

Über die Umwandlung des Guanins im Organismus des Kaninchens.

Von

Alfred Schittenhelm und Ernst Bendix.

(Aus der Göttinger medizinischen Univ.-Klinik. Dir. Geh.-Rat. Prof. Dr. Ebstein.)

(Der Redaktion zugegangen am 30. November 1904.)

Ob freies Guanin im tierischen Organismus eine Umsetzung zu Harnsäure erfährt, ist zur Zeit eine noch offene Frage.

Kerner¹⁾ hat schon im Jahre 1857 darüber Versuche angestellt. An 2 Kaninchen verfütterte er innerhalb 4 Tagen 25 g Guanin, ohne danach eine Zunahme der Harnsäure im Urin nachweisen zu können. Diese Versuche sind jedoch insofern nicht einwandfrei, als die angewandte quantitative Harnsäurebestimmung nach Heintz und Schwanert geschah (Fällung durch Salzsäure). Später hat Stadthagén²⁾ 6 g Guanin an einen Hund verfüttert und danach weder die Harnsäure- noch die Purinbasenausscheidung im Urine vermehrt gefunden. Weitere Versuche sind von Burian und Schur³⁾ am Menschen angestellt worden. In einem Versuche verfütterten sie in 3 Tagen 7,1 g, im anderen 1,1 g Guanin, ohne danach eine Harnsäurevermehrung im Urin konstatieren zu können.

Krüger und Schmid⁴⁾ haben in einem Versuche am Menschen nach Darreichung von 0,61 g Guanin per os in einmaliger Dosis ein geringes Anwachsen der im Urin ausgeschiedenen Harnsäure gefunden. Die Mehrausscheidung betrug jedoch nur 0,0194 g, so daß die Verfasser selbst den Einfluß des Guanins auf die Harnsäureausscheidung nur für wahrscheinlich hielten und eine Wiederholung der Versuche für wünschenswert ansahen. Mit Recht konnte daher Minkowski⁵⁾ das Resultat der bisherigen Versuche dahin zusammenfassen, daß bisher eine Harnsäurebildung aus Guanin nicht einwandfrei erwiesen ist.

Ehe wir der Frage experimentell näher traten, suchten wir unter Ausschaltung aller Fehlerquellen die günstigsten Bedingungen für einen beweisenden Versuch aufzufinden. In einer Vorarbeit stellten wir beim Kaninchen fest, daß von zirkulierender Harnsäure höchstens 18% der Zerstörung entgingen und als solche im Urine ausgeschieden wurden. Übertragen wir dieses Resultat auf die Guaninversuche, so ist daraus ohne weiteres ersichtlich, daß von der aus dem Guanin etwa entstehenden Harnsäure nur dann deutlich nachweisbare Mengen ausgeschieden werden können, wenn das verabfolgte Guanin auch tatsächlich in genügender Menge — also mindestens in Grammen — an die harnsäurebildenden Stätten geführt wird.

Die Schwerlöslichkeit bzw. nahezu Unlöslichkeit des Guanins in den gewöhnlichen Lösungsmitteln macht daher vorstehendes Postulat nahezu unmöglich, wenn das Guanin per os verabfolgt wird. Schon Krüger und Schmid waren sich dieser Schwierigkeit bewußt und Walker Hall⁶⁾ brachte den experimentellen Beweis dafür, daß von dem per os verabreichten Guanin schon in den nächsten 18 Stunden 51% aus den Faeces als solches wiedergewonnen werden konnte. Wir glaubten also von vornherein eine Darreichung per os zur Entscheidung der Frage verwerfen zu müssen. Es blieb uns somit noch der subkutane und intravenöse Weg übrig.

Wir beschränkten zunächst den erstgenannten Weg. Selbstverständlich durfte das Guanin nur in gelöster Form zur Anwendung kommen, und so blieb bei seinen bekannten Lösungsverhältnissen nur die Natronlauge als Lösungsmittel übrig, da Kaninchen, unsere Versuchstiere, gegen Säuren bekanntlich überaus empfindlich sind. Das jedesmal zur Injektion kommende Guanin (0,3 g) wurde in der zur Lösung eben ausreichenden Menge von Normalnatronlauge (ca. 4 ccm) gelöst.

