XV.

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Breslau.

(Direktor: Prof. Dr. Minkowski.)

Über eine besondere Wirkung des Ureasefermentes auf den tierischen Organismus.

Von

Dr. Alfred Lublin.

Das Ferment Urease, das sich in der Sojabohne, der Jackbohne, der Wurzel der Pseudoakazie und in einer Anzahl anderer Pflanzen findet, zerlegt den Harnstoff in Ammoniumkarbonat und Wasser. Marshall (2) verwertete diese Eigenschaft des Ureasefermentes, indem er das Ureaseverfahren zur Harnstoffbestimmung ersann, das vielfach nachgeprüft und für sehr brauchbar befunden wurde. Unter anderen hat Feigl (17) weitgehende Untersuchungen über den Wert des Ureaseverfahrens angestellt, deren Ergebnis er dahin zusammenfaßt, daß er das Ureaseverfahren als das einzige Verfahren zur quantitativen Harnstoffbestimmung hinstellte. Van Slyke und Cullen (1) und Hahn (3, 4) haben die Methodik des Ureaseverfahrens noch weitgehend vereinfacht, so daß es, was Leichtigkeit der Ausführung anlangt, der Hefegärungsmethode zur quantitativen Bestimmung des Traubenzuckers nicht nachsteht, ja in puncto Präzision diese noch übertrifft.

Nachdem ich mich ebenfalls von der Brauchbarkeit des Soja-Ureaseverfahrens überzeugt hatte und bestätigen konnte, daß die mit dem Ureaseverfahren ermittelten Harnstoffwerte im Harn, Blut, Liquor, in Trans- und Exsudaten mit den Werten übereinstimmten, die das Mikroverfahren nach Bang ergab, ging ich daran, die Wirkung des Ureasefermentes auf den tierischen Organismus festzustellen. Nach dem vorläufigen Abschluß meiner Untersuchungen las ich ein Referat über die mir leider im Original nicht zugängliche Arbeit von Carnot, Gérard und Moissonnier aus dem Pasteurschen Institut, sowie

die Arbeit von Löwgren (5). Diese Autoren haben ebenfalls die Wirkungsweise der Sojaurease auf den tierischen Organismus studiert, und zwar haben die erstgenannten Autoren beobachtet, daß jedes Tier, dem man Sojaurease intravenös oder subkutan gibt, unter dem typischen Bilde der Ammoniakvergiftung zugrunde geht; je größer die Dosis, desto stürmischer die Erscheinungen. Als Ursache des Todes sehen sie eine Anhäufung von Ammoniak in der Leber an. In einzelnen Fällen wollen diese Autoren ein völliges Verschwinden des Harnstoffs aus dem Blut beobachtet haben. Löwgren berichtet über die toxische Wirkung des Sojaureasefermentes: »In den lebenden Organismus subkutan oder intravenös eingeführt, übt die Ureaselösung starke toxische Wirkungen aus, die sich durch Gewichtsabnahme, Durchfall, Temperaturerhöhung und bisweilen Tod kennzeichnen. Daß es sich hier um eine Wirkung des Enzyms handelt, geht aus der Tatsache hervor, daß eine auf 90° erhitzte Ureaselösung keine toxischen Wirkungen hervorbringt«.

In den von mir an Kaninchen und weißen Mäusen angestellten Versuchen über die Wirksamkeit des Sojaureasefermentes auf den tierischen Organismus konnte ich ebenfalls feststellen, daß das Ureaseferment toxisch auf den Tierkörper einwirken kann, jedoch nur bei ganz hohen Dosen: Weiße Mäuse, die extrem hohe Dosen subkutan erhielten, gingen innerhalb von 24 Stunden unter dem Bilde der Ammoniakvergiftung zugrunde, während ich eine tödliche Wirkung bei entsprechend hohen und noch höheren Dosen beim Kaninchen bisher nicht beobachten konnte. Eine deutliche Herabsetzung des Blutharnstoffspiegels beim Kaninchen nach subkutaner Ureaseinjektion konnte ich in mehr als 60 Analysen nur zweimal, ein völliges Verschwinden des Harnstoffs aus dem Blut niemals feststellen; dagegen machten sich beträchtliche physiologische Schwankungen des Harnstoffspiegels häufig geltend. In einem Punkte aber weichen meine Befunde von denen der oben genannten Autoren wesentlich ab, die die Wirkung des Ureasefermentes nach subkutaner Injektion mit denen nach intravenöser Darreichung gleichstellen: Während ich, wie gesagt, nach subkutaner Injektion des Fermentes keine deutliche Wirkung auf das Kaninchen, auch in relativ hohen Dosen, feststellen konnte, lehrten mich meine Versuche, daß die intravenöse Injektion selbst kleiner Dosen des Fermentes den sofortigen oder spätestens 45 Minuten post inj. eintretenden Tod des Tieres zur Folge hatte. Diese Tiere verendeten aber nicht unter dem Bilde der Ammoniakvergiftung, d. h. unter anfänglicher Somnolenz und daran sich anschließenden Krämpfen und Koma, sondern boten mir eher ein Bild einer Embolie

