



Das Amid (IX) wurde in Chloroform mittels Phosphorpentachlorid bei Zimmertemperatur zum 1-(4'-Benzyloxy)-3,4-dihydro-6-methoxy-7-benzyloxy-isochinolin-chlorhydrat [XII, Schmp. 164 bis 165°; Cl ber. 7,09, gef. 7,12; Pikrat: Schmp. 165 bis 166° (Zers.); ber. C 64,15, H 4,66, gef. C 64,00, H 4,70] kondensiert. Durch Entbenzylieren mittels 20%iger Salzsäure erhielten wir 1,2-Dehydro-coclaurin-chlorhydrat [XIII, Pikrat: Schmp. 200 bis 201° (Zers.); ber. C 53,90, H 3,93, gef. C 54,19, H 4,00] und daraus durch katalytische Hydrierung in Wasser an PtO₂ nach Adams das d,l-Coclaurin-chlorhydrat [XIV, Schmp. 255 bis 256° (Zers.); ber. für 1 Molekül Kristallwasser C 60,09, H 6,53, gef. C 59,98, H 6,50; CH₃O ber. 9,13, gef. 9,07]. Das Kristallwasser ist äußerst fest gebunden und wird selbst beim Trocknen über P₂O₅ bei 120° nur zur Hälfte abgegeben (ber. für das Halbhydrat: C 61,72, H 6,40, gef. C 62,12, H 6,41). —

Den Österr. Stickstoffwerken danken wir für die wirksame Unterstützung, die sie dieser Arbeit angedeihen ließen.

Die Wirkung von Toxinen auf Fermente.

III. Der Gehalt an Lactat und Pyruvat in Geweben und im Blut diphtherievergifteter Meerschweinchen.

(Kurze Mitteilung.)

Von

W. Zischka, H. Eibl, O. F. Schwarz und O. Hoffmann-Ostenhof.

Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut der Universität Wien, dem Bundesstaatlichen serotherapeutischen Institut in Wien und dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 15. Mai 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 7. Juni 1951.)

In der II. Mitteilung dieser Reihe¹ berichteten wir über den Einfluß von Diphtherietoxin auf den Stoffwechsel von Lactat und Pyruvat in

¹ Mh. Chem. 82, 391 (1951).

Homogenaten aus Meerschweinchengewebe. Schon vor längerer Zeit konnten verschiedene Autoren² eine Erhöhung des Milchsäurespiegels im Blute diphtherie-intoxifizierter Tiere feststellen. Wir haben nunmehr die Untersuchung des Lactatgehaltes bei Diphtherieintoxikation auf eine Anzahl von Geweben ausgedehnt und gleichzeitig die Bestimmung des Gehaltes an Pyruvat (als Gesamtketosäuren) in denselben Geweben durchgeführt. Wir konnten zeigen, daß sowohl im Blut als auch in den verschiedenen untersuchten Organgeweben der Gehalt an Lactat im Vergleich mit unbehandelten Tieren merklich erhöht ist. Der Pyruvatgehalt in denselben Substraten, welcher übrigens durchwegs weniger als ein Zehntel des Lactatgehaltes ausmacht, zeigte hingegen ein weniger einheitliches Verhalten, aus welchem bestenfalls auf eine schwach abfallende Tendenz des Brenztraubensäurespiegels im Verlauf der Intoxikation geschlossen werden kann. Wir untersuchten weiters die Möglichkeit, daß die Vermehrung des Lactats durch einen „abnormalen“ Abbau der Kohlehydrate, etwa über intermediär entstehendes Methylglyoxal zustande komme (vgl. *E. Kun*³). In diesem Falle müßte die Milchsäure die unphysiologische linksdrehende Form aufweisen⁴. Unsere diesbezüglichen Versuche, welche mit zwei voneinander unabhängigen Methoden durchgeführt wurden, schließen aber eindeutig die genannte Möglichkeit aus.

Methodik.

Die Meerschweinchen wurden subcutan mit 1 ml eines Diphtherietoxins, dessen *Dosis letalis minima* für ein Meerschweinchen etwa 0,0012 ml betrug, injiziert. Bei diesem Toxinüberschuß erfolgte der Tod der Tiere etwa nach 10 bis 12 Std. Die Tiere wurden in der vorbestimmten Zeit nach der Toxininjektion durch intraperitoneale Injektion von 1 ml einer 5%igen Pentothalösung (Pentothal USP) narkotisiert und darauf durch Genickschlag getötet. Die zu untersuchenden Organe wurden sofort entnommen, in flüssige Luft gebracht und gewogen. Sie wurden dann mit 2 ml 50%iger Trichloressigsäure im Homogenisator von *Potter* und *Elvehjem*⁵ homogenisiert, das Homogenat dann mit *Aqua destillata* auf 10 ml aufgefüllt, zentrifugiert und im klaren Zentrifugat Lactat und Pyruvat nach den in der II. Mitteilung beschriebenen Methoden bestimmt.

Blut wurde aus dem Herzen entnommen, sofort mit 0,5 ml einer 25%igen Jodessigsäurelösung pro ml Blut versetzt, dann 2 ml 50%ige Trichloressigsäure zugesetzt und mit *Aqua destillata* auf 6 ml aufgefüllt. Die Analyse auf Lactat und Pyruvat erfolgte hier ebenso wie bei den untersuchten Organen.

Zur Bestimmung, ob die vorhandene Milchsäure teilweise der unphysiologischen linksdrehenden Form angehört, wurde die Milchsäure aus dem

² *H. Yannet* und *D. C. Darrow*, *J. clin. Invest.* **12**, 767 (1933). — *P. Bamberger*, *H. E. Never* und *H. A. Oelkers*, *Z. ges. exp. Med.* **104**, 511 (1938).

