

## Über die Harnsäurebildung in Gewebsauszügen.

Von

**Alfred Schittenhelm.**

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik der Universität Göttingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juni 1904.)

Die bekannten Versuche Horbaczewkis,<sup>1)</sup> wodurch er die Entstehung von Harnsäure aus den Nucleinen der Organe erwies, stellten eigentlich den ersten Versuch dar, eine Harnsäurebildung durch Gewebsfermente zu erweisen, wenn auch Horbaczewski selbst den harnsäurebildenden Faktor in seinen Versuchen nicht in einem entsprechenden Ferment erkannt hat. Seine Versuchsanordnung war die folgende: er digerierte frische Milzpulpa mit der 8—10fachen Menge destillierten Wassers 8 Stunden lang bei 50° C.; es muß dabei leichte Fäulnis auftreten, ein Punkt, den Horbaczewski für das Gelingen des Versuches für notwendig hielt. Nach beendeter Digestion wird vom ungelösten filtriert, die Lösung zur Entfernung der Eiweißkörper und Sterilisierung mit Bleiessig vorsichtig ausgefällt. Dann wird die nach dem Absetzen überfiltrierte und von Blutfarbstoff rotgefärbte Lösung mit etwa derselben Menge frischen arteriellen Blutes versetzt, bei 40—50° einige Stunden erwärmt oder unter Luftdurchleitung im Brutschrank belassen. Auf diese Weise kann aus 1 g Milzpulpa ca. 2.5 mg Harnsäure erhalten werden. Auch Nucleine, nach Miescher durch Pepsinsalzsäureverdauung aus Organen gewonnen, geben mit Blut ebenso behandelt Harnsäure. Er schließt daraus, daß die Harnsäure aus den Xanthinbasen der Zellkerne entstehe. Seine Versuche wurden wiederholt nachgeprüft und als richtig befunden.

<sup>1)</sup> J. Horbaczewski, Beiträge zur Kenntnis der Bildung der Harnsäure und der Xanthinbasen, sowie der Entstehung der Leukocyten im Säugetierorganismus, Monatshefte der Chemie, 1891, Bd. 12, S. 221.

Spitzer<sup>1)</sup> hat dieselben Versuche in etwas anderer Weise angestellt und gefunden, daß bei der Digestion von Milz- und Leberauszügen unter Luftdurchleitung und Ausschluß der Fäulnis auch eine Bildung von Harnsäure stattfindet. Mit der Zunahme der Harnsäure ging eine Abnahme der nachweisbaren freien Nucleinbasen, wie sie nach Salkowskis<sup>2)</sup> Angaben bei der Autodigestion sich abspalten, Hand in Hand. Des weiteren erwies er, daß Hypoxanthin und Xanthin sich durch den Sauerstoff der Luft bei Anwesenheit gewisser in den Extrakten von Leber und Milz enthaltener Substanzen zu Harnsäure oxydieren und daß auch aus Adenin und Guanin unter denselben Versuchsbedingungen Harnsäure entstehe, aber in viel geringerem Umfange als aus Hypoxanthin und Xanthin. Auch Wiener<sup>3)</sup> fand bei ähnlicher Versuchsanordnung, daß Hypoxanthin, dem Leberauszuge des Rindes zugesetzt, starke Vermehrung der Harnsäure bei Ausschluß von Fäulnis ergebe. Spitzers Versuche, welche zu der Annahme einer harnsäurebildenden Oxydase in Leber und Milz führen müssen, scheinen dafür zu sprechen, daß die Aminopurine in der Tat betreffs ihrer Überführung in Harnsäure anderen Bedingungen unterliegen, als die Oxypurine. Es wäre diese Beobachtung von Wichtigkeit, weil bekanntlich Minkowski<sup>4)</sup> die Oxydation von freiem Adenin und Guanin zu Harnsäure, welche nach den Fütterungsversuchen von Krüger und Schmid<sup>5)</sup> sehr wahrscheinlich gemacht wurde, energisch bestritt, während er eine Oxydation der Oxypurine zu Harnsäure als bewiesen annahm. Auf seine weitere Anschauung betreffs der Notwendigkeit der Paarung von Nucleinsäure oder ihren basenfreien Komponenten

<sup>1)</sup> W. Spitzer, Die Überführung von Nucleinbasen in Harnsäure durch die sauerstoffübertragende Wirkung von Gewebsauszügen, *Archiv für Physiol.*, 1899, Bd. 76, S. 192.