dar. Zu dieser Annahme halte ich mich deshalb um so eher berechtigt, als ich fand, daß eine Ureasefermentlösung in vitro selbst in den stärksten Verdünnungen eine fast sofortige Agglutination der roten Blutkörperchen erzeugte. Diese agglutinierende Eigenschaft des Ureasefermentes auf die roten Blutkörperchen dürfte die Ursache für kapillare Embolien sein, die dann in so foudroyanter Weise zum Tode führte. In einem Falle entleerte das Kaninchen im Augenblick des Verendens einen braunroten Harn, der massenhaft freies Hämoglobin, aber keine intakten roten Blutkörperchen enthielt. Als weiteren Punkt gegen die Ansicht der oben genannten Autoren, der Tod der intravenös gespritzten Tiere sei eine Folge der Ammoniakvergiftung, möchte ich anführen, daß der Tod meiner Versuchstiere viel früher eintrat, als sich überhaupt eine nennenswerte Harnstoffzersetzung im Organismus durch Einwirken des Ureasefermentes entfalten konnte. Nach meinen Erfahrungen läßt sich nämlich die Wirkung des Fermentes in vitro bei Bluttemperatur kaum vor 20 Minuten deutlich nachweisen, wohingegen eines meiner intravenös gespritzten Kaninchen bereits 5 Minuten post. injekt. verendete.

Als Methode der Harnstoffbestimmung im Blut benützte ich das Mikrokjeldahlverfahren nach Bang (Äther-Alkohol-Extraktionsflüssigkeit). Es wurden in jedem Fall drei bis vier Kontrollbestimmungen ausgeführt. Das Ureaseferment wurde nach Marshall in der Weise dargestellt, daß ein Teil Sojabohnenmehl mit fünf Teilen physiologischer Kochsalzlösung 30 Minuten bei 56° im Wasserbade erhitzt wurden. Nach halbstündigem Zentrifugieren (mit etwa 1000 Touren) stellte der grünlich-gelbe homogene Extrakt die konzentrierte (100%ige) Stammlösung dar, die sofort injiziert wurde.

Die Kaninchen wurden durchweg mit Kohlblättern und gekochten Kartoffeln, die weißen Mäuse mit Hafer und milchgetränktem Weißbrot gefüttert.

Während ich in dem bisher Gesagten darlegen konnte, daß ich bei parenteraler Darreichung des Sojaureasefermentes Wirkungen auf den tierischen Organismus beobachten konnte, die sowohl von den oben genannten Autoren in ähnlicher Weise erzielt, aber in anderer Weise gedeutet wurden, so möchte ich im folgenden kurz von einer bisher unbekannten Beobachtung berichten, die sich mir im weiteren Verlauf meiner Versuche bot: Erhöht man den Harnstoffspiegel im Blut des Kaninchens oder der Maus künstlich durch parenterale Darreichung von Harnstoff, und spritzt das Tier sodann subkutan an einer beliebigen Körperstelle mit einer solchen (geringen) Ureasedosis, die an und für sich sicher nicht die geringste Wirkung auf den tierischen

Organismus ausübt, so kommt das Tier ausnahmslos in 1 Stunde bis zu 8 Stunden unter dem Bilde der Ammoniakvergiftung ad exitum. —

Aus Gründen der Raumersparnis seien nur einige wenige Beispiele angeführt. Versuch a, b und c zeigen, daß intravenöse Darreichung von 2—4 g Harnstoff intravenös und 2,5 g Harnstoff subkutan zu einer Erhöhung des Blutharnstoffspiegels führen, ohne das Tier irgendwie zu schädigen. Bemerkenswert erscheint mir die Tatsache, daß der jähe Harnstoffanstieg nach intravenöser Injektion ebensowenig Krankheitserscheinungen auslöst wie der allmähliche Anstieg nach subkutaner Injektion.

Versuch a.

Graues Kaninchen, ♀, 1700 g Gewicht.

Vor der Injektion: 16,3 mg Harnstoff. 4,0 g Harnstoff (10,0 g einer 40%igen Lösung) intravenös. Nach 3 Minuten: 213,0 mg Harnstoff. Nach 8 Minuten: 168,0 mg Harnstoff. Nach $\frac{3}{4}$ Stunden: 67,0 mg Harnstoff. Nach 24 Stunden: 21,0 mg Harnstoff. In 24 Stunden 225 ccm eiweißfreier Harn mit 7,71‰ (= 1,7 g) Harnstoff. Das Tier frißt gut und ist munter!

Versuch b.

Graues Kaninchen, ♀, 2010 g Gewicht.

Vor der Injektion: 8,0 mg Harnstoff. 2,0 g Harnstoff (10,0 g einer 20%igen Lösung) intravenös. Nach 2 Minuten: 72,7 mg Harnstoff. Nach 6 Minuten: 51,3 mg Harnstoff. Nach 45 Minuten: 38,3 mg Harnstoff. Keine Krankheitserscheinungen.

Versuch c.

Gelbes Kaninchen, ♀, 1340 g Gewicht.

Vor der Injektion: 20,3 mg Harnstoff. 2,5 g Harnstoff (10,0 g einer 25%igen Lösung) subkutan. Nach 1 Minute: 21,0 mg Harnstoff. Nach 3 Minuten: 35,5 mg Harnstoff. Nach 6 Minuten: 40,0 mg Harnstoff. Nach 8 Minuten: 52,0 mg Harnstoff. Nach 45 Minuten: 70,3 mg Harnstoff. Keine Krankheitserscheinungen.

Auch weiße Mäuse von 17—23 g Gewicht zeigten nach subkutanen Dosen von 0,1—0,25 g Harnstoff in physiologischer Kochsalzlösung nicht die geringsten Krankheitserscheinungen.

Daß die subkutane Injektion von Sojaureaseferment an und für sich beim Kaninchen und bei Mäusen keinen deutlichen Einfluß auf den Harnstoffspiegel im Blut und das Wohlbefinden dieser Tiere ausüben, mögen die Versuche d und e sowie sieben Versuche an weißen Mäusen dartun.

Versuch d.

Schwarzes Kaninchen, ♀, 1610 g Gewicht.

Vor der Injektion: 4,5 mg Harnstoff. 12^h 30' p. m. 13,0 g (konzentrierter) Sojaextrakt subkutan. Nach 2½ Stunden: 6,6 mg Harnstoff. Nach 3 Stunden: 7,3 mg Harnstoff. Nach 3½ Stunden: 5,6 mg Harnstoff. Nach 5 Stunden: 13,0 mg Harnstoff. Nach 6 Stunden: 6,6 mg Harnstoff. Nach 8 Stunden: 13,6 mg Harnstoff. Keine Krankheitserscheinungen.

Versuch e.

Schwarzes Kaninchen, ♀, 1620 g Gewicht.

Vor der Injektion: 18,0 mg Harnstoff. 12^h 00' mittags: 14,0 g (konzentrierter) Sojaextrakt subkutan. Nach 2 Stunden: 23,6 mg Harnstoff. Nach 4 Stunden: 26,3 mg Harnstoff. Keine Krankheitserscheinungen.

Sieben Versuche an weißen Mäusen im Gewicht von 17—23 g zeigten ebenfalls, daß die subkutane Injektion einer konzentrierten Ureaselösung (1,0 g Lösung pro 15 g Maus) in keiner Weise das Wohlbefinden dieser Tiere beeinträchtigte.

Die tödliche Wirkung des subkutan injizierten Sojaureasefermentes bei gleichzeitiger Gabe von 2—4 g Harnstoff geht dagegen aus den Kaninchenversuchen f und g und aus den nachstehenden 11 Versuchsreihen an Mäusen hervor.

Versuche an Kaninchen.

(Ureaseferment + Harnstofflösung subkutan.)

Versuch f.

Gelbes Kaninchen, ♀, 1450 g Gewicht.

Vor dem Versuch	9,0 mg Harnstoff
5 ^h 30' p. m. 15,0 g (konzentrierter) Sojaextrakt subkutan.	
Nach 10 Minuten	6,0 » »
» 20 »	12,0 » »
Keine Reaktion.	
6 ^h 50' p. m. 4,0 g Harnstoff (10,0 g einer 40%igen Lösung) subkutan.	
Nach 15 Minuten	65,5 » »
» 30 »	76,0 » »
» 1 Stunde	83,0 » »

Nach 3 Stunden liegt das Tier in extremis.

