenlösung aufgefangen und 2 Stunden im Thermostaten gehalten. Die Diastase spaltet aus dem Glykogen in dieser Zeit Glucose ab. Der Glucosegehalt wird nach Enteiweißung bestimmt. Diesen gefundenen Glucosewert zieht man von dem vorher bestimmten Nüchternblutzucker sowie dem Eigenreduktionswert der Glykogenlösung ab, und hat so ein vergleichbares Maß für die diastatische Kraft verschiedener Blutproben.

Auf die Fehlerquellen der Methode, die durch die gewaltige Streuung der Normalwerte auffällt (Normalschwankungsbreite 105 mg%), haben BALTZER und BRINK¹⁷ hingewiesen und die Einflüsse der Temperatur, der Verdünnung, der Elektrolyte und der Filtration auf den Glykogenleerwert festgestellt.

Eine Mikromethode der Amylasebestimmung unter Verwendung von Stärke als Substrat geben ENGELHARDT und GERTSCHUK (l. c.) an. Sie nehmen 0,06 ccm Blut + 3 ccm Aqua dest. und setzen nach der Hämolyse 3 ccm Puffer hinzu. Als Pufferlösung verwenden sie $n/_{15}$ - KH_2PO_4 mit NaCl, enthaltend 9,078 g KH_2PO_4 mit 4,5 g NaCl im Liter, und $n/_{15}$ - Na_2HPO_4 , enthaltend 11,876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ im Liter, im Verhältnis ein Teil Natriumphosphat und 2 Teile Kaliumphosphat. Diesem Gemisch entnehmen sie 2 ccm und versetzen es mit 1 ccm einer 0,3proz. Stärkelösung und als Antisepticum einem Tropfen Toluol, verkorken es und stellen die Versuchsproben 2 Stunden in den Thermostaten von 37°.

Das Verfahren von OTTENSTEIN, auch in der Modifikation von BALTZER sieht keine Pufferung vor. Das ist ein grundsätzlicher Mangel (KUHN). Daneben bleibt der hohe Reduktionswert der Glykogenlösung unverständlich, den wir nach unseren umfangreichen Untersuchungsergebnissen mit Glykogen-Diastase-Ansätzen nicht bestätigen können.

Im Verfahren von ENGELHARDT und GERTSCHUK, das wir erst nach Beendigung unserer Untersuchungen auffanden, ist Stärke als Substrat gewählt. Vergleichsbestimmungen zwischen Diastaseansätzen mit Glykogen und Stärke, die wir im Rahmen anderer Untersuchungen anstellten, ließen beide Substrate für die Diastase gleichwertig erscheinen. Bemerkenswert und bedeutungsvoll ist der NaCl-Zusatz zu den Ansätzen, da NaCl die Diastase stark aktiviert.

Eigene Untersuchungen.

Es ist für die Klinik an der Zeit, endlich einmal eine brauchbare und wissenschaftlich fundierte, in ihren Werten reproduzierbare Blutdiastasebestimmung zu finden. Ansätze hierzu sind in der Einleitung schon namhaft gemacht. Besonders das von ENGELHARDT und GERTSCHUK angegebene Verfahren, das uns nach Fertigstellung unserer Versuche bekannt wurde, scheint der Forderung nach einer vernünftigen Blutdiastasebestimmung am nächsten zu kommen. Ein Nachteil der Methode ist, daß mit viel zu geringen Blutmengen pro Ansatz gearbeitet wird, und daß die Reaktionszeit mit 2 Stunden nach unseren Erfahrungen zu kurz gewählt ist. Außerdem ist nicht verständlich, warum die Verff. mit hämolysiertem Blut arbeiten. Indes läßt sich über den Wert der Methode noch nichts Endgültiges sagen, da die Verfasser bisher Zahlenmaterial noch nicht veröffentlicht haben.

Richtungsgebend für den Ausbau unserer Methode waren folgende Grundsätze:

1. Vereinfachte Blutentnahme.
2. Gleichbleibende Pufferung.
3. Geeignete Substratkonzentration.
4. Einwandfreie Analytik des Fermenteffektes.

ad 1. Die einfachste und einwandfreieste Gewinnung *genügend großer* Mengen Blut ist die bei der Blutsenkungsreaktion angewandte. Da wir von vornherein die Konstruktion einer Mikromethodik der Amylasebestimmung ablehnten, war dies für uns das geeignete, für den Patienten schonendste Verfahren, das bei entsprechender Handhabung auch noch die beste Gewähr für steriles Arbeiten gibt.

Wir entnahmen also stets bei nüchternen Patienten in einer 2-ccm-Spritze, in die 0,4 ccm sterile 3,8proz. Natriumcitricumlösung oder 0,4 ccm sterile 1,5proz. Natriumfluoridlösung (Motivierung s. u.) aufgezogen war, 1,6 ccm leicht gestautes Venenblut. Die durch Umschwenken in der Spritze ungerinnbar gemachte Blutmischung wurde dann in ein steriles Wassermann-Röhrchen gespritzt. Von diesem Gemisch wurden dann 1,2 ccm, entsprechend 1 ccm Nativblut, zur Fermentreaktion gebraucht.

ad 2. Das optimale p_H für Blutdiastase liegt wie oben angegeben bei p_H 6,8. Die gleiche Mischung $n/15$ KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 entspricht praktisch dieser Forderung. Wir setzten deshalb zum Ansatz 1,8 ccm der sterilen Pufferlösung hinzu und überzeugten uns davon, daß in den von uns gebrauchten

Reaktionszeiten und unter Berücksichtigung der sonstigen Reagenszusätze die Pufferungskapazität ausreichend war.

ad 3. Verschiedene Verfahren der Blutdiastasebestimmung arbeiten mit Glykogen als Substrat (s. oben), andere mit pflanzlicher Stärke. In ausgedehnten Untersuchungen von CHROMETZKA und BRUNSEN gelegentlich der chemischen Aufarbeitung eines Falles von Glykogenspeicherkrankheit wurde festgestellt, daß die Gewebs- und Blutdiastase des menschlichen Organismus bei entsprechender Pufferung und Aktivierung der Diastase ein gleich gutes Fermentsubstrat in der Stärke wie in dem Glykogen besitzt. Ja, es zeigte sich sogar eine gewisse Überlegenheit der Diastasewirkung auf Stärke in quantitativer Beziehung bei sonst völlig gleichem Reaktionsablauf. Man verfährt also nicht unphysiologisch, wenn man der Blutdiastase Stärke als Substrat anbietet, hat vielmehr noch einen ökonomischen Vorteil, der bei Reihenuntersuchung nicht außer acht zu lassen ist.