<sup>2)</sup> E. Salkowski, Über Autodigestion der Organe, *Zeitschrift für klin. Medizin.*, 1890, Bd. 17, Suppl., S. 77.

<sup>3)</sup> H. Wiener, Über Zersetzung und Bildung von Harnsäure im Tierkörper, *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak.*, 1899, Bd. 42, S. 373.

<sup>4)</sup> O. Minkowski, *Die Gicht*, Wien 1903.

<sup>5)</sup> M. Krüger und J. Schmid, Die Entstehung der Harnsäure aus freien Purinbasen, *Diese Zeitschrift*, 1902, Bd. XXXIV, S. 549.

mit den Aminopurinen brauche ich nicht näher einzugehen. Ich habe diese Verhältnisse erst jüngst in einem ausführlichen Referate<sup>1)</sup> besprochen.

Da sich demnach hier zwei Ansichten gegenüberstehen, so habe ich es unternommen, weitere Versuche nach dieser Richtung anzustellen. Ich ging dabei von der Spitzerschen Versuchsanordnung aus und benutzte vorerst der Einheitlichkeit halber im wesentlichen Milzextrakt.

Es fand sich nun die wichtige Tatsache, daß auch Adenin und Guanin, ganz wie es Spitzer für die Oxypurine fand, nahezu quantitativ in Harnsäure überging. Daß dabei ein fermentartiges Agens eine wichtige Rolle spielt, bewies wieder die Tatsache, daß die Versuche nicht gelangen, sobald anstatt frisch bereiteten Extraktes ein anderer verwandt wurde, der vorher einige Zeit auf 100° im Dampftopf erhitzt worden war. Spitzers einmaliger Versuch mit Adenin gelang wohl nicht in dem Maße, weil die Versuchsdauer eine wesentlich kürzere war, und seine Versuche mit Guanin verliefen weit weniger intensiv, weil er zur Lösung des Guanins Salpetersäure verwandte, die wohl schädigend auf die Oxydase gewirkt haben mag.

Weiter konnte ich zeigen, daß nicht nur die freien Aminopurine, sondern auch die an Thymusnucleinsäure gebundenen in Harnsäure umgesetzt wurden. Unter gleichen Versuchsbedingungen erreichte ich eine Bildung von Harnsäure durch Zugabe von  $\alpha$ -nucleinsaurem Natrium zu den Extrakten, welche in quantitativer Beziehung ungefähr  $\frac{2}{3}$  der in dem angewandten Präparat enthaltenen Purinbasen entsprach. Es trat demnach bei den gebundenen Aminopurinen eher eine geringere Umwandlung in Harnsäure ein, als bei den freien, ein Resultat, welches wohl zu einem guten Teil darin seinen Grund hat, daß durch das als Folge der Reaktion aufgetretene basenfreie Spaltprodukt eine vollkommene Ausfällung der gebildeten Harnsäure verhindert wurde.

Dieselbe Eigenschaft, wie der Milzextrakt, hat auch

<sup>1)</sup> A. Schittenhelm, Die Purinkörper und ihre Stellung im tierischen Organismus, Zentralblatt für Stoffwechsel- und Verdauungskrankheiten, 1904, Nr. 9, S. 226.

der Leberextrakt und endlich konnte ich ein weiteres Organ, welches dieselbe Oxydase enthält und mithin auch dieselbe Umsetzung zu bewirken vermag, nämlich die Lunge auffinden.

Zu erwähnen wäre noch der schädigende Einfluß des Alkohols auf die Lebensfähigkeit des Fermentes.

Die Harnsäure bildende Oxydase wird gefällt durch Aussalzen mit Ammonsulfat und ich erhielt aus den Niederschlägen gut wirksame Extrakte, welche sehr wenig organische Substanz und so gut wie keine Purinbasen, also auch keine Nucleoproteide enthielten. Weitere Versuche, welche über die Art des Fermentes und über das Verhalten der Organauszüge gegenüber methylierten Purinen Aufschluß geben sollen, werde ich später beschreiben.

