XIII.

Zur Frage der Glykokollbildung aus Leucin im thierischen Organismus.

Von

Prof. Dr. Rudolf Cohn in Königsberg i. Pr.

Die im Folgenden mitzutheilenden Versuche habe ich unternommen, um die von Hugo Wiener¹⁾ behauptete Umwandlung von an Kaninchen subcutan verabreichtem Leucin in Glykokoll einer Nachprüfung zu unterziehen. Wiener hatte gefunden, dass Leucin toxische Dosen von gleichzeitig innerlich verabreichter Benzoësäure entgiftet, und hatte in einem Versuche den Nachweis geliefert, dass die an die ausgeschiedene Benzoësäure gebundene Glykokollmenge, die nach einmaliger Darreichung von Benzoësäure eine bestimmte Höhe nicht überschreitet, bei gleichzeitiger Leucindarreichung eine beträchtliche Vermehrung erfährt, woraus er den Schluss auf eine directe Umwandlung des Leucins in Glykokoll zieht.²⁾ In einer experimentellen Nachprüfung der Wiener'schen Arbeit habe ich schon unter Anderem zeigen können³⁾, dass die von Wiener angenommene Entgiftung der Benzoësäure durch Leucin doch nicht ganz zu Recht bestehen könne, denn mein Versuchsthier bekam starke Hä-maturie und ging nach circa 3 Wochen unter allmählicher Abmagerung und beständigem Eiweissgehalt des Urins zu Grunde. Da Wiener in einer Entgegnung⁴⁾ auf meine Arbeit, auf die ich an anderer Stelle ausführlicher zurückzukommen mich genöthigt sehe⁵⁾, diesen Punkt ganz ignorirt und im Uebrigen seine Behauptung aufrecht erhält, so glaubte ich nochmals in eine nähere Prüfung dieser

1) Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmacol. XL, S. 313.

2) Wiener macht keine Angaben über die Löslichkeit und die Eigenschaften seines Leucins, sodass man nicht in der Lage ist, zu beurtheilen, ob er überhaupt reines Leucin in Anwendung gezogen hat. Er sagt nur, das Kaninchen bekam 2,6728 g Leucin subcutan.

3) Festschrift zur Feier des 60. Geburtstags von Max Jaffe, S. 321.

4) Prager med. Wochenschrift 1901, Nr. 50—51.

5) Prager med. Wochenschrift 1902.

Frage eintreten zu sollen, die, wenn sie dieselbe auch nicht voll zur Lösung gebracht hat, doch zeigt, dass die Wiener'sche Deutung seiner Versuche keine richtige sein kann.

Versuch I.

Ein Kaninchen von 2500 g Gewicht erhält Nachmittags 6 $\frac{3}{4}$ Uhr pro Kilo 2,62¹⁾, im Ganzen 6,5 g reines Leucin (dasselbe krystallisirte in farblosen Blättchen und zeigte den Schmelzpunkt 283⁰; es war von mir durch HCl-Spaltung aus Casein dargestellt worden) in 100 Wasser, worin es sich beim Kochen nur unter Zusatz von etwas NaOH bis zur schwach alkalischen Reaction vollständig löste, nach dem Filtriren und Abkühlen auf 37⁰ auf eine Reihe von Stellen vertheilt subcutan, und sofort darauf 1,99 g pro Kilo, im Ganzen 5 g Benzoëssäure als Na-Salz in 70 Wasser innerlich. Die tödtliche Dosis beträgt nach Wiener 1,7 g pro Kilo. Die angewandte Dosis von 1,99 g pro Kilo wird nach Wiener bei gleichzeitiger Leucindarreichung symptomlos vertragen. Zunächst war das Thier etwas unruhig, wurde nach einer halben Stunde ruhiger und entleerte etwas blutigen Urin. Am nächsten Tage war es sehr matt, hatte Durchfall. Der um $\frac{1}{2}$ 11 Uhr abgedrückte Urin enthielt etwas Eiweiss. Nachmittags 2 Uhr starb das Thier. Bei der Section enthielt die Blase keinen Tropfen Urin, auch spontan war keiner entleert. Die unter die Haut gespritzte Leucinlösung war überall resorbiert.

Eine Entgiftung hatte also, entgegen den Wiener'schen Angaben, nicht stattgefunden, ob mehr gebundene Benzoëssäure ausgeschieden wurde, konnte nicht festgestellt werden, da das Thier zu früh starb.

Versuch II.

Dieser Versuch ergab ein identisches Resultat. Ein 1600 g schweres Kaninchen, das 24 Stunden gehungert hatte, erhält 6 $\frac{1}{2}$ Uhr Abends subcutan pro Kilo 2,62 g Leucin, im Ganzen 4,2 g, in 80 Wasser gelöst, und pro Kilo 1,9935 g Benzoëssäure als Na-Salz, im Ganzen 3,2 g innerlich. Das Leucin löste sich beim längeren Kochen noch nicht in 70 Wasser, erst nach Zusatz von 10 cem 20 proc. Na₂CO₃-Lösung trat Lösung ein. Während des Einspritzens der auf 37⁰ abgekühlten Lösung begann schon geringe Ausscheidung, beim Einspritzen gingen einige Cubikcentimeter verloren. Abends um $\frac{1}{2}$ 9 Uhr war das Thier noch vollständig normal, am nächsten Morgen wurde es todt gefunden. Der spontan entleerte Urin war eiweissfrei, der in geringen Mengen in der Blase befindliche war stark eiweisshaltig. Bei der Section zeigte sich die Leucinlösung überall resorbiert, nur an einer Stelle war eine sulzige Infiltration von mässiger Grösse.

Das Thier hatte mehrere Stunden gelebt, und ich benutzte den Versuch zum Nachweis, ob aus dem Magen schon sämmtliche Benzoëssäure verschwunden war. Der bei der Section nicht ganz vollständig gewonnene Mageninhalt wurde mit Wasser verdünnt, mit NaOH zur Lösung etwa frei gewordener Benzoëssäure alkalisch gemacht,

1) Das sind die von Wiener benutzten Dosen.

nach dem Absetzen etwa die Hälfte abfiltrirt, mit HCl stark angesäuert, 2 Mal mit Aether extrahirt. Wegen Emulsionsbildung konnte nur etwa die Hälfte des Aetherextractes verarbeitet werden, auch genügte jedenfalls die zweimalige Aetherextraction noch nicht zur völligen Entziehung der Benzoëssäure. Höchstens konnte ich also den 4. Theil der eventuell vorhandenen Benzoëssäure erhalten. Der Aetherrückstand ergab 0,3 g fast reine Benzoëssäure, so dass also im Magen noch mindestens 1 g unresorbirte Benzoëssäure vorhanden war. Der Darminhalt, der gleichfalls noch Benzoëssäure hätte enthalten können, wurde nicht untersucht. Dass der erhobene Befund mit der Annahme von Wiener (s. u.) nicht in Einklang zu bringen ist, dass schon nach wenigen Stunden sämmtliche freie Benzoëssäure wieder ausgeschieden sein soll, wenn sogar ein verhältnissmässig grosser Antheil noch nicht einmal resorbirt zu sein braucht, liegt auf der Hand, und er entspricht auch ganz meinen unten mitgetheilten Versuchen, die die langsame Ausscheidung der Benzoëssäure erweisen.

Versuch III.

In diesem Versuche gab ich eine nicht tödtliche Dosis Benzoëssäure, in der Annahme, dass das Thier dann durchkommen würde und ich die ausgeschiedene Hippursäure auf Beimengung etwa gebildeter Leucinihippursäure untersuchen könnte. Ein Kaninchen von 2300 g Gewicht erhält Mittags 1 $\frac{1}{2}$ Uhr 6 g reines Leucin in 90 ccm Wasser und 10 ccm Na₂CO₃-Lösung, subcutan auf 8 Stellen vertheilt, und gleich darauf 3,5 g (1,5 g pro Kilo) Benzoëssäure als Na-Salz in 50 Wasser innerlich. Es wurde bald darauf schwach, lag platt auf dem Bauche. Um 6 Uhr bekam es zwei sehr starke Krampfanfälle kurz hinter einander und starb. Vorher schon war die Athmung dyspnoisch geworden. Urin hatte es seit der Einspritzung nicht gelassen, die Blase war bei der Section ganz leer.

Versuch IV.

Kaninchen von 2260 g Gewicht erhielt 3,4 g Benzoëssäure (1,5 g pro Kilo) als Na-Salz und 6 g Leucin (2,62 g pro Kilo), beides zusammen in 100 ccm Wasser unter Zusatz von 15 ccm Na₂CO₃-Lösung nach längerem Kochen gelöst und dann auf Körpertemperatur abgekühlt, um 1 Uhr Mittags innerlich mittelst Schlundsonde. Nach einigen Stunden stellten sich höchst intensive flüssige Darmentleerungen ein, und in der Nacht starb das Thier. Die von Herrn Privatdocent Dr. Max Askanazy gütigst vorgenommene Section ergab: Die Nieren auf dem Durchschnitt feucht, etwas trübe, die Magenschleimhaut mässig injicirt, kleine Blutungen. Der ganze Dünndarm und das Cöcum stark erweitert, schwappend mit Flüssigkeit gefüllt, es besteht folliculäre Enteritis. In der Blase einige Cubikcentimeter trüben, stark eiweisshaltigen Urins. Die mikroskopische Untersuchung der Kanincheniere ergab das Vorhandensein einer geringen Nephritis-Hyperämie; nicht sehr ausgedehnte Nekrosen am Epithel verschiedener Abschnitte der Harnkanälchen; etwas hyalin-tropfiger Inhalt in den Kapselräumen der Glomeruli.

Merkwürdigerweise wirkte also das Leucin nicht nur nicht entgiftend auf die Benzoëssäure, sondern die Thiere starben schon nach sonst ungiftigen Dosen, wenn gleichzeitig Leucin gereicht wurde.

Versuch V.

Kaninchen von 1630 g Gewicht erhält Mittags 1½ Uhr 2,7 g Benzoëssäure als Na-Salz innerlich (fast 1,7 g pro Kilo), und unmittelbar vorher 4 g Leucin (nicht ganz 2,6 pro Kilo) in 90 Wasser, kochend ohne Alkalizusatz gelöst, subcutan. Beim Abkühlen schieden sich ganz geringe Mengen aus. Das Kaninchen war Abends noch ganz munter, bekam aber am nächsten Tage sehr starke Hämaturie und etwas Durchfall. Die Hämaturie hielt 2 Tage an, darauf zeigte der Urin noch geringe Eiweissmengen. Das Thier starb erst nach 14 Tagen, so dass ich Gelegenheit hatte, den Urin auf Leucinhippursäure zu untersuchen. Es wurde der Harn von 3½ Tagen verarbeitet.

Der Rückstand der alkoholischen Harnextracte wurde in wenig Wasser gelöst, mit HCl stark angesäuert und 5 Mal mit Essigäther extrahirt, die Extracte mit wenig Wasser gewaschen, nach 24 Stunden, nachdem sie klar geworden, filtrirt, abdestillirt, der letzte Rest auf einem mässig erwärmten Wasserbade in einer Schale verdunstet. Der etwas dunkelgefärbte, krystallinische, mit Harz vermenigte Rückstand wog wenig über 4 g. Er wurde zunächst mit Petroläther ausgekocht, welcher 0,25 g freie Benzoëssäure entfernte, dann aus Wasser, ohne Thierkohlezusatz, umkrystallisirt. Die abfiltrirten Krystalle werden nochmals aus Wasser mit Thierkohle umkrystallisirt, es scheiden sich farblose, lange, dicke, hippursäureartige Nadeln aus, die 1,5 g wiegen und bei 186—188° schmelzen. Die vereinigten beiden Filtrate, die die eventuelle Leucinhippursäure hätten enthalten können, werden heiss mit Ba(OH)₂ gesättigt und 3 Stunden am Rückflusskühler auf dem Sandbade gekocht, darauf mit viel Wasser verdünnt, CO₂ durchgeleitet, das Filtrat eingeeengt, der ausgeschiedene BaCO₃ abfiltrirt, auf 30 ccm eingeeengt, mit H₂SO₄ angesäuert und mit Aether 5 Mal extrahirt. Der Aetherrückstand (Benzoëssäure) wog 0,83 g. Aus der schwefelsauren Lösung wird der Aether verjagt, der BaSO₄ abfiltrirt, die H₂SO₄ genau mit Ba(OH)₂-Lösung ausgefällt. Das farblose Filtrat wird eingedampft, es hinterbleibt ein geringer, dunkelbraun gefärbter syrupöser Rückstand, der nach einigem Stehen nur minimale Mengen Krystalle absetzt, die nicht die Leucinform zeigen.

Auffällig an dem Versuche ist das verhältnissmässig grosse Deficit an Benzoëssäure und auch das eben besprochene Verhalten des Glykokollrückstandes, der sonst bei gleicher Behandlungsmethode sich beim Eindampfen nicht zersetzt und sehr leicht krystallisirt.

Von den umkrystallisirten 1,5 g Hippursäure werden 1,4 g ebenfalls mit heissgesättigtem Barytwasser durch zweistündiges Kochen zersetzt. Ich erhielt 0,86 g reine Benzoëssäure und 0,45 g Glykokoll vom Schmelzpunkt 230°. Leucin liess sich nicht auffinden.

Der versuchte Nachweis von Leucinhippursäure ist also nicht geglückt, und ich muss selbstverständlich die Möglichkeit zugeben,

dass auch keine vorhanden war. Indessen selbst dann berechtigt der Versuch noch keineswegs zu dem von Wiener gezogenen Schlusse, dass das Leucin direct in Glykokoll übergegangen sei, und zu den weiteren von ihm daran geknüpften Schlussfolgerungen. Die Thiere, denen Benzoësäure, auch in nicht toxischen Dosen, und gleichzeitig Leucin dargereicht wurde, zeigten starke, zum Tode führende Vergiftungserscheinungen, meistens trat Hämaturie auf, und es ist nicht ausgeschlossen, dass erhebliche Stoffwechselstörungen eintreten, die zu stärkerem Eiweisszerfall oder sonstigen noch unbekannten und nicht übersehbaren Veränderungen führen, und dass dadurch eine vermehrte Glykokollbildung stattfindet. Vielleicht bildet sich auch wirklich Leucinhypursäure, reizt aber die Nieren so sehr, dass es zu Hämaturie kommt und dass ihre Ausscheidung dadurch verhindert wird. Jedenfalls ist die Sache noch dunkel und bedarf weiterer Aufklärung.

Angesichts der höchst merkwürdigen combinirten Wirkung der Benzoësäure und des Leucins musste ich natürlich noch daran denken, dass das Leucin schon allein giftig wirkte, so sonderbar das auch gewesen wäre. Ich stellte daher folgenden Versuch an:

Versuch VI.

Ein Kaninchen von etwas über 1600 g Gewicht erhält Mittags 1 Uhr 4,5 g Leucin in ca. 100 Wasser unter Zusatz von 15 ccm Na_2CO_3 -Lösung gelöst subcutan. Nachmittags 6 Uhr ist das Thier etwas schwach, die geringe, durch Abdrücken erhaltene Urinmenge, ca. 10 ccm, ist stark alkalisch, enthält kein Eiweiss. Nach dem Stehen über Nacht in einem offenen Schälchen hatten sich an der Oberfläche dicke, weisse Krusten abgeschieden, nach weiterem Stehen und Verdunsten an der Luft bis auf einige Cubikcentimeter war das Ganze erfüllt von Krystalldrüsen, die unter dem Mikroskop aus Kugeln mit radiärer Streifung und am Rande ausstrahlenden spitzen Blättchen bestanden, genau so, wie Leucin in nicht ganz reinem Zustande krystallisirt. Auf einer Thonplatte abgesogen, blieb ein Rückstand, der beim Erhitzen im trocknen Reagensglase sich wie Leucin verhielt. Der Schmelzpunkt konnte nicht genau bestimmt werden, weil die Substanz nicht rein genug war, er lag über 230° . Der erste Urin enthielt also unzersetzt ausgeschiedenes Leucin.

Der am nächsten Tage spontan entleerte Urin, ca. 30 ccm, setzte kein Leucin mehr ab, auch nach dem Eindampfen nicht, war stark alkalisch, enthielt kein Eiweiss, lieferte massenhaft Harnstoff aus dem verabreichten Leucin, schon beim Eindampfen krystallisirte reichlich Harnstoff aus, die alkoholischen Extracte erstarrten beim Eindampfen zu einem festen Krystallbrei von Harnstoff. Das Kaninchen frass reichlich, zeigte keine Vergiftungserscheinungen.

Es bleibt danach die merkwürdige Thatsache bestehen, dass das

an sich ungiftige Leucin in Combination mit nicht toxischen Benzoësäuredosen intensive Vergiftungserscheinungen entfaltet.

Im Anschlusse an diese Versuche prüfte ich noch eine weitere, in seiner Entgegnung auf meine Arbeit enthaltene, aber durch keinen Versuch begründete Behauptung von Wiener, dass nämlich die innerlich verabreichte Benzoëssäure, soweit sie nicht an Glykokoll gebunden werde, in freiem Zustande vollständig innerhalb weniger Stunden ausgeschieden werde. Es handelt sich hierbei um eine für die Wiener'schen Anschauungen sehr wichtige Behauptung, auf die ich an anderer Stelle¹⁾ ausführlicher zurückkomme.

Zwei Wege scheinen mir für eine experimentelle Prüfung der Frage gangbar zu sein: Einmal könnte man in kurzen Zwischenräumen, etwa von 2 oder 4 Stunden nach der Injection des benzoësauren Na, den Urin der Thiere untersuchen und sehen, wann die Ausscheidung der freien Benzoëssäure beendet sei. Diesen directen Weg habe ich nicht beschritten, weil es vielleicht doch gewisse Schwierigkeiten gehabt hätte, bei Kaninchen die Blase stets vollständig zu entleeren, und eine quantitative Bestimmung der Hippursäure und Benzoëssäure in den jedesmaligen geringen Harnmengen doch wohl mit zu vielen Fehlerquellen behaftet gewesen wäre. Ich wählte vielmehr folgenden indirecten Weg: Ich spritzte einem Kaninchen benzoësaures Na innerlich ein und gab nach einer gewissen, in den einzelnen Versuchen wechselnden Zeit, einen grossen Ueberschuss von Glykokoll subcutan. Befand sich jetzt noch freie Benzoëssäure in Circulation, so musste sie sich mit dem Glykokoll paaren und die ausgeschiedene Hippursäuremenge erhöht werden. Für solche vergleichende Bestimmungen ist die Wiener'sche Methode brauchbar, da nach einmaliger Benzoësäureinjection die ausgeschiedene Glykokollmenge nach Wiener's Versuchen eine constante ist. Trat also nach der Einspritzung des Glykokolls eine Vermehrung der Hippursäure auf gegenüber der nach einmaliger blosser Benzoësäureinjection auftretenden Menge, so war daraus zu schliessen, dass zum Zeitpunkte der Glykokolleinspritzung freie Benzoëssäure sich noch in Circulation befand, noch nicht ausgeschieden war, denn eine Paarung der schon ausgeschiedenen Benzoëssäure mit Glykokoll ist natürlich als ausgeschlossen zu betrachten. So konnte ich mit Leichtigkeit die unbewiesene Behauptung von Wiener auf ihre Richtigkeit prüfen.

1) Prager med. Wochenschr. 1902.

Versuch VII.

Ein nach Abdrücken des Urins 1850 g schweres Kaninchen erhält Abends 5 $\frac{1}{2}$ Uhr 1,5 g Benzoësäure pro Kilo, im Ganzen 2,7 g als Na-Salz in 60 Wasser innerlich. 2 Stunden darauf 2,5 g Glykokoll subcutan. Der Urin der nächsten 4 Tage liefert 0,14 g freie und 2,6 g gebundene Benzoësäure¹⁾. Das Thier hätte nach Wiener 0,8 g pro Kilo, im Ganzen also 1,48 g gebundene Benzoësäure liefern müssen, es waren also nach 2 Stunden noch 1,12 g freie Benzoësäure in Circulation, die sich mit dem eingespritzten Glykokoll gepaart haben.

Versuch VIII.

Ein 1660 g schweres Kaninchen erhält Mittags 12 $\frac{1}{4}$ Uhr 1,5 g Benzoësäure pro Kilo, im Ganzen 2,5 g in 50 Wasser innerlich, Nachmittags 6 $\frac{1}{4}$ Uhr 2,5 g Glykokoll subcutan. Das Thier war vor der Glykokolleinspritzung schon schwach, lag platt auf dem Bauch und konnte sich auf den Vorderpfoten nicht aufrichten. Um 9 Uhr Abends wurde es wieder munter. Am nächsten Tage enthielt der Urin Spuren Eiweiss, das Thier wog nur noch 1450 g. Der viertägige Urin lieferte 0,21 g freie und 2,3 g gebundene Benzoësäure. Das Thier hätte nach Wiener 1,328 g gebundene Benzoësäure liefern müssen, es waren also nach 6 Stunden noch 0,97 g freie Benzoësäure in Circulation.

Versuch IX.

Ein Kaninchen von 2150 g Gewicht erhält Abends 6 Uhr 1,5 g pro Kilo, im Ganzen 3,2 g Benzoësäure als Na-Salz in 50 Wasser innerlich. Der Urin des nächsten Tages enthielt höchstens Spuren Eiweiss. Abends 6 Uhr, also nach genau 24 Stunden, erhält es subcutan 2,5 g Glykokoll. Der viertägige Urin lieferte 0,6 g freie Benzoësäure und 2,5 g gebundene. Also selbst nach 24 Stunden war noch nicht alle Benzoësäure ausgeschieden, es fand nach der Glykokollinjection eine Erhöhung der gebundenen Benzoësäure um 0,8 g statt, die noch circulirt haben müssen.

Es folgt ganz unzweideutig aus diesen Versuchen, dass die freie Benzoësäure nicht nur nicht in wenigen Stunden, wie Wiener behauptet, ausgeschieden wird²⁾, sondern sogar nach 24 Stunden noch nicht ganz ausgeschieden zu sein braucht, so dass auch diese Behauptung von Wiener als widerlegt anzusehen ist.

1) Die Bestimmung geschah nach der von mir in der in der Jaffé-Festschrift erschienenen Arbeit angegebenen einfachen Methode.

2) Siehe hierzu noch Versuch II.