Mehr als das bisher beachtet wurde, haben wir die Stärkekonzentration möglichst hoch gewählt, um den Reaktionsablauf optimal zu gestalten. Wir verwandten deshalb 1proz. statt der sonst bei Blutdiastase geläufigen 1prom. Stärke. Außerdem haben wir die Stärke in physiol. Kochsalzlösung kolloidal gelöst, so daß wir durch das Kochsalzstärke-substrat gleichzeitig die NaCl-Ausgleichsaktivierung für die diastatische Wirkung erzielten. In entsprechenden Versuchsreihen haben wir uns immer wieder davon überzeugt, daß die Kochsalzstärke-lösung in dem Zeitpunkt ihrer Verwendung steril war. — Zu dem einzelnen Ansatz wurde 5 ccm dieses hochkonzentrierten Substrates zugesetzt. Nach Zufügung einiger Tropfen Toluol und genügender Durchmischung des Fermentansatzes wurden die Gläser für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

ad 4. Die Aufarbeitung der Fermentansätze nach WOHLGEMUTH im Sinne der Restsubstratbestimmung haben wir trotz ihrer Einfachheit und klinischen Verwendbarkeit abgelehnt, weil das Verfahren zu ungenau ist, und die Ablesung viele subjektive Fehlerquellen in die Methode hineinbringt; außerdem erfährt die Diastasebestimmung unter Zugrundelegung der Jodstärkereaktion nur einen Teil der diastatischen Wirkung, die Depolymerisierung des Stärkemoleküls zu undefinierten Spaltprodukten. Wir haben deswegen grundsätzlich in allen unseren Ansätzen die Bestimmung der reduzierenden Reaktionsprodukte, die im Verlauf der Diastasewirkung auftreten, vorgenommen. Die Summe der reduzierenden Substanzen wurde nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt und als Glucose berechnet. Um die optimale Wirkungszeit der Diastase in den wie oben beschriebenen Ansätzen festzustellen, wurde nach 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden nach vorhergehendem gutem Durchmischen des Ansatzes die Analysenprobe entnommen, und zwar ganz in der Weise, wie HAGEDORN-JENSEN es für ihre Blutzuckerbestimmung vorsehen.

Nach Darlegung dieser prinzipiell wichtigen Bausteine der Blutdiastasebestimmungsmethode untersuchten wir 1. den zeitlichen Ablauf der Reaktion, 2. den Einfluß der Glykolyse auf die diastatische Wirkung und 3. die Reproduzierbarkeit der Werte.

1. Der zeitliche Ablauf der Fermentreaktion.

KATSCH, OTTENSTEIN und die meisten anderen Autoren, die sich mit Diastaseanalysen beschäftigen, beschränken die Reaktionszeit der Diastase auf wenige Stunden. Das hat einmal seine praktische Bedeutung, um das Analyseergebnis rasch in die Hand zu bekommen, weiter sichert es am besten gegen bakterielle Störungsreaktionen und vielleicht auch gegen komplizierende glykolytische Wirkungen, was bei Verwendung der Reaktionsprodukte als Diastasetest auch nach unseren Erfahrungen Bedeutung haben kann. Gleichwohl haben wir, schon deswegen, weil langdauernde Blutdiastaseuntersuchungen noch nicht vorlagen, den Reaktionsablauf der Diastasewirkung im Blut bis zu 24 Stunden beobachtet. Wir entnahmen während des Fermentablaufes zu bestimmten Zeiten, nämlich nach 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden, Analysenproben aus dem Reaktionsgemisch, um den zu diesen Zeitpunkten erreichten Stärkeabbauwert im Ansatz zu erfassen und durch Vergleich der Werte die Reaktionszeitkurve aufzunehmen. Wir hofften, dabei Differenzen in der diastatischen Kraft der einzelnen Blutproben auch dann noch aufdecken zu können, wenn die Anfangswerte der Diastasewirkung überhaupt keine oder nur kleine Unterschiede aufzeigen sollten.

Auf diese Weise haben wir bei unserem ganzen zur Untersuchung gelangten Krankenmaterial pro Ansatz 5 Diastasewerte gewonnen, d. h. den Diastasewert nach 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden, und so auch die Möglichkeit, den Zuwachswert der Diastasewirkung in bestimmten Zeiträumen zu berechnen, genug Werte, um Wirkungsdifferenzen des Blutes verschiedener Provenienz herauszufinden, wenn solche überhaupt vorhanden waren.

Überblickt man die erhaltenen Reaktionszeitkurven aller unserer Blutproben von Patienten verschiedenster Erkrankung, so fällt die Gleichförmigkeit der Kurvenführung auf. Die einzelne Kurve hat fast linearen Verlauf, die Abweichungen im Sinne der Parabel dabei waren, wie wir uns überzeugt haben, ohne Bedeutung. Man kann aber aus den Kurven eine krankheitsbedingte Gesetzmäßigkeit des Verlaufs nicht ohne weiteres feststellen.