Versuch I.

Vier kräftige Kaninchen erhalten an vier Tagen je 0,3 g Guanin in obiger Lösung subkutan verabfolgt. Die gesammelte Urinmenge beträgt 800 ccm. Es wurde darin die Menge der Harnsäure und der Purinbasen nach Krüger und Schmid (vergl. Thierfelder-Hoppe-Seyler, S. 435) bestimmt.

Die Harnsäuremenge betrug:

0,2930 g.

Die Menge der Purinbasen, als Silbërniederschlag gewogen, betrug

0,1730 g.

Um nun vergleichsweise festzustellen, wie sich die Harnsäureausfuhr beim Kaninchen ohne Guaninzufuhr verhält und ob vor allem nicht die Natronlauge an sich eine beträchtliche Mehrausfuhr bedingt, machten wir folgenden Versuch, in dem gesunden Kaninchen gleiche Mengen Normalnatronlauge subkutan injiziert wurden.

Versuch II.

Zwei große Kaninchen erhalten an vier Tagen je 4 ccm Normalnatronlauge subkutan injiziert. Die gesammelte Urinmenge betrug 400 ccm. Es fand sich

0,0470 g Harnsäure.

Der Basenniederschlag mit ammoniakalischer Silberlösung war ein so minimaler, daß eine weitere Verarbeitung zwecklos erschien.

Berechnet man diese Harnsäuremenge auf die Verhältnisse des ersten Versuches, so ergibt sich 0,09 g Harnsäure.

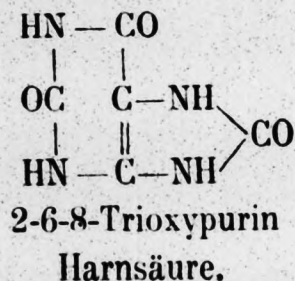
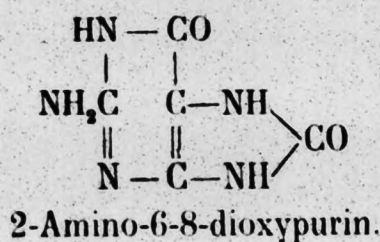
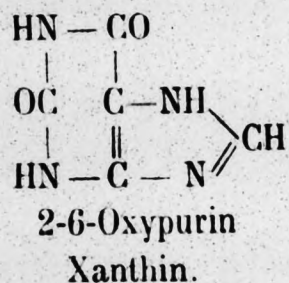
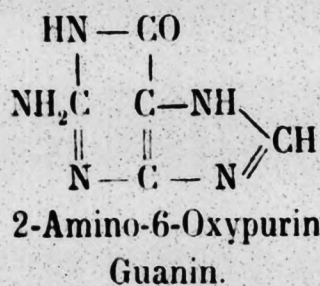
Es fand sich im Guaninversuche demnach mehr als dreimal soviel Harnsäure als im Kontrollversuche. Vor allem aber konnten aus dem Urin der Guanintiere noch relativ beträchtliche Mengen von Purinbasen isoliert werden im Gegensatze zum Kontrollversuch, in dem der Urin so gut wie basenfrei war.

Hieraus ergibt sich schon deutlich, daß subkutane Guaninzufuhr nicht nur die Harnsäureausfuhr erheblich vermehrt, sondern auch eine vermehrte Ausfuhr von freien Purinbasen zur Folge hat.

Der Nachweis der Purinbasenvermehrung ließ hoffen, daß bei zweckmäßiger Anordnung der Übergangskörper vom Guanin zur Harnsäure eventuell gefunden werden könnte. Wir hatten nun bei der subkutanen Anwendung des Guanins die Beobachtung gemacht, daß die Resorption des Guanins eine durchaus

unvollkommene ist. Denn mehrere Tage nach der Injektion fanden sich bei der Sektion der Tiere Guanindepots im Unterhautzellgewebe. Aus diesem Grunde schien uns die subkutane Darreichung des Guanins nicht genügend zu sein und wir glaubten daher, die intravenöse Applikation wählen zu müssen: denn nur bei dieser Anordnung ist die Garantie dafür gegeben, daß das verabreichte Guanin auch tatsächlich in den Stoffwechsel ohne Verlust eintritt; zugleich bietet diese Versuchsanordnung den Vorteil, daß der Organismus mit einem Schlage mit Guanin überschwemmt wird, und hierbei konnten wir hoffen, die besten Bedingungen zur Auffindung eines Übergangskörpers zu erhalten.

