

Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse.

II. Mitteilung.

Von

R. Stangassinger, Assistent des Institutes.

(Aus dem pharmakologischen Institute der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. März 1908.)

In einer früheren Arbeit¹⁾ wurde gezeigt, daß bei der Autolyse von Organextrakten und Organpreßsäften Umwandlung zugesetzten Kreatins in Kreatinin, sowie eine Zerstörung beider Körper stattfindet und daß sich diese größtenteils auf Fermentwirkungen beruhenden Vorgänge ganz allgemein in autolytierten Organen wie Leber, Niere, Muskeln, Milz usw. abspielen.

Es soll hier noch ein Beispiel für die Autolyse von Lungenextrakt gegeben werden, das auch für dieses Organ die zerstörende Wirkung auf zugesetztes Kreatin dartut.

Verhalten von Lungenextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°

(je 35 ccm Extrakt, entsprechend 35 g Hundelunge; je 120 ccm Flüssigkeit in den einzelnen Autolyseproben).

Versuch Nr. 1.

Probe	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin					
	in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt		Kreatinin als solches in mg	Kreatininvermehrung		Kreatin- und Kreatinin zusammen in mg	Abnahme des Kreatin- plus Kreatininwertes	
					in mg	in % des Kreatins		in mg	in %
a	kein Zusatz		sofort untersucht	Spur	—	—	Spur	—	—
b	125	107,85	2 Tage	3,602	3,602	3,34	92,576	15,274	14,16

¹⁾ Gottlieb und Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 1.

Somit kommt auch dem Lungengewebe die Fähigkeit zu, Kreatin zu zerstören, wenn auch in weit geringerem Grade als z. B. der Leber und anderen Organen.

Von Interesse dürfte es weiterhin sein, daß sich mittels des Autolyseversuchs der Nachweis von Vorstufen des Kreatinins im Blute führen läßt. Es nimmt nämlich unter Umständen der Gesamtgehalt an Kreatin plus Kreatinin bei der Autolyse des Blutes zu. Es kann also, abgesehen von der ausgiebigen Umwandlung von Kreatin in Kreatinin, über die wir schon in der vorigen Mitteilung berichtet haben, im Blute auch eine Entstehung von Gesamtkreatinin aus unbekanntem Vorstufen vor sich gehen. Die Zunahme beträgt in dem folgenden Versuch (2) 2,3 mg pro 100 g Blut, d. i. etwa 100% des Anfangswertes. Fügt man zum Blