

Beiträge zur Kenntnis der Harnsäurebildung.

III. Mitteilung.

Harnsäurebildung in Leberextrakten nach Zusatz von Dialursäure und Harnstoff.

Von

Prof. M. Ascoli und Assistenten Dr. G. Izar.

(Aus dem Institute für spezielle Pathologie innerer Krankheiten der K. Universität Pavia:
Professor M. Ascoli.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. August 1909.)

In der ersten Mitteilung¹⁾ wurde gezeigt, daß Rindsleberextrakte, die bestimmte Mengen zugesetzter Harnsäure zerstört haben, letztere wieder zu bilden imstande sind, sobald ihnen der Sauerstoff entzogen wird. Es entstand nun die Frage, aus welchem Material die wiedergefundene Harnsäure gebildet wird. In dieser Beziehung konnten wir schon feststellen (*loc. cit.*), daß Leberkolaturen die Fähigkeit besitzen, aus Filtraten von bei schwach essigsaurer Reaktion gekochten Leberbreiaufschwemmungen, die zugesetzte Harnsäure schon zerstört haben, bei Sauerstoffabschluß Harnsäure zu bilden.

Wir haben die aufgeworfene Frage methodisch weiter verfolgt und eine Reihe der bekannten Spaltungs- resp. Oxydationsprodukte der Harnsäure daraufhin geprüft, ob sie imstande sind, zu Leberbrei hinzugefügt, unter den erforderlichen Bedingungen, d. h. unter Luftabschluß, Harnsäure zu bilden.

Bei unseren Versuchen befolgten wir die in der früheren Arbeit angegebene Technik. Die einzelnen Portionen einer und derselben Rindsleberkolatur für jede Versuchsreihe kamen nach Zusatz der zu prüfenden Substanzen und 10‰ Toluol und Chloroform²⁾ in Glasflaschen, die mit geschliffenen Glasstopfen sorgfältig verschlossen wurden, in den Brutschrank (39°) und wurden 2 mal in 24 Stunden kräftig geschüttelt. Die Glasflaschen wurden immer von solcher Größe gewählt, daß sie mit den Ex-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVIII, S. 529.

²⁾ Dieser Zusatz ist zum Hintanhalt von Fäulnisvorgängen, wie wir uns auch selbst durch Anlegen von Kulturen überzeugen konnten, vollständig genügend (Yoshimoto, Diese Zeitschrift, Bd. LVIII), wenn Durchleitung von Gasen ausbleibt. (M. Ascoli und Izar, *loc. cit.*, S. 53.)

trakten bis auf ungefähr 50 ccm gefüllt waren. Wo es ausdrücklich angegeben ist, wurde durch die Kolaturen während der Versuchsdauer ein Kohlensäurestrom durchgeleitet, da die Kohlensäure nach unseren früheren Erfahrungen (loc. cit.) die Harnsäurebildung begünstigt. In einigen Versuchen (vgl. Protokolle) wurden die Kolaturen vorher 72stündiger Autolyse unter Luftdurchleitung überlassen: bei Ansetzen des eigentlichen Versuches erfolgte dann erneuter Toluol- und Chloroformzusatz. Die Harnsäurebestimmung geschah entweder durch Wägung (nach vorherigem Umkrystallisieren nach Horbaczewski) oder durch Bestimmung ihres Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl. Bezüglich der Reaktion bemerken wir, daß dieselbe, falls nicht absichtlich mit NaOH alkalisiert wurde (wo dies ausdrücklich vermerkt ist), zu Ende des Versuches gewöhnlich stärker oder schwächer sauer (mitunter auch neutral) sich erwies (Lackmus); übrigens wird der Einfluß der Reaktion auf diese Vorgänge Gegenstand einer besonderen Mitteilung bilden, auf die wir verweisen.

Bei Zusatz der bekannten Zerfallsprodukte der Harnsäure, nämlich von Allantoin, Harnstoff und Allantoin, Uroxansäure, Harnstoff und Alloxan, Harnstoff und Parabansäure, Harnstoff und Oxalursäure, Harnstoff und Glykokoll konnten wir Bildung von Harnsäure durch Leberextrakte¹⁾ nicht erzielen.

