

Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. T. RIECHERT)

Untersuchungen über freie Aminosäuren und Amine in Gehirn und Leber unter Anwendung der Hochspannungselektrophorese bei Normaltieren und nach Hypoxie

(Ein Beitrag zum Krampfgeschehen)* **

Von

ROBERT HEMMER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. März 1958)

I. Einleitung

Die weitaus größte Zahl biochemischer Untersuchungen über die Epilepsie bezieht sich auf das Verhalten der Körperflüssigkeiten vor und nach dem Anfall. Untersuchungen des Gehirns selbst sind nur in relativ geringer Zahl durchgeführt worden (siehe unten). Bisher gibt es unseres Wissens keine Untersuchungen über das Verhalten von Aminosäuren, Peptiden und Aminen in Leber und Gehirn nach dem Krampfanfall. Die fortlaufende Entwicklung chromatographischer Methoden und ihrer Modifizierungen (Hochspannungselektrophorese) machen es nun auch dem Kliniker möglich, sich mit biochemischen Fragen im Rahmen dieser Methodik zu beschäftigen und klinischen Problemen nachzugehen. Die vorliegende Arbeit stellt sich zur Aufgabe, die mittels *Hochspannungselektrophorese aufgetrennten niedermolekularen Rest-N-Substanzen von Gehirn und Leber* auf Grund ihrer Färbbarkeit zu untersuchen, die darin enthaltenen körpereigenen Wirkstoffe pharmakologisch zu vergleichen und ihr Verhalten nach *Hypoxie* zu prüfen. In einer anderen Arbeit sollen die Veränderungen bei Elektroschock untersucht werden.

Zum Vergleich von Hypoxie und Elektroschock führte die Tatsache, daß im Anfall, der nicht durch Muskelrelaxantien modifiziert wird, infolge des Stimmritzenverschlusses und der erhöhten Motorik ein hochgradiger Sauerstoffmangel einsetzt, der zur Cyanose führt. Der Sauerstoffmangel kann — je nach dem Zustande des Zentralnervensystems — sich unter Umständen verschieden auswirken. Beim hypoxischen Krampf (BÜCHNER u. Mitarb.), der meist Streck-Krämpfen vom decerebrierten Typ entspricht und auch im Hirnstrombild keinerlei Krampfpotentiale zeigt (CREUTZFELDT u. a.) kann Zufuhr von Sauerstoff

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** I. Mitteilung

den Krampf schlagartig beenden; auf der anderen Seite kann Sauerstoffdrosselung einen Krampf durch Lähmung der Zellfunktion hemmen. Für den generalisierten Krampfanfall bzw. die sich dabei abspielende Krampftätigkeit ist eine adäquate Sauerstoffzufuhr erforderlich (GURDJIAN, WEBSTER u. STONE und JASPER u. ERICKSON). Schließlich kann ein in Gang gekommenes Krampfgeschehen durch Sauerstoffzufuhr verlängert werden (RUF). Die Möglichkeit, daß anoxische Schädigungen des Gehirns in der Folge zur Entstehung einer Epilepsie mit einem elektrencephalographisch nachweisbaren „Focus“ führen können (GIBBS, GIBBS u. LENNOX), das Auftreten epileptischer Krampfanfälle 2—3 Tage nach einer kurzen Periode schwerer Anoxie (WEINBERGER-GIBBON) und schließlich das Auftreten abnormer elektrischer Aktivität mit Krampfpotentialen nach vorübergehendem Verschuß der A. cerebri media beim Affen (HARVEY u. RASMUSSEN) geben weitere Hinweise für die Bedeutung des Sauerstoffmangels im Rahmen des epileptischen Geschehens.

Veränderungen des Stoffwechsels von Gehirn und Leber im Sauerstoffmangel

Im Sauerstoffmangel finden sich im *Gehirn* viele Parallelen zu den chemischen Veränderungen nach Elektroschock. So stellt STONE unter anderem einen Milchsäureanstieg auf mehr als 200% nach 2—3 min Anoxie, raschen Abfall des Phosphokreatin und relativ stabiles ATP fest. In der Ischämie nimmt nach anderen Autoren das ATP langsam aber stetig ab und ist nach 9 min kaum noch nachweisbar (THORN, PFLEIDERER, FROWEIN u. ROSS). Nach GERLACH, DÖRING u. FLECKENSTEIN geschieht die Abnahme des ATP noch schneller (innerhalb der 2. min um 50%). Glykogen ist bei Hypoxie relativ stabil, desgleichen die Brenztraubensäure, Glucose verhält sich zum Blut in normalen Werten (STONE), bei Anoxie erfolgt eine Ammoniakvermehrung. Die Acetylcholin-Konzentration des Gehirns dient nach CROSSLAND und RICHTER als empfindlicher Maßstab der Atmungskettenphosphorylierung und es muß damit gerechnet werden, daß im Gehirn in der Hypoxie diese Funktion gestört ist, bevor es zu merklicher Beeinträchtigung der Atmung kommt (SCHMIDT, BÜCHNER). Sicher ist jedenfalls nach anfänglicher Steigerung der Sauerstoffaufnahme (OPITZ u. SCHNEIDER) und vermehrter Durchblutung auf Kosten anderer Organe (NOELL u. SCHNEIDER) der rasche Abfall der energiereichen Phosphatverbindungen, die Erschöpfung der Substrate, Zerstörung der Co-Fermente und die Anhäufung der Milchsäure. Letztere muß aber rasch wieder in die Peripherie ausgeschwemmt werden, denn neuere Untersuchungen WINTERSTEINS zeigten, daß während und nach dem Sauerstoffmangel eine Alkalisierung des Liquors eintritt. Hierzu würde auch die von STONE festgestellte pH-Steigerung in der Hirnrinde bei Hypoxie passen, die ebenso wie die Alkalisierung des Liquors auf den raschen Abtransport der sauren Stoffwechselprodukte durch die vermehrte Durchblutung zurückgeführt wird. Die Verhältnisse verstärken sich bei schwerster Hypoxie oder Anoxie. Es treten dann auch morphologisch faßbare Änderungen auf, wobei die Vulnerabilität des Gehirns im ganzen von den cranialen zu den caudalen Teilen abnimmt. Das „Schädigungsmuster“ bei anderen Versorgungsstörungen (Co-Vergiftung usw.) ist wieder anders und bevorzugt die basalen Ganglien. Hierüber liegen viele Untersuchungen von BÜCHNER u. Mitarb. vor. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß ein schwerer kritischer Sauerstoffmangel im Gehirn seine

irreversiblen Spuren (Ganglienzellnekrose, ischämische und homogenisierende Ganglienzellerkrankung SPIELMEYERS) auch dann hinterlassen kann, wenn er überlebt wird (ALTMANN u. SCHUBOTHE).

