

204. Beiträge zur Alloxan-Glucosurie¹⁾von Karl Bernhard, Marc Favarger²⁾, Albert Renold und Otto Spühler.

(7. VIII. 47.)

Die 1943 von *Dunn* und Mit.³⁾ nach Injektion von Alloxan an Kaninchen beobachtete Glucosurie bei Degeneration des Inselapparates wurde in den letzten Jahren durch zahlreiche Autoren bestätigt. Indessen ist immer noch nicht bekannt, ob das Alloxan selbst oder ein Abbauprodukt desselben Ursache der genannten Erscheinungen ist und warum die sehr spezifischen Veränderungen der β -Zellen auftreten. Eine ausführliche Darstellung der bereits umfangreichen Literatur soll an anderer Stelle gegeben werden⁴⁾.

Es schien uns interessant, den Einfluss des Alloxans auf das Bluteiweiß und ferner auf die in der Pankreasdrüse gebildeten Fermente zu verfolgen, wobei wir in erster Linie im Zusammenhang mit dem Kohlenhydratstoffwechsel an die Amylase dachten. Im weiteren versuchten wir festzustellen, ob Alloxan-ähnliche Verbindungen an Tiere verabreicht, gleichfalls Glucosurie herbeiführten.

Wir haben indessen vorerst die Zuckerausscheidung eines Hundes in Abhängigkeit der jeweiligen Nahrung untersucht.

Ein 20 kg schweres Tier erhielt nach intravenöser Injektion von Alloxan ein Futter mit einem täglichen Energiewert von 1000 Kalorien, wobei einerseits eine Diät A aus 1000 g Kartoffeln und 100 g magerem Fleisch, anderseits eine Diät B aus 600 g Fleisch und 36 g Fett gefüttert wurde. Der Hund verlor dabei stark an Gewicht und wog zu Ende des 54 Tage dauernden Versuches noch 13,2 kg. Während einer jeweiligen Periode von 11 Tagen fanden wir im Harn bei Kohlenhydrat-Nahrung täglich im Mittel 141, bei Eiweißnahrung im Mittel 55 g Glucose.

Tägliche Glucose-Ausscheidung in g bei Kohlenhydrat-reicher (Diät A) oder Eiweiß-reicher Nahrung (Diät B).

Tage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	g Glucose Mittel
Diät A	142	147	114	135	140	149	176	151	124	153	123	141
Diät B	58	54	59	42	42	50	39	73	65	61	59	55

Bei einer gemischten Kost (Diät C) aus 600 g Kartoffeln, 100 g Fleisch und 32 g Fett wurden im Mittel täglich 117, bei Diät D, bestehend aus 300 g Fleisch, 36 g Fett und 384 g Kartoffeln, 81 g Glucose ausgeschieden:

¹⁾ Vorgetragen an der 29. Tagung des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen in Genf am 29. Juni 1946 (vgl. *Helv. physiol. acta* **4**, C 42 (1946)).

²⁾ Stipendiat der Stiftung für biologisch-medizinische Stipendien.

³⁾ *Dunn, J.S., Sheehan, H.L. und McLetchie, N.G.B.*, *Lancet* **244**, 484 (1943); *Dunn, J.S. und McLetchie, N.G.B.*, *Lancet* **245**, 384 (1943).

⁴⁾ *Renold, A.*, Diss. med. Zürich (in Vorbereitung).

Tägliche Glucose-Ausscheidung in g bei gemischter Nahrung (Diät C und D).

Tag	1	2	3	Mittel
Diät C	109	117	125	117
Diät D	79	94	69	81

Injiziertes Alloxan lässt sich, wie aus Beobachtungen von *Leech* und *Bailey*¹⁾ und *Karrer* und Mit.²⁾ hervorgeht, schon nach wenigen Minuten im Blut nicht mehr nachweisen. Wir prüften, ob Alloxan mit dem Bluteiweiß in Reaktion tritt, indem wir den Rest-Stickstoff im Blut und Serum vor und nach Zugabe bekannter Alloxanmengen bestimmten. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, nimmt der Rest-N dabei nicht ab, sondern bei höheren Alloxankonzentrationen zu.

Bestimmungen des Rest-N im Blut und Serum vor und nach Alloxan-Zugaben
(Angaben in mg N pro 5 cm³ Blut).

	Alloxan-Zugabe		Rest-Stickstoff		
	total mg	mg N	mg N im Gemisch	Zunahme	
				mg N	% ³⁾
Blut					
Rest-N: 1,7 mg pro 5 cm ³	235	41,1	49,6	6,8	400
	226	39,5	50,2	9,0	530
	226	39,5	49,2	8,0	470
	113	19,8	29,4	7,9	460
	113	19,8	28,8	7,3	430
	57	9,9	14,6	3,0	180
	57	9,9	14,2	2,6	150
	22	4,0	5,6	-0,1	—
	22	4,0	5,8	0,1	6
Serum					
Rest-N: 1,9 mg pro 5 cm ³	235	40	43,2	1,3	69
	235	40	43,1	1,2	63
	113	20	23,0	1,1	58
	113	20	22,6	0,7	37

Im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung der Pankreas-Amylase durch Alloxan haben wir die Verzuckerung von Stärke durch Pankreasfistel-Sekret eines Patienten und durch Pankreatin verfolgt⁴⁾.

Zu 50 cm³ 2-proz. Stärkelösung gaben wir 3,5 cm³ 0,02-n. sek. Natriumphosphatlösung, 150 mg Natriumchlorid und 0,5 oder 1 g Pankreatin. Nach 30 Minuten Verweilzeit im Brutschrank wurde die gebildete Glucose bestimmt. Analoge Ansätze haben wir mit

¹⁾ *Leech, R.S. und Bailey, C.C.*, J. Biol. Chem. **157**, 525 (1945).

²⁾ *Karrer, P., Koller, F. und Stürzinger, H.*, Helv. **28**, 1529 (1945).

³⁾ Bezogen auf den ursprünglichen Rest-N-Gehalt.

⁴⁾ *Sherman, H.C., Kendall, E.C. and Clark, E.D.*, Am. Soc. **32**, 1073 (1910); s. a. *Bamann und Myrbäck*, Meth. Fermentf. Bd. 2, 1881 (1941).

bekannten Mengen Alloxan oder N-Methyl-alloxan versetzt und gleich lang bebrütet. Aus den folgenden Angaben geht hervor, dass keine wesentlichen Unterschiede beobachtet wurden.

mg Pankreatin . . .	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
mg Alloxan. . . .	10	10	10	0,75	1,25	2,5	5	10
mg Glucose. . . .	38	40	36	22	22	22	23	24
mg Glucose ohne Alloxan-Zusatz . . .		34				21		

Die im Harn normalerweise enthaltene Diastase stammt nach allgemeiner Annahme grösstenteils aus dem Pankreas. Jedenfalls darf als gesichert gelten, dass in vielen Fällen von Pankreasnekrose, Pankreatitis oder in der Nähe der Pankreasdrüse liegenden Affektionen im Harn die Amylase vermehrt ist¹⁾.

Wir haben weisse Ratten mit einer Nahrung nach *Mc Collum* versehen und im Harn nach der modifizierten Methode von *Wohlgemuth* die Diastase bestimmt. Die Tiere wurden nach dieser Vorperiode mit Alloxan injiziert, worauf wir wieder die Diastase-Ausscheidung und auf Auftreten von Zucker im Harn verfolgten. Es ergab sich, dass bei Alloxan-Diabetes die Diastase-Einheiten auf sehr geringe Werte oder praktisch auf Null zurückgingen. Ein Beispiel möge zur Illustrierung dieser Beobachtung genügen:

Diastase- und Zuckergehalt des Harnes einer Ratte nach Alloxan-Injektion.

Tagen nach Alloxan-Injektion	0	1	2	3	4	5	6	7	10	20	23	25	26	27	28	29	30
Harnmenge, cm ³ .	7	12	12	13	6	14	23	24	24	55	47	39	56	70	50	70	50
Diastase-Einheiten	128	128	4	2	2	2	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose ²⁾ , g . . .	0	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	5,5	4,8	5,1	4,6	4,4	3,1	

Erholten sich indessen die Tiere wieder in dem Sinn, dass die Zuckerausscheidung zurückging und schliesslich ganz ausblieb, so war auch die Diastase im Harn wieder nachweisbar und erreichte ihre ursprünglichen Werte:

Tagen nach Injektion	0	1	2	5	6	7	8	9	11	13	14	15-18	19	20
Harnmenge, cm ³ .	10	10	33	33	43	20	24	37	18	6	8	7-9	6	9
Diastase-Einheiten	128	128	2	2	2	2	2	16	32	128	64	128	128	128
Glucose ³⁾ , g . . .	0	—	—	2,1	—	—	—	2,2	—	—	0,4	—	0	0

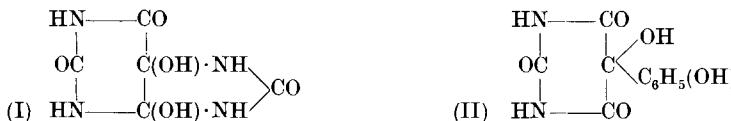
¹⁾ *Ammon, R. und Chytrek, E.*, Erg. Enzymf. **8**, 107 (1939).

²⁾ *Fehling'sche* Zuckerprobe im Harn vom ersten Tag der Alloxan-Injektion an positiv.

³⁾ *Fehling'sche* Zuckerprobe im Harn vom 1.-18. Tag nach der Alloxan-Injektion positiv.

Die Frage, ob Alloxan-ähnliche Verbindungen zu Diabetes führen, ist verschiedentlich gestellt worden. Schon *Jacobj*¹⁾ will nach intravenöser Applikation von Coffein-sulfonsäure und Coffein an Kaninchen Glucosurie beobachtet haben, welche indessen bei zuckerarmer Nahrung ausblieb.

Wir fanden nach subcutaner Einspritzung von 70, 110 oder 120 mg/kg/die Coffein an Ratten keinen Zucker im Harn. Auch Wiederholung solcher Gaben in Abständen von 2 oder mehr Tagen änderte nichts an diesem Befund. Desgleichen verursachte subcutan appliziertes Harnsäureglykol (I) (135 bis 470 mg/kg/die) keine Zuckerausscheidung:



Eine dem Alloxan analoge Wirkung konnte indessen für das N-Methyl-alloxan gezeigt werden. Subcutan an Ratten injizierte Mengen von 435, 183, 164, 155, 135 und 128 mg/kg/die bewirkten nach kurzer Zeit starke Glucosurie und Hyperglykämie (z. B. 504 mg % Blutzucker), während in Abständen von 3 Tagen wiederholte Injektionen von je 65 mg/kg/die nicht zu Diabetes führten. Eine einmalige Dosis von 100 mg blieb gleichfalls ohne Wirkung; als 2 Tage darauf erneut 100 mg pro kg/die injiziert wurden, trat Zucker im Harn auf. Wir begnügen uns mit der Wiedergabe der Harn- und Zuckermengen einer zu Beginn des Versuches 168 g, zu Ende noch 104 g schweren Ratte, bei der eine einmalige Injektion von 135 mg/kg/die Methyl-alloxan Diabetes auslöste:

Tage nach Injektion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Harnmenge, cm ³ . . .	30	—	80	70	60	30	40	70	75	60	70	65	60	55
Glucose, g	0,22	7,8	5,8	6,5	5,6	2,2	3,4	4,4	4,8	4,0	4,6	4,2	4,2	4,0
Tage nach Injektion	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Harnmenge, cm ³ . . .	30	35	40	48	56	40	15	20	25	75	60	45	85	80
Glucose, g	3,1	3,2	3,7	4,0	4,4	3,4	1,5	1,8	2,3	4,0	3,4	2,8	4,0	3,8

Andersartig verhielt sich das N,N-Dimethyl-alloxan. Eine einmalige Dosis von 316 mg/kg/die führte nach 8 Stunden zum Tode; bei 110 mg/kg/die ging ein anderes Tier nach 32 Stunden zu Grunde. Injektionen von 30 und 60 mg/kg/die wurden ertragen, ebenso fünfmal in Abständen von 2 Tagen wiederholte Injektionen von 64 mg/kg/die Dimethyl-alloxan. Ein so behandeltes Tier ertrug schliesslich 130 mg/kg/die. Polyurie und Glucosurie konnten nie beobachtet werden²⁾.

Alloxan ist bekanntlich gegen Alkalien sehr empfindlich. Wir versetzten verdünnte wässrige Lösungen von N-Methyl- und Dimethyl-alloxan mit Natriumcarbonat und liessen sie bei pH 7,4—8 30 Minuten im Brutschrank stehen. Nach Injektion an Ratten erwiesen sie sich als unwirksam, Zuckerausscheidung bzw. toxische Störungen traten nicht mehr auf.

¹⁾ *Jacobj, C.*, Arch. exp. Path. Pharm. **35**, 213 (1895).

²⁾ Über diese Versuche hat der eine von uns (*M.F.*) bereits am 4. Dezember 1945 an den Präsidenten der Stiftung für biologisch-medizinische Stipendien ausführlich berichtet. Eine Mitteilung von *Brückmann* und *Wertheimer*³⁾ über diabetogene Wirkung von Methyl-alloxan, Alloxantin, Dimethyl-alloxantin, Dialursäure und Methyl-dialursäure wurde uns erst später bekannt.

³⁾ *Brückmann, G.* und *Wertheimer, E.*, Nature **155**, 267 (1945).

Die Phenol-dialursäure (II) führte, in Mengen von 49, 52, 171, 245 und 269 mg/kg/die an Ratten injiziert, nicht zu Glucosurie. Störungen wurden nicht beobachtet. Nach Fütterung dieser Verbindung an Hunde isolierten wir aus dem Harn eine gut krystallisierte Verbindung $C_9H_7O_4N$, die sich indessen auch in vitro bei alkalischer Reaktion bildet und später näher beschrieben werden soll.

Experimentelles.

Als Versuchstiere dienten gesunde, meist ausgewachsene Ratten bzw. gesunde, männliche Hunde. Die verabreichten Verbindungen waren analysenrein; Alloxan und Coffein haben wir aus dem Handel bezogen, Harnsäureglykol nach den Angaben von *Biltz* und *Heyn*¹⁾, N-Methyl-alloxan aus Theobromin²⁾ hergestellt. Das N-Dimethyl-alloxan erhielten wir analog aus Coffein, die Phenol-dialursäure aus dem Anhydrid des Alloxans mit Phenol in Eisessig durch Einleiten von Chlorwasserstoff³⁾. Die Injektionen erfolgten bei den Ratten subcutan. Die Glucose-Bestimmungen führten wir nach der Methode von *Bertrand* aus.

Diskussion der Ergebnisse.

Änderungen der Diät wirken sich auch bei Alloxan-diabetischen Tieren bestimmd auf die Zuckermengen im Harn aus. Unser Hund schied bei einem kohlenhydratreichen Futter maximal 176, minimal 114, bei einer Fleisch-Fett-Nahrung nur 73 bzw. 39 g Glucose pro Tag aus. Die Glucosurie konnte aber durch eine Kohlenhydrat-arme Diät nicht zum Verschwinden gebracht werden im Gegensatz zu den Beobachtungen von *Burn*, *Lewis* und *Kelsey*⁴⁾ an fettreichen gefütterten Ratten. Untersuchungen von *Stetten* und *Boxer*⁵⁾ an Alloxan-diabetischen Ratten unter Anwendung von Deuterium als Indikator ergaben, dass bei einer Kost aus 60% Kohlenhydraten drei Viertel des Harnzuckers direkt aus der Nahrung und nur ein Viertel aus dem Stoffwechsel stammen.

Durch Zugabe bekannter Mengen Alloxan zu Blut oder Serum wurde der Rest-Stickstoff-Gehalt nicht niedriger, sondern höher als die Summe aus den Rest-N-Werten beider Komponenten. Es bilden sich also zwischen dem Bluteiweiss und dem Alloxan keine durch Trichloressigsäure fällbaren Verbindungen. Der zusätzlich gefundene Stickstoff nahm aber von einer bestimmten Alloxan-Konzentration an nicht mehr zu; bei Zugabe von 113 oder 235 mg zu 5 cm³ Blut blieben die Verhältnisse gleich. Eine Erklärung dieser Befunde stösst auf Schwierigkeiten.

Die Stärkespaltung durch ein Amylase-haltiges Präparat aus Pankreas (Pankreatin) oder durch ein Pankreasfistel-Sekret bei p_H 6,8 wurde durch Alloxan (0,75—10 mg pro 50 cm³ Stärkelösung) nicht gehemmt; die ermittelten Glucosemengen entsprachen in

¹⁾ *Biltz, H. und Heyn, M.*, B. **45**, 1677 (1912).

²⁾ *Biltz, H.*, B. **45**, 3673 (1912).

³⁾ *Biltz, H.*, B. **45**, 3669 (1912).

⁴⁾ *Burn, J.H., Lewis, F.H.C. und Kelsey, F.D.*, Brit. Med. J. **2**, 752 (1944).

⁵⁾ *Stetten, DeWitt, Jr., und Boxer, G.E.*, J. Biol. Chem. **156**, 271 (1944).

unseren Versuchen etwa denjenigen, die unter gleichen Bedingungen ohne Alloxanzugabe entstanden. Bei Alloxan-diabetischen Ratten trat mit beginnender Glucosurie eine starke Verminderung des Diastase-Gehaltes im Harn ein. Sehr bald war auch unter optimalen Konditionen keine Stärkespaltung mehr nachweisbar, also praktisch keine Diastase mehr vorhanden. Es ist natürlich daran zu denken, dass dieser Rückgang zum Teil durch die vermehrte Harnmenge bedingt wird; es geht aber aus unseren Resultaten deutlich hervor, dass schon zu Beginn der diabetischen Erkrankung bei noch nicht ausgeprägter Polyurie der Diastasegehalt stark sinkt. Eindrucksvoll gestaltet sich diese Beziehung in dem gezeigten Falle einer Heilung der Alloxan-diabetischen Erkrankung; hier liess sich die Diastase nach dem Rückgang und dem Verschwinden der Glucosurie wieder in den ~~beim~~ gesunden Tier vorhandenen Mengen nachweisen.

