Über den Einfluss ultraniedriger Temperaturen auf verschiedene biologische Erscheinungen.

I. Mitteilung.

Einfluss ultraniedriger Temperatur auf fermentative Wirkungen.

Von

Sentaro Kusaka.

(日下千太郎)

(Aus der Medizinischen Klinik von Prof. Dr. Kato,
Kaiserliche Tohoku-Universität zu Sendai.)

Über die biologische Wirkung ultraniedriger Temperaturen von nahe an -200°C , wie z.B. der Temperatur flüssiger Luft liegen die Mitteilungen der Autoren, Brown und Escombe¹⁾, MacFadyen²⁾, MacFadyen und Rowland³⁾, Belli⁴⁾ u. a. vor, aber bei ihnen handelte es sich meistens um die Wirkung ultratiefer Temperaturen auf Pflanzensamen, Sporen, Bakterien u. s.w. In den letzten Jahren liess Kusida⁵⁾ die flüssige Luft auf Rücken, Bein, Ohr usw. des Kaninchens einwirken und beobachtete dabei auftretende Veränderungen des allgemeinen Befindens sowie des Blutbildes. Ferner bestimmte er in vitro die Refraktionen, das spezifische Gewicht, die Oberflächenspannung usw. des mit flüssiger Luft behandelten Serums. Klinké⁶⁾ bewies, dass nach direktem Einbringen von Geschwulst und Normalgewebe in flüssigen Stickstoff (-196°C) oder in flüssigen Wasserstoff (-253°C) noch überlebende Zellelemente vorhanden waren. Um den Einfluss durch flüssigen Sauerstoff und Stickstoff erzeugter ultratiefer Kälte auf die Eiweisskörper des Blutes, des Hirns, der Leber und Niere normaler sowie mit Uran vergifteter Kaninchen zu untersuchen, hat Moriguti⁷⁾ an der hiesigen Klinik die Veränderungen des Gesamt-N, Rest-N, Albumin-N, Globulin-N und des kolloid-osmotischen Drucks (kurz: k.o.D.) bestimmt. Aus den Versuchsergebnissen ging hervor, dass die Gewebe normaler sowie mit Uran vergifteter Kaninchen keinen wesentlichen Unterschied in ihren Reaktionsänderungen zeigten. Beim Serum wurden eine Abnahme des Rest-N, eine Zunahme des Albumin-N, eine Abnahme des Globulin-N, folglich eine Vermehrung des Albumin-Globulin-Quotienten und eine Steigerung des k.o.D.

und des Drucks pro 100 mg/dl Eiweiss-N konstatiert. Beim Gewebseiweiss wurden ebenfalls eine Abnahme des Rest-N und eine Zunahme des Albumin-N wie beim Serum festgestellt, das Globulin aber nahm fast in der Hälfte der Fälle ab und in der anderen Hälfte zu, und zwar wurde der Albumin-Globulin-Quotient vermehrt und der k.o.D. und Druck pro 100 mg/dl Eiweiss-N gesteigert gefunden. Bei Uranvergiftung war die Abnahme des Rest-N im Serum etwas kleiner und die Globulinabnahme etwas grösser als die Norm; im allgemeinen wurden sowohl beim Serum als auch beim Gewebseiweiss grössere quantitative Schwankungen erkannt. Beim Immuns Serum wurden ferner die Wirkung des Agglutinins und Hämolytins verstärkt, die Viskosität und Oberflächenspannung des Serums vermindert und die Adsorptionsfähigkeit gesteigert gefunden.

Es sind aber nicht wenige Fragen über den biologischen Einfluss ultraniedriger Temperaturen von flüssigen Gasen, die neuerdings vielfach auf industriellem Gebiet sowie zu physikalisch-chemischen Untersuchungen angewendet werden, noch offen. Die vorliegenden Untersuchungen wurden daher unternommen, um einige der betreffenden Fragen zu beantworten.

Verschiedene chemische Reaktionen im Organismus können eigentlich bei Körpertemperatur des Organismus keine für die Erhaltung des Lebens genügende Reaktionsgeschwindigkeit haben, dessenungeachtet gehen sie rasch vonstatten. Das rührt von dem Vorhandensein von Substanzen katalytischer Wirkung, den Fermenten, her. Die Fermente sind von so grosser Wichtigkeit, dass von keiner Lebenserscheinung ohne Berücksichtigung dieser Katalysatoren geredet werden darf. Um den Einfluss ultraniedriger Temperaturen auf die Lebenserscheinungen zu erforschen, haben wir darum zuerst ihre Wirkung auf Fermente untersucht. Als Fermente wurden Pepsin, Diastase und Blutkatalase gewählt.

Flüssige Luft ist ein Gemisch von flüssigem Sauerstoff und flüssigem Stickstoff, und ihre Temperatur schwankt je nach dem Verhältnisse ihrer Mischung zwischen -183°C und -196°C . Um diese Inkonzanz der Temperatur zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Untersuchung der flüssige Sauerstoff oder flüssige Stickstoff* angewendet, dessen Temperatur stets bei -183°C bzw. -196°C liegt.

---

* Der flüssige Stickstoff und Sauerstoff wurden liebenswürdig von Prof. S. Aoyama am Kälteforschungsinstitut hiesiger Universität geliefert, wofür ich hier meinen aufrichtigen Dank ausspreche.

Versuchsergebnisse.

1. Einfluss auf Pepsin.

Es wurde mit N/100 NCl eine 0,01%ige Pepsin (Merck)-Lösung hergestellt. Diese Lösung wurde auf 2 Kölbchen verteilt, deren eines dem Kontrollversuch diente. Das andere wurde in eine flüssigen Stickstoff enthaltende, breitmündige Thermosflasche hineingelegt und, wenn der flüssige Stickstoff aufhörte zu siedern, noch 10 Minuten lang darin gelassen. Nachdem die Pepsinlösung auf diese Weise der ultraniedrigen Temperatur von -196°C hinreichend ausgesetzt worden war, wurde sie herausgenommen und bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis das Material vollkommen geschmolzen war. 10 g Carminfibrin „Grübler“, wurden mit 70 ccm N/100 HCl gequellt. Man versetzte 5 ccm davon mit 1 ccm der oben erwähnten 0,01 %igen Pepsinlösung und filtrierte nach 30 minutigem Stehenlassen bei 20°C im Wasserbad. Dann wurde das Filtrat teils dem Kontrollversuch unterzogen, teils mit flüssigem Stickstoff behandelt; die hierbei auftretenden Farbentöne wurden verglichen.

Bei allen Versuchen wurde konstatiert, dass die auftretenden Farbentöne gleich stark waren, dass also die Wirkung von Pepsin durch eine ultraniedrige Temperatur von -196°C keine Änderung erleidet.

2. Einfluss auf Diastase.

„Turu“-Diastase wurde in destilliertem Wasser im Verhältnisse 1:100 gelöst. Als Stammlösung im Eisschrank aufbewahrt, wurde diese Lösung 10 fach verdünnt zum Versuche gebraucht. Diese 1 $^{0}_{00}$ ige Lösung wurde in zwei Teile geteilt; die eine Hälfte diente zur Kontrolle. Die andere Hälfte wurde in gleicher Weise wie im Pepsin-Versuch mit flüssigem Stickstoff auf -196°C gebracht und dann bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis das Material vollkommen geschmolzen war. Nun wurde sie nach der Wohlgemuth'schen Methode auf die Weise untersucht, dass zuerst ein I. und II. Reagensglas je 1 ccm von 1 $^{0}_{00}$ iger Diastaselösung und das II.-X. Reagensglas je 1 ccm destilliertes Wasser bekamen. Nachdem dann der Inhalt des II. Reagensglases gemischt worden war, wurde 1 ccm davon in ein III. Reagensglas hineingegossen. Nachdem der Inhalt des III. Reagensglases gemischt worden war, wurde wiederum 1 ccm davon in ein IV. Reagensglas hineingegossen, und dieselbe Manipulation wurde bis zum X. Reagensglas wiederholt, von dessen Inhalt man endlich 1 ccm weggoss. Nach Zugabe von je 1 ccm von 1 $^{0}_{00}$ iger Stärkelösung wurde jedes Reagensglas hinreichend geschüttelt und 30 Minuten lang bei 38°C im Wasserbad stehen gelassen. Wenn man sie im Eiswasser schnell kühlte und je einen Tropfen N/50 Jodlösung zufügte, so blieb die Flüssigkeit, welche keine Wirkung von Diastase erlitten hatte, blau, während diejenige, welche sich in Erythrodextrin verwandelt hatte, rot gefärbt wurde und diejenige, welche vollkommen verdaut worden war, die Stärkereaktion verlor und einen gelben Farbenton annahm. Als positiv wurden diejenigen bis zur Rotfärbung bezeichnet.