Veränderungen des *Leberstoffwechsels* in der Hypoxie sollen nur insoweit berücksichtigt werden, als sie für das Verständnis unserer eigenen Untersuchungsergebnisse unerlässlich sind. Leber und Herz werden durch Sauerstoffmangel früher (und nachhaltiger) irreparabel geschädigt als das Gehirn (PICHOTKA, MÜLLER u. ROTTER, ALTMANN u. SCHUBOTHE). Bei subkritischer Hypoxie ist die Leberfunktion reversibel gestört, es findet sich auch eine Hemmung der oxydativen ATP-Bildung (BÜCHNER). DUSPIVA u. NOLTENIUS (zit. nach BÜCHNER) fanden bei sofortiger Tiefkühlung des excidierten Leberstückchens nur eine etwa 20%ige Abnahme der ATP-Konzentration, wobei ADP und AMP konstant blieben. Was die Aminosäuren anlangt, so tritt — wenigstens im Plasma nur bei relativ schwerer Lebererkrankung eine Vermehrung der Aminosäuren ein. STARY berichtet, daß nur bei bereits vorhandenem Parenchymschaden der Leber eine Veränderung in ihrem Aminosäuregehalt festzustellen ist. Bei Anoxie soll ein Anstieg des Amino-N auf sehr hohe Werte nur bei Tieren, die bereits moribund sind, vorhanden sein (WIGGERS). Niedriger Sauerstoff-Druck beschleunigt die Bildungsgeschwindigkeit der Amine, so daß sie sich bei der Hypoxie anhäufen können (DRUCKREY). Eine Fernwirkung dieser Amine, die besonders in Leber und Niere gebildet werden, auf das Gehirn ist denkbar (HOLTZ).

II. Methodik

Die Hypoxieversuche wurden größtenteils mit einem Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch (7% O₂ 93% N₂) durchgeführt. Aus einer Gemisch-Bombe bekam das evipanarkotisierte Tier über ein Flatterventil (STEPHAN-SLATER) das Atmungsgemisch zugeführt. Auch wurden kurzdauernde Anoxien (1—2 min) bis zum Atemstillstand oder hypoxydotischen Krämpfen herbeigeführt, indem wir die Tiere industriellen Stickstoff (2% O₂) atmen ließen.

Organverarbeitung und Färbung

Während der Hypoxie wurde die Schädeltrepanation und Bauchsektion vorgenommen, Leber und Großhirn einschließlich der basalen Ganglien gleichzeitig entnommen. Die Organe kamen sofort nach Entnahme in ein Kohlensäure-Aceton-Gemisch (—85°C) und wurden gefroren. Danach erfolgte die Verarbeitung, wie sie früher von HEILMEYER u. Mitarb. angegeben wurde. In einem Methanol-Aceton-Gemisch (3 : 1) wurde das Homogenat 24 Std im Eisschrank bei —4°C aufbewahrt, dann zentrifugiert, filtriert und im Vakuum sowie im Wasserbad bei 38°C unter Kohlensäure zur Trockene eingeengt, dann erneut mit einem Methanol-Aceton-Gemisch (1 : 1) nachgefällt. Die Auftragung der Substanz wurde nach Auflösen im Puffergemisch (siehe unten) vorgenommen. Testungen mit verschiedenen Mengen ergaben uns bei einer Streifenbreite 12 cm und einer Länge von 1 m eine Auftragsmenge für Leber entsprechend 6 g Organgewicht und für Gehirn entsprechend 5 g Organgewicht als zur färberischen Darstellung am besten geeignet.

Die Auftrennung der niedermolekularen Rest-N-Substanzen erfolgte mit der von HEILMEYER u. Mitarb. zum klinischen Gebrauch modifizierten Hochspannungselektrophorese, die zuerst von MICHL, später von WESTPHAL und KICKHÖFEN beschrieben wurde¹. An einen Hochspannungsgleichrichter mit einer Klemmspannung von 10000 Volt und einer Stromstärke bis zu 100 Milliamp. waren 3 Kammern angeschlossen. Die beiden kleineren erlaubten Streifen von 60 cm Länge und 7,5 cm

¹ Herrn Prof. HEILMEYER sowie Herrn Dr. CLOTTEN, Frl. Dr. LIPP und Herrn Doz. Dr. REHN bin ich für die Einarbeitung in die Methodik und die freundliche Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet.

Breite, die große Kammer (nach CLOTTEN) 2 Streifen bis zu 1,20 m Länge und 15 cm Breite aufzuhängen. Als Kühlung verwandten wir einen Solekühler der Firma Brown Boveri & Comp. Die Streifen (Schleicher u. Schüll 2034 B) hängen in Elektroden-nähe (Platin bzw. Kohleelektroden) in einem Pyridin-Eisessig-Wassergemisch (1 : 10 : 89) mit einem p_H von 3,6. Als inertes Medium wurde Heptan verwandt. Vor dem Aufhängen wird der Streifen mit Puffer (Pyridin-Eisessig-Wasser) getränkt und durch eine Walzenpresse gepreßt. Die Auftragung der Substanz erfolgte zu Vergleichszwecken stets in gleichen Mengen. Die Auftragsstelle befindet sich bei kleinen Streifen 15 cm vom anodischen Streifenende, beim großen Streifen 30 cm. Wir arbeiteten durchweg mit einer Spannung von 60 V/cm und einer Laufzeit von 1—5 Std. Die Streifen wurden anschließend im Trockenschrank bei 100° C getrocknet und mit Ninhydrin (0,2% in Aceton) gefärbt. Die Fixierung erfolgte mit Cadmiumchlorid (KAWEAU u. WIELAND), wobei die vorher violette Färbung in eine rote übergeht. Zur weiteren Differenzierung wurde noch die Färbung nach REINDEL verwandt, die eine bessere Lokalisation niederer Peptide erlaubt, welche sich mit Ninhydrin nicht darstellen. Die Färbung mit diazotierter Sulfanilsäure (PAULY) wies die aromatischen Substanzen mit kirschroter bis gelber Färbung nach, während die Sulfhydrylfärbung mit Nitroprussidnatrium (TOENNIES u. KOLB) die S-H- und S-S-Bindungen vor allem also das Glutathion in seiner reduzierten und oxydierten Form erkennen läßt. Zur Ergänzung wurde auch die Platinchloridfärbung (CONDEN, GORDON u. MARTIN), welche noch das Methionin kenntlich machte, angewandt. Wir verglichen die Streifen, indem wir uns an die von HEILMEYER, CLOTTEN u. LIPP ausgearbeiteten Pherogramme hielten und große Gruppen einander gegenüberstellten (basische, neutrale und saure Fraktionen).

Biologische Testung der Substanzen

Zur biologischen Testung für unsere Substanzen verwandten wir in erster Linie die blutige Blutdruckregistrierung an der Katze. Außerdem prüften wir die Wirkung dieser Substanzen auf das Hirnstrombild.

Substanzgewinnung. Neben einzelnen „Total-Organen“, worunter wir die eingengten Rest-N-Substanzen ohne Auftrennung durch die Hochspannungselektrophorese verstehen, wurden die Streifeneluate i.v. injiziert. Die Streifen wurden nach dem Trocknen und Färben eines 1 cm breiten Orientierungsstreifens in verschiedene Abschnitte eingeteilt, welche herausgeschnitten und mit aqua dest. eluiert wurden. Mit entsprechender Menge einer physiologischen Kochsalzlösung versetzt, injizierten wir 1 cm³ dieser Lösung. Die Ausgangsmenge für die Lebereluate entsprach einem Organgewicht von 40 g, die des Großhirns einem Organgewicht von 10 g.

*Blutdruckregistrierung*¹. Nach Evipan- oder Numal-Narkose (5 mg/kg) i.v. wurde zur Injektion der Substanzen eine Kanüle in die V. femoralis eingebunden. Die Blutdruckregistrierung erfolgte über ein mit der A. femoralis, A. iliaca oder A. Carotis verbundenes Quecksilbermanometer auf ein Russkymographion. (Trendelenburgsche Gegenstrominfusion). Das Blut wurde mit Heparin ungerinnbar gemacht.

¹ Für die Einarbeitung in die Methodik, vor allem die Möglichkeit, diese Untersuchung im Pharmakologischen Institut durchführen zu dürfen, bin ich Herrn Prof. JANSSEN zu besonderem Dank verpflichtet. Herrn Doz. Dr. SCHMIDT danke ich für seine Unterstützung.

III. Ergebnisse

Das Verhalten von Leber und Gehirn der Normaltiere im Hochspannungselektropherogramm

Bevor wir die Unterschiede der Pherogramme unter verschiedenen Bedingungen untersuchen, ist es nötig, die normale Variationsbreite der Gehirn- und Leberpherogramme kennen zu lernen („Leer-Organ“).

Bei der Deutung des Farbverhaltens der niedermolekularen ninhydringefärbten Rest-N-Substanzen ist Zurückhaltung geboten. Unterschiede in der Streifenfeuchtigkeit, Diffusionserscheinungen, Elektroosmose, Temperaturschwankungen und Störungen des Ionengleichgewichts können Fehlerquellen rein technischer Art verursachen (HEILMEYER u. Mitarb.). Vor allem ist die Methode in quantitativer Hinsicht begrenzt. Dies ist u. a. dadurch bedingt, daß die Anfärbbarkeit der einzelnen Aminosäuren unterschiedlich ist. So kann eine scheinbar gleiche Farbtintensität zweier Aminosäuren in Wirklichkeit aus einem mengenmäßig erheblichen Überwiegen einer schlechter anfärbbaren Aminosäure resultieren. Darauf hat JÜNGST KOFRANY aufmerksam gemacht. So kann nur die Kenntnis einer großen, unter vergleichbaren Bedingungen gewonnenen Zahl von Pherogrammen vor Fehlurteilen schützen. Auch wir mußten aus diesem Grunde einige frühere Ergebnisse einer Revision unterziehen.

Zur Feststellung der *normalen Variationsbreite der Pherogramme von Leber und Gehirn* der Katze untersuchten wir 50 Tiere. Wir beschränkten unsere Untersuchungen auf den Vergleich der 3 großen Gruppen: anodisch wandernde saure Fraktionen, nahe der Auftragsstelle lokalisierte neutrale Fraktionen und kathodisch wandernde basische Fraktionen. Einzelne Aminosäuren sind auch in diesen Komplexen zu lokalisieren. So stellen sich Glutaminsäure und Asparaginsäure im Bereich der anodischen Fraktionen, Histidin als basische Aminosäure dar. Den Abschluß der färbbaren Substanzen bildet das Histamin nahe der Kathode.

Die *Evipan-Narkose* und zusätzliche Injektion eines Muskelrelaxans (Skolin¹) wirken sich auf das Pherogramm nicht aus. Die Pherogramme beider Organe zeigen ein unterschiedliches Verhalten, welches so ausgeprägt ist, daß man direkt von einem „organspezifischen Farbenspektrum“ sprechen kann. Bei gleicher Auftragsmenge (entsprechend 5g Organgewicht) sind die Schwerpunkte der ninhydrinpositiven Substanzen verschieden ausgeprägt (Abb. 1). Glutaminsäure und auch noch Asparaginsäure sind im Hirnpherogramm deutlich als stärkere Fraktionen zu erkennen. Das Leberpherogramm zeigt im Bereich der neutralen Fraktionen die stärkere Ausdehnung und Intensität der Färbung, ebenfalls sind die basischen aromatischen Fraktionen wesentlich stärker ausgeprägt. Im Pherogramm des Hirns stellt sich dagegen eine nicht aromatische Aminosäure, das Arginin als Hauptkomponente der stark färbbaren basischen Fraktion dar. Nach salzsaurer Hydrolyse dieser

¹ Succinyl-bis-cholinchlorid.

Fraktion kommt praktisch nur das Arginin zur Darstellung, während Histidin und Glutaminsäure lediglich angedeutet sind.

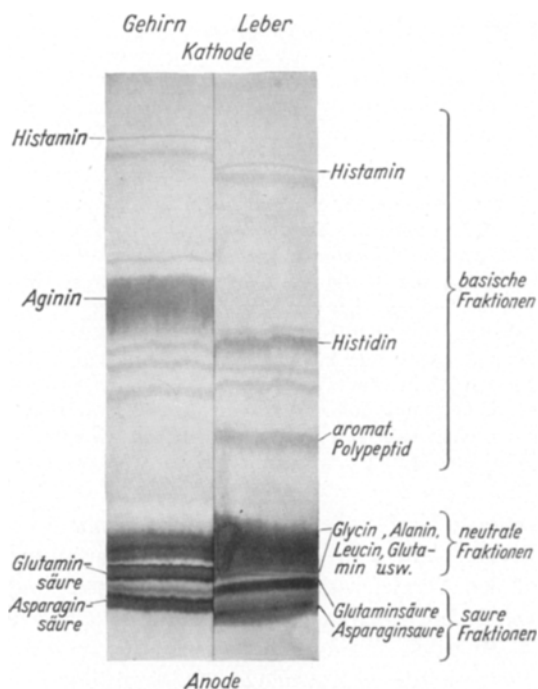


Abb. 1. Hochspannungselektropherogramm von Gehirn und Leber normaler Tiere (Laufzeit 100 min 60 v/cm) Ninhydrinfärbung

Vergleichende quantitative Untersuchungen von DENTON, WILLIAMS und ELEVEHJEM (siehe FELIX) an der Ratte ergaben im Gehirn der Ratte den beinahe doppelten Arginingehalt der Leber. Auch das Verhalten der Peptide zeigt Unterschiede, die sich vor allem an den kathodenwärts wandernden Fraktionen manifestieren. Ein in der Leber häufig sehr stark vorkommendes Peptid, welches wir als Fraktion A abgegrenzt haben und das sich nach Elution und salzsaurer Hydrolyse als aus mehreren Aminosäuren (Asp.-S., Glut.-S., Serin, Glutamin, Glycin, Alanin u. a.), basischen Aminen und vor allem dem starken aromatischen Histidin zusammengesetzt erwies, ist im Hirn nur äußerst selten und dann nur ganz schwach vorhanden.

Andere Organe des Zentralnervensystems

wie Kleinhirn und Rückenmark weisen das gleiche Verteilungsmuster wie das Großhirn auf, was sich in über 20 Kontrolluntersuchungen zeigte.

Das Pherogramm nach Hypoxie

Die *Hypoxie-Versuche* (13) wurden teils mit zeitlich gestuftem Sauerstoffmangel (45—180 min 7% O₂), teils mit wiederholter kurzfristiger Anoxie herbeigeführt.

Im *Hirnptherogramm* findet keine mit färberischen Methoden faßbare Veränderung der ninhydrinpositiven Rest-N-Substanzen statt. Auch die aromatischen und schwefeltragenden Verbindungen lassen keine Veränderung erkennen.

Im *Leberpherogramm* tritt nach Hypoxie eine allgemeine *Vermehrung ninhydrinpositiver Fraktionen* ein. Die neutralen und sauren Fraktionen sind vor allem vermehrt, teilweise sogar so stark, daß die Auftrennung nicht mehr sauber erfolgt und wie auf der Schwarz-weiß-photographie

ersichtlich saure und neutrale Substanzen einen großen dunklen Komplex bilden (Abb. 2).

Es ist dabei gleichgültig, ob wiederholte kurzfristige Anoxie oder bis zu 3 Std dauernde Hypoxie angewandt wurden.

Nach 5stündiger Auftrennung der Fraktionen anodenwärts läßt sich die Vermehrung der sauren ninhydrinpositiven Substanzen ebenfalls deutlich erkennen (Abb. 3). Der auf Grund dieser Auftrennung bessere

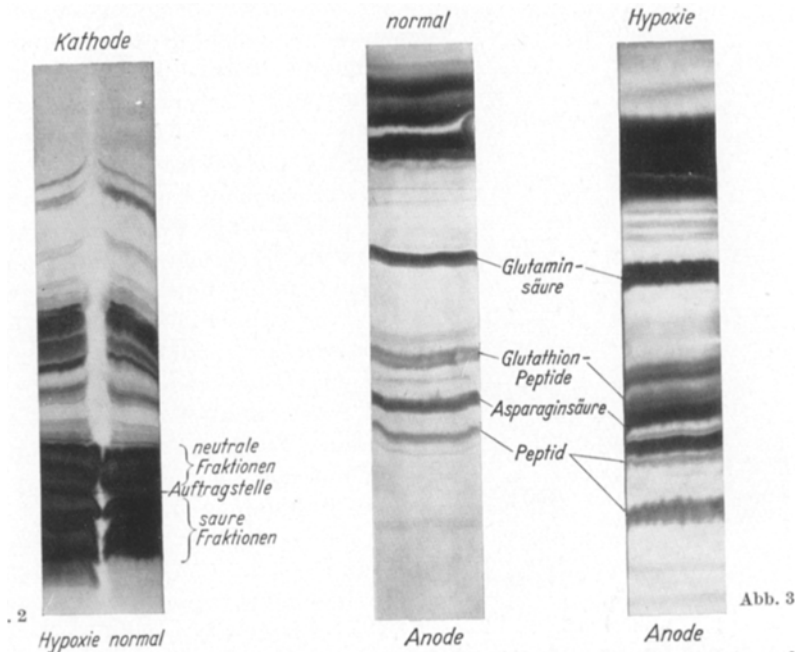


Abb. 2. Komparatives Leberpherogramm (Ninhydrinfärbung). Deutliche Vermehrung neutraler und saurer Aminosäuren und Peptide nach Hypoxie. (Wiederholte Anoxie) (Laufzeit 100 min, 60 v/cm)

Abb. 3. Leberpherogramm von Normaltier und nach Hypoxie. 5stündige Auftrennung der sauren Aminosäuren und Peptide (60 v/cm)

Überblick über das Verhalten des Glutathions erlaubt jedoch nicht den Schluß, daß auch dieses vermehrt sei. Die spezielle Färbung der S-S- und S-H-Gruppen zeigt nämlich, daß das Glutathion selbst nicht sicher verändert ist, sondern die diese Fraktion begleitenden Peptide vermehrt sind. Wir finden eine sichere Vermehrung der Glutaminsäure, Asparaginsäure sowie der normalerweise auch gering vorhandenen Peptide.

Das Verhalten blutdruckwirksamer Stoffe der Rest-N-Substanzen von Gehirn und Leber bei Normaltieren

Die Prüfung der blutdruckwirksamen Substanzen innerhalb der Rest-N-Fraktion machte eine Unterteilung der aufgetrennten

Substanzen nötig. Die Streifen wurden nach der Hauptlokalisation der großen ninhydrinpositiven Fraktionen beim Gehirn in 5 bei der Leber in 6 Abschnitte eingeteilt. (Abb. 4) in X_1 sind nicht färbare, am weitesten kathodenwärts wandernde basische Substanzen lokalisiert, in X_2 von der Auftragstelle anodenwärts wandernde saure Substanzen, wobei die stark färbaren Fraktionen Glutaminsäure, Glutathion und Asparaginsäure

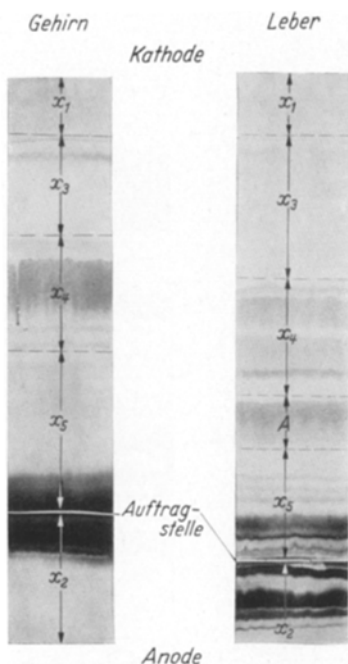


Abb. 4. Aufteilung des Elektrophorese-Streifens in einzelne Abschnitte zur Testung blutdruckwirksamer Substanzen

sowie Peptide enthalten. In X_3 sind von färbereich nachweisbaren Substanzen lediglich Histamin und ein aminiertes Polysaccharid vorhanden, X_4 stellt in der Leber vor allem basische aromatische Fraktionen (Histidin, Carnosin usw.) im Gehirn vor allem Arginin dar. Anschließend folgt der Abschnitt X_5 , der den großen Komplex der neutralen Fraktionen (Aminosäuren, Peptide, Harnstoff usw.) enthält. Die in der Leber zwischen X_4 und X_5 liegende Fraktion A hebt sich oft färbereich hervor und stellt ein aromatisches Peptid dar, dessen Hauptbestandteil Histidin ist. Diese Fraktion ist im Gehirn nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt. Da diese Fraktion A nur in der Leber vorhanden und die Blutdruckwirkung gering ist, kann sie in der vergleichenden Bewertung vernachlässigt werden.

Die Charakterisierung der blutdruckwirksamen Substanzen erfolgte durch Testung mit Atropin, Regitin und Antistin. Eine bindende Aus-

sage über die Struktur der Substanzen läßt sich auf Grund dieser Testung nicht machen. Wir können lediglich die Beeinflußbarkeit ihrer Wirkung durch die Testsubstanzen registrieren und die Ähnlichkeit mit bekannten Stoffen feststellen. Das Regitin wählten wir, weil es das beste wirksame Adrenolyticum darstellt [2-(N-p-Tolyl-N-m-oxy-phenylaminomethyl)-imidazolin] (GROSS, TRIPOD u. MEIER). Dosen von 0,1 mg/kg und darüber führten zu der für die Sympatholytica typischen Umkehr der Blutdrucksteigerung in eine Senkung. Im Gegensatz dazu läßt sich der durch Noradrenalin bedingte Druckanstieg auch durch sehr hohe Dosen von Regitin lediglich abschwächen oder höchstens aufheben, nicht jedoch in eine entsprechende Umkehr verwandeln (GROSS u. a.). Da im System der körpereigenen blutdrucksenkenden Stoffe das Acetylcholin die

Hauptrolle spielt, wurden alle Substanzen grundsätzlich mit Atropin zuerst getestet, das Antistin wurde nur zusätzlich bei abgeschwächter Atropinwirkung verwandt.

Die Wirksamkeit der Testsubstanzen auf Acetylcholin, Adrenalin und Histamin (diese Stoffe wurden auch den Organen zugegeben und erlitten durch die Verarbeitung keine Minderung ihrer Wirksamkeit) wurde vor Versuchsbeginn geprüft.

In der Regel enthält das *Gehirn wesentlich stärkere blutdrucksenkende Wirkstoffe als die Leber*. Dies geht daraus hervor, daß die 4fach geringere Konzentration der Gehirneluatate zumindest die gleiche Tiefe der Blutdrucksenkung zeigt, meist sogar noch etwas mehr als die der Lebereluatate. Spritzt man die nicht aufgetrennte totale Rest-N-Substanz, so werden die blutdrucksteigernden Komponenten unterdrückt, es kommt nur eine Blutdrucksenkung zustande.

Die blutdrucksteigernden Wirkstoffe befinden sich in den Abschnitten X_2 und X_4 . In beiden Organen finden sich in X_2 blutdruckhebende Substanzen, die auf Regitin meist eine Umkehr zeigen, also adrenalinähnliche Körper sind. Während sämtliche X_4 -Substanzen der Leber auf Regitin eine einheitliche Reaktion im Sinne einer Umkehr zeigen, tritt diese Umkehr bei den X_2 -Substanzen des Gehirns nicht so häufig ein teilweise bleibt die Blutdruckerhöhung noch bestehen. Eine weitere blutdrucksteigernde Substanz befindet sich in X_4 des Gehirns. Die Leber zeigt hier nur wenige, kaum verwertbare Steigerungen. Die X_2 -Substanz des Gehirns reagiert nun nach Regitin nicht mit einer Umkehr, sondern regelmäßig mit einer Egalisierung der Erhöhung. Es handelt sich also offenbar um 2 verschiedene blutdrucksteigernde Substanzen. Eine Serotoninwirkung liegt wahrscheinlich nicht vor, da Serotonin von Regitin nicht beeinflusst wird; auch lokalisiert sich Serotonin (als Substanz im Hochspannungselektropherogramm gewandert) als bräunliche Fraktion tiefer, d. h. anodenwärts von Substanz X_4 . Dagegen ist es möglich, daß es sich um Noradrenalin handelt.

Was die blutdrucksenkenden Stoffe anlangt, so sind diese ganz besonders in unserem Abschnitt X_3 in beiden Organen angesammelt. Hier wandern im Pherogramm sowohl Histamin wie Acetylcholin hin. Das Acetylcholin (ACh) ist zwar auf dem ganzen Streifen nachweisbar, setzt sich aber zum größten Teil in X_3 ab. Die blutdrucksenkende Wirkung der X_3 -Substanzen des Gehirns ist teilweise um das 3fache höher als die des entsprechenden Abschnittes des Leberpherogramms. Die Übereinstimmung der Lokalisation von ACh im Hochspannungspherogramm und die vollkommene Blockierung dieser X_3 -Substanz des Gehirns durch Atropin machen doch sehr wahrscheinlich, daß es sich hier um Acetylcholin zumindest aber um eine acetylcholinähnliche Substanz handelt. In der Leber wird dagegen X_3 nur zu einem Teil durch Atropin gehemmt,

der andere Teil wird durch Antistin oder Soventol beeinflußt, ein kleinerer Teil ist allerdings durch beide Substanzen nicht zu beeinflussen. Einzelne dieser durch Atropin und Antistin nicht behebbaren Senkungen finden sich auch in X_5 der Leber, vereinzelt auch im Gehirn.

Ganz allgemein läßt sich sagen, daß die blutdrucksenkenden Substanzen im Gehirn zu 75–100% durch Atropin aufgehoben werden, während in der Leber dies nur zu etwa 50% der Fall ist. Die blutdruck,

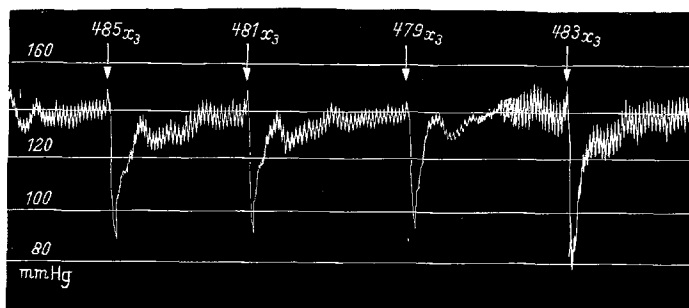


Abb. 5. Blutdruck-Kurve nach Injektion des Eluates des Abschnittes X_3 des Gehirns. Vergleich zwischen Normaltier (Evipan-Schlaf und zusätzlich Muskelrelaxans Succinylbischolinchlorid) Elektroschock- und Hypoxietier (479 u. 483)

senkenden Substanzen finden sich in absteigender Reihenfolge in X_3 , X_2 und X_5 sowie in X_1 ; X_4 enthält nur vereinzelt senkende Substanzen. Die chemische Natur dieser Stoffe spricht nach dem Ergebnis der salzsauren Hydrolyse am ehesten für Amin-Charakter.

Die Auswirkung der Hypoxie auf die blutdruckwirksamen Stoffe

Nach der Hypoxie oder wiederholter Anoxie verändert sich im Gehirn ebenfalls wie in der Leber das Ausmaß der blutdrucksenkenden Wirkung. Die *Vermehrung* der blutdrucksenkenden Substanzen im Gehirn ist in X_3 , etwas weniger in X_2 , deutlich (Abb. 5, 6 und 7). Auch die blutdrucksteigernden Substanzen des Abschnittes X_4 sind im Gehirn nach Hypoxie deutlich vermehrt.

In der Leber ist diese *Vermehrung* der blutdrucksenkenden Stoffe besonders stark. Auffallend stark wirksame Substanzen finden sich in X_1 , X_3 , X_4 und X_5 . Die Substanzen sind gleichmäßig vermehrt, ohne daß man von einer besonderen Bevorzugung im Sinne einer stärkeren oder schwächeren Atropin- oder Antistininwirkung sprechen könnte. Die blutdrucksteigernden Substanzen zeigen keine Veränderung.

Wir finden also im *Gehirn* nach Hypoxie oder wiederholter Anoxie einen Anstieg derjenigen blutdrucksenkenden Substanzen, die schon normalerweise vorhanden sind und praktisch voll durch Atropin antagonisiert werden. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um *Acetylcholin*.

Noch deutlicher als bei den einzelnen Abschnitten kommt diese Anhäufung der depressorischen Substanzen bei Injektion des totalen —

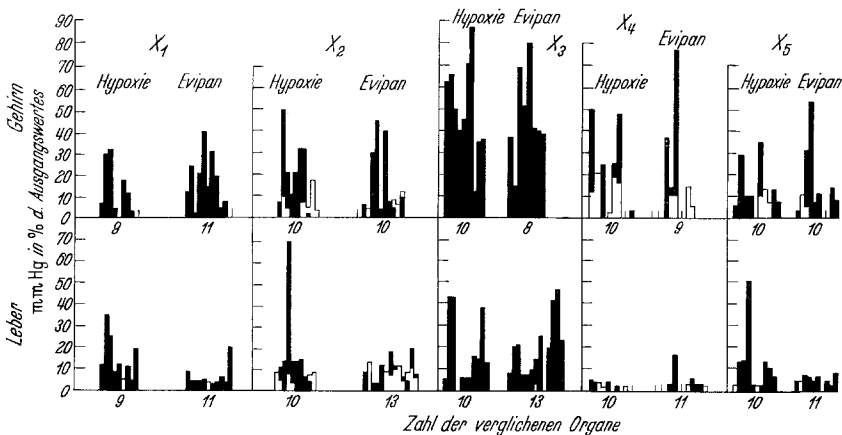


Abb. 6. Blutdruckwerte sämtlicher Streifenabschnitte in Prozent des Ausgangswertes, schwarz: Blutdrucksenkung, weiß: Blutdrucksteigerung

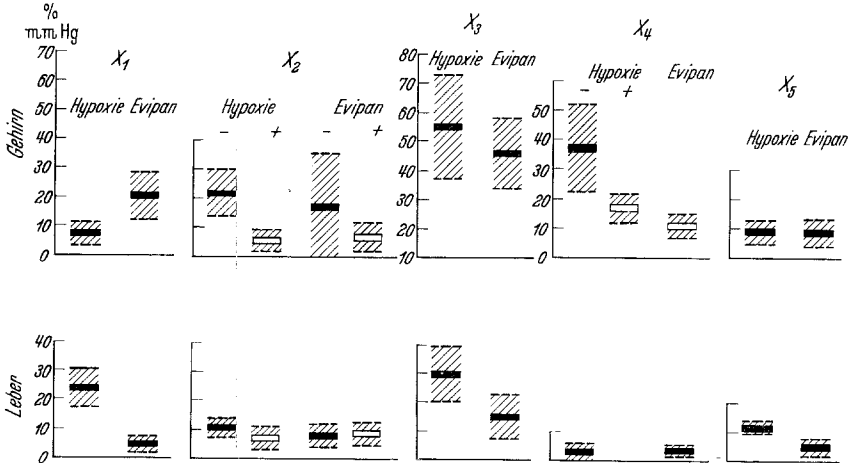


Abb. 7. Statistische Mittelwerte der Blutdruckbewegung in Prozent des Ausgangswertes von sämtlichen Streifenabschnitten, schwarz: Blutdrucksenkung —, weiß: Blutdrucksteigerung + Streuung: schräg schraffiert

nicht elektrophoretisch aufgetrennten — Rest-N.-Gehaltes zum Ausdruck. Die einzige Abweichung in X_1 setzt sich in der Gesamtwirkung nicht durch. Die pressorische Substanz, welche nach Hypoxie im Gehirn vermehrt angetroffen wird, dürfte *Noradrenalin* darstellen. Die Bedeutung des Noradrenalins im Rahmen des adrenerischen Wirkungs-

prinzips haben EULER u. a. in ausgedehnten biochemischen Untersuchungen herausgestellt.

Auch in der *Leber* finden wir keine neu auftretenden Substanzen nach Hypoxie. Es sind die physiologischerweise schon vorhandenen depressorischen Stoffe, die zu einem großen Teil acetylcholinähnlich, zu einem kleineren histaminähnlich und zu einem weiteren Teil unbekannter Natur sind, welche eine Anhäufung zeigen. Soweit durch die salzsaure Hydrolyse feststellbar, sind alle diese Stoffe Amine.

IV. Besprechung der Ergebnisse

In Analogie zu der kurzdauernden initialen Asphyrie beim epileptischen Krampfanfall wurden wiederholte kurze Anoxien mit anschließender Erholung und längere (7% O₂) Hypoxien hervorgerufen. Es zeigte sich, daß die erhaltenen Resultate *unabhängig von der Dauer der Hypoxie* waren. Bis zu 10 und öfters wiederholten Anoxien zeigten dasselbe Bild wie Hypoxien (7% O₂) von 145—180 min Dauer. Das ist übrigens von anderen chemischen Veränderungen (Milchsäure, Phosphorkreatin) ebenfalls bekannt (STONE).

Im einzelnen fanden wir nun im *Gehirn* nach Hypoxie und wiederholter Anoxie *keine* Unterschiede im Verhalten der ninhydrinpositiven Substanzen, auch die aromatischen und schwefelhaltigen Verbindungen ließen keine durch Frabreaktion faßbaren Veränderungen erkennen.

In der *Leber* war dagegen eine deutliche *Vermehrung sämtlicher ninhydrinpositiver Substanzen*, besonders der neutralen und sauren Aminosäuren und Peptide festzustellen.

Das Verhalten der schwefeltragenden, für das Redoxsystem wichtigen Verbindungen läßt auch in der Leber bei der vergleichenden Färbung keinen Unterschied erkennen. Dies ist eine etwas überraschende Feststellung, sollte man doch glauben, daß gerade unter Sauerstoffmangel in diesem System Störungen faßbar sind, die sich auch färberisch zeigen.

Wie kann man sich nun die Vermehrung der ninhydrinpositiven Substanzen nach Hypoxie in der Leber erklären? Wir wissen, daß der Leber im Stoffwechsel der Aminosäuren die Aufgabe zufällt, die Konzentration, in der diese Stoffe den peripheren Organen vom Blut her zugeführt werden, zu stabilisieren. Beim leberkranken Menschen wird ein Ansteigen des Aminosäuren-Gehaltes im Blut erst dann festgestellt, wenn auch andere Leberfunktionen gestört sind (STARY, LANG). Unter den experimentellen Bedingungen der Phosphor- und Chloroformvergiftung scheint die Fähigkeit der Leber, Aminosäuren aus dem Blut aufzunehmen, nicht vermindert zu sein (LEVEN and VAN SLIKE, zitiert nach STARY) Auch bei Erkrankungen der Gallenblase sind keine chromatographisch nachweisbaren Veränderungen der Aminosäuren vorhanden (KNEDEL u. NEIKES). Wir sehen, daß auf der einen Seite bei

Erkrankungen der Leber kaum Veränderungen des Aminosäuregehaltes eintreten, auf der anderen Seite zeigen sich nach Hypoxie deutliche Vermehrungen normalerweise auch vorhandener Aminosäuren, Peptide und Amine. Nach Hypoxie haben wir es mit einem plötzlichen Schaden zu tun, bei Lebererkrankungen oft mit einem schleichenden Prozeß, der unter Umständen Kompensationsmechanismen entstehen läßt. Wenn man die vielfältigen Aufgaben der Leber als Stoffwechselzentrum betrachtet, kommt aber dem Sauerstoffmangel auch eine stärkere Bedeutung zu und wir müssen annehmen, daß der Sauerstoffmangel schon in subkritischer Dosierung den Eiweiß-Stoffwechsel der Leber beeinträchtigt. Der vermehrte Gehalt an ninhydrinpositiven Rest-N-Substanzen kann Symptom einer vermehrten Proteolyse und damit möglicherweise Vorstufe des Parenchymschadens sein. Die gefundenen Veränderungen gleichen denen, die REHN in der Leber von Hunden mit Verbrennungen und bei Hypoxämie durch Entblutung fand, wobei allerdings bei der Verbrennung im Vordergrund basische Amine und beim Entblutungskollaps anodische (saure) Fraktionen vermehrt sind.

Das Verhalten der blutdruckwirksamen Substanzen

Die blutdruckwirksamen Substanzen der Rest-N-Fraktion in Gehirn und Leber — es handelt sich um Amine — lassen sich in blutdrucksenkende und blutdrucksteigernde einteilen. Die Substanzen mit senkender Wirkung überwiegen bei weitem. Sie stellen im Gehirn Acetylcholin oder einen acetylcholinartigen Stoff dar, während es sich in der Leber um einen ganzen Komplex wirksamer Substanzen handelt, teils acetylcholinartig, teils histaminähnlich, teils unbekannter Natur — durch Atropin und Antihistaminica nicht beeinflussbar. Sowohl die blutdrucksenkenden wie die steigernden Stoffe sind im Gehirn gegenüber der Leber vermehrt. Bei den pressorischen Stoffen handelt es sich einesteils um adrenalinähnliche, anderenteils um noch unbekannte Stoffe, die sich praktisch *nur* im Gehirn und nicht in der Leber (X_4) finden. Sie zeigen nach Regitin keine Umkehrreaktion, sondern werden lediglich blockiert (Noradrenalin?)

Die Anhäufung der blutdruckwirksamen Amine im Gehirn kommt wohl via Leber zustande und ist vielleicht sekundärer Natur. Allerdings fanden WELSH u. HYDE ein Ansteigen des Acetylcholingehaltes bei Anoxämie und Hypoglykämie in verschiedenen Nervengeweben und sehen in diesem Anwachsen Zeichen einer Resistenzwirkung gegen Sauerstoffmangel.

Zusammenfassung

Das Verhalten der niedermolekularen Rest-Stickstoffsubstanzen von Gehirn und Leber der Katzen wurde im Barbituratschlaf (Evipan- oder Numal) und nach *Hypoxie* mittels Hochspannungselektrophorese untersucht.

Leber und Gehirn normaler Katzen (50) unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihres Aminosäurespektrums als auch hinsichtlich ihres Gehaltes an blutdruckwirksamen Substanzen deutlich voneinander. Das Gehirn ist bei weitem reicher an Aminosäuren, an pressorisch und depressorisch wirkenden Substanzen. Die blutdruckwirksamen Substanzen sind Amine. Die depressorisch wirkenden Stoffe sind im Gehirn *Acetylcholin* oder zumindest acetylcholinartige Substanzen, während es sich in der Leber um einen ganzen Komplex von Stoffen teils acetylcholinartiger, teils histaminähnlicher, teils unbekannter Natur handelt. Diese Stoffe sind im Pherogramm hauptsächlich kathodenwärts lokalisiert. Die pressorischen Substanzen vom Adrenalintyp wandern im Pherogramm zur Anode, während die anderen pressorischen Substanzen — vermutlich Noradrenalin — zur Kathode wandern.

Wiederholte kurzfristige Anoxie und bis zu 3 Std dauernde *Hypoxie* (7% O₂) ergaben bei sämtlichen Tieren (13) übereinstimmende Ergebnisse. Der Sauerstoffmangel in dieser Dosierung führt zu einer *Vermehrung bestimmter*, schon normalerweise vorhandener *Rest-N-Substanzen*. Es kommt im *Gehirn* zu einer *Anhäufung blutdruckwirksamer Amine* (Acetylcholin und wahrscheinlich Noradrenalin). In der *Leber* werden *vermehrt blutdrucksenkende Stoffe* gefunden, außerdem besteht eine *Anhäufung* vorwiegend *neutraler und saurer Aminosäuren und Peptide*. Der wesentlich massivere Befund in der Leber wird als Zeichen einer vermehrten Proteolyse und damit möglicherweise als Vorstufe eines Leberparenchymschadens gedeutet.

Das parallel mit der Hypoxie untersuchte Verhalten von Gehirn und Leber nach Elektrokrämpfen und seine Analyse hinsichtlich des Sauerstoffmangels wird in einer zweiten Arbeit mitgeteilt werden.

Literatur

- ALTMANN, H. W., u. H. SCHUBOTHE: Funktionelle u. organische Schädigung d. ZNS d. Katze im Unterdruckexperiment. Beitr. path. Anat. **107**, 3 (1942). — BÜCHNER, F.: Veränderungen des Gehirns u. seiner Entwicklung nach allgemeinem Sauerstoff-Mangel. Nervenarzt **18**, 311 (1948). — Die Pathologie der cellulären u. geweblichen Oxydationen. Hdb. d. allgem. Pathologie Bd. IV/2. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957. — CONSDEN, R., A. H. GORDON and J. P. MARTIN: Qualitative analysis of proteins a partition chromatographic method using paper. Biochem. J. **38**, 224 (1944). — CREUTZFELDT, O., A. KASAMATSU u. A. VAZ-FERREIRA: Aktivitätsänderungen einzelner corticaler Neurone im akuten Sauerstoff-Mangel u. ihre Beziehungen zum EEG der Katze. Pflügers Arch. ges. Physiol. **263**, 647 (1957). — DRUCKREY, H.: Die Stoffwechselvorgänge im Gewebe und ihre Bedeutung für den Kreislauf. Verh. dtsh. Ges. Kreisl.-Forsch. **14**, 177 (1941). — EULER, U. S. v.: Noradrenalin (Arterenol), adrenal medullary hormone and chemical transmitter of adrenergic nerves. Ergebn. Physiol. **46**, 261 (1950). — FELIX, K.: Der Stoffwechsel der Eiweiße u. Aminosäuren. Thannhausers Lehrbuch d. Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten. N. ZÖLLNER, Stuttgart: Thieme 1957. — FLECKENSTEIN, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch als Energieprinzip in Muskel