Die Analyse der Diastasestundenwerte der klinisch zugeordneten Fälle ergab in den einzelnen Reaktionszeitabschnitten zwar gute Übereinstimmungen, doch war die Streuung der Werte bei Benutzung kleinerer Reaktionszeitabschnitte zu groß, als daß sie sich zur Berechnung der Diastasewerte, zur Aufstellung einer *Diastasenorm* und zur Festlegung bestimmter Abweichungen bei bestimmten Krankheitsgruppen verwenden

ließen. Nach umfangreichen Berechnungen gelangten wir schließlich zu der Einsicht, daß der *diastatische Reaktionswert der ersten 12 Stunden den einwandfreiesten Diastasebezugswert* abgibt. Offenbar gleichen sich bis dahin alle möglichen, zum größten Teil unbekannt, Hemmungs- oder Aktivierungsfaktoren soweit aus, daß nach 12 Stunden in allen Blutproben, ob normal oder pathologisch, die optimale Diastasewirkung eingetreten ist.

Ehe wir das an Zahlen demonstrieren, ist es notwendig, daß wir die *Errechnung des Diastasewertes* erläutern:

Wie oben mitgeteilt, setzt sich der Blutdiastaseansatz folgendermaßen zusammen:

1,2 ccm Blutcitratgemisch (entspr. 1 ccm Blut) + 1,8 ccm Puffer [p_H 6.813] + 5 ccm 1 proz. Stärkelösung in physiol. NaCl-Lösung.

Da wir bei der jeweiligen Entnahme zur Bestimmung der reduzierenden Substanzen nach HAGEDORN-JENSEN 0,1 ccm aus dem Ansatz entnehmen und nach der Tabelle von HAGEDORN-JENSEN auf 100 ccm Analysenflüssigkeit umrechnen, *bestimmen wir jeweils die diastatische Kraft von 12,5 ccm Blut*. Die Zahl, die diese diastatische Wirkung zum Ausdruck bringt, ist weiter nichts als der nach HAGEDORN-JENSEN analysierte Reduktionszuwachs, ausgedrückt als Milligramm Glucose.

Beispiel: Normalblut, in der oben angegebenen Form mit Stärke in Ansatz gebracht, hat einen Ausgangsreduktionswert von 0,031 g %. Der Reduktionswert nach 12 Stunden ist 0,119 g %. $119 - 31 = 88$ mg reduzierende Substanz ist durch 12,5 ccm Blut aus der angebotenen Stärke gebildet. Der Diastasewert dieses Blutes ist, so sagen wir jetzt, 88, und bringen es auf die kurze Formel $\Delta_B^{37^\circ}_{12h} = 88$.

Die Umrechnung auf Vergleichszahlen anderer Untersucher, die unter ähnlichen Versuchsbedingungen arbeiten wie wir, ist insofern einfach, als unser Blutdiastasewert nur mit 8 multipliziert werden braucht, um auf den diastatischen Wirkungswert von 100 ccm Blut zu kommen.

Der *Blutdiastasewert normaler Menschen*, die außerdem frei von maßgebenden vegetativen Stigmata sind, *ist nach dieser Citratblutmethode 70—90* (Milligramm Glucosezuwachs durch 12,5 ccm Blut bei 12stündiger Reaktionszeit).

2. Einfluß der Glykolyse auf die diastatische Wirkung.

Wir waren uns von vornherein darüber klar, daß die von uns aufgenommenen Diastasekurven nicht der Diastasewirkung allein ihr Zustandekommen verdanken. Wenn wir von anderen, sicherlich wenig bedeutungsvollen, Störungsfaktoren absehen, wird wahrscheinlich die *glykolytische* Wirkung des Blutes den Kurvenverlauf am stärksten beeindrucken. Wir haben deswegen diese Störungskomponente bei den Diastasebestimmungen auszuschalten versucht, indem wir Natriumfluorid zu den Fermentansätzen zufügten. Es ist längst bekannt, daß Natriumfluorid die Glykolyse maßgeblich hemmt, ohne die Diastasewirkung zu stören. Aus diesem Grunde

haben wir alle Blutdiastaseansätze gleichzeitig mit Citrat- und Fluoridblut durchgeführt. Während uns beim Citrat eine 3,8proz. Lösung zur Ungerinnbarmachung des Blutes diente, benutzten wir für Fluoridansätze eine sterile 1,5proz. Natriumfluoridlösung, die sich nach den Untersuchungen von CHROMETZKA und MARTINS für ihre Fluoridsenkungsreaktion als gerinnungshemmende Fluoridkonzentration bewährt hat. (Doktordissertation 1937, MARTINS.) Im übrigen war der Fluoridblutdiastaseansatz bezüglich Menge des Blutes, Puffer und Stärkezusatz genau der gleiche wie in dem oben beschriebenen Citratblutdiastaseansatz. Der Vergleich der Diastasewirkung bei Verwendung von Fluorid statt Citrat zeigt nun, daß in allen Fällen, normalen wie pathologischen, der Fluoriddiastasewert des Blutes höher liegt als der zeitlich zugeordnete Citratblutdiastasewert. Eine Ausnahme von dieser Regel machen einzig und allein nur die meisten Fluoridblutansätze der Diabetiker, ein Nebenbefund, der sich mit den Angaben der Literatur deckt, daß die glykolytische Wirkung im Diabetikerblut ganz wesentlich herabgesetzt ist. Die Annäherung der Citrat- und Fluoriddiastasewerte beim Diabetikerblut kommt also dadurch zustande, daß der Citratblutdiastasewert für sich schon keine glykolytische Depression aufweist.

Zur Veranschaulichung der Fluoridwirkung in den Diastaseansätzen bringen wir in Tab. 1 aus unserem umfangreichen Zahlenmaterial Vergleichszahlen der Citrat- und Fluoridansätze.

Tabelle 1.

	Ausgangswert	3 Std.	6 Std.	9 Std.	12 Std.	24 Std.
g% Glucose als Ausdruck des Reduktions-Wertes						
Pat. R. normal.						
Citratblut	0,029	0,059	0,079	0,093	0,109	0,213
Fluoridblut	0,029	0,061	0,083	0,115	0,119	0,232
Pat. B. Diabetes.						
Citratblut	0,057	0,095	0,134	0,148	0,155	0,264
Fluoridblut	0,055	0,090	0,131	0,152	0,172	0,257
Pat. H. Vegetative Neurose.						
Citratblut	0,034	0,074	0,115	0,148	0,155	0,264
Fluoridblut	0,034	0,075	0,127	0,162	0,179	0,276
Pat. K. Ikterus.						
Citratblut	0,047	0,084	0,122	0,145	0,179	0,262
Fluoridblut	0,050	0,088	0,143	0,170	0,204	0,280
Pat. K. Tetanie.						
Citratblut	0,039	0,081	0,104	0,134	0,148	0,253
Fluoridblut	0,034	0,084	0,110	0,150	0,166	0,268
Pat. H. Tuberkulose.						
Citratblut	0,043	0,077	0,090	0,113	0,136	0,228
Fluoridblut	0,039	0,084	0,102	0,139	0,161	0,261

Es zeigte sich nun bei der Berechnung der Blutdiastasewerte in den einzelnen Beobachtungsperioden und insbesondere in der für die Blutdiastase wichtigen 12-Stundenperiode, daß bei Fluoridzusatz nicht nur die Diastasewerte als solche gegenüber den Citratwerten erhöht sind, sondern daß bei Verwendung von Fluoridblut auch *die Streuungsbreite der 12-Stundenwerte des Normalblutes wesentlich kleiner* ist. Während nämlich der 12-Stunden-Blutdiastasewert des Citrat-Normalblutes 70—90 ausmacht, ist der entsprechende *Fluoridwert 90—98* (Tab. 2).

Tabelle 2. Normalpatienten.

$\Delta_{12h}^{37^\circ}$	
Citratblut	Fluoridblut
88	92
88	99
83	93
90	98
83	94
77	96
70	90
80	90
Streuung: 70—90	90—98

Das praktische Ergebnis dieser Ansätze mit Natriumfluorid als gerinnungshemmendes Mittel ist also das, daß die Normalbezugswerte des 12-Stundenwertes wesentlich eindeutiger und engumgrenzter sind als bei Verwendung des Citrates zum Ansatz.

Damit ist der letzte wesentliche Faktor zum Ausbau der Blutdiastasebestimmungsmethode, nämlich die Verwendung von Fluorid zu den Blutdiastaseanalysen, erklärt.

Die *Methode* gewinnt damit folgende endgültige Fassung:

Beim nüchternen Patienten entnimmt man mit einer 2-ccm-Spritze, in die 0,4 ccm sterile 1,5proz. Natriumfluoridlösung aufgezogen war, 1,6 ccm leicht gestauten Venenblut. Nach Umschwenken in der Spritze wird dieses Blutgemisch in ein steriles Wassermann-Röhrchen gespritzt. Von dieser Mischung wird mit der Pipette 1,2 ccm entnommen und in das Ansatzglas, wir benutzen hierzu Reagensgläser, zusammen mit 1,8 ccm $n/_{15}$ -Phosphat-Pufferlösung p_H 6,8 und 5 ccm steriler 1proz. Stärkelösung, gelöst in physiol. NaCl-Lösung, getan. Dann werden als Antisepticum mehrere Tropfen Toluol hinzugefügt, gut durchgemischt und nach HAGEDORN-JENSEN der Ausgangswert bestimmt. Die verkorkten Ansatzröhrchen werden dann in den Brutschrank gestellt und nach 12 Stunden die Reduktionswerte bestimmt. Zu beachten ist die Sterilität von Lösungen und Röhrchen, ferner die p_H -Konstanz der Pufferlösung.

3. Reproduzierbarkeit der Werte.

Am unbefriedigendsten bei fast allen bisher angegebenen Blutdiastasemethoden ist die enorme Streuung der Normalwerte und die großen Schwankungen derselben bei dem glei-

chen Patienten, kurzum die schlechte Reproduzierbarkeit der Werte überhaupt. Das ist bei der von uns angegebenen Methode grundsätzlich anders: Doppelbestimmungen bei ein und demselben Individuum am gleichen Tag zeigen ebenso wie Doppelbestimmungen an sehr weit auseinandergelegenen Zeitpunkten größte Übereinstimmung. Aus unserem Material seien einige Werte in der Tab. 3 wiedergegeben.

Tabelle 3.

Name	Diagnose	Datum	$\triangle_{12h}^{37^\circ}$		Datum	$\triangle_{12h}^{37^\circ}$	
			Citratwert	Fluoridwert		Citratwert	Fluoridwert
L.	Normal	15. III.	70	90	9. IV.	72	89
R.	Normal	15. III.	80	90	9. IV.	79	93
E.	Normal	15. III.	88	99	9. IV.	92	96
S.	Diabetes	21. III.	163	163	4. IV.	165	166
E.	Diabetes	28. III.	120	119	16. IV.	117	121

Wieersichtlich, gilt diese Übereinstimmung nicht nur für Normalpatienten, sondern überraschenderweise auch für Diabetiker. Diese Konstanz der Werte ist natürlich ganz abhängig von der sehr sorgfältigen Einhaltung aller Versuchskautelen, insbesondere von der Sauberkeit und Sterilität der einzelnen Lösungen.

Wie weitgehend die Fehlerquelle der Bakterienwirkung verhindert werden kann, zeigen einige Ansätze, bei denen das Ferment durch Inaktivierung bei 70° zerstört worden war oder durch Auswaschen der roten Blutkörperchen entfernt werden konnte.

Tabelle 4. Plasmaansatz nativ.