Hingegen bewirkt der Zusatz von Dialursäure und Harnstoff zu Leberbrei die Bildung von Harnsäure (Vers. I—IV).

Versuch I. Kolatur aus 300 g Leberbrei + 1 l NaCl-Lösung. 72stündige Autolyse unter Luftdurchleitung; darauf Verteilung in zwei gleiche Portionen (a, b); b wird mit 0,5 g Dialursäure und 0,5 g \bar{U} ⁺ versetzt. 72stündige Autolyse bei O-Abschluß.

$$a = 26,75 \text{ mg } \bar{U} \text{ (gewogen); } b = 203,1 \text{ mg } \bar{U} \text{ (gewogen).}$$

Versuch II. a) 100 g Leberbrei + 500 ccm NaCl-Lösung; nach 72stündiger Autolyse bei O-Abschluß: \bar{U} (gewogen) = 26,5 mg.

b) 100 g Leberbrei + 500 ccm NaCl-Lösung + 1 g Dialursäure + 1 g \bar{U} ⁺; nach 72stündiger Autolyse bei O-Abschluß: \bar{U} (gewogen) = 198,2 mg.

Versuch III. Kolatur aus 200 g Leberbrei + 1 l NaCl-Lösung; 72stündige Autolyse unter Luftdurchleitung. Verteilung in zwei Portionen (a, b); b wird mit 1 g Dialursäure und 1 g \bar{U} ⁺ versetzt. Nach 72stündiger Autolyse bei O-Abschluß: a = 19,8 mg \bar{U} (gewogen)

$$b = 121 \quad , \quad , \quad ,$$

¹⁾ Sei es einfach in verschlossenem Gefäße, als unter CO₂-Durchleitung; die Protokolle lassen wir der Kürze halber fort.

Versuch IV.

Leberbrei	NaCl-Lösung	Dialursäure	+	U	U mg (N-Bestimmung)
100 g	+ 400 ccm	—	—	—	24 st. Autolyse = 16,5
100 >	+ 400 >	+ 0,5 g	+ 0,25 g	—	bei O-Abschluß = 69,5
100 >	+ 400 >	—	—	—	48 st. Autolyse = 72,8
100 >	+ 400 >	+ 0,5 g	+ 0,25 g	—	bei O-Abschluß = 101,1
100 >	+ 400 >	—	—	—	72 st. Autolyse = 65,6
100 >	+ 400 >	+ 0,5 g	+ 0,25 g	—	bei O-Abschluß = 106,3

Die gefundenen Harnsäuremengen sind ansehnlich. Was ihre Abstammung anbelangt, so ist die Möglichkeit einer gesteigerten Umsetzung der Alloxurbasen in Betracht zu ziehen. Burian¹⁾ deckte nämlich in der Dialursäure diese Eigenschaft auf.²⁾ In unsern Versuchen tritt aber beträchtliche Harnsäurevermehrung nur dann ein, wenn Dialursäure und Harnstoff herangezogen werden, nicht aber Dialursäure oder Harnstoff allein (s. Vers. V, IX).

Um zu erforschen, inwieweit die gefundene Harnsäure aus der Spaltung der (latenten und manifesten) Xanthinbasen abstammen kann, wurde ferner in Versuchen V—VIII der Gesamt-purinbasengehalt nach Salkowski bestimmt; das Ergebnis

¹⁾ Die Versuche Burians (Diese Zeitschrift, Bd. XLIII) betreffen die von Wiener (Hofmeisters Beitr. II) festgestellte Zunahme der gebildeten Harnsäure, wenn er zu Leberkolaturen Dialursäure hinzufügte und die Extrakte andauernd schüttelte. Burian erbrachte den Nachweis, daß diese übrigens geringe (16, resp. 30 mg in Wieners Versuchen) Harnsäuresteigerung auf die von der Dialursäure bewirkte katalytische Beschleunigung des bei Sauerstoffzufuhr stattfindenden Xanthinumsatzes zurückzuführen ist, wie auch unsere Kontrollen mit Dialursäure allein ergeben. Harnstoffzufuhr ist unter diesen Umständen natürlich belanglos, wie auch Wieners Untersuchungen belegen. Bei unserer Versuchsanordnung findet hingegen eine sehr bedeutende Harnsäurezunahme statt, die jedoch die gleichzeitige Gegenwart von Harnstoff und Dialursäure benötigt. Es handelt sich wohl um prinzipiell verschiedene Vorgänge: einerseits, bei Wiener, um katalytisch beschleunigten oxydativen Purinumsatz, in unserem Falle um Synthese aus Dialursäure und Harnstoff.

²⁾ Eigentlich kommt diese Möglichkeit nach Burian selbst (loc. cit., S. 505) nicht in Betracht, da zur Harnsäurebildung (aus Purinbasen) in Leberextrakten die Gegenwart von Sauerstoff erforderlich ist; in unseren Versuchen — deren Dauer länger gewählt war — fand immerhin eine geringe Harnsäurebildung auch in den Kontrollproben ohne Zusatz statt.

derselben zeigt, daß die Alloxurbasen im günstigsten Falle nur für die Entstehung eines kleinen Bruchteiles der gefundenen Harnsäure verantwortlich gemacht werden können.

Versuch V. Kolatur aus 500 g Leber + 2 l NaCl-Lösung; verteilt in 5 gleiche Portionen (1—5).

		\bar{U} (N-Bestimmung)	Gesamt-Xanthinbasen ¹⁾ (in \bar{U} ausgedrückt)
Nr. 1 (sofort koaguliert)	Nach	4,7 mg	49,98 mg
» 2 + 0	72stündiger Auto- lyse bei O-Ab- schluß	35,4 »	12,18 »
» 3 + 0,5 g Dialursäure		40,7 »	13,44 »
» 4 + 0,5 g \bar{U}		38,9 »	15,96 »
» 5 + 0,5 » + 0,5 Dialursäure		215,3 »	16,38 »

Versuch VI. 2,21 Kolatur aus 300 g Leber + NaCl-Lösung, verteilt in 5 gleiche Portionen:

		\bar{U} mg (N-Bestimmung)	Gesamt-Xanthinbasen (in \bar{U} ausgedrückt) mg
1. + 0	sofort bestimmt	0,82	44,52
2. + 0,5 g Dialursäure + 1 g \bar{U}		0,7	43,26
3. + 0	72stünd. Autolyse bei O-Ab- schluß	24,0	13,44
4. + 0,5 g Dialursäure + 1 g \bar{U}		117,3	16,38
5. + 1,0 » + 1 » »		214,7	14,7

Versuch VII. 3,1 l Kolatur²⁾ aus 600 g Leber + NaCl-Lösung, verteilt in 6 gleiche Portionen:

		\bar{U} mg (N-Bestimmung)	Gesamt-Xanthinbasen (in \bar{U} ausgedrückt) mg
1. + 0	sofort bestimmt	1,5	37,18
2. + 0,5 g Dialursäure + 1 g \bar{U}		1,0	35,28
3. + 1,0 » + 1 » »		1,4	32,34
4. + 0	72stünd. Autolyse bei O-Ab- schluß	30,3	5,46
5. + 0,5 g Dialursäure + 1 g \bar{U}		134,0	4,2
6. + 1,0 » + 1 » »		249,5	7,56

¹⁾ Bestimmt nach Salkowski.

²⁾ In diesem und dem folgenden Versuche wurde der Leberbrei in eisgekühlter NaCl-Lösung aufgenommen und die Eiskühlung dauerte auch während des zweistündigen Schüttelns der Aufschwemmung im Schüttelapparat.

Versuch VIII. 3,2 l Kolatur aus 500 g Leber + NaCl-Lösung, verteilt in 4 gleiche Portionen:

	\bar{U} mg (N-Bestimmung)	Gesamt-Xanthinbasen (in \bar{U} ausgedrückt) mg
1. + 0) sofort	0,0	22,26
2. + 0,5 g Dialursäure + 1 g \bar{U}) bestimmt	0,0	26,88
3. + 0) 72stündige Autolyse bei	14,5	2,94
4. + 0,5 g Dialursäure + 1 g \bar{U}) O-Abschluß	198,0	4,20

In Versuchen IX, X wurden die Leberextrakte unter Eiskühlung¹⁾ bereit; auch diese Auszüge erwiesen sich fähig, bei Zusatz von Dialursäure und Harnstoff erhebliche Mengen Harnsäure zu bilden, die füglich nicht von den Purinkörpern abgeleitet werden können.

Versuch IX. 1,5 l Kolatur aus 500 g Leber + 1,5 l NaCl-Lösung, bei dauernder 24stündiger Eiskühlung bereit. Verteilung in 5 Portionen:

1. 300 ccm Kolatur; Verarbeitung sofort.		
2. 300 „ „		
3. 300 „ „ + 0,5 g Dialursäure	} 72stünd. Autolyse in verschlossenem Gefäße.	
4. 300 „ „ + 0,5 „ \bar{U}		
5. 300 „ „ + 0,5 „ „ + 0,5 g Dialursäure		

Nr.	Gesamt-Purinbasen ²⁾ (in \bar{U} ausgedrückt) mg	Manifeste Purinbasen ³⁾ (in \bar{U} ausgedrückt) mg	\bar{U} mg
1	43,54	13,44	6,02
2	20,02	16,80	23,66
3	23,18	18,48	24,70
4	23,18	16,80	22,18
5	21,00	16,80	236,04

¹⁾ Burian, R., Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 498.

²⁾ Nach Kossel-Burian, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 336.

³⁾ Nach Salkowski.

Versuch X. 350 g Kalbsleber + 750 ccm NaCl-Lösung; 6 stündige Extraktion unter Eiskühlung; Kolatur 750 ccm verteilt:

1. 250 ccm Kolatur sofort verarbeitet.

2. 250 „ „

3. 250 „ „ + 0,5 g Dialursäure + 0,5 g Ü } 72 stündige
Autolyse unter CO₂ ¹⁾
Sättigung.

Nr.	Gesamtpurinbasen ²⁾ (in \bar{U} ausgedrückt) mg	Manifeste Purinbasen ³⁾ (in \bar{U} ausgedrückt) mg	\bar{U} mg
1	83,68	12,60	3,68
2	39,80	19,32	40,00
3	40,16	17,64	184,44

Die Ausbeute an Harnsäure bleibt immer hinter der berechneten Menge zurück; am günstigsten scheinen die Verhältnisse zu liegen, wenn Dialursäure und Harnstoff ungefähr in ihren Molekulargewichten entsprechendem Verhältnisse zum Leberbrei hinzugesetzt werden (Vers. XI, vgl. auch Vers. VI, VII).

Versuch XI. Kolatur aus 1 kg Leberbrei + 4 l NaCl-Lösung verteilt in 6 Portionen:

	\bar{U} mg (N-Bestimmung)	
1. + 0	66,6	
2. + 0,5 g Dialursäure + 0,5 g Ü	} 72 stündige Autolyse bei O-Abschluß.	
3. + 0,5 „ „ + 1,0 „ „		155,0
4. + 0,5 „ „ + 2,0 „ „		151,7
5. + 1,0 „ „ + 0,5 „ „		155,4
6. + 2,0 „ „ + 0,5 „ „		254,0
		272,5

Bei Verwendung von gekochten Leberextrakten bildet sich trotz Zusatz von Dialursäure und Harnstoff keine Harnsäure; ebensowenig wird dieselbe aus Dialursäure und Harnstoff allein, ohne Leberauszug, gebildet (Vers. XII).

¹⁾ Alle 12 Stunden ein Kohlensäurestrom aus einer Bombe durchgeleitet.

²⁾ Nach Kossel-Burian, Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 336.

³⁾ Nach Salkowski.

Versuch XII. 100 g Leberbrei + 900 ccm NaCl-Lösung; 72 stündige Autolyse unter Luftdurchleitung; darauf gekocht und in 2 gleiche Portionen verteilt (1, 2).

1. + 0.	} 27 stündige Autolyse bei O-Abschluß	U mg (gewogen)
2. + 0,5 g Dialursäure + 0,5 g U ⁺		41,5
Kontrolle: 500 ccm NaCl-Lösung + 0,5 g Dialursäure + 0,5 g U ⁺		42,3
		0,0