Weil die Einflüsse ultraniedriger Temperaturen auf Fermente je nach ihrer Wirkungsdauer verschieden sein könnten, liess man die 1 $^{0}_{00}$ ige Diastaselösung 12

Stunden lang, während deren die Kontrolle im Eisschrank aufbewahrt wurde, in flüssigem Stickstoff stehen und untersuchte nach derselben Methode die Wirkung der Diastase.

Aus den Versuchsergebnissen ging hervor, dass die ersten 6 Reagensgläser einen positiven Ausfall zeigten, gleichviel ob die Diastase ultraniedriger Kälte ausgesetzt war oder nicht und ob die Einwirkung ultraniedriger Kälte lang genug dauerte oder nicht. Die Wirkung der Diastase zeigte nämlich keine Abweichungen von den Resultaten der Kontrollversuche, unabhängig davon, dass sie der ultraniedrigen Temperatur von -196°C 10 Minuten lang oder 12 Stunden lang ausgesetzt worden war.

3. Einfluss auf Blutkatalase.

Normales Kaninchenblut wurde mit destilliertem Wasser 1000 fach verdünnt. In gleicher Weise wie beim Pepsin-Versuch wurde eine Hälfte davon mit flüssigem Stickstoff 10 Minuten lang auf -196°C gebracht, während die andere Hälfte ohne der Ultrakälte ausgesetzt zu werden, zur Kontrolle diente. Die Bestimmung der Katalase erfolgte nach der Inoue⁸⁾ schen Methode.

Man stellte durch Kompensation mit N/10 Oxalsäure eine N/10 Kaliumpermanganatlösung her, welche, als Stammlösung aufbewahrt, durch Kompensation genau N/10 blieb und vor dem Versuche fünffach verdünnt wurde. Andererseits wurde eine H_2O_2 -Lösung mit NaOH neutralisiert und die darin enthaltene Menge von H_2O_2 mit oben erwähneter Kaliumpermanganatlösung bestimmt; daraus wurde das Volumen der H_2IO_2 -Lösung berechnet, das zur Herstellung von 1000 ccm 1⁰/₁₀₀ iger H_2O_2 -Lösung nötig war. Zur dem auf diese Weise ausgerechneten Volumen der H_2O_2 -Lösung fügte man 50 ccm M/3 Phosphatgemischlösung, welche durch Mischung von 2 Volumen M/3 sekundärer Natriumphosphat-Lösung und 1 Volumen M/3 primärer Natriumphosphat-Lösung erzeugt wurde, und destilliertes Wasser auf 1000 ccm hinzu, um eine 1⁰/₁₀₀ ige H_2O_2 -Lösung herzustellen.

10 ccm dieser 1⁰/₁₀₀ igen H_2O_2 -Lösung wurden auf 4 Reagensgläser verteilt und 5–6 Minuten lang bei 38°C im Wasserbad stehen gelassen, bis sie die Temperatur von 38°C erreichten. Vorher wurde 1000 fach verdünntes Kaninchenblut erwärmt, bis es auch dieselbe Temperatur erreichte. 2 ccm davon bekam das I. Reagensglas, 1 ccm das II. Reagensglas und 0,5 ccm das III. Reagensglas, während das IV. Reagensglas nichts davon bekam. Dann wurden sie 30 Minuten lang bei 38°C im Wasserbad stehen gelassen. Zuletzt fügte man zu jedem Reagensglas 2 ccm von 20 % iger H_2SO_4 hinzu und titrierte mit N/50 Kaliumpermanganatlösung. Die Werte des I. Reagensglases wurden unberücksichtigt gelassen, da bei ihm H_2O_2 fast vollkommen zersetzt war. Wenn man in bezug auf N/50 Kaliumpermanganatlösung die Differenzen zwischen der zur Titrierung des IV. Reagensglases gebrauchten Menge und der zur Titrierung des II. bzw. III. Reagensglases gebrauchten Menge berechnete, so sollte eigentlich die Differenz zwischen der Menge für das IV. Reagensglas und