Normalpatienten	Ausgangswert %	3 Std.	6 Std.	9 Std.	12 Std.	24 Std.
		%	%	%	%	%
Pat. L.						
Citratblut	0,039	0,072	0,106	0,132	0,146	0,226
Fluoridblut	0,041	0,076	0,106	0,132	0,143	0,222
Pat. R.						
Citratblut	0,043	0,075	0,108	0,134	0,150	0,219
Fluoridblut	0,041	0,080	0,110	0,138	0,152	0,224
Pat. E.						
Citratblut	0,039	0,070	0,110	0,138	0,152	0,224
Fluoridblut	0,039	0,073	0,106	0,137	0,154	0,228
Plasmaansatz nach Inaktivierung.						
		n. Entnahme aus dem Inaktivator				
Pat. R.						
Citratblut	0,038	0,050	0,054	0,055	0,052	0,050
Fluoridblut	0,039	0,049	0,050	0,053	0,054	0,054
Pat. E.						
Citratblut	0,041	0,047	0,048	0,045	0,047	0,043
Fluoridblut	0,038	0,048	0,051	0,046	0,050	0,045

Tabelle 5. Ansatz der zelligen Blutelemente.

Normalpatienten	Ausgangswert	3 Std.	6 Std.	9 Std.	12 Std.	24 Std.
	%	%	%	%	%	%
Pat. L.						
Citratblut	0,020	0,020	0,022	0,020	0,021	0,022
Fluoridblut	0,025	0,022	0,020	0,022	0,020	0,025
Pat. R.						
Citratblut	0,022	0,024	0,019	0,019	0,022	0,019
Fluoridblut	0,020	0,023	0,020	0,020	0,021	0,022
Pat. E.						
Citratblut	0,020	0,024	0,023	0,022	0,022	0,022
Fluoridblut	0,019	0,024	0,022	0,024	0,023	0,024

Tabelle 4 zeigt, daß die gesamte Diastasewirkung im Plasma sitzt und daß die Inaktivierung bei 70° in 1 Stunde jegliches diastatisches Fermentgeschehen unterdrückt. Entsprechend sind die Diastasewerte im aktiven Plasma höher als die im Gesamtblut, da ja bekanntlich der glykolytische Faktor an die zelligen Elemente gebunden ist. Die Plasmadiastasewerte mit Citrat als gerinnungshemmendes Agens liegen bei 107—113, die Fluoridwerte bei 102 bis 115, zeigen also untereinander gute Übereinstimmung. Die entsprechenden Blutdiastasewerte liegen für Citratblut, wie oben schon aufgeführt, bei 70—90 und Fluoridblut zwischen 90—98.

Tabelle 5 zeigt dieselbe diastatische Inaktivität und dieselbe ideale Bakterienfreiheit wie der eben geschilderte Plasmaansatz nach Inaktivierung. Eine Diastasewirkung war, wie zu erwarten, nicht mehr abzulesen. Trotz der großen Stärkemengen findet keine Spontanzersetzung oder bakterielle Zerstörung des Substrates innerhalb von 24 Stunden statt.

II. Mitteilung.

Über die Norm des Blutdiastasewertes und ihre Abweichungen bei bestimmten Krankheitsbildern.

1. Normalwerte.

Nach der oben angegebenen Citrat- und Fluoridblutdiastaseanalyse mit 12stündiger Reaktionszeit ergaben sich bei allen Normalfällen folgende Werte:

Citratblutdiastase 70—90	} mg % neugebildeter reduzierender Substanz, nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt, auf Glucose berechnet.
Fluoridblutdiastase 90—98	

Diese Werte sind Blutdiastasenüchternwerte. Die Abhängigkeit des Blutdiastasewertes von täglichen Stoffwechselschwankungen sowie von der Kohlehydrat-, Fett- und Eiweißzufuhr wurde nicht analysiert. Untersuchungen in dieser Richtung behalten wir uns vor.

2. Blutdiastase bei Neurosen.

Bei hochgradig vegetativ stigmatisierten Menschen mit entsprechenden Beschwerden ohne somatisch faßbare Abwei-

chungen von der Norm finden sich nun deutliche Erhöhungen des Diastasegehaltes. Der Blutdiastasewert der Neurosen unseres Materials zeigt folgende Streuungswerte:

Citratblutdiastase 113—128,
Fluoridblutdiastase 126—145.

3. Basedow.

Dieser Befund der Erhöhung des Blutdiastasenüchternwertes bei Neurosen wird bestätigt und findet seine Erklärung durch die Analysenzahlen beim Basedow. Die hier gefundenen Blutdiastasewerte waren folgende:

Citratblutdiastase: 124—128.
Fluoridblutdiastase: 129—136.

Es handelte sich dabei in allen Fällen um ausgesprochene Basedows mit Grundumsatzerhöhung von +40 bis +70%.

Interessant ist ein Einzelbefund beim Myxödem: Citratblutdiastase: 163, Fluoridblutdiastase: 177. Allerdings stand die Patientin unter Thyroxinbehandlung. Ob dieses den Blutdiastasegehalt erhöht hat, entzieht sich vorläufig noch unserer Kenntnis.

4. Carcinom.

Beim Carcinom fanden LOVAGLIO¹⁸ und v. STRASSER¹⁹ erhöhte, ELMAN²⁰ erniedrigte und VERCELLANA²¹ normale Diastasemengen. DE NIORD²² stellte beim Carcinom keine bestimmte Richtung fest, und auch KATSCH fand Blutdiastasewerte, die ziemlich normal, bisweilen aber sehr niedrig waren. Ob diese niedrigen Werte auf kachektische Funktionsschwäche, auf Hunger oder auf Glykogenmangel beruht, läßt KATSCH offen.

Bei 3 Carcinomfällen finden wir als Citratblutdiastasewert 97, 110 und 121 und für Fluoridblut 112, 128 und 147.

5. Lebererkrankungen.

Nach SCHULER, DREIER und JONAS (l. c.) ergaben sich bei einigen Leberkrankheiten hohe Blutdiastasewerte. Nach CARRERAS²³ soll bei Insuffizienz der Leber die Blutdiastase vermindert sein, wie auch KATSCH bei Lebercirrhose manchmal erniedrigte, manchmal normale und bisweilen ein wenig erhöhte Werte angibt. Mit der Bestimmung von WOHLGEMUTH fand SOTGRU²⁴ eine Veränderung bei 5 von 14 Leberfällen, und LOVAGLIO¹⁸ erhöhte Blutdiastasewerte bei Lebercirrhose und Icterus infectiosus, während POLACK²⁵ feststellte, daß weitaus die meisten von 31 untersuchten Leberfällen normale Diastasewerte hatten. Gallen- und Duodenalerkrankungen haben nach BRINK normale und nach SOTGRU veränderte Diastasemengen. KATSCH sah bei chronischer Cholecystitis beim akuten Schub mit Ikterus einen sehr hohen Diastasewert, und ähnliche oder geringe Erhöhung konstatierte er fast bei jedem akuten cholecystitischen Schub.