³ *J. biol. Chemistry* **187**, 289 (1950).

⁴ Vgl. z. B. *C. Neuberg*, *Biochem. Z.* **49**, 502; **51**, 487 (1913).

⁵ *J. biol. Chemistry* **114**, 495 (1936).

Gewebe nach *Emden* und *Jost*⁶ isoliert und dann einerseits polarimetrisch untersucht und andererseits die Methode von *Edson*⁷ unter Verwendung eines Acetonrockenpulvers aus *Mycobacterium phlei* angewandt.

Ergebnisse.

Tabelle 1. Lactatgehalt und Pyruvatgehalt (Werte in Klammer) der einzelnen Gewebe nach bestimmten Zeiten nach der Toxininjektion.

Die Werte stellen μg Lithiumlactat bzw. Gesamtketosäure als Pyruvat pro Gramm Gewebe dar und sind Durchschnittswerte aus 4 Versuchstieren.

Stdn. nach Diphtherie-intoxikation	Hirn	Herz	Leber	Niere	Skelett Muskel	Blut
0	412 (19)	823 (24)	444 (36)	448 (27)	435 (39)	333 (13)
4	407 (13)	805 (14)	604 (29)	577 (18)	—	218 (21)
6	951 (9)	1149 (16)	519 (28)	801 (29)	1027 (41)	339 (18)
8	1152 (13)	1150 (23)	560 (26)	1112 (27)	—	196 (16)
10	1180 (9)	1530 (17)	634 (24)	1015 (32)	1030 (14)	694 (25)
12	1147 (6)	1622 (15)	599 (26)	1100 (30)	1271 (22)	773 (10)

Aus Tabelle 1 läßt sich allgemein ein Ansteigen des Lactatgehaltes in den Geweben der diphtherie-intoxifizierten Tiere erkennen, wobei allerdings das Verhalten der einzelnen Gewebsarten zeitlich beachtliche Unterschiede aufweist. Während bei Hirn, Herz, Niere und Skelettmuskel der Anstieg etwa mit der 6. Std. nach der Intoxikation stark merklich wird, steigt der Lactatgehalt der Leber innerhalb der ersten 4 Stdn. etwas an, um dann praktisch konstant zu bleiben; andererseits wird die Erhöhung des Milchsäurespiegels im Blut erst nach 10 Stdn., also knapp *ante exitum* deutlich.

Die Werte für den Pyruvatgehalt zeigen starke Streuungen und man kann aus ihnen höchstens eine gewisse Allgemeintendenz zum Absteigen im Verlauf der Intoxikation entnehmen; diese Tendenz ist im Hirngewebe am deutlichsten. Ein korrespondierendes Verhalten von Lactatzunahme und Pyruvatabnahme konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Die Versuche, das Vorkommen der unphysiologischen linksdrehenden Milchsäure in Geweben diphtherievergifteter Tiere nachzuweisen, ergaben ein negatives Resultat. Die gesamte Milchsäure erwies sich als der physiologischen rechtsdrehenden Form zugehörig.

Diskussion.

Aus den gefundenen Lactatwerten in den verschiedenen Organen diphtherievergifteter Tiere geht eine auffallende Übereinstimmung mit

⁶ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 230, 69 (1934).

⁷ Biochemic. J. 41, 145 (1947).

den Ergebnissen unserer II. Mitteilung hervor, in welcher wir über ganz analoge Effekte nach Zugabe des Toxins zu den Homogenaten von Geweben gesunder Tiere berichteten.

Diese Übereinstimmungen erscheinen uns von verschiedenen Gesichtspunkten aus interessant. So schließen sie die Annahme aus, daß der Anstieg des Lactats nur eine Folge der allgemein auf Grund der immer stärker werdenden Kreislaufstörungen und der morphologisch in den Endstadien nachweisbaren Albuminurie ins Gewebe nach *Eppinger* auftretenden Hypoxämie (*Cobet*⁸) zustande kommt. Diese Erscheinungen können die Parallelergebnisse unserer Versuche *in vitro* niemals erklären. Außerdem konnten *Höller* und *Eibl* in noch unveröffentlichten Versuchen zeigen, daß bei diphtherie-intoxifizierten Meerschweinchen eine Verringerung der Sauerstoffaufnahme erst 8 Stdn. nach der Intoxikation festgestellt werden konnte, wobei die Versuchsbedingungen allgemein die gleichen wie bei unseren Experimenten waren.

Der Nachweis, daß die gesamte Milchsäuremenge der physiologischen rechtsdrehenden Form angehört, schließt die Möglichkeit einer Entstehung auf einem „abnormalen“ Glykolyseweg (über Methylglyoxal) aus. Weitere Versuche zur Frage der Herkunft des vermehrten Lactats sind im Gange.

Die mit unseren Versuchen gleichzeitig durchgeführten histologischen Untersuchungen, welche demnächst an anderer Stelle ausführlich publiziert werden sollen, zeigen eine auffallende Übereinstimmung zwischen Auftreten und Ansteigen der Milchsäure und morphologische Veränderungen in den Geweben.

Abschließend muß betont werden, daß die berichteten Ergebnisse unter Verwendung sehr großer, die *Dosis letalis minima* weit überschreitender Mengen Diphtherietoxins erhalten wurden; ob die Verhältnisse unter Verwendung subletaler Dosen ähnlich sind, müßte eine weitere Versuchsreihe zeigen.

⁸ *R. Cobet*, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **145**, 140 (1929).