der für das II. Reagensglas doppelt so viel als Differenz zwischen der Menge für das IV. Reagensglas und der für das III. Reagensglas sein. Weil aber einige Abweichungen beobachtet wurden, berechnete man das durchschnittliche Volumen der doppelten Differenz zwischen der Menge für das IV. Reagensglas und der für das III. Reagensglas und der Differenz zwischen der Menge für das IV. Reagensglas und der für das II. Reagensglas aus, und dieses Volumen betrachtete man als das Volumen von N/50 Kaliumpermanganatlösung, welche auf die Menge von durch 1 ccm 1000 fach verdünnten Kaninchenblutes zu zersetzendem H_2O_2 reagieren und dadurch entfärbt werden sollte. Indem man dieses Volumen mit dem Koeffizienten 0,3402 multiplizierte, den die Titrierung von 1 ccm 1000 fach verdünnten Kaninchenblutes durch N/50 Kaliumpermanganatlösung ergeben hatte, rechnete man aus, wieviel g H_2O_2 durch 1 ccm Blut zu zersetzen war. Der auf diese Weise gewonnene Werte als Katalasenzahl betrachtet.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ergaben die Resultate, dass die Katalasenzahl bei normalem Kaninchenblut 4,87—7,03 betrug. Diese Werte liegen der Katalasenzahl normalen Kaninchenblutes : 2,11—7,89 sehr nahe, welche Sibuya⁹⁾ an hiesiger Klinik nach derselben Methode gewonnen hatte. Unter 15 Versuchen zeigten 2 keine Änderung der Katalasenzahl und 2 eine Abnahme, und die 11 übrigen zeigten eine geringe Zunahme der Katalasenzahl. Die Wirkung der Katalase des Kaninchenblutes scheint also durch die Einwirkung einer ultraniedrigen Temperatur von -196°C nicht abgeschwächt, vielmehr in gewissem Grade verstärkt zu werden.

Es wurde schon längst experimentell festgestellt, dass die Fermente durch Chemikalien, mechanisches Schütteln, Strahlen etc. einen gewissen Einfluss erleiden. Auch Sibuya⁹⁾ teilte mit, dass sich die Blutkatalase durch die Einwirkung von Ultra-Schallwellen verminderte. Die Wirkungen der Fermente erleiden ebenfalls durch die Temperatur bedeutenden Einfluss. Für sie gibt es also eine Optimaltemperatur, aber viel Fermentarten erreichen schon vor 100°C ihre sog. Tötungstemperatur und werden zerstört. So schwach ist die Resistenz der Fermente gegen hohe Temperatur. Gegen niedrige Temperaturen ist sie aber, wie in vorliegenden Versuchen festgestellt

Tabelle

Versuchs-Nr.	Hb (g/dl)	K-zahl		% d. Ab- u. Zunahme
		Kontrolle	Kälte	
1	14,6	5,26	5,48	+ 4,18
2	13,7	6,18	6,05	- 2,10
3	14,9	6,02	6,78	+12,62
4	16,3	5,82	5,82	0
5	14,6	6,43	7,05	+ 9,64
6	15,2	5,56	5,93	+ 6,65
7	15,3	4,87	5,25	+ 7,80
8	14,7	5,84	5,98	+ 2,40
9	13,7	7,03	7,86	+11,81
10	15,4	6,60	7,33	+11,06
11	14,6	6,28	6,12	- 2,55
12	15,7	6,76	7,07	+ 4,58
13	16,4	5,63	5,88	+ 4,44
14	13,8	6,72	6,72	0
15	15,5	6,58	6,94	+ 5,47

wurde, sehr stark, und zwar wurde die Wirkung von Pepsin und Diastase bei -196°C durchaus unverändert und die der Katalase sogar einigermaßen verstärkt gefunden.

Auf welchen Mechanismus diese Wirkungssteigerung der Katalase zurückzuführen sei, ist heute schwer zu erklären, da der Wirkungsmechanismus der Fermente selbst noch nicht vollkommen geklärt ist. Indessen wird es vielleicht nicht undenkbar sein, dass in so komplizierten Molekülen wie denen der Fermente irgendwelche Änderungen bei ultraniedrigen Temperaturen wie z.B. -196°C hervorgerufen werden. Darum wäre auch die Folgerung nicht ganz auszuschliessen, dass unter Einwirkung einer ultratiefen Kälte von -196°C in den Molekülen der Katalase gewisse Änderungen herbeigeführt werden, welche auf die fermentative Wirkung der Katalase günstigen Einfluss ausüben, oder dass aus Eiweisskörpern ohne fermentative Wirkung neue Katalase gebildet wird.

