

Über die Hemmung enzymatischer Reaktionen durch Harn.

Von

Hans Euler und Olof Svanberg.

Mit 2 Abbildungen.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. November 1916.)

Das biochemische Studium der Zuckerkrankheit muß einerseits dahin zielen, die anormalen Begleiterscheinungen der Glykosurie festzustellen und sie mit der Störung des Zuckerabbaus im Tierkörper in Verbindung zu setzen.

Andererseits wird man versuchen, die Ursachen der primären Störung festzustellen, welche den Zuckerumsatz hemmen.

Schon mehrfach ist die Annahme geäußert worden, daß beim Diabetes ein oder mehrere derjenigen Enzyme, welche den Zuckerabbau bewirken, nicht in normaler Weise funktionieren.¹⁾ Man kann annehmen, daß die Bildung dieser Enzyme mehr oder weniger vollständig ausbleibt, oder aber, daß diese Enzyme in ihrer Wirksamkeit durch Paralysatoren oder Gifte gehemmt werden. Ist letzteres der Fall, so ist es wenigstens nicht ausgeschlossen, daß es gelingt, eine den Zuckerabbau des Tierkörpers spezifisch hemmende Substanz im ausgeschiedenen Harn nachzuweisen. Der Nachweis wird zunächst in der Weise geführt werden, daß untersucht wird, in welchem Grad enzymatische Reaktionen durch den Harn gehemmt werden.

Im normalen Harn sind bis jetzt mehrere Enzyme mit Sicherheit nachgewiesen worden.

Bereits 1861 fand Brücke, daß normaler Harn in saurer Lösung Fibrin verdaut; eine quantitative Schätzung dieser

¹⁾ Euler und Funke, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 496, 1912.
— Embden und Mitarbeiter, Diese Zeitschrift, Bd. 93, S. 5, 1914. —
Jacoby, Deutsche med. Wochenschr., Bd. 42, S. 478, 1915.

Wirkung konnte Grützner mit seinen Schülern 1882—1887 unternehmen. Matthes¹⁾ erkannte dieses Enzym als Pepsin. Weitere Versuche in neuerer Zeit verdankt man Wilenko, Brodzki und Benfey. Das Pepsin wird vermutlich in Zymogenform ausgeschieden.²⁾

Wilenko (Berl. klin. Woch. 1908) untersuchte die Pepsinausscheidung in drei Fällen von Diabetes und fand bei dieser Krankheit die Pepsinausscheidung nicht immer vermehrt, wenn man den 24-stündigen Urin bearbeitet.

Auch Trypsin ist, obwohl weniger oft, im Harn nachgewiesen worden. Zuerst von Hoffmann, später von Bergmann und Bamberg, welcher auch zeigte, daß dieses Enzym im aktiven Zustand vorkommt, daß aber Protrypsin bezw. ein aktivierbares Zymogen im Harn nicht existiert.

Seltener als die genannten Fermente findet sich im menschlichen Harn das Labferment, welches darin von Grützner aufgefunden wurde, aber nach Untersuchungen von Boas nicht regelmäßig darin vorkommt.

Auch über die Ausscheidung einer Lipase im Harn liegt nur eine einzige Beobachtungsreihe vor, sodaß darüber noch sichere Anhaltspunkte fehlen.

Am besten untersucht unter den Harnenzymen ist die Amylase, deren Vorkommen im menschlichen Urin J. Cohnheim 1863 aufgefunden hat. Sie ist seither mehrfach sehr eingehend durch Grützner und seine Schüler, ferner von Holoschtiner, von Leo und besonders von Wohlgemuth³⁾ studiert worden.

Was in diesem Zusammenhang besonders interessiert, ist die Veränderung der Amylaseausscheidung bei Diabetes. Leo glaubt den Nachweis geführt zu haben, daß bei Diabetes der Amylasegehalt des Harns bedeutend höher ist, als beim gesunden Menschen. Zum gleichen Resultat kam Bendersky⁴⁾

¹⁾ Matthes, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 49, 1902.

²⁾ Vgl. hierzu: Fuld und Hirayama, Berl. klin. Wochenschr., Bd. 47, S. 1062, 1910.

³⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr., Bd. 21, S. 427, 1909.

⁴⁾ Virchows Arch., Bd. 121, S. 554, 1890.

und Nigay,¹⁾ während Lépine²⁾ bei Diabetes eine Verminderung der Diastase fand. Auch Wohlgemuth³⁾ konstatierte eine auffallend geringe Diastasemenge bei Diabetes.

In welcher Weise diese Diastasewirkungen bereits durch Antikörper beeinflusst sind, wurde in der Literatur nie besprochen und ließ sich auch bis jetzt nicht entscheiden.

Antikörper im Urin.

Anhaltspunkte über Antikörper liegen bisher nur vereinzelt vor.

Döblich⁴⁾ konnte eine allerdings geringe antitryptische Wirkung des Urins nachweisen. Ob ein organisches Gift oder ein anderer Hemmungskörper diese Wirkung verursacht hat, läßt sich nicht angeben. Jedenfalls war dasselbe hitzebeständig und nicht dialysierfähig. Es ist anzunehmen, daß die antitryptische Wirkung von einem Kolloid ausgeübt wird, inwiefern ein solches aber spezifisch auf Trypsin wirkt, ist nicht festgestellt. Nach Schipper⁵⁾ wäre anzunehmen, daß es sich um nicht spezifische Enzymhemmungen verschiedener Art handelt.

Das zweite Antienzym des Harns, dessen Vorkommen angenommen wurde, ist die Antiurease, welche Moll⁶⁾ im normalen Kaninchenharn fand. Auch hier ist über die Natur dieses Hemmungskörpers noch nichts Näheres festgestellt.

In diesem Zusammenhang mag auch eine Beobachtung von Fuld und Hirayama⁷⁾ erwähnt werden. Wenn man eine Pepsinogenlösung mit einem Carcinomurin mischt, und den Titer sofort und nach mehrtägiger Digestion bestimmt, so findet man mit der Zeit einen Rückgang, während der unver-

¹⁾ Soc. de Biol., Bd. 64, S. 793, 1908.

²⁾ Lépine, Compt. rend., Bd. 113, S. 1014, 1891.

³⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr., Bd. 21, S. 437, 1919. Bei Nephritis ist der Diastasegehalt des Urins nach Angabe von Wohlgemuth vermindert (Berl. klin. Wochenschr., Bd. 47, S. 1444, 1910).

⁴⁾ Döblich, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 4, S. 224, 1909.

⁵⁾ Schipper, Deutsch. med. Wochenschr., Bd. 36, Nr. 45, 1910.

⁶⁾ Moll, Hofmeisters Beitr., Bd. 2, S. 344, 1902.

⁷⁾ Fuld u. Hirayama, Berl. klin. Wochenschr., Bd. 47, S. 1062, 1910.

mischte aufbewahrte Urin seine anfängliche Wirksamkeit unverändert beibehält. Diese Erscheinung wäre eventuell durch das Auftreten eines Antikörpers zu erklären, wenn auch Fuld selbst keine das Pepsinogen zerstörende besondere Substanz annimmt.

1. Versuche mit Invertase.

Um nachzuweisen, ob überhaupt Enzymgifte im Harn zuckerkranker Personen vorhanden sind, wurde zunächst untersucht, ob und in welchem Umfange im Diabetiker-Harn eine Hemmung eines kohlenhydratspaltenden Enzymes eintritt. Es wurde die Invertase gewählt, wegen der Genauigkeit, mit welcher diese Enzymwirkung festgelegt werden kann.

Das Enzym wurde aus Hefe in üblicher Weise durch Extraktion gut gewaschener und dann getrockneter Zellen gewonnen. Die Lösung wurde bis zur vollkommenen Klärung filtriert und mit Wasser so weit verdünnt, daß ein geeigneter Wirksamkeitsgrad erreicht wurde.

Es wurde also in den folgenden Versuchen Rohrzucker durch Invertase gespalten mit und ohne Zusätze von Urin. Die Wirksamkeit des Enzyms wurde quantitativ bestimmt durch die Ermittlung der Geschwindigkeit der Inversion, für welche sich bekanntlich eine Konstante nach der Formel

$$kt = \ln \frac{a}{a-x}$$

berechnen läßt, wenn man dem Gang der Zuckerspaltung mittels einer geeigneten Methode, z. B. durch polarimetrische Beobachtungen, folgt.

Eine Verminderung der Inversionskonstanten durch Urinzusatz bedeutet also die Hemmung (Vergiftung) eines Teiles des Enzymes, welcher sich unmittelbar aus den berechneten Konstanten ergibt.

Zur Methodik ist folgendes zu bemerken:

Es wurden gemischt:

- 20%ige Rohrzuckerlösung
- 5 „ Lösung von KH_2PO_4
- Wasser bzw. Harn
- Invertaselösung.

Da bekanntlich nach Sörensen u. a. die Inversionsgeschwindigkeit stark von der H-Konzentration abhängt, muß für eine bestimmte und konstante Acidität gesorgt werden. Dies geschieht am besten durch den hier angewandten Zusatz des sauren Natriumphosphates.

Da ferner nach Hudson bei der enzymatischen Spaltung des Rohrzuckers α -Glykose entsteht, muß die Einstellung der Enddrehung bewirkt werden. Dies geschieht dadurch, daß die zu untersuchenden Proben mit einer 5%igen Sodalösung alkalisch gemacht werden; hierdurch wird gleichzeitig die Reaktion abgebrochen. Bezüglich der Versuchsanordnung im übrigen kann auf frühere Arbeiten verwiesen werden. Die Ablesung der Drehung geschah in einem Polarisationsapparat im 1 dm-Rohr bei 18°.

Bei Berechnung der Konstanten wurde der Endwert der Linksdrehung, L, für jede Zuckerlösung aus der Rechtsdrehung R der angewandten Zuckerlösung nach der Formel berechnet:

$$L = R (0,44 - 0,005 t)$$

wo t die Temperatur der Lösung bei der polarimetrischen Ablesung bedeutet.

Im Anhang zu dieser Arbeit findet man die Beobachtungen angegeben, welche zur Ermittlung der im Text mitgeteilten Konstanten geführt haben.

Ergebnisse.

Bereits der erste Versuch zeigte eine bedeutende Hemmung, welche durch den Harn einer zuckerkranken Patientin, Olga Ohl., erzielt wurde. Zuckergehalt dieses diabetischen Urins im Mittel 3%; tägliche Zuckerausscheidung 45 g; tägliche Harnmenge 1500 ccm.

Die Mischung, in welcher die Inversion vorging, war folgende:

- 10 ccm 20%ige Rohrzuckerlösung,
- 10 „ 5 „ Lösung von KH_2PO_4 ,
- 20 „ Wasser bzw. Harn,
- 20 „ Invertaselösung.

Versuch 1.

Invers.-Konst.	proz. Erniederung
Wasser 237	
Harn Olga Ohl. 138	58

Beim zweiten Versuch wurden nur 10 ccm Invertaselösung angewandt, sodaß 50 ccm Mischung entstanden.

Versuch 2.

Invers.-Konst.	proz. Erniederung
Wasser 127	
Diabetes-Patient: Jon. . 77	60,6
zuckerfreier Normalharn 50	39,4

Der Diabetes-Patient hatte eine tägliche Zuckerausscheidung von 165 g; tägliche Harnmenge im Mittel 3000 ccm.

Es ist hier zunächst besonders zu beachten, daß die Hemmung durch den zuckerfreien Urin stärker war als durch den zuckerhaltigen. Da die mittlere Tagesquantität des betreffenden Patienten 3000 ccm beträgt, konnte dies auf der größeren Verdünnung der hemmenden Substanz in diesem Harn beruhen.

Es wurde nun zunächst untersucht, welche der normalen Harnbestandteile diese Wirkung hervorbringen können.

Ein Vergleich mit einer 2%igen wässerigen Lösung von Harnstoff ergab, daß dieser Körper eine derartige Wirkung nicht hervorruft. Es betrug nämlich die Konstante $K \cdot 10^{-4}$ (Versuch 3): mit Wasser 161, mit Harnstofflösung 154.

Ein ebenso negatives Resultat wurde erhalten, als der Vergleich zwischen reinem Wasser und einer Harnstofflösung angestellt wurde, welche mit Harnsäure gesättigt war. Die Konstanten betrugten nämlich (Versuch 4)

mit Wasser 73, Lös. v. Harnsäure 70.

Auch andere organische Harnbestandteile erzeugten in der Menge, in welcher sie natürlich vorkommen, keine Wirkung. So ergab sich (Versuch 5):

Wasser	150
0,05 g Kreatinin	152
0,05 g Kreatin .	150

Es wurde nun ein Vergleich mit einer Lösung ausgeführt, welche der Zusammensetzung des Harns entspricht. Sie enthielt in 250 ccm Wasser (Versuch 6):

2,3 g NaCl	0,1 g CaCl ₂ (wasserfrei)
0,9 g K ₂ SO ₄	0,2 g MgCl ₂ kryst.
0,4 g KH ₂ PO ₄	5,0 g Harnstoff
mit Wasser	127
Salzlösung entspr. Urin	99

Wie ersichtlich, ist auch hier die Erniedrigung bedeutend geringer als diejenige, welche mit natürlichem Harn erreicht wird. Die letzteren Versuche wurden noch durch folgende Einzelbestimmungen ergänzt (Versuch 7):

Wasser	101
0,020 Calciumchlorid, wasserfrei	101
0,080 kryst. Magnesiumchlorid .	98

Das gleiche Ergebnis zeigte Versuch 8.

Wasser . .	118	0,472 g NaCl	} 105
0,472 NaCl	104	0,02 g CaCl ₂	

Der angewandte, zuckerfreie «Normalurin» hatte eine ganz leicht alkalische Reaktion. Wir wollten uns durch einen besonderen Versuch überzeugen, daß der Zusatz von Phosphatlösung bei unseren Versuchen hinreichend war, um den geringen Aciditätsunterschied gegen die neutrale Wasserlösung auszugleichen. (Versuch 9.)

50 ccm Normalurin wurden mit 0,7 ccm einer 4-norm. Salzsäurelösung auf einen solchen Säuregrad gebracht, daß die Mischungen Wasser—Phosphat und Urin—Phosphat gleich sauer waren; es entsprach die Acidität in beiden Fällen dem Exponenten $p_H = 4,8$.

Bei dieser Versuchsreihe wurde für $K \cdot 10^4$ erhalten

Wasser . . .	182
Urin $p_H = 4,8$	73
Urin $p_H = 5,6$	69

Dies zeigt, daß die Unterschiede der Acidität, welche im Verlauf der Untersuchung bei Anwendung verschiedener Urine auftraten, einen so geringen Einfluß auf die erhaltenen Inversions-

konstanten hatten, daß dieselben nicht in Betracht gezogen zu werden brauchen. Die Aciditäten schwankten bei den verschiedenen sonstigen Versuchen zwischen $p_H = 4,8$ und $5,4$.

Es wurden als wirksame Substanzen bei der gesuchten Giftwirkung nun die Gallensäuren in Betracht gezogen. Bei der in unseren Versuchslösungen herrschenden Acidität ist die Löslichkeit sowohl der reinen Gallensäuren, wie Cholsäure, als auch der natürlichen Gemische aus Gallensteinen außerordentlich gering, und es wurde aus diesem Grunde keine Giftwirkung erzielt. (Versuch 10.)

Daß Gallenstoffe an dem hier studierten Effekt wesentlich beteiligt sind, war schon dadurch unwahrscheinlich geworden, daß der Harn eines stark an Ikterus leidenden Diabetikers — (G. O. Fors.), welcher uns vom Chef der inneren Abteilung des hiesigen Serafimer-Lazarettes, Prof. I. Holmgren, zur Verfügung gestellt wurde — keine wesentlich höhere Giftwirkung zeigte als normaler Harn. Im Versuch 11 erhalten wir für $K \cdot 10^4$:

Wasser 20,3 Urin 4,1.

Beim Vergleichsversuch 12 mit Normalurin ergab sich:

Wasser 74 Urin 18.

Dies entspricht einer Hemmung auf 20% bzw. 24%.

Über den Einfluß der Harnfarbstoffe gibt der folgende Versuch einen Anhalt.

Normaler Harn wurde dreimal mit der doppelten Menge Chloroform im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Hierauf wurde das Chloroform abgelassen und schließlich aus der wässrigen Lösung durch Einleiten von Luft entfernt.

Der so behandelte Harn wurde mit unbehandeltem verglichen. Es zeigte sich hierbei, daß die hemmende Wirkung des normalen Harns nicht bedeutend abgenommen hatte. Für $K \cdot 10^4$ erhielten wir (Versuch 13):

Extrahierter Harn: 46. Nicht extrahierter Harn: 29.

Um Anhaltspunkte über den Lösungszustand der wirksamen Substanz zu gewinnen, wurde untersucht, ob dieselbe durch Tierkohle absorbiert wird. Es wurden ca.: 75 ccm Urin mit 2 g Tierkohle auf 80° während 2 Stunden erhitzt,

und nach Abkühlung und Filtration der Kohle wie früher untersucht, bezw. mit Wasser verglichen. Versuch 14:

Vorbehandelter Normalurin $K \cdot 10^4 = 26$

Wasser 40.

Das entspricht einer Hemmung auf 65%.

Eine starke oder gar vollständige Absorption wurde durch die Behandlung mit der Tierkohle, trotz des großen Überschusses dieses absorbierenden Mittels über die vermutliche Menge des Giftes nicht erzielt. Dies schließt zwar die Kolloidnatur des Giftes nicht ganz aus, macht sie aber immerhin weniger wahrscheinlich.

Andererseits zeigten Dalysiersversuche, daß die hemmende Substanz nur in sehr geringem Grade Pergament- und Kolloidium-Membrane passiert.

Nach 20stündiger Dialyse von 50 ccm Harn gegen fließendes Wasser wurde dieses in der gewöhnlichen Weise untersucht¹⁾ und verglichen. Es ergab sich eine Hemmung von 112 auf 58, d. h. bei Korrektur wegen der Volumvergrößerung auf 45%.

Wie der folgende Versuch 15 zeigt, ist die gesuchte Substanz kochbeständig, also kein Eiweißkörper. Der Urin wurde während einer $\frac{1}{2}$ Stunde auf 98° erhitzt und nach dem Abkühlen mit dem nicht erhitzten Urin verglichen. Versuch 15:

Normalurin unerhitzt $K \cdot 10^4 = 115$

Normalurin erhitzt 103

Wasser 185.

Die Bindung zwischen dem untersuchten Hemmungskörper und dem Gift scheint sich sofort vollständig herzustellen; jedenfalls tritt die Hemmung innerhalb weniger Minuten ein, und eine längere Einwirkung des Giftes auf die Invertase ist jedenfalls von keiner Steigerung der Giftwirkung begleitet,

¹⁾ Bei diesen Versuchen wurde die auffallende, noch weiter zu verfolgende Beobachtung gemacht, daß der dialysierte Urin, welcher selbst keine optische Drehung zeigte, die spezifische Drehung der Glukose in Gegenwart von Phosphat erniedrigte.

eine Inkubationszeit läßt sich also nicht feststellen. (Versuch 16):

Wasser $K \cdot 10^4 = 44$
 Urin unmittelbar zugesetzt 22
 Urin 2ständiger Einwirkung auf Invertase 21.

Der folgende Versuch deutet darauf hin, daß die hemmende Substanz in die Oberfläche der lebenden Hefezellen eindringt. Wie der eine von uns früher gezeigt hat,¹⁾ läßt sich die Inversion des Rohrzuckers durch lebende Hefe quantitativ ebenso genau messen wie diejenige durch extrahiertes Enzym; auch diese Inversion durch lebende Hefe wird durch das untersuchte Harngift gehemmt. (Versuch 17.)²⁾

Der Versuch wurde in folgender Weise angestellt:

70 ccm Wasser bzw. Harn
 20 ccm Phosphatlösung
 10 g Rohrzucker
 —————
 90 ccm Mischung.

Jeder Versuchskolben enthielt 20 ccm dieser Mischung + 0,1 g lebende Hefe. In jedem Kolben wurde die Inversion durch 10 ccm 10%iger Sodalösung abgebrochen. Ein solcher Versuch ergab:

Wasser 24,3
 Normalurin 11,8

Es trat also eine Erniedrigung auf 47% ein.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 71, S. 14, 1911.

²⁾ Die alkoholische Gärung der Glukose durch lebende Hefe wurde dagegen durch die von uns untersuchten Harne — sowohl normale als diabetische — nicht beeinflusst.

0,5 g frische Brauerei-Unterhefe wurde in einer Mischung von 10 ccm 5%iger KH_2PO_4 -Lösung und 50 ccm Wasser bzw. Urin aufgeschlämmt, welcher 4 g Glukose zugesetzt waren. Die Kohlensäureentwicklung wurde volumetrisch verfolgt. Temp. 25°.

Minuten	Harnversuch	Wasserversuch
30	6,2 ccm CO_2	8,7 ccm CO_2
60	11,0 „ „	13,5 „ „
120	24,4 „ „	22,2 „ „
150	29,5 „ „	29,0 „ „
180	36,3 „ „	35,8 „ „

Mit der Zuckerausscheidung bei Diabetes mellitus hängt weder das Auftreten eines Hemmungskörpers im Urin noch der Grad der Hemmung zusammen; bei den von uns untersuchten Fällen hemmt der zuckerfreie Urin meist stärker als derjenige von zuckerkranken Personen männlichen oder weiblichen Geschlechtes, wie folgende Zusammenstellung zeigt:

Ursprung des Urins	Versuch	Zucker- gehalt %	Urin- versuch	Parallel- versuch	%
Normalurin O. S.	2, 9, 12, 13	—	Mittel		68
Patient Olga Ohl. ¹⁾	1	2	138	237	42
• Nord	19	3,2	39	96	59
• Sigfrid Ohl.	18	—	14	46	69
• Knut Törng.	18	3,5	18	46	61
• Gustaf O. Forsl.	11	6	4,1	20,3	80
• Anders G. Jon.	12	4,5	32	74	57

Die Versuche 2, 9, 12, 13 mit Normalurin zeigen, daß zu verschiedenen Tagen und Tageszeiten gewonnener Urin einer gesunden Person hinsichtlich der untersuchten Hemmung recht erheblich schwankt, was nicht auffallend ist, da ja der Gehalt fast aller normalen Urinbestandteile täglichen Schwankungen unterworfen ist.

Wir wollen bei dieser Gelegenheit bemerken, daß wir einstweilen nur die unter analogen Bedingungen gewonnenen Hemmungswirkungen quantitativ vergleichen. Wir können aus unseren Zahlen noch nicht auf die relative Giftmenge in den betreffenden Urinproben schließen, da noch nicht festgestellt worden ist, ob Giftwirkung und Giftmenge proportional sind, bzw. in welcher Weise die Hemmung von der Menge Gift und der Menge Enzym abhängt.

Die gefundene Hemmung der enzymatischen Zuckerinversion veranlaßte uns, zu untersuchen, ob auch andere Enzyme durch den gleichen Harnbestandteil inaktiviert werden. Diese Versuche haben bis jetzt nur orientierenden Charakter.

¹⁾ Bei diesem Versuch war die Urinkonzentration geringer (20 ccm auf 60 ccm Mischung, siehe Tabelle).

2. Hemmung der Katalase.

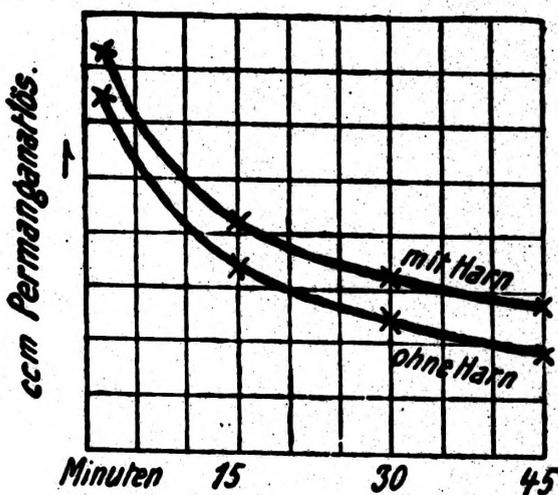
Wir arbeiteten mit Katalase aus Hefe und untersuchten die Verzögerung, welche die enzymatische Spaltung von Wasserstoffsperoxyd durch Zusatz von Urin erfährt.

Es wurden gemischt:

- 5 ccm Katalaselösung, verdünnt
- 5 ccm 10%ige H_2O_2 -Lösung
- 20 ccm Wasser bezw. Harn

Aus dieser Mischung wurden von Zeit zu Zeit Proben von je 5 ccm entnommen und mit 0,10 norm. Permanganat titriert.

Minuten	Verbraucht Kubikzentimeter $KMnO_4$ per ccm Lösung		
	Wasserversuch	Harnversuch	Harnversuch kor.
2	1,32	1,52	1,44
15	0,70	0,90	0,82
30	0,50	0,72	0,64
45	0,38	0,64	0,56



Der in den titrierten Proben enthaltene Harn ($\frac{2}{5}$ ccm) verbrauchte selbst 0,08 ccm Permanganatlösung.

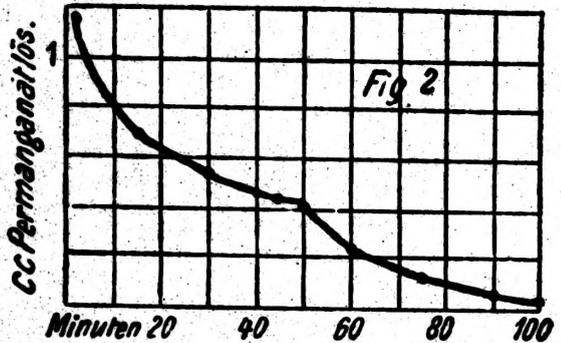
Die Hemmung durch den Harn wird aus obiger Tabelle und aus Fig. 1 ersichtlich. Sie beträgt rund 25%, ist also schwächer als die

Hemmung der Invertase, aber doch deutlich nachweisbar. Besondere Versuche zeigten, daß diese Hemmung nicht durch den Harnstoff und die anorganischen Salze des Harns hervorgerufen wird.

Bei obigem Versuch wird die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds sehr langsam, bevor alles Superoxyd verbraucht ist. Wie der folgende Versuch zeigt, rührt dies davon her, daß während der enzymatischen Reaktion das Enzym selbst zerstört wird.

Setzt man nach einiger Zeit neues Enzym zu, so geht die Zersetzung weiter.

Gemischt: 10 ccm Katalaselösung + 8 ccm 10%ige H_2O_2 -Lösung + 40 ccm Harn.



Die Proben wurden wie beim ersten Versuche behandelt. Nach Verlauf der 45 Minuten langen ersten Periode wurden noch 5 ccm Katalaselösung der Versuchsflüssigkeit gegeben und fünf weitere Proben genommen.

Zeit in Minuten	Kubikzentimeter Permanganat	Permanganatverbrauch des Harnes in entsprechenden Konzentrationen	Differenz
2	1,24	0,08	1,16
15	0,78		0,70
30	0,62		0,54
45	0,54		0,46
50	0,44	0,50	0,43
60	0,28	0,32	0,25
75	0,17	0,19	0,12
90	0,12	0,14	0,07
105	0,09	0,10	0,03

$\times \frac{(58-20) + 5}{58-20}$

3. Versuche mit Amylase.

Die Versuche wurden genau nach der sehr empfehlenswerten Methode von Wohlgemuth ausgeführt.

Die Amylase wurde durch Extraktion frisch gekeimter Gerste gewonnen; der Extrakt wurde verdünnt. Es wurden gemischt: 10 ccm AmylaseLösung + 20 ccm Wasser bzw. Urin. Die Reagenzröhren wurden bei Versuch 1—4 mit folgenden Mengen Amylasegemisch beschickt:

Nr.	1	2	3	4	5	6
	1 ccm	0,5 ccm	0,3 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm

Hierzu wurden 5 ccm einer 1%igen Stärkelösung gesetzt. Indikator: 1%ige Jodlösung.

Wir geben die Ergebnisse unserer Versuche genau nach dem Vorgang von Wohlgemuth wieder, dessen Arbeit hierüber nachzusehen ist.

Versuch 1.

Versuchstemperatur: 40°. Versuchszeit: 30 Minuten.

Lösung	Limesprobe	D	Acidität pH
Wasser	4	25	7,0
Normalurin	4	25	7,5
Kaliumphosphatlösung ¹⁾	5	50	5,8
Urin des Diabetikers Anders G. Jon.	Wirkung nicht beobachtet	< 5	7,0

Versuch 2.

Versuchstemperatur: 40°. Versuchszeit: 30 Minuten. pH = 5,8.

Lösung	Limesprobe	D
Phosphatlösung	5	50
Normalurin	4	25
Urin des Diabetikers Anders G. Jon.	Wirkung nicht beobachtet	< 5
Urin des Diabetikers Olga Ohl.	4	25
Urin des Diabetikers Nord.	4	25

¹⁾ Die Konzentration des Phosphates entsprach der Phosphatkonzentration des Urins.

Versuch 3 und 4.

Versuchstemperatur: 40°. Versuchszeit: 30 Minuten. $p_H = 5,8$.

Lösung	Limesprobe	D
Phosphatlösung	5	50
Normalurin, 1 Tag alt	4	25
Wasser	6	100
Urin des Diabetikers Anders G. Jon.	6	100

Versuch 5.

Beschickung der Röhren: 0,7 0,6 0,5 0,4 0,3 0,2 0,1
+ 5 ccm Stärkelösung.Versuchstemperatur: 40°. Versuchszeit: 60 Minuten. $p_H = 5,8$.

Lösung	Limesprobe	D
Phosphatlösung	5—6	20
Normalurin	7	50
Urin der Diabetikerin Olga Ohl.	4	12,5

Aus diesen Zahlen ergibt sich, daß der Harn eine Substanz enthält, welche die Amylase-Wirkung hemmt. Die quantitative Ermittlung des relativen Gehaltes an dieser Substanz wird dadurch sehr erschwert, daß Harn außer dem Phosphat, dessen erheblich aktivierende Wirkung auf Amylase ja bekannt ist, auch andere, vermutlich noch stärkere Aktivatoren enthält, welche auch großen Schwankungen unterworfen zu sein scheinen.

Bei einem Versuch (Nr. 1—2) enthielt der Harn eines Diabetikers, Anders G. Jon., offenbar eine außergewöhnlich große Menge der hemmenden Substanz, indessen war diese Erscheinung wenige Tage darauf verschwunden. Das Auftreten dieser Substanz wird später noch weiter verfolgt werden.

Im Anschluß an die erwähnten Versuche haben wir auch die eigene Amylasewirkung einiger Diabetikerharn untersucht und mit einem zuckerfreien Normalharn verglichen.

Versuch 6.

Die Röhren wurden beschickt mit:

2 1 0,5 0,25 0,10 und 0,05 ccm Harn + 5 ccm Stärkelösung.

Versuchszeit: 24 Stunden.

Temperatur: 40°.

pH = 6,8.

Lösung	Limesprobe	D
Normalurin	5	50
Harn, Diabetiker Anders G. Jon.	Keine Wirkung :	< 2,5
Harn, Diabetiker Olga Ohl.	1	2,5
Harn, Diabetiker Nord.	1	2,5

Zunächst fällt der große Unterschied auf zwischen der Amylasewirkung des Normalharns und der zuckerhaltigen Harne.

Es liegt natürlich nahe, zu vermuten, daß diese Ergebnisse nicht direkt den relativen Amylasegehalt ausdrücken, sondern durch den Gehalt der verschiedenen Harne an Hemmungskörper stark beeinflußt sind. In welcher Weise, läßt sich noch nicht sagen; unsere oben mitgeteilten Versuche sind mit relativ sehr viel größeren Enzymmengen ausgeführt, als irgend ein Harn enthält; sie müssen mit weiteren Versuchen ergänzt werden.

Immerhin bestätigt sich das experimentelle Resultat von Wohlgemuth, daß Diabetikerharn schwächere Amylasewirkung zeigt als Normalharn.

Über die Existenz von Enzymgiften oder Enzymparalysatoren im normalen oder pathologischen Harn liegen bis jetzt in der Literatur, so weit wir sehen konnten, keine Angaben vor.

Dagegen ist schon lange bekannt, daß der Harn Stoffe enthält, welche unter verschiedenen Bedingungen in den Tierkörper eingeführt, z. B. bei Injektion in die Blutbahn, als Gifte wirken, und zwar ist eine solche Giftwirkung des Harns keineswegs unerheblich¹⁾ oder auf pathologische Fälle beschränkt.

Welcher Stoff, oder richtiger, welche Stoffe hier in erster Linie ihre Wirkung äußern, ist noch nicht näher endgültig

¹⁾ Absolute Bestimmungen der Harngiftigkeit, wie sie Bouchard vorgeschlagen hat (Bestimmung der Kilo Kaninchen gewicht, auf welches die vom Kilo Körpergewicht in 24 Stunden ausgeschiedene Harnmenge tödlich wirkt), geben keine wissenschaftlich brauchbaren Aufschlüsse. Siehe von Noorden, Handb., 2. Aufl., Bd. 1, S. 1020, 1907.

klargelegt. Sieht man von der Giftwirkung des Kaliumions ab, so kommen von eigentlichen Giftstoffen neben den Harnfarbstoffen organische Basen verschiedener Konstitution in Betracht; so das von Kutscher und seinen Mitarbeitern aufgefundene Methylguanidin, ferner Dimethylguanidin, Novain, Reduktonovain, Mingin, Vitiatin, weiter Histidin und Imidazolaminoessigsäure.

Auch alkaloidartige Körper sind, besonders von französischen Forschern, Bouchard, Lépine u. a., im Harn gefunden worden. Im pathologischen Harn kommen zweifellos Ptomaine vor (Ewald, Jacobson, Griffiths, Albu), welche an der Giftwirkung des Harns wohl beteiligt sind.

Über spezielle Giftwirkung bei Diabetes-Harn scheint nichts bekannt zu sein.

G. Perrin¹⁾ kam zu dem Resultat, daß die Giftigkeit des menschlichen Harns umgekehrt proportional seiner Oberflächenspannung ist. Da sowohl Gallensäuren wie auch Alkaloide allgemein eine starke Änderung der Oberflächenspannung des Wassers hervorrufen, so wäre es nicht auffallend, wenn eine Beziehung zwischen Oberflächenspannung und Toxicität hervortritt; ob aber eine wirkliche Proportionalität zwischen den genannten Größen besteht, mag bei der gewiß nicht einfachen Art der Erscheinung und bei dem einstweilen noch unzureichenden Versuchsmaterial dahingestellt bleiben.

Natürlich haben wir vielfach erwogen, ob die studierte Hemmung, besonders diejenige der Invertase, nicht auf der Bindung eines Kolloids an das Enzym beruht, und also in naher Beziehung zu den Enzymhemmungen steht, welche Hedin und sein Schüler A. Eriksson²⁾ eingehend studiert haben.³⁾ Bis jetzt haben wir keine Anhaltspunkte für diese Annahme gefunden. Die Dialysierfähigkeit unserer Substanz ist zwar

¹⁾ Thèse, Lyon 1906.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 324, 1911.

³⁾ Anm. bei der Korrektur: Auf die neueste Literatur, die dem einen von uns gegenwärtig nicht zugänglich ist, besonders auf die Untersuchungen aus dem Harriman Research Lab. (Griffin und Nelson), werden wir später zurückkommen.

gering, was auf hohes Molekulargewicht hindeutet, indessen ist andererseits zu erwägen gewesen, daß die Substanz von Kohle wenig adsorbiert wird, kochbeständig ist und auch nach dem Knochen durch Filtrierpapier nicht zurückgehalten wird.

Ergebnisse.

In normalen und pathologischen Harnen tritt ein Stoff auf, welcher auf Emzymreaktionen stark hemmend wirkt.

Der Stoff ist kochbeständig, wird von Tierkohle nur in geringem Grad adsorbiert, und wird dem Harn durch Ausschütteln mit Chloroform nur in geringem Grad entzogen.

Der Hemmungskörper tritt in stark wechselnden Mengen auf, und zwar variiert sowohl der Harn eines gesunden Menschen hinsichtlich der enzymhemmenden Wirkung, als besonders die durchschnittliche Wirkung verschiedener pathologischer Harne.

Mit dem Zuckergehalt bei Diabetes mellitus konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Die normalen und pathologischen Enzymwirkungen von Harnen dürften durch diesen Hemmungskörper wesentlich beeinflußt sein.

Das experimentelle Resultat von Wohlgemuth, daß Diabetikerharn eine schwächere Amylasewirkung zeigt als Normalharn, bestätigt sich.

Anhang.

Versuch 1.

t min.	Wasser		20 ccm Harn Olga Ohl. in 60 ccm Mischung	
	a Drehung	$\frac{1}{t} \cdot \log \frac{1,32 + 0,49}{a + 0,49} \cdot 10^4$	a ¹⁾ Drehung	$\frac{1}{t} \cdot \log \frac{1,34 + 0,49}{a + 0,49} \cdot 10^4$
0	1,32	—	1,34	—
5	—	—	1,07	139
10	0,57	232	0,84	138
15	—	—	0,66	135
20	0,10	243	0,47	140
∞	-0,49	—	-0,49	—
Mittel: 237			138	

¹⁾ Die Ablesungen sind mit der Eigondrehung des Harnes vermindert. Dieselbe betrug in entsprechender Konz. 0,44°.

Versuch 2.

20 ccm Harn in 50 ccm Mischung.

t min.	Wasser		Harn Jon.		Harn Norm.	
	Drehung	Konstante	Drehung ¹⁾	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,57	—	1,57	—	1,55	—
10	1,04	122	1,22	77	1,32	49
20	0,62	126	0,96	73	1,13	47
30	0,27	133	0,65	80	0,87	55
∞	— 0,59	—	— 0,59	—	— 0,59	—
Mittel: 127				77	50	

Versuch 3.

t min.	20 ccm Wasser		20 ccm Harnstofflösung	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,50	—	1,48	—
10	0,87	156	0,89	146
20	0,39	164	0,41	158
30	0,08	165	0,10	159
Mittel: 161			154	

Versuch 4.

20 ccm Harn in 65 ccm Mischung.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Harnsäurelösung	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,96	—	1,97	—
10	1,58	67	1,56	72
20	1,18	75	1,25	68
30	0,87	76	0,94	71
∞	— 0,70	—	— 0,70	—
Mittel: 73			70	

¹⁾ Eigendrehung des Harnes 0,91°.

Versuch 5.

t min.	50 ccm Wasser		+ 0,05 g Kreatinin		+ 0,05 g Kreatin	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,94	—	1,94	—	1,93	—
10	1,21	141	1,18	147	1,20	141
20	0,62	150	0,61	152	0,61	151
30	0,18	159	0,19	157	0,19	157
	Mittel: 150		152		150	

Versuch 6.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Lösung	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,90	—	1,97	—
10	1,28	118	1,45	94
20	0,76	125	0,98	100
30	0,30	138	0,62	102
	Mittel: 127		99	

Versuch 7.

t min.	Wasser		0,02 g CaCl ₂ , gek.		0,08 g MgCl ₂ , kryst.	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,97	—	1,98	—	1,96	—
10	1,46	96	1,42	102	1,43	97
20	0,96	103	1,00	99	1,00	97
30	0,61	103	0,63	101	0,62	101
	Mittel: 101		101		98	

Versuch 8.

t min.	Wasser		+ 0,4723 g NaCl		+ 0,4724 g NaCl + 0,02 g CaCl ₂ , gek.	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,97	—	1,94	—	1,95	—
10	1,35	115	1,41	97	1,42	97
20	0,83	121	0,91	107	0,92	107
30	0,48	118	0,55	108	0,52	112
	Mittel: 118		104		105	

Versuch 9.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Harn, sauer		50 ccm Harn	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,93	—	1,93	—	1,95	—
10	1,06	175	1,53	72	1,55	71
20	0,44	181	1,22	68	1,22	70
30	0,00	191	0,83	78	0,94	67
	Mittel: 182		73		69	

Versuch 10.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Lösung von Gallenstein	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,97	—	1,97	—
10	1,23	141	1,24	139
20	0,67	145	0,67	145
	Mittel: 143		142	

Versuch 11.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Harn	
	Drehung	Konstante	Drehung ¹⁾	Konstante
0	1,97	—	2,05	—
10	1,85	20,0	2,03	3,1
20	1,73	20,5	2,005	3,6
30	1,62	20,3	1,96	4,8
60	—	—	1,875	4,8
Mittel:		20,3		4,1

Versuch 12.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Harn A		50 ccm n-Harn B	
	Drehung	Konstante	Drehung ²⁾	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,97	—	1,96	—	2,03	—
10	1,56	72	1,77	32	1,92	17
20	1,20	74	1,59	32	1,78	21
30	0,89	75	1,44	32	1,72	17
Mittel:		74		32		18

Versuch 13.

t min.	50 ccm Wasser		30 ccm Harn mit CHCl ₃ ausgesch. + 20 H ₂ O		30 ccm Harn + 20 ccm Wasser	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,98	—	1,96	—	1,97	—
10	1,37	112	1,70	45	1,79	30
20	0,89	113	1,43	48	1,65	28
Mittel:		113		46		29

¹⁾ Eigendrehung des Harnes — 0,04°.

²⁾ Eigendrehung des Harnes 1,83°.

Versuch 14.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Harn	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	2,08	—	2,04	—
15	1,73	39	1,82	24
30	1,41	40	1,62	28
45	1,10	42	—	—
Mittel: 40			26	

Versuch 15.

t min	20 ccm Wasser		20 ccm Ungekocht		Gekochter Harn	
	Drehung	Konstante	Drehung ¹⁾	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,55	—	1,57	—	1,57	—
10	0,84	175	1,12	102	1,16	92
20	0,32	186	0,68	115	0,75	104
30	— 0,04	194	0,30	128	0,40	113
Mittel: 185			115		103	

Versuch 16.

t min	50 ccm Wasser		N-Harn		2-stündige Vergift.	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	1,99	—	2,00	—	1,98	—
10	1,74	42	1,86	23	1,85	22
20	1,50	44	1,76	21	1,74	20
30	1,27	45	1,64	21	1,64	20
Mittel: 44			22		21	

¹⁾ Eigendrehung des Harnes 0,84°.

Versuch 17.

t min.	70 ccm Wasser		70 ccm n-Harn	
	Drehung	Konstante	Drehung	Konstante
0	4,75	—	4,75	—
20	4,08	24,0	4,40	12,2
30	3,75	24,6	4,27	11,3
∞	1,66	—	1,66	—
Mittel: 24,3			11,8	

Versuch 18.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Harn A		50 ccm Harn B	
	Drehung	Konstante	Drehung ¹⁾	Konstante	Drehung ²⁾	Konstante
0	2,02	—	2,02	—	2,01	—
10	1,75	45	1,94	13	1,90	18
20	1,50	46	1,84	15	1,80	18
30	1,28	46	1,76	15	1,68	19
Mittel: 46			14		18	

Versuch 19.

t min.	50 ccm Wasser		50 ccm Harn	
	Drehung	Konstante	Drehung ²⁾	Konstante
0	1,96	—	1,97	—
10	1,45	93	1,75	37
20	1,00	97	1,52	40
30	0,66	97	1,34	39
Mittel: 96			39	

¹⁾ Eigendrehung des Harnes A — 0,03° (Sigfrid Ols.)

²⁾ „ „ „ B + 1,40° (Knut Törng.)

³⁾ „ „ „ 1,64° (Nord.)