Bei Berücksichtigung der Konstitution des Guanins und von der Annahme ausgehend, daß in unserem ersten Versuche der Beweis für den Übergang desselben in Harnsäure erbracht ist, kommen als Übergangskörper nur das Xanthin und das 2-Amino-6-8-dioxyapurin in Frage, je nach dem Angriffspunkte und dem Verlaufe der Oxydation.



Nachdem Nicolaier⁷⁾ bei Ratten nachgewiesen hatte, daß das Adenin über das 6-Amino-2-8-Dioxyapurin abgebaut wird, lag der Gedanke nahe, daß bei dem Guaninabbau auch die Aminogruppe zunächst der Oxydation Widerstand entgegensetzt und der Angriffspunkt der Oxydation an C₈ des Purinrings liegt. So richteten wir unsere Aufmerksamkeit vor allem auf die Auffindung des 6-Amino-2-8-Dioxyapurins. Das Resultat entsprach jedoch diesem Analogieschlusse nicht.

Ehe wir auf unsere Versuche genauer eingehen, möchten wir die technischen Schwierigkeiten der intravenösen Guaninapplikation hervorheben. Zunächst machten wir die Erfahrung, daß nur ganz kräftige Kaninchen zu diesen Versuchen sich eigneten. Von der anfänglich geübten Einspritzung des Guanins als einer Emulsion in physiologischer Kochsalzlösung gingen wir bald ab, da nur wenige Tiere dem Tod infolge von Embolie entgingen. Wir wandten daher die gleiche Lösung wie bei den subkutanen Versuchen an, nämlich 0,3 g Guanin in 4—5 ccm Normalnatronlauge. Die Zeitdauer einer solchen einzelnen Injektion in die Ohrvene betrug immer 12—15 Minuten, nachdem wir bei rascherer Injektion die Erfahrung gemacht hatten, daß die Tiere daran zugrunde gingen. Auch bei den protrahierten Injektionen verloren wir noch viele Tiere — meist bei der ersten Injektion —, während einmaliges Überstehen einer Injektion in der Regel ein Zeichen dafür war, daß auch fernere Injektionen gut überstanden wurden.

Versuch III.

Vier großen Kaninchen wurden im ganzen 2,4 g Guanin durch Injektion in die Ohrvene beigebracht. Der gesammelte Urin betrug 850 ccm.

Die gesamten Purinkörper wurden als Kupferoxydulsalze isoliert und nach der Zersetzung mit H_2S wurde das Filtrat salzsauer bis auf 50 ccm eingedampft. Nach 3—4stündigem Stehen wurde die ausgefallene Harnsäure abgesaugt, mit Alkohol, Äther, CS_2 und wieder mit Äther behandelt; die Menge der bei 100° getrockneten Harnsäure betrug:

0,312 g.

Typische Kristallform und intensive Murexidprobe.

Die noch stark braun gefärbte Harnsäure wurde nach Horbaczewski gereinigt; nunmehr betrug ihr Gewicht

0,252 g.

Zur Analyse wurde die Harnsäure nochmals in der nötigen Normalnatronlauge gelöst, mit Tierkohle entfärbt und mit HCl ausgefällt.

0,1140 g Substanz verbrauchten 27,2 ccm $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure.

Verl.: 33,33 % N.

Gef.: 33,40 % N.