#### Experimenteller Teil.

Zur Herstellung des Extraktes wurden jedesmal frisch vom Schlachthaus erhaltene Organe vom Rinde in der Fleischhackmaschine fein zerkleinert und dann noch, wenn nötig, wie z. B. bei der Lunge, mit Hackmessern bearbeitet. Von dem so erhaltenen feinen Brei wurden je 500—700 g mit 3 l Wasser und 50 ccm Chloroform 4 Stunden lang durch den automatischen Rührer durchgearbeitet. Die durch mehrstündiges Stehen abgesetzte Flüssigkeit wurde kolfiert und durch aufgeschwemmtes Filtrierpapier filtriert. Der so erhaltene Extrakt war noch mehr oder weniger getrübt, enthielt aber keine gröberen Bestandteile mehr. Auf eine Filtration durch Faltenfilter, wobei absolute Klarheit des Filtrats erzielt werden kann, wurde in den meisten Fällen wegen der Langwierigkeit des Filtrationsprozesses verzichtet.

Von dem Extrakte wurden stets 500 ccm zum einzelnen Versuche verwandt. Die Purinbasen, welche ich teils von Merk käuflich bezog, teils selbst aus Organen (Pankreas etc.) dargestellt hatte und von deren Reinheit ich mich durch Stickstoffanalysen vorher überzeigte, gab ich stets in gelöster Form zu und zwar gebrauchte ich zu ihrer Lösung Normalnatronlauge unter möglichster Vermeidung jeden Überschusses. Auch das nach Neumanns<sup>1)</sup> Vorschrift aus Thymusdrüse dargestellte

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat. und Physiol., Suppl. 1899, S. 552.

$\alpha$ -nucleinsäure Natrium, welches sich nahezu klar löste, vorschriftsgemäß gelatinisierte und nach Spaltung mit 2%iger Schwefelsäure 6,58% Basenstickstoff enthielt, wurde gelöst zugegeben. Jede einzelne Portion des versuchsfertigen Extraktes wurde, wenn sie nicht bereits vorher alkalisch war, mit Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht.

Nunmehr wurden die Extrakte im Wasserbad bei 40—45° unter ständiger Luftdurchleitung 3 Tage lang digeriert und jeden Tag etwas Chloroform zugegeben.

Die Isolierung der Harnsäure geschah folgendermaßen: Die Reaktionsflüssigkeit, in welcher sich während der Dauer des Versuches flockige Abscheidungen bildeten, wurden natronalkalisch aufgeköcht, wobei alles in Lösung ging, hierauf eben essigsauer gemacht und vom entstandenen Niederschlag rasch abfiltriert. Der Niederschlag wurde nochmals mit Wasser ausgeköcht. Aus den vereinigten Filtraten wurden die Purinkörper entweder mit Natriumbisulfit-Kupfersulfat-Fällung nach Krüger oder mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, die erhaltene Verbindung gut gewaschen und mit Schwefelkaliumlösung zersetzt. Vor dem Filtrieren gab ich nach Wieners<sup>1)</sup> Angabe einige Kubikzentimeter einer gesättigten Aluminiumacetatlösung zu und machte ganz schwach essigsauer. Hierdurch erzielt man immer ein klares Filtrat; der dicke Niederschlag wurde nochmals ausgeköcht und die vereinigten Filtrate salzsauer auf wenige Kubikzentimeter eingedampft und einige Stunden stehen gelassen.

Die ausgefallene, auf ein gehärtetes Filter gebrachte Harnsäure wurde mit schwach salzsaurem Wasser gewaschen, mit heißem Alkohol zur Entfernung der Fettsäuren und mit Schwefelkohlenstoff zur Entfernung des anhaftenden Schwefels gereinigt und mit Äther getrocknet, endlich gewogen. Wo die erhaltene Menge zu gering zur Analyse war, wurde nach Horbaczewski<sup>2)</sup> aus konzentrierter Schwefelsäure (0,2 ccm auf 0,1 g. Substanz und Wiederausfällung durch das 4fache Volumen Wasser) um-

<sup>1)</sup> l. c., S. 381.