Die Fermente sind einleuchtend Eiweisskörper. Dass die Eiweisskörper verschiedene Substanzen adsorptiv binden, wurde auch von Bennhold¹⁰⁾ und Ebstein¹¹⁾ festgestellt. Moriguti⁷⁾ stellte an der hiesigen Klinik fest, dass die Adsorptionsfähigkeit des Serumeiweisses für Farbstoffe gesteigert wurde, wenn man eine ultraniedrige Temperatur von -196°C auf das Serumeiweiss einwirken liess; ferner führte er die Abnahme des Rest-N, die sich bei der Einwirkung derselben Ultrakälte auf die Eiweisskörper des Blutserums und der verschiedenen Organgewebe einstellte, auf die Adsorption durch Eiweisskörper zurück. Die Katalase ist zusammengesetztes Eiweiss, welches durch Bindung von Eiweisskörpern und einer prosthetischen Gruppe entstanden ist. Wenn es auch nicht klar ist, ob sie chemisch oder adsorptiv gebunden sind, wird mit Rücksicht auf die Versuchsergebnisse von Bennhold¹⁰⁾, Ebstein¹¹⁾, Moriguti⁷⁾ u.a. die Folgerung nicht falsch sein, dass sie adsorptiv gebunden sein dürften. Nach Sumner und Dounce¹²⁾ ist die prosthetische Gruppe der Katalase eine häminartige Substanz und zwar dem aus Hämoglobin gewonnenen Bluthämin sehr nahe verwandt. Darum wird es auch wohl möglich sein, dass aus dem Hämoglobin des Kaninchenblutes unter dem Einflusse ultratiefer Kälte die prosthetische Gruppe der Katalase erzeugt wird. Wenn in verdünntem Kaninchenblut ausser der Katalase, die durch adsorptive Bindung von prosthetischer Gruppe und Eiweisskörpern entstanden ist, noch freie prosthetische Gruppen und Eiweisskörper vorhanden sind, so ist es denkbar, dass Eiweisskörper, deren Adsorptionsfähigkeit durch die Einwirkung ultratiefer Kälte gesteigert ist, freie prosthetische Gruppen adsorptiv binden. Berücksichtigt man die Tatsache, dass die Wirkung des Pepsins, d.h. die des einfachen Eiweisses, unverändert blieb und die der Katalase, nämlich des zusammen-

gesetzten Eiweisses, verstärkt wurde, so würde die Folgerung am richtigsten sein, dass Eiweisskörper, deren Adsorptionsfähigkeit durch die Einwirkung ultratiefer Kälte gesteigert ist, freie prosthetische Gruppen adsorbieren und dass die Wirkung der Katalase dadurch verstärkt werde.

Schluss.

Man liess eine ultratiefe Kälte (-196°C) auf Pepsin, Diastase und Blutkatalase des Kaninchens einwirken und bestimmte ihre fermentative Wirkung.

1. Die fermentative Wirkung von Pepsin und Diastase blieb unverändert.

2. Die fermentative Wirkung der Blutkatalase des Kaninchens wurde einigermaßen verstärkt.

Es wurde versucht, diese Erscheinungen zu erklären.

Literatur.

- 1) Brown u. Escombe, Proc. Roy. Soc. London, 1898, **62**, 160.
  - 2) MacFadyen, Lancet, 1900, **158**, 849.
  - 3) MacFadyen u. Rowland, Lancet, 1900, **158**, 1130.
  - 4) Belli, Zbl. f. Bakt., 1900, **28**, 594.
  - 5) Kusida, Mitt. med. Akad. Kioto, 1937, **20**, 887 u. 915.
  - 6) Klinke, Klin. Wschr., 1940, 585
  - 7) Moriguti, Tohoku J. Exp. Med., 1942, **42**, 358, 383, 391, 399.
  - 8) Inoue, Tokyo Igakkai Zassi, 1920, **34**, 1190.
  - 9) Sibuya, Tohoku J. Exp. Med., 1936, **30**, 181.
  - 10) Bennhold, Ergeb. inn. Med., 1932, **42**, 273.
  - 11) Ebstein, Acta med. scand., 1936, **90**, 427; 1937, **91**, 191.
  - 12) Sumner u. Dounce, J. Biol. Chem., 1937, **121**, 417.
-