Aus den einzelnen Filtraten der Harnsäure wurden die zurückgebliebenen Purinkörper nach Neutralisation mit NaOH durch Silberfällung isoliert. Die Silbersalze wurden mit HCl zerlegt und mit dem Filtrat nochmals eine Kupferfällung vorgenommen. Nach Zerlegung mit H_2S wurde die nunmehr wasserklare Basenlösung zur Trockene eingedampft. Die so erhaltene Menge der reinen Purinbasen betrug nur einige Zentigramm. Sie gab keine Murexidreaktion, dagegen in typischer Weise alle 3 Xanthinproben (Thierfelder-Hoppe-Seyler, S. 143). Zur weiteren Identifikation wurde der Rest auf bekannte Weise in salpetersaure Salz verwandelt; nach längerem Stehen schieden sich die schweren Kristalle des Xanthinnitrats aus, welche die charakteristische Form zeigten.

Versuch IV.

8 Kaninchen wurden 4,8 g Guanin in Normalnatronlauge wie oben gelöst intravenös beigebracht. In dem aufgefangenen Urin wurden täglich Kupferfällungen gemacht. Die gesammelten Kupferniederschläge wurden bis zur neutralen Reaktion gewaschen und mit H_2S zersetzt. Zur Vermeidung von Verlusten wurde das Schwefelkupfer nochmals in heißem Wasser suspendiert und mit H_2S behandelt. Die vereinigten wasserklaren Filtrate wurden zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wurde zur Trennung von der Harnsäure nach Horbaczewski behandelt. Nach 4stündigem Stehen wurde die ausgefallene Harnsäure abfiltriert und unter Anwendung von wenig Tierkohle durch Lösung in NaOH und wieder Fällung durch HCl gereinigt. Die bei 100° getrocknete Harnsäuremenge betrug

0,231 g.

0,10 g Substanz verbrauchten 23,8 ccm $\frac{1}{10}$ Normaloxalsäure.

Gef.: 33,32 % N.

Das Filtrat wurde nochmals wie oben mit der Kupfersulfatbisulfidfällung behandelt. Die aus der Kupferfällung nach Einwirkung von H_2S erhaltene klare Lösung der Purinkörper

wurde salzsauer auf ca. 30 ccm eingeeengt und stehen gelassen. Nach ca. 5 Stunden hatte sich daraus ein kristallinischer Niederschlag abgeschieden, der abfiltriert und mit HCl-haltigem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen wurde. Nach dem Trocknen bei 100° war sein Gewicht

0,130 g.

Der Körper gab intensive Murexidprobe. Er wurde durch Lösung in Natronlauge mit etwas Tierkohle gereinigt und mit HCl wieder gefällt.

0.0911 g Substanz verbrauchten 22,0 ccm $\frac{1}{10}$ Normaloxalsäure.

Gefunden 33,81 % N.

Daraus ergibt sich, daß dieser Körper aus Harnsäure bestand, dem noch Spuren eines N-reicheren Purinkörpers anhafteten.

Durch weiteres Einengen des Filtrates wurden nochmals **0,065 g** eines die Murexidprobe intensiv gebenden Körpers erhalten, dessen Kristallformen wiederum für Harnsäure sprachen.

Aus dem zurückbleibenden Filtrat wurden die Purinkörper mit der Silberfällung herausgeholt, die Silbersalze mit H_2S zerlegt und das klare Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde zur Beseitigung etwa anhaftenden Schwefels mit Schwefelkohlenstoff und dann mit Äther gewaschen und bei 100° getrocknet.

Erhalten **0,0765 g.**

Dieser Körper gab keine Murexidprobe mehr: dagegen war die Xanthinprobe positiv.

0.0665 g Substanz verbrauchten 17,3 ccm $\frac{1}{10}$ Normaloxalsäure.

Verl.: für $C_5H_4N_4O_2$: 36,84 % N.

Gef.: 36,42 % N.

Es waren also bei diesem Versuch **0,426 g** Harnsäure und **0,0765 g** Xanthin erhalten worden.

Alle drei Guaninversuche haben somit gemeinsam, daß in ihnen Harnsäurewerte gefunden wurden, welche die im normalen Kaninchenurin gefundenen Werte weit übertreffen. Durch diese Versuche muß daher als bewiesen angesehen werden, daß der Organismus des Kaninchens imstande ist, die Umwandlung des Guanins in Harnsäure zu bewirken. Wenn man

die Erfahrungen unserer früheren Versuche,⁸⁾ durch welche die schnelle und ausgiebige Zerstörung zirkulierender Harnsäure im Kaninchenorganismus festgestellt wurde, auf vorliegende Versuche überträgt, folgt daraus rücksichtlich der quantitativen Verhältnisse der Schluß, daß der größte Teil des Guanins in Harnsäure umgewandelt worden ist, da nämlich die gefundenen Harnsäuremengen nur einen relativ kleinen Prozentsatz der im Organismus tatsächlich gebildeten Harnsäure ausmachen können.

Außer der Harnsäure haben wir nicht unbeträchtliche Mengen einer Purinbase gefunden. Zur Anstellung einer vollständigen Elementaranalyse war die Menge zu gering. Da jedoch der N-Gehalt für Xanthin stimmte, die bekannten Xanthinproben in charakteristischer Weise verliefen und das Nitrat die charakteristische Kristallform zeigte, so stehen wir nicht an, den Körper für Xanthin anzusprechen.

Nach unseren orientierenden Versuchen finden sich im normalen Kaninchenurin keine oder höchstens Spuren von Purinbasen, und auch Krüger,⁹⁾ welcher größere Mengen von Kaninchenharn auf Xanthin speziell untersuchte, konnte die Abwesenheit desselben feststellen. Es ist daher klar, daß das Xanthin als Zwischenkörper bei der Umwandlung des Guanins in Harnsäure aufzufassen ist. Krüger und Salomon¹⁰⁾ haben in ihren bekannten Untersuchungen über die Natur der Purinbasen im menschlichen Urin unter anderem feststellen können, daß derselbe kein Guanin — wohl aber Xanthin enthält. Zwischen diesem und unserem Ergebnis besteht insofern eine gewisse Übereinstimmung, als Guanin kein Bestandteil des Urins ist — selbst dann nicht, wenn der Organismus mit Guanin überschwemmt wird. Daß ein Teil des im menschlichen Urin vorkommenden Xanthins seine Herkunft dem Guanin verdankt, scheint nach unseren Versuchsergebnissen nicht unwahrscheinlich, da der menschliche Organismus dem Kaninchenorganismus in bezug auf den Purinkörperstoffwechsel nahe steht.

Es besteht also offenbar keine Analogie mit dem Abbau des Adenins, da es nach unseren Versuchen so gut wie sicher ist, daß wenigstens beim Kaninchen ein Übergang des Guanins in 2-Amino-6-8-dioxypurin nicht stattfindet.

Durch A. Schittenhelm¹¹⁾ ist der Beweis erbracht worden, daß mittelst isolierter Fermente in der Retorte die Umwandlung des Guanins zur Harnsäure über das Xanthin stattfindet. Vorstehende Untersuchungen stehen in vortrefflicher Übereinstimmung mit diesem Resultate.

Literatur.

1. Kerner, *Annalen d. Chem. u. Pharm.*, Bd. 103, S. 249.
2. Stadthagen, *Virchows Arch.*, Bd. 109, S. 416.
3. Burian u. Schur, *Pflügers Arch.*, Bd. 80, S. 317.
4. Krüger u. Schmid, *Diese Zeitschrift*, Bd. XXXIV, S. 549.
5. Minkowski, *Die Gicht*. Wien 1903 (Nothnagels Sammelwerk).
6. Walker Hall, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, März 1904, S. 246.
7. Nicolaier, *Zeitschrift f. klin. Med.*, Bd. 45, S. 359.
8. Bendix u. Schittenhelm, *Diese Zeitschrift*, Bd. XLII, S. 461.
9. Krüger u. Schmidt, *Berichte d. deutschen chem. Ges.* 1899, Bd. 32, S. 2680.
10. Krüger u. Salomon, *Diese Zeitschrift*, Bd. XXVI.
11. Schittenhelm, *Diese Zeitschrift*, Bd. XLIII, S. 228.