Im Venenblut 51,2 mg Harnstoff.

Herztätigkeit gut. Kußmaulsche Atmung. Weite Pupillen. Starkes Pulsieren der Ohrarterie. Haut- und Sehnenreflexe gesteigert.

Nach 3 weiteren Stunden Exitus, nachdem das Tier nach und nach schwächer geworden war.

Im Herzblut unmittelbar post mortem 45,6 mg Harnstoff.

Letzter spontan entleerter Harn frei von Eiweiß und Blut, enthält aber viel phosphorsaure Ammoniakmagnesia und Ureaseferment.

Versuch g.

Schwarzes Kaninchen, ♀, 1740 g Gewicht.

12^h 00' 20,0 g (konzentrierter) Sojaextrakt subkutan (rechter Hinterlauf).

Keine Reaktion.

Nach 3 Stunden 4,0 g Harnstoff (10,0 g einer 40%igen Lösung) subkutan (linker Hinterlauf).

Nach 1 1/2 Stunde feuchte Schnauze und leichter Opisthotonus. Rhythmische schnappende Zuckungen.

Nach weiteren 15 Minuten blitzartige Bewegungen am ganzen Körper. Das Tier wird nach und nach schwächer und verendet nach weiteren 35 Minuten. Autopsie ohne krankhaften Befund.

Versuche an Mäusen.

(Ureaseferment + Harnstofflösung subkutan.)

Kontrolltiere		Versuchstier
Maus 1, 17 g Gewicht 0,1 g Harnstoff	Maus 2, 18,5 g Gewicht 1,0 g Ureaselösung	Maus 3, 18,5 g Gewicht 0,1 g Harnstoff + 0,1 g Ureaselösung + nach 1 Stunde unter blitzartigen Zuckungen und Sprüngen
Keine Reaktion		
		Maus 2, 17 g Gewicht 0,2 g Harnstoff + 0,4 g Ureaselösung + nach 12 Stunden (Somnolenz)
Maus 1, 18 g Gewicht 0,2 g Harnstoff + 1,0 g NaCl	Maus 7, 23 g Gewicht 1,0 g Ureaselösung + 1,0 g NaCl	Maus 8, 22 g Gewicht 0,2 g Harnstoff + 1,0 g Ureaselösung + nach 8 Stunden (Somnolenz)
Keine Reaktion		
		Maus 9, 16,5 g Gewicht 0,2 g Harnstoff + 1,0 g Ureaselösung + nach 7 Stunden (Somnolenz)
		Maus 1, 17 g Gewicht 0,3 g Harnstoff + 1,25 g Ureaselösung + nach etwa 10 Stunden (Somnolenz)

Kontrolltiere		Versuchstier
Maus 7, 0,1 g Harnstoff Keine Reaktion	Maus 4, 1,0 g Ureaselösung Keine Reaktion	Maus 10, 17 g Gewicht 0,1 g Harnstoff + 1,0 g Ureaselösung † nach 7 Stunden (Somnolenz)
Maus 14, 23 g Gewicht 0,1 g Harnstoff + 1,0 g NaCl Keine Reaktion	Maus 16, 18,5 g Gewicht 1,0 g Ureaselösung + 1,0 g NaCl Keine Reaktion	Maus 15, 17 g Gewicht 0,1 g Harnstoff + 1,0 g Ureaselösung † nach 16 Stunden (Somnolenz)
Maus 13, 22 g Gewicht 0,25 g Harnstoff + 1,0 g NaCl Keine Reaktion	Maus 19, 21 g Gewicht 1,0 g Ureaselösung + 1,0 g NaCl Keine Reaktion	Maus 20, 22,5 g Gewicht 0,25 g Harnstoff + 1,0 g Urease- lösung † nach 27 Stunden (Somnolenz)
Maus 14, 24 g Gewicht 0,25 g Harnstoff + 1,4 g NaCl Keine Reaktion	Maus 13, 22 g Gewicht 1,46 g Ureaselösung + 1,0 g NaCl Keine Reaktion	Maus 7, 20 g Gewicht 0,25 g Harnstoff + 1,3 g Urease- lösung † nach 7 Stunden (Somnolenz)
		Maus 4, 17 g Gewicht 0,25 g Harnstoff + 1,1 g Urease- lösung † nach 1 Stunde unter Krämpfen
	Maus 21, 15 g Gewicht 1,0 g Ureaselösung + 1,0 g NaCl Keine Reaktion	Maus 18, 15 g Gewicht 0,25 g Harnstoff + 1,0 g Urease- lösung † nach 25 Minuten unter stürmischen Krämpfen

Daß das Ureaseferment etwa 3 Stunden post injectionem im Harn erscheint und ohne jede Schädigung der Harnsekretion etwa 48 Stunden post injectionem ausgeschieden ist, habe ich wiederholt beobachten können.

Die merkwürdige Tatsache, daß relativ hohe, subkutan injizierte Ureasedosen keine deutlich herabsetzende Wirkung auf den Harnstoffspiegel des Kaninchens ausüben, selbst in den Fällen, in denen nach gleichzeitiger Gabe von Ureaseferment und Harnstoff der Tod des Tieres eintrat, wäre vielleicht so zu erklären, daß das in irgendwelchen Organen (z. B. im Gehirn) durch die Ureasewirkung auf den Harnstoff freiwerdende Ammoniumkarbonat sofort wieder in der Leber synthetisch in den ungiftigen Harnstoff übergeführt wird.

Im Zusammenhange mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen darf ich die Urämietheorie Frerichs erwähnen, der 1851 den Satz aussprach, daß »die Verwandlung von Harnstoff in Ammoniumkarbonat im Blut bei Anwesenheit eines Fermentes die Ursache für das Zustandekommen der Urämie sei«. In weiteren Versuchsreihen wird der Frage nachgegangen werden müssen, ob der Nachweis von Ureaseferment im Blut und Harn bei Urämikern gelingt.

Literatur.

1. Marshall, Journ. of Biol. Chem. 1913, Nr. 14, S. 283 und Nr. 15, S. 487. —
2. van Slyke, Zacharias and Cullen, Dtsche. med. Wochenschrift 1914, S. 1219. — 3. Hahn und Saphra, Ebenda, S. 431. — 4. Hahn, Ebenda, 1915, Nr. 5. — 5. Löwgren, Bioch. Zeitschr., Bd. 119. — 6. Rona und Petow, Ber. über d. ges. Physiol. u. exp. Pharm. V, 1921, S. 447. — 7. Rona und György, Ebenda, S. 554. — 8. Wester, Ebenda, S. 115. — 9. Carnot, Gérard et Moissonnier, Annales de l'institut Pasteur, 1921, Vol. 35, Nr. 1, S. 1—42; ref. in den Ber. über d. ges. Physiol. u. exp. Pharm., Juni 1921, Bd. 7, Hft. 3—4, S. 227. — 10. Thoms, Ber. d. dtsch. pharmazent. Ges., 1920, Jhg. 30, Hft. 3, S. 175. — 11. Pin Yin Yi, Ebenda, S. 178. — 12. Wester, Ebenda, S. 163. — 13. Dox, Americ. journ. of pharm., Bd. 93, Nr. 3, S. 153. — 14. Partos, Bioch. Zeitschr., Bd. 103, Hft. 4/6, S. 292. — 15. Friedländer, Münch. med. Wochenschrift 1921, S. 1225. — 16. Joannowies, Arch. intern. de Pharmacodynamie et de Thérapie, 1903, Bd. 12, 1 und 2. — 17. Feigl, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., Bd. 12, Hft. 1/2. — 18. Strohmann und Flintzer, Zentralbl. f. innere Med., 1921, Nr. 27. — 19. v. Schröder, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1885, Hft. 19, S. 373. — 20. Frerichs, zit. bei Salkowski und Leube, Die Lehre vom Harn 1882. — 21. Naunyn, Berl. klinische Wochenschrift 1869, Nr. 4. — 22. Schleich, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1875, Hft. 4, S. 82. — 23. Margarete Falk, Bioch. Zeitschr. 1914, Bd. 59, S. 298. — 24. Löffler, Ebenda 1916, Bd. 76, S. 55. — 25. Jacoby, Ebenda 1916, Bd. 76, S. 275. — 26. Guggenheimer, Arch. f. klin. Med. 1913, Bd. 112, S. 248. — 27. Wester, Bioch. Zeitschrift Bd. 122, S. 188.

Nachtrag bei der Korrektur.

Während der Drucklegung dieser Arbeit hatte ich Gelegenheit, die oben zitierte Arbeit von Carnot, Gerard et Moissonnier im Original zu lesen. Die von meinen Resultaten in wesentlichen Punkten abweichenden Befunde dieser Autoren sind wohl einerseits durch die Herstellungsweise der Fermentlösung (Alkohol-Ätherfällung), andererseits aber auch dadurch zu erklären, daß ich meine Versuche an Kaninchen und weißen Mäusen anstellte, während C., G. et M. Hunde als Versuchstiere benutzten.