und Nerv. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955. — GERLACH, E., H. J. DÖRING u. A. FLECKENSTEIN: Papierchromatographische Studien über die Adenin- und Guanin-Nucleotide sowie andere säurelösliche Phosphorverbindungen des Gehirns bei Narkose, Ischämie und in Abhängigkeit von der Technik der Gewebsementnahme. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **266**, 266 (1958). — GIBBS, F. A., E. L. GIBBS and W. G. LENNOX: Cerebral dysrhythmias of epilepsy. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago) **39**, 289 (1938). — GROSS, F., I. TRIPOD u. R. MEYER: Regitin (Präparat C 7337) ein neues Imidazolinderivat mit spezieller sympathicolytischer Wirkung. *Schweiz. med. Wschr.* **1951**, 15, 352. — GURDJIAN, E. S., J. E. WEBSTER and W. E. STONE: Chemical changes in cerebral cortex associated with convulsive activity. *J. Neurophysiol.* **8**, 233 (1945). — HARVEY, J., and T. RASMUSSEN: Electroencephalographic changes associated with experimental temporary focal cerebral anaemia. *EEG Clin. Neurophysiol.* **3**, 341 (1951). — HEILMEYER, L.: 1. Lehrbuch der speziellen path. Physiologie STURM, A., S. 536ff. Stuttgart: Gust. Fischer 1955. — 2. Vorträge aus dem Gebiet der klin. Chemie und Cardilogie. (Die Hochspannungselektrophorese und ihre med. Bedeutung.) Stuttgart: Georg Thieme 1956. — HEILMEYER, L., R. CLOTTEN, I. SANO, A. STURM and A. LIPP: Analyse d. Reststickstoffs mit Hilfe des Hochspannungspherogramms. *Klin. Wschr.* **1954**, 831. — HOLTZ, P.: Fermentative Aminbildung aus Aminosäuren. *Ergebn. Physiol.* **44**, 230 (1941). — JASPER, H., and W. C. ERICKSON: Cerebral blood flow and pH in excessive cortical discharge induced by metrazol and electrical stimulation. *J. Neurophysiol.* **4**, 333 (1941). — KNEDEL, M., u. K. NEIKES: Untersuchungen über freie Aminosäuren und Amine in der Galle. *Klin. Wschr.* **1956**, 1005. — KAWERAU, E., u. TH. WIELAND: *Nature* (Lond.) **168**, 77 (1951), zit. nach CRAMER, F.: Papierchromatographie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Bergstraße (1954). — KOFRANY, E.: Über quantitative Papierchromatographie v. Aminosäuren u. Proteinhydrolysaten. *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **299**, 129 (1955). — LANG, K.: Die Biochemie des intermediären Stoffwechsels. Hdb. d. allg. Path. IV/2 Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957. — MICHL, H.: *Mh. Chem.* Wien **8**, 489 (1951); zit. nach KICKHÖFEN, B., u. O. WESTPHAL: Über eine einfache Kombination v. Papierelektrophorese u. Papierchromatographie. *Z. Naturforsch.* **7 B**, 659 (1952). — MÜLLER, E., u. E. ROTTER: Über histologische Veränderungen beim akuten Höhentod. *Beitr. path. Anat.* **107**, 156 (1942). — NOELL, W., u. M. SCHNEIDER: Über die Durchblutung und Sauerstoffversorgung des Gehirns im akuten Sauerstoffmangel. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **246**, 181 (1942). — OPTIZ, E., u. M. SCHNEIDER: Über die Sauerstoffversorgung des Gehirns u. den Mechanismus von Mangelwirkungen. *Ergebn. Physiol.* **46**, 126 (1950). — PAULY, H.: Über die Einwirkung von Diazoniumverbindungen auf Imidazole. *Hoppe-Seylers Z. physiol. chem.* **44**, 159 (1904) **94**, 284. — PICHOTKA, J.: Pathologische Histologie des akuten Höhentodes. *Beitr. path. Anat.* **107**, 117 (1942). — REHN, J.: Habilitationsschrift Med. Fakultät Freiburg 1956; zus. mit KRAUSS: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der Verbrennungskrankheit. *Dtsch. med. Wschr.* **1957**, 1062. — REINDEL, F., u. W. HOPPE: Über eine neue Färbemethode zum Nachweis v. Aminosäuren, Peptiden u. Eiweißkörpern auf Papierchromatogramm u. Elektropherogramm. *Naturwissenschaften* **40**, 221 (1953). — RICHTER, D., u. R. M. C. DAWSON: Ammoniak- u. Glutamingehalt des Gehirns. *J. biol. Chem.* **176**, 1199 (1948). — RICHTER, D., R. M. C. DAWSON u. L. LEES: Über Ammoniak u. Glutamingehalt des Liquors. *J. ment. Sci.* **95**, 148 (1949). — RICHTER, D., and J. CROSSLAND: Variation in acetylcholine content of the brain with physiological state. *Amer. J. Physiol.* **159**, 247 (1949). — RUF, H.: Experimentelle Untersuchungen über Krampfverlängerung durch Sauerstoff u. Adrenalin. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **187**, 97 (1951). — SCHMIDT, C. G.: Gehirn und Nerven. *Physiol. Chemie.*

Ein Lehr- und Handbuch f. Ärzte, Biol. und Chemiker, von B. FLASCHENTRÄGER u. E. LEHNARTZ, Bd. 2/2. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956. — STARY, Z.: Leber und Galle in *Physiol. Chemie.* Hrsg. von E. LEHNARTZ, Bd. 2/2. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956. — STONE, W. E.: Acid soluble phosphorus, compounds and lactic acid in the brain. *J. biol. Chem.* **135**, 43 (1940). — STONE W. E., C. MARSHALL and L. F. NIMS: Chemical changes in the brain produces by injuria and by anoxia. *Amer. J. Physiol.* **132**, 770 (1941). — THORN, W., G. PFLEIDERER, R. A. FROWEIN u. J. ROSS: Stoffwechselfvorgänge im Gehirn bei akuter Anoxie, Ischämie und in der Erholung. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **261**, 334 (1955). — TOENNIS, G., u. I. I. KOLB: Technic and reagents for paperchromatography. *Analyt. Chem.* **23**, 823 (1951). — WEINBERGER, L. M., M. H. GIBBON and J. H. GIBBON: Temporary arrest of the circulation to the central nervous system. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago) **43**, 615 (1940). — WELSH, J. H., and E. HYDE: Acetylcholine content of myenteric plexus and resistance to anoxia. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **55**, 256 (1944). — WIGGERS, C. J.: *Physiology of Shock*. New York, The Commonwealth Found 1950. — WINTERSTEIN, H., u. N. GÖKHAN: Die chemische Reaktion der Cerebrospinalflüssigkeit im Sauerstoffmangel. *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **295**, 71 (1955).

Dr. ROBERT HEMMER, Freiburg i. Br., Neurochirurg. Univ. Klinik, Hugstetterstr. 55