In dieser Rubrik ist bei uns der Icterus catarrhalis, Lebercirrhose und hochgradige Stauungsinduration der Leber bei Mitralstenose zusammengefaßt. Alle Blutdiastasewerte liegen weit über der Norm und zeigen folgende Streuung:

Citratblutdiastase 125—145.
Fluoridblutdiastase 136—164.

6. *Diabetes.*

Am meisten untersucht und am ausgiebigsten diskutiert ist in der Literatur die Frage, ob beim Diabetes eine Erhöhung der Blutdiastase vorhanden ist; aber geklärt ist die Frage der Beziehung zwischen Diabetes und Blutdiastasegehalt nicht. KATSCHE fand bei seinen Diabetespatienten teilweise sehr niedrige, sogar abnorm niedrige, teilweise auch sehr hohe Werte. Der Diastasegehalt des Blutes war im Koma relativ niedrig. Er führt diese niedrige Diastasenmenge bisweilen auf einen Hungerzustand bzw. auf Verarmung des Glykogendepots im Körper zurück und glaubt, daß besonders in ungünstigen Fällen der Wert sehr niedrig ist. Dergleichen sahen LEPINE²⁶ und BRINK bei Diabetes Verminderung und häufig niedrigen Diastasegehalt, und POLACK stellte einen allgemein tieferen Wert fest, je ungünstiger der Zustand des Patienten war. SORGIV hatte bei 6 von 15 Diabetikern eine Veränderung, v. STRASSER nach der Methode von WOHLGEMUTH von 16 Diabetikern 14 normale und 2 sehr hohe, DE TULLIO²⁷ bei Diabetikern unveränderte Werte, allerdings recht erhebliche individuelle Schwankungen. DE NIORD sah wohl in der Regel ein gewisses Parallelgehen von Blutzucker und Blutdiastase, jedoch nichts Charakteristisches beim Diabetes; auch WOHLGEMUTH konnte weder eine Vermehrung noch eine Verminderung feststellen. WYNHAUSEN²⁸ und LEVISO²⁹ gelang es nicht, Beziehung zwischen Diabetes und Diastase nachzuweisen. SCHULER, DREIER und JONAS entnehmen aus ihren Befunden, daß beim Diabetes der Diastasegehalt nicht vermindert sei, denn von 51 Diabetikern wiesen 2 niedrige Diastasewerte, bei 40 ergaben sich normale und bei den übrigen erhöhte Werte. Eine sichere Beziehung zwischen der Höhe des Blutdiastasegehaltes und der Art und Schwere der Erkrankung, der Stoffwechsellage, dem Blutzuckerwert oder der Menge des verabreichten Insulins ließ sich dabei nicht erkennen.

Selbstverständlich hat auch uns das Problem maßgeblich interessiert, so daß wir an Hand unserer brauchbaren Blutdiastasebestimmung mit einer gewissen Berechtigung auf Grund unserer gefundenen Werte zu dem aktuellen Problem Stellung nehmen können. Bei 19 Diabetikern fanden wir folgende Werte:

Tabelle 6.

	Ausgangswert %	3 Std. %	6 Std. %	9 Std. %	12 Std. %	24 Std. %
1. Pat. S.						
Citratblut . . .	0,052	0,101	0,131	0,175	0,215	0,288
Fluoridblut . .	0,048	0,097	0,127	0,173	0,211	0,292
2. Pat. G.						
Citratblut . . .	0,048	0,070	0,093	0,113	0,132	0,186
Fluoridblut . .	0,048	0,074	0,095	0,113	0,129	0,191
3. Pat. H.						
Citratblut . . .	0,063	0,095	0,119	0,148	0,161	0,219
Fluoridblut . .	0,059	0,095	0,120	0,152	0,166	0,223
4. Pat. K.						
Citratblut . . .	0,059	0,095	0,125	0,166	0,184	0,232
Fluoridblut . .	0,054	0,093	0,122	0,061	0,188	0,236

Tabelle 6 (Fortsetzung).

	Ausgangswert %	3 Std. %	6 Std. %	9 Std. %	12 Std. %	24 Std. %
5. Pat. O.						
Citratblut . . .	0,045	0,068	0,086	0,102	0,124	0,177
Fluoridblut . .	0,050	0,070	0,092	0,106	0,127	0,181
6. Pat. B.						
Citratblut . . .	0,070	0,093	0,113	0,143	0,161	0,213
Fluoridblut . .	0,074	0,097	0,111	0,145	0,166	0,217
7. Pat. E.						
Citratblut . . .	0,099	0,119	0,161	0,195	0,219	0,268
Fluoridblut . .	0,102	0,124	0,163	0,199	0,221	0,272
8. Pat. K. (Koma)						
Citratblut . . .	0,065	0,092	0,111	0,127	0,145	0,228
Fluoridblut . .	0,068	0,088	0,115	0,132	0,150	0,232
9. Pat. S.						
Citratblut . . .	0,045	0,072	0,127	0,152	0,170	0,257
Fluoridblut . .	0,050	0,074	0,132	0,154	0,165	0,259
10. Pat. S.						
Citratblut . . .	0,057	0,086	0,143	0,161	0,177	0,266
Fluoridblut . .	0,054	0,088	0,145	0,164	0,179	0,270
11. Pat. W.						
Citratblut . . .	0,029	0,047	0,084	0,099	0,117	0,170
Fluoridblut . .	0,032	0,050	0,081	0,104	0,119	0,173
12. Pat. H.						
Citratblut . . .	0,057	0,074	0,106	0,124	0,146	0,208
Fluoridblut . .	0,059	0,074	0,102	0,127	0,150	0,215
13. Pat. B.						
Citratblut . . .	0,061	0,104	0,129	0,186	0,219	0,310
Fluoridblut . .	0,064	0,108	0,132	0,191	0,222	0,316
14. Pat. K.						
Citratblut . . .	0,043	0,064	0,086	0,101	0,125	0,186
Fluoridblut . .	0,045	0,063	0,090	0,097	0,127	0,190
15. Pat. B.						
Citratblut . . .	0,057	0,095	0,134	0,148	0,170	0,255
Fluoridblut . .	0,055	0,090	0,131	0,152	0,172	0,257
16. Pat. J.						
Citratblut . . .	0,032	0,074	0,099	0,122	0,141	0,219
Fluoridblut . .	0,032	0,075	0,102	0,125	0,143	0,224
17. Pat. S.						
Citratblut . . .	0,048	0,099	0,129	0,173	0,213	0,264
Fluoridblut . .	0,045	0,104	0,125	0,177	0,211	0,268
18. Pat. R. (Diab. = Gangrän)						
Citratblut . . .	0,048	0,068	0,095	0,124	0,146	0,198
Fluoridblut . .	0,045	0,077	0,108	0,155	0,173	0,222
19. Pat. R. (Diab. + Tbc.)						
Citratblut . . .	0,048	0,088	0,106	0,132	0,152	0,226
Fluoridblut . .	0,074	0,101	0,127	0,164	0,181	0,257

Daraus errechnen sich als Blutdiastaseswerte nach unserer Definition folgende Zahlen:

Tabelle 7.

Nr.	Patient	Citrat- werte	Fluorid- werte	Nüch- tern Blut- zucker %	Alter Jahre	Dauer der Behand- lung Jahre	Insulinmenge
1	S.	163	163	238	45	3	60 E. pro die
2	G.	84	81	182	55	1 ¹ / ₂	Diät
3	H.	98	107	204	41	2	20 E. pro die
4	K.	125	134	247	62	6	20 E. pro die
5	O.	79	77	159	46	6	30 E. pro die
6	B.	91	92	268	18	3	45 E. pro die
7	E.	120	119	408	13	4	70 E. pro die
8	K.	80	88	600	33	1	150 E. pro die
9	S.	125	115	333	59	1	15 E. pro die
10	S.	120	125	260	47	2	20 E. pro die
11	W.	88	87	62	39	5	20 E. pro die
12	H.	89	91	304	53	25	Diät
13	B.	158	158	391	53	11	20 E. pro die
14	K.	82	82	184	44	1	Diät
15	B.	113	117	249	42	2	20 E. pro die
16	J.	89	111	189	63	8	Diät
17	S.	165	166	Pat. 1 mit Furunkel			
18	R.	98	125	195	61	4	Diät
19	R.	104	107	208	55	4	10 E. pro die
Streuung		79—165	77—166				

In dieser Tabelle sind die den einzelnen Werten zugeordneten Patienten nach Alter, Blutzuckeranalysen am gleichen Tage, Insulinmenge und Dauer der Behandlung kurz charakterisiert. Es ergibt sich, daß bei 12 von 19 Patienten die Blutdiastasewerte einwandfrei erhöht sind, während bei 7 normale Werte vorliegen.

Wie kommt es nun, daß 7 Patienten unseres Materials einen normalen Diastasewert aufweisen, da ja alles dafür spricht, daß der in seinem Stoffwechsel dekompenzierte Diabetiker eine Blutdiastaseerhöhung hat?

Eine Abhängigkeit vom Insulin läßt sich nach den Ergebnissen bei diesen 19 Diabetikern nicht finden*. Wir haben gerade diesen Punkt experimentell noch näher untersucht, indem wir einmal Insulin zum Blutdiastaseansatz zufügten und 2. den Diastasewert des Blutes vor und 1 Stunde nach Injektion von Insulin (30 E) feststellten. Weder in vivo noch im Vitroansatz ergab sich eine Spur einer Diastasebeeinflussung.

Zur Beantwortung oben aufgeworfener Frage müssen wir die 7 Diabetesfälle etwas genauer analysieren: Fall 8 mit dem Normalwert 80/88 ist ein Coma diabeticum, bei diesen hat schon KATSCH eine Erniedrigung des Blutdiastasewertes festgestellt. Fall 2 und 14 sind leichte Diabetesfälle, die rein diätetisch in ihrem Stoffwechsel korrigiert sind, Fall 12 mit dem

* SCHULER, DREIER und JONAS konnten zwischen verabreichter Insulinmenge und Diastasegehalt keine Beziehung feststellen, ähnliche Angaben macht auch DE TULLIO.

Diastasewert 89/91 kann man mit zu dieser Gruppe rechnen, da er trotz 25 Jahre bestehendem Diabetes niemals Insulin erhalten hat; auch hier sind sicherlich maßgebliche innersekretorische Störungen nicht vorhanden. Fall 11 ist durch eine besondere Insulinempfindlichkeit schon seit Jahren ausgezeichnet und bewegt sich mit seinem Blutzucker meist auf *hypoglykämischen* Werten. Hierzu ist weiterhin Fall 5 zu rechnen, mit einem Diastasewert von 79/77. Fall 6 ist mit seinem Wert von 91/92 an der Grenze der Norm; daß er als jugendlicher sehr labiler Diabetiker keine höheren Werte aufweist, ist allerdings nicht verständlich. Zusammenfassend kann man zu diesen 7 sich regelwidrig verhaltenden Diabetikern sagen, daß das Gros derselben voll auskompensierte, meist leichte Diabetiker sind und stoffwechselfmäßig sich kaum von einem Normalen unterscheiden. Die Tatsache, daß das Gros der Diabetiker, wie wir festgestellt haben, einen erhöhten Blutdiastasewert aufweist, Insulin erhält und trotzdem hohe und höchste Blutzuckerwerte hat, weist entschieden darauf hin, daß ein Insulinmangel in der Regel einen erhöhten Blutdiastasewert nach sich zieht, ob pankreas- oder leberbedingt, können wir natürlich nicht entscheiden. Ebenso liegt es uns fern, die Diastaseerhöhung als einen Kompensationsmechanismus des Körpers erklären zu wollen.

7. Einige Diastasebefunde bei interessanten Krankheitsfällen, die wir in Tab. 8 einordnen:

Tabelle 8.

	Ausgangswert %	3 Std. %	6 Std. %	9 Std. %	12 Std. %	24 Std. %
Pat. P. Akromegalie.						
Citratblut	0,038	0,079	0,125	0,143	0,164	0,241
Fluoridblut	0,043	0,083	0,125	0,146	0,163	0,241
Pat. S. Hochgradige hypophysäre Kachexie.						
Citratblut	0,038	0,115	0,161	0,181	0,213	0,276
Fluoridblut	0,038	0,117	0,173	0,188	0,224	0,288
Pat. K. Tetanie.						
Citratblut	0,039	0,081	0,104	0,134	0,148	0,253
Fluoridblut	0,034	0,084	0,110	0,150	0,166	0,268

Von diesen ist die hochgradige hypophysäre Kachexie besonders erwähnenswert mit ihrem extremen, einem unserer höchsten Blutdiastasewerte, die wir überhaupt feststellen konnten. Sie stand zur Zeit der Untersuchung unter folgender Therapie: Viel Dextrose, kohlehydratreiche Kost, parenterale Injektion von Totalkalbs-hypophyse. Dieser Fall eröffnet viele neue Probleme in der Diastaseforschung.

Selbstverständlich kann es nicht Sinn dieser Veröffentlichung sein, alle Krankheitsbilder unter dem Aspekt der Blut-

diastase zu untersuchen; hier müssen systematische Untersuchungen einsetzen. Ebenso ist das Problem der hormonalen Beeinflussung der Diastase nur gestreift worden, und es scheint so, als ob Hypophyse und Schilddrüse sich im Sinne einer Blutdiastaseerhöhung auswirken; dafür sprechen die Werte des Basedows, der Akromegalie, des Falles mit Hypophysenganzbehandlung, des mit Thyroxin behandelten Myxödems; dafür sprechen auch die Befunde beim Diabetes, bei denen das sympathische-parasympathische Gleichgewicht infolge Insulinmangels gestört ist.

Zusammenfassung: Es wird eine verbesserte Blutdiastasebestimmung angegeben und die methodischen Einzelheiten begründet.

Die neue Methode gibt erstmalig konstante und engbegrenzte Normwerte.

Es werden mit der neuen Methode die Diastasewerte einzelner im Rahmen des Zuckerstoffwechsels interessierender Krankheitsbilder auf ihren Diastasegehalt hin untersucht. Dabei ergibt sich, daß bei Diabetes, Lebererkrankungen, Basedow und Neurosen, bei Carcinom und Infektionskrankheiten der Diastasewert des Blutes erhöht ist.

Es wird die Arbeitshypothese aufgestellt, daß die Diastasemenge des Blutes, wahrscheinlich auch der Gewebe, hormonal geregelt wird.

Literatur: ¹ BIAL, Pflügers Arch. **53**, 156 (1893). — ² NOBECOURT u. SEVIN, Soc. Biol. **56**, 261 (1904). — ³ WOHLGEMUTH, Biochem. Z. **21**, 381 (1909). — ⁴ NOGUCHI, Arch. klin. Chir. **98**, 545 (1912). — ⁵ KATSCH, Münch. med. Wschr. **1934 I**, 505. — ⁶ SCHULER, DREIER u. JONAS, Klin. Wschr. **1936 I**, 782. — ⁷ BRINK, Dtsch. Arch. klin. Med. **175**, 691 (1933). — ⁸ SCHNEIDER u. ZAHN, Arch. klin. Chir. **169**, 306 (1932). — ⁹ BALTZER, Klin. Wschr. **1935 II**, 1395. — ¹⁰ SHERMAN, J. amer. chem. Soc. **45**, 1960 (1923). — ¹¹ ENGELHARDT u. GERTSCHUK, Biochem. Z. **167**, 43 (1925). — ¹² SCHAEFFER, C. r. Soc. Biol. Paris **98**, 1491 (1928). — ¹³ WILLSTÄTTER, OPPENHEIMER, Meth. d. Fermente **1**, 692. — ¹⁴ WOHLGEMUTH, Biochem. Z. **9**, 1 (1908). — ¹⁵ URBAN OLSSON, Hoppe-Seylers Z. **119**, 1 (1921/22). — ¹⁶ LINTNER-SOLLIED, Z. Brauwes. **26**, 329 (1903). — ¹⁷ BALTZER u. BRINK, Klin. Wschr. **1935 I**, 929. — ¹⁸ LOVAGLIO, Policlinico Sez. med. **35**, H. 4, 221 (1928). — ¹⁹ v. STRASSER, Dtsch. Arch. klin. Med. **151**, 110 (1926). — ²⁰ ELMAN, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **25**, 173 (1937). — ²¹ VERCELLANA, Z. Krebsforsch. **43**, 163—172 (1935). — ²² DE NIORD, Arch. int. Med. **23**, 484 (1919). — ²³ CARRERAS, Roum. Soc. Ital. Patol. Pisa **1913**. — ²⁴ SOTGIU, Probl. alimentare **2**, 5—30 (1932). — ²⁵ POLACK, Hosp. tid. **68**, Nr 29, 681 (1935). — ²⁶ LEPINE, C. r. Acad. Sci. Paris **113**, 1014 (1891). — ²⁷ DE TULLIO, Fol. med. (Napoli) **14**, 1764 (1928). — ²⁸ WYNHAUSEN, Berl. klin. Wschr. **47**, 1281 (1910). — ²⁹ LEWIS, J. of biol. Chem. **44**, 455 (1923).