<sup>2)</sup> J. Horbaczewski, Über die Trennung der Harnsäure von den Xanthinbasen, Diese Zeitschrift, 1894, Bd. XVIII, S. 341.

kristallisiert und die so erhaltene Harnsäure durch die Murexidprobe und ihre Kristallform identifiziert. In den meisten Fällen wurde eine Analyse vorgenommen, wozu die Harnsäure 2—3 mal in Natronlauge gelöst, mit Tierkohle entfärbt und durch Salzsäure aus dem Filtrat wieder ausgefällt wurde. Das mit Alkohol und Äther gewaschene Endprodukt wurde nach Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz analysiert.

Auf diese Weise wurde von jedem frischen Extrakt eine Kontrollprobe vor Beginn des Versuches verarbeitet, wobei jedesmal eine geringe Menge von Harnsäure (0,02—0,04 g im Milzextrakt, in Lunge und Leber bedeutend weniger) gefunden wurde. Ich habe daher auch ganz frische Organe nach Aufschluß mit 3%iger Schwefelsäure durch 4stündiges Kochen am Rückflußkühler auf Harnsäuregehalt untersucht und dabei höchstens minimale Spuren erhalten, meist aber ein negatives Resultat erzielt, ein Befund, der mit Stadthagens<sup>1)</sup> und Spitzers<sup>2)</sup> Angaben vom Fehlen der Harnsäure in frischen Organen gut zusammenstimmt. Die in den Extrakten gefundene Harnsäure muß daher bereits als während des Rührens gebildete aufgefaßt werden.

#### Versuch I. Milzextrakt.

a) Ohne Zusatz. Erhalten **0,081 g Harnsäure,**

b) Mit **0,2 g Guanin.** > **0,301 >**

0,116 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 27,6 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normal-Oxalsäure.

Berechnet für  $C_5H_4N_4O_3$ : 33,33% N

Gefunden : 33,31% >

Mithin waren **98,89%**<sup>3)</sup> des zugegebenen Guanins als Harnsäure wiedergefunden.

#### Versuch II. Milzextrakt.

a) Ohne Zusatz. Erhalten **0,1242 g Harnsäure,**

b) Mit **0,3 g Guanin.** > **0,3582 >**

Mithin **70,1%** des zugegebenen Guanins als Harnsäure wiedergefunden.

<sup>1)</sup> Virchows Arch., 1887, Bd. 109, S. 390.

<sup>2)</sup> l. c. S. 197.

<sup>3)</sup> Die Umrechnung von Guanin, Adenin und Hypoxanthin auf Harnsäure geschah unter Zugrundelegung der Molekulargewichte.

c) Mit **0,3 g Guanin**. Erhalten **0,3982 g Harnsäure**.

0,1153 g Substanz gaben 0,1509 g CO<sub>2</sub> und 0,0262 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Gefunden

35,71% C und 2,38% H

35,69% C und 2,52% H.

Es war demnach **82%** des zugegebenen Guanins als Harnsäure wiedergefunden.

#### Versuch III. Milzextrakt.

a) Ohne Zusatz.

Erhalten **0,1 g Harnsäure**

b) Mit **2,0 g a-thymonucleinsaurem Natrium**.

**0,360**

0,1551 g Substanz gaben 0,2026 g CO<sub>2</sub> und 0,0354 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Gefunden

35,71% C und 2,38% H

35,63% C und 2,54% H.

Es waren demnach **65,86%**<sup>1)</sup> der in dem thymonucleinsauren Natrium enthaltenen Basen als Harnsäure wiedergefunden.

c) Mit **0,2 g Adenin**. Erhalten **0,27 g Harnsäure**.

0,1451 g Substanz gaben 0,1904 g CO<sub>2</sub> und 0,0335 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Gefunden

35,71% C und 2,38% H

35,78% C und 2,56% H.

Es waren demnach **68,2%** des angewandten Adenins als Harnsäure wiedergefunden worden.

#### Versuch IV. Milzversuch.

a) Ohne Zusatz. Erhalten **0,078 g Harnsäure**.

Die vereinigten Harnsäuremengen aus den Milzversuchen ohne Zusatz wurden nach mehrmaligem Umkristallisieren analysiert.

0,1274 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 30,35 ccm  $n/_{10}$ -Normal-Oxalsäure.

