

Über das sogenannte Protagon der Niere.

Von

Th. Panzer.

(Aus dem Universitätslaboratorium für angewandte medizinische Chemie in Wien.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juli 1906.)

Mit histologischen Untersuchungen über die große weiße Niere beschäftigt machte mich Herr Privatdozent Dr. Oskar Stoerk, Assistent am Wiener pathologisch-anatomischen Institute, auf das Vorkommen einer von den Histologen bisher als Protagon bezeichneten Substanz aufmerksam und stellte mir in liebenswürdigster Weise solche Nieren zur chemischen Untersuchung zur Verfügung. Er hat die Ergebnisse seiner Untersuchungen unter dem Titel «Über Protagon und über die große weiße Niere» in den Sitzungsberichten der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien (Mathem.-naturw. Klasse; Bd. CXV., Abt. III, Februar 1906) publiziert. Ich entnehme dieser Abhandlung folgende auf diese Substanz sich beziehende Sätze:

«Das Protagon tritt in der Niere bei mikroskopischer Betrachtung an zwei Stellen auf: intraepithelial in sehr wechselnder Reichlichkeit als Tröpfchen und Granula im Protoplasma und im Zwischengewebe, in letzterem Bereich bisweilen in solcher Menge, daß auch ein makroskopisches Erkennen möglich ist.

Sie sind fast ausschließlich bei entzündlich affizierten Nieren (mit Einschluß der arteriosklerotisch veränderten), und zwar bei etwas längerem Bestehen des Entzündungsprozesses anzutreffen.

Das Bild des in der früher erwähnten Weise gewonnenen Zupfpräparates ist ein überaus charakteristisches. Man sieht neben cellulären Elementen farblose oder blaß gelbliche, klumpige und schollige Gebilde, welche bei enger Blende einen eigen-

tümlichen Glanz, bei Bewegung der Mikrometerschraube ein eigentümliches Glitzern erkennen lassen. Im polarisierten Licht heben sie sich bei gekreuzten Nikols in weißem Atlasglanz leuchtend vom dunklen Grunde ab.

Es finden sich zwischen, auf und in den eigentümlichen Schollen und Klümpchen, welche im Nativgefrierschnitt dicht gedrängte, stark lichtbrechende Tröpfchen in mannigfacher Größe umschließen, nach Formolbehandlung scharf hervortretend mehr weniger reichlich krystallinische Bildungen in Form von kurzen, kleinen Krystallen oder von feineren und gröberen Nadeln und Nadelbüscheln. Besonders die zentralen Anteile vieler größerer Schollen enthalten die letzteren oft in dichter Menge und solche Schollen gewinnen dadurch schon bei Betrachtung mit schwacher Vergrößerung ein vorwiegend parallel- und feinstreifiges Aussehen.

Bei Färbung der Gefrierschnitte mit Fettfarbstoffen (Scharlach R., Sudan III.) färben sich die scholligen Massen leuchtend gelblich rot.

In absolutem Alkohol, Aceton, Schwefeläther, Benzin, Chloroform und Xylol wird die Substanz mehr weniger rasch gelöst, selbst Glycerin scheint sie bei längerer Einwirkung in eigentümlicher und das optische Verhalten aufhebender Weise zu beeinflussen. Es finden sich nämlich in Schnitten mit Glycerineinschluß meist schon nach wenigen Wochen und im Laufe der Zeit immer mehr zunehmend vielfach an Stelle der doppeltbrechenden Elemente größere, wie durch Extraktion und Konfluenz entstandene, ziemlich stark glänzende Tropfen ohne Doppelbrechung.

Die Einwirkung der Überosmiumsäure hebt stets die Fähigkeit, doppelt zu brechen, auf. Betrachtet man die osmierten Gefrierschnitte oder Gefrierschnitte osmierter Gewebe in Wasser oder Glycerin, so erscheinen die Schollen sowie ein Teil der intraepithelialen Tröpfchen und Granula ungeschwärzt, in einem schmutzig blaßbräunlichen Farbton — von letzteren meist die kleineren und kleinsten; die größeren und größten intraepithelialen Tröpfchen oft schwarz («primäre Osmiumschwärzung»). Überträgt man die Schnitte auf 24 Stunden in Alkohol, so er-

scheinen nunmehr alle Schollen und Tröpfchen schwarz («sekundäre Osmiumschwärzung»).

Entfernt man die Osmiumschwärzung aus dem Gefrierschnitt, beispielsweise durch Behandlung mit H_2O_2 , so stellt sich das Phänomen der Doppelbrechung nicht wieder ein.»

Die erste Aufgabe der chemischen Untersuchung war natürlich die Reindarstellung der beschriebenen Substanz. Zunächst wurden einige Vorversuche angestellt, und zwar wurden in der Meinung, daß es sich hier um Protagon oder eine ähnliche Substanz handle, Verfahren versucht, welche zur Darstellung von Protagon geeignet sind; sie führten zu keinem Ziele. Durch weitere Versuche wurde siedendes Aceton als brauchbares Extraktionsmittel für die Substanz aufgefunden.

Es wurden nun drei Nierenpaare, welche nach der mikroskopischen Untersuchung viel von der doppeltbrechenden Substanz enthielten, in Arbeit genommen und zwar wurde jedes Nierenpaar separat verarbeitet.

Die Nieren wurden mit der Schere zerkleinert und in 95%igem Alkohol unter öfterem Wechseln des Alkohols durch mehrere Wochen gehärtet. Die gehärteten Nierenstückchen wurden hierauf durch ein engmaschiges Drahtsieb gepreßt und der so erhaltene Brei mehrmals mit 95%igem Alkohol bei Zimmertemperatur und hierauf mehrmals mit Aceton bei Zimmertemperatur extrahiert. Die gut abgepreßten Gewebsrückstände wurden nun in etwa $\frac{1}{2}$ Liter Aceton verteilt und die Flüssigkeit in bedecktem Gefäße durch eine Viertelstunde auf dem Wasserbade in schwachem Sieden erhalten. Dann wurde rasch siedend heiß filtriert und das Filtrat in den Eiskasten gestellt. Am anderen Tage hatten sich aus der Flüssigkeit farblose Kryställchen abgeschieden. Zwar erschienen diese Kryställchen bei mikroskopischer Betrachtung vollkommen einheitlich, trotzdem wurden sie noch mehrmals aus siedendem Aceton umkrystallisiert. So wurden aus jeder der drei Nieren einige Zentigramme bis 0,25 g gereinigter Krystalle erhalten.

Herr Dr. Stoerk hatte die Liebenswürdigkeit, nachzuweisen, daß diese Krystalle dasselbe Verhalten zeigten, wie die von ihm beschriebene Substanz (Doppelbrechung, Färbung mit Sudan III, Osmiumschwärzung).

Die Krystalle, unter dem Mikroskope kurze Prismen, oft zu Drusen gruppiert, waren unlöslich in Wasser, schwer löslich in kaltem Alkohol und in kaltem Aceton, leicht löslich in heißem Alkohol, in heißem Aceton, in Äther, Benzol und Chloroform. Der Schmelzpunkt von jedem der drei Präparate war 68° C. Eines der drei Präparate wurde nochmals aus heißem Aceton umkrystallisiert, der Schmelzpunkt änderte sich nicht.

Die Substanz war frei von Stickstoff, Phosphor und Schwefel. Sie war also kein Protagon. Eine Probe der Krystalle, in Chloroform gelöst, wurde mit etwas Essigsäureanhydrid und einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt; erst nach einigen Minuten trat eine Grünfärbung auf, wie sie das Cholesterin bei gleicher Behandlung in viel kürzerer Zeit zeigt.

Eine Beimengung von Cholesterin erscheint nach der Konstanz des Schmelzpunktes, noch mehr aber nach dem eingeschlagenen Darstellungsverfahren vollkommen ausgeschlossen. Eben aus diesem Grunde wurde ja dieses Verfahren beibehalten, obwohl es mit kolossalen Verlusten arbeitet und die erhaltenen Substanzmengen offenbar nur geringe Bruchteile des Gehaltes der Nieren an doppeltbrechender Substanz sind.

Es war demnach an einen Ester des Cholesterins zu denken, wofür auch das langsame Eintreten der Cholestolreaktion spricht. Indessen bereitete die Verseifung des Esters Schwierigkeiten. Als geeigneter Weg erwies sich die Verseifung mit Natriumalkoholat in Benzollösung. 0,2 g des Esters wurden in 50 ccm Benzol gelöst, blanke Natriumstückchen und etwas absoluter Alkohol zugesetzt; dann wurde auf dem Wasserbade zum Sieden erhitzt und vorsichtig absoluter Alkohol in kleinen Portionen eingetragen, bis das Metall eben gelöst war. Das Sieden wurde hierauf unter Anwendung eines eingeschliffenen Rückflußkühlers 4 Stunden lang fortgesetzt. Nach dem vollständigen Erkalten wurde filtriert und die ungelösten Seifen mit Benzol ausgewaschen. Die vereinigten Benzolfiltrate wurden mit destilliertem

Wasser so oft ausgeschüttelt, bis das Wasser auf Lackmus nicht mehr alkalisch reagierte.

Diese wässerigen Flüssigkeiten wurden mit Bleiessig ausgefällt; der entstandene Niederschlag enthielt nur sehr geringe Spuren organischer Substanz.

Die gewaschene Benzollösung wurde auf einem mäßig geheizten Wasserbade verdunstet, der Abdampfrückstand in Alkohol gelöst, die Lösung zum Sieden erhitzt und solange mit Wasser versetzt, bis sie in der Siedehitze trüb blieb. Die Trübung wurde durch Zusatz von einigen Tropfen Alkohol in Lösung gebracht, die Flüssigkeit heiß filtriert und langsam erkalten gelassen. Die hierbei sich ausscheidende farblose Substanz wurde in der eben beschriebenen Weise noch zweimal aus wasserhaltigem Weingeist umkrystallisiert, schließlich in Chloroform gelöst und die Lösung langsam verdunsten gelassen.

Der hinterbleibende Rückstand war farblos und bestand, wie die mikroskopische Betrachtung erwies, nur aus Krystallen von der für Cholesterin typischen Krystallform. Sein Schmelzpunkt war 144° unkor. (für Cholesterin 145°). Die Krystalle zeigten endlich die Liebermannsche Cholestolreaktion in den für Cholesterin charakteristischen Farben.

Damit erscheint das Cholesterin dargestellt und identifiziert.

Zur Isolierung der mit dem Cholesterin veresterten Säuren wurde der in Benzol ungelöst gebliebene Seifenrückstand in Wasser gelöst und die Lösung mit Bleiessig ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde auf einem Filter mit Wasser ausgewaschen, auf dem Wasserbade getrocknet und in einem gläsernen, nur mittels Glasschliffen, ohne Anwendung von Kork zusammengefügtten Soxhletischen Extraktionsapparate durch 3 Tage mit Äther extrahiert.

Die ätherische Lösung wurde nun verdunstet und der Rückstand durch längere Zeit auf dem Wasserbade mit sehr verdünnter Salzsäure behandelt. Er verwandelte sich dabei in einige Öltropfen von Hanfkorngroße, welche auf der wässerigen Flüssigkeit schwammen und beim Erkalten erstarrten. Die wässrige Flüssigkeit enthielt gelöstes Blei.

Die erstarrten Öltröpfchen wurden mit destilliertem Wasser-

gewaschen und zwischen Filtrierpapier getrocknet; sie waren schwach bräunlich gefärbt. Kleine Proben derselben wurden in Alkohol und in Äther gelöst und die Lösungen auf Objektträgern langsam verdunsten gelassen; die Rückstände zeigten unter dem Mikroskope Andeutungen von krystallinischer Struktur (kurze Prismen), bestanden aber größtenteils aus amorphen Schollen. Die Substanz löste sich leicht in Alkohol. Die alkoholische Lösung reagierte auf Lackmus deutlich sauer.

Der Schmelzpunkt der erstarrten Öltröpfchen war 39—40°.

Eine Probe dieser Substanz wurde in verdünntem Ammoniak gelöst, die Lösung auf dem Wasserbade abgedampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Die Lösung gab mit Lösungen von Chlorcalcium, Chlorbaryum und Magnesiumsulfat Niederschläge, sie wurde auf Zusatz von Salzsäure trüb, klärte sich aber wieder beim Schütteln mit Äther.

Eine Probe der Säure wurde in Chloroform gelöst und die Lösung mit einer sehr verdünnten Lösung von Brom in Chloroform versetzt; die durch das Brom bedingte Gelbfärbung verschwand.

Die Säure zeigt die Liebermannsche Cholestolreaktion nicht.

Aus der in Äther unlöslichen Bleiverbindung wurde ebenso, wie für das lösliche Bleisalz beschrieben, die Säure abgetrennt. Ihre Menge war etwa doppelt so groß als die der Säure aus dem löslichen Bleisalz. Auch sie bestand aus Öltröpfchen, die beim Erkalten erstarrten. Langsam verdunstete alkoholische oder ätherische Lösungen hinterließen Rückstände, welche unter dem Mikroskope Tendenz zur Krystallisation zeigten. Auch gegen Reagenzien verhielt sie sich so wie die beschriebene Säure; sie war leicht in Alkohol löslich, die alkoholische Lösung reagierte sauer, sie zeigte die bereits angeführten, den höheren Fettsäuren zukommenden Fällungsreaktionen, addierte Brom und gab nicht die Cholestolreaktion. Nur ihr Schmelzpunkt lag höher als der der ersten Säure, nämlich bei 53—54° C.

Nach diesen Ergebnissen bin ich nicht imstande, die mit dem Cholesterin veresterte Säure zu identifizieren. Sicher ist, daß diese Säure die Eigenschaften einer Fettsäure zeigt, und daß sie eine ungesättigte Verbindung ist. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die dargestellte Säure bereits ein Veränderungsprodukt der im Ester enthaltenen Säure ist; dafür würde auch die Verschiedenheit der Schmelzpunkte der aus der in Äther löslichen Bleiverbindung einerseits, der in Äther unlöslichen andererseits sprechen.

War einmal schon die leichte Veränderlichkeit in Betracht gezogen, so lag es nahe, an die Ölsäure zu denken. Der Ölsäurecholesterinester ist bereits bekannt; er schmilzt nach Hürthle¹⁾ bei 42° (Schmelzpunkt des aus den Nieren dargestellten Esters: 68° C.). Die aus dem Ester abgeschiedene Säure hat einige Ähnlichkeit mit der Elaidinsäure, auch ihr Schmelzpunkt liegt nahe dem dieser Säure. Ich habe daher, wie anhangsweise beschrieben werden soll, den Ester der Elaidinsäure mit dem Cholesterin dargestellt. Der Schmelzpunkt dieses Esters stimmt mit dem des aus den Nieren erhaltenen Esters nicht überein.

Endlich wäre noch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß ein Gemenge mehrerer Ester vorliegt, daß also nicht eine, sondern mehrere Säuren in der aus den Nieren dargestellten Substanz zu suchen wären; dagegen spricht aber das einheitliche Aussehen des Esters, die leichte Krystallisationsfähigkeit und die Konstanz des Schmelzpunktes. Hingegen würde für ein Gemenge sprechen, daß sich die abgeschiedenen Bleiseifen in zwei Fraktionen zerlegen ließen, in eine in Äther lösliche und eine in Äther unlösliche; es ist aber auch ganz gut denkbar, daß die Bleiseife nur sehr schwer in Äther löslich ist, so daß eine dreitägige Extraktion nicht zur vollständigen Erschöpfung des Niederschlages genügte, oder aber, daß Verunreinigungen, Nebenprodukté der Verseifung, die Löslichkeit eines kleinen Teiles der Bleiseife bedingt haben.

Da schon wiederholt auf die Möglichkeit hingewiesen wurde, daß die Säure sich bei ihrer Abscheidung verändert haben kann,

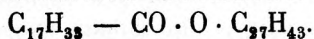
¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 335.

so muß auch dem Einwande begegnet werden, daß etwa die doppelte Kohlenstoffbindung in der Säure ebenfalls ein Kunstprodukt sei. Daß der Ester, wie durch einen Versuch festgestellt wurde, Brom addiert, beweist hier nichts, da auch das Cholesterin eine ungesättigte Verbindung ist und Brom addiert. Vielmehr muß dieser Einwendung entgegnet werden, daß bei einer einfachen Verseifung nicht leicht Doppelbindungen entstehen und daß der Ester durch Überosmiumsäure geschwärzt wird, eine Reaktion, die bisher immer auf die Anwesenheit von Ölsäure (Cholesterin gibt keine Osmiumreaktion), also einer ungesättigten Säure, zurückgeführt wurde.

Die Literatur über das Vorkommen von Cholesterinestern im tierischen Organismus ist in einer jüngst erschienenen Arbeit von R. Bünz¹⁾ nachgewiesen. Es erscheint daher überflüssig, auf diese Literatur hier einzugehen, zumal da sie für den vorliegenden Gegenstand keine Anknüpfungspunkte bietet.

Ich kann also aussagen, daß die aus der großen weißen Niere dargestellte, von den Histologen als Protagon der Niere bezeichnete, krystallinische Substanz der Ester des Cholesterins mit einer ungesättigten Säure ist, welche, wie die Ölsäure, einige Eigenschaften der Fettsäuren zeigt.

Der Cholesterin-Elaidinsäureester.



Da ich in der Literatur keine Angaben über diesen Ester fand, soll er im folgenden beschrieben werden.

2 g Elaidinsäure (Merck) und 2,77 g aus menschlichen Gallensteinen dargestelltes Cholesterin wurden im zugeschmolzenen Rohr durch 24 Stunden auf 200° C. erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Röhre geöffnet, ihr brauner Inhalt mit siedendem Aceton aufgenommen und diese Lösung von wenig ungelöstem Harz durch Filtration befreit. Beim Erkalten schieden sich aus der filtrierten Lösung reichliche, noch braun gefärbte Krystallmassen aus, welche wiederholt, gegen Ende unter Anwendung von etwas Tierkohle, aus siedendem Aceton umkry-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 47.

stallisiert wurden. Der Schmelzpunkt der beiden letzten Kristallisationen war gleich.

So wurden schließlich 0,7 g einer weißen, sehr leichten Substanz erhalten, welche unter dem Mikroskope betrachtet aus zu Rosetten gruppierten kurzen, dicken Prismen bestand. Sie schmolz bei 47° C., war unlöslich in Wasser, schwer löslich in kaltem Alkohol und in kaltem Aceton, leicht löslich in heißem Alkohol, in heißem Aceton, in Äther, Benzol und Chloroform. Sie zeigte die Liebermannsche Cholestolreaktion ebenso zögernd, wie der aus den Nieren dargestellte Ester. Die Elementaranalyse ergab folgende Zahlen:

0,1924 g im Vakuum über Schwefelsäure getrockneter Substanz lieferten
0,2058 g Wasser und 0,5864 g Kohlendioxyd.

Berechnet für $C_{46}H_{76}O_2$:

C 83,25 %

H 11,81 %

Gefunden:

83,13 %

11,98 %