Da die Harndiastase wohl weitgehend aus dem Pankreas herkommt, ist anzunehmen, ihre Entstehung in der Drüse werde durch die Einwirkung von Alloxan beeinflusst, d. h. gehemmt oder weitgehend gestört. Nachdem letzteres die Degeneration der β -Zellen veranlasst, kann man sich vorstellen, dass dieselben mit der Amylase-Bildung in Zusammenhang stehen oder das Alloxan auf den exokrinen Pankreasanteil eine histologisch nicht nachweisbare Wirkung ausübt.

Schon früher wurde gezeigt, dass auch bei Diabetes mellitus niedere Diastase-Werte angetroffen werden, Beobachtungen, die z. B. *Schmerel*¹⁾ bestätigte und erweiterte. Die vermehrte Harnausscheidung wurde bereits als mögliche Ursache dieser Erscheinung in Betracht gezogen, erlaubte aber nicht, die verminderte diastatische Eigenschaft des Diabetikerharns zu erklären.

Etwa in gleichem Ausmass wie das Alloxan erwies sich das Methyl-alloxan wirksam. Wir glauben, es sei zur Erzeugung von experimentellem Diabetes in der Wirkung gleichmässiger und darum besser geeignet, als Alloxan selbst. Wird indessen der Wasserstoff am anderen N-Atom gleichfalls durch eine Methylgruppe ersetzt, so geht die diabetogene Aktivität im Dimethyl-alloxan verloren. Diese Verbindung ist stark toxisch. Wir haben damit die Befunde von *Brückmann* und *Wertheimer*²⁾ und von *Hidy*³⁾ bestätigt. Erstere Autoren haben ganz kürzlich über die Wirkung weiterer Homologen des Alloxans und ähnlicher Verbindungen wertvolle Ergebnisse mitgeteilt⁴⁾.

Phenol-dialursäure wurde von den Tieren gut ertragen, sie ist unwirksam oder wird offenbar rasch in ein unwirksames Abbauprodukt umgewandelt.

¹⁾ *Schmerel, F.*, Bioch. Z. **208**, 415 (1929).

²⁾ *Brückmann, G.* und *Wertheimer, E.*, Nature **155**, 267 (1945).

³⁾ *Hidy, P.H.*, J. Biol. Chem. **163**, 307 (1946).

⁴⁾ *Brückmann, G.* und *Wertheimer, E.*, J. Biol. Chem. **168**, 241 (1947).

Zusammenfassung.

1. Die Zuckerausscheidung beim Alloxan-diabetischen Hund erwies sich stark von der Zusammensetzung der jeweiligen Nahrung abhängig und betrug bei einem Energiewert des Futters von 1000 Kalorien bei Kohlenhydrat-reicher Diät pro Tag 141, bei Eiweiss-reicher Diät 55 g Glucose.
2. Der Rest-Stickstoff des Blutes wird durch Alloxan-Zugaben über das berechnete Mass hinaus erhöht (in vitro-Versuche).
3. Kleine Alloxan-Mengen bewirken keine wesentliche Beeinflussung der Glucose-Bildung aus Stärke durch Pankreasfistel-Sekret oder Pankreatin.
4. Bei Ratten sinkt mit beginnender, durch Alloxan-Gaben bedingter Glucosurie der Diastasegehalt des Harnes stark; nach einigen Tagen ist das Ferment praktisch nicht mehr nachweisbar. Dieser Befund wird durch die sich einstellende Polyurie nur z. T. bedingt, indem schon vor dem Auftreten grosser Harnmengen die Diastase vermindert vorkommt. Tritt Heilung der diabetischen Erkrankung und damit Aufhören der Glucosurie ein, so ist auch die Diastase im Harn wieder in normalen Werten vorhanden. Vielleicht beeinflusst das Alloxan auch den exokrinen Pankreasanteil; es sei denn, die β -Zellen stünden im Zusammenhang mit der Amylase-Bildung.
5. Coffein, Harnsäureglykol, Dimethyl-alloxan und Phenoldialursäure wurden auf ihre diabetogene Eigenschaft geprüft und unwirksam gefunden. Dimethyl-alloxan ist toxisch. N-Methyl-alloxan führt nach subcutaner Injektion wie das Alloxan zu Zuckerausscheidung im Harn.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.