Verlangt 33,33%

Gefunden 33,35%.

b) Mit **0,6 g Guanin**. Erhalten **0,53 g Harnsäure**.

0,1312 g Substanz verbrauchten 31,35 ccm  $n/_{10}$ -Norm.-Oxalsäure.

Verlangt 33,33%

Gefunden 33,45%.

Demnach waren **67,7%** des zugegebenen Guanins als Harnsäure wiedergefunden.

#### Versuch V. Milzversuch.

a) Ohne Zusatz.

Erhalten **0,035 g Harnsäure**,

b) Mit **2,0 g nucleinsaurem Natrium**.

**0,25**

Demnach waren **54,5%** der im zugegebenen nucleinsauren Natrium enthaltenen Purinbasen als Harnsäure wiedergefunden worden.

#### Versuch VI. Milzversuch.

Die Hälfte der frischen zerkleinerten Milz (400 g) mit 1000 ccm H<sub>2</sub>O kurz gekocht, auf 3000 ccm aufgefüllt, 2 Stunden gerührt. Von der Auf-

<sup>1)</sup> Zu 2 g thymonucleinsaurem Na sind, wie oben angegeben, 0,1316 g Purinbasenstickstoff enthalten; in dem Zuwachs an Harnsäure (0,26 g) sind 0,0867 g Stickstoff; folglich sind 65,85% des Purinbasenstickstoffs als Harnsäure wiedergefunden.

schwemmung 500 ccm mit 15 ccm  $H_2SO_4$  4 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Wie oben analysiert. Keine Harnsäure nachweisbar.

Der zweite Teil der Milz (400 g) wie gewöhnlich verarbeitet.

- a) Sofort nach dem Filtrieren (8 Stunden nach dem Tod des Tieres) auf Harnsäure verarbeitet. Erhaltene Menge = **0,035 g.**
- b) Sofort nach dem Filtrieren (wie a) 1 Stunde im Dampföfen auf  $100^\circ$  erhitzt. Dann 3 Tage unter Luftdurchleitung bei  $40-45^\circ$ . Erhaltene Harnsäuremenge = **0,025 g.**
- c) Ohne Zusatz. 3 Tage unter Luftdurchleitung bei  $40-45^\circ$ . Erhaltene Harnsäuremenge = **0,09 g.**

#### Versuch VII. Lungenextrakt.

- a) Nach dem Filtrieren sofort verarbeitet. Erhaltene Harnsäuremenge = **0,029 g,**
- b) Ohne Zusatz wie gewöhnlich angesetzt. Erhaltene Harnsäuremenge = **0,08 g,**
- c) Mit **0,25 g Hypoxanthin.** Erhaltene Harnsäuremenge = **0,25 g.**  
0,142 g Substanz verbraucht nach Kjeldahl 34,0 ccm  $n_{10}$ -Normal-Oxalsäure.

Gefunden für  $C_5H_4N_4O_3$ : 33,37% N.

Demnach waren **55,05%** des angewandten Hypoxanthins als Harnsäure wiedergefunden.

#### Versuch VIII. Leberextrakt.

- a) Ohne Zusatz. Erhaltene Harnsäure = **0,02 g.**
- b) Mit **2,0 g nucleinsaurem Natrium.** „ „ = **0,173 g.**  
0,1176 g Substanz verbraucht nach Kjeldahl 27,81 ccm  $n_{10}$ -Normal-Oxalsäure.

Gefunden für  $C_5H_4N_4O_3$ : 33,20%.

Demnach waren **38,7%** der im zugegebenen nucleinsauren Natrium erhaltenen Basen als Harnsäure wiedergefunden.

- c) Mit **0,25 g Guanin.** Erhaltene Harnsäure = 0,23 g.  
Demnach sind **75,54%** des angewandten Guanins als Harnsäure wiedergefunden worden.

Die mit Lunge und Leber angestellten Versuche sollen vorderhand nur erweisen, daß auch ihnen die Fähigkeit zukommt, Harnsäure zu bilden. Eine endgültige Entscheidung über den quantitativen Umfang derselben kann erst nach Beendigung darauf hinzielender Versuche, welche im Gange sind, mitgeteilt werden.

Zum Schlusse danke ich Herrn Geh. Rat Ebstein für das Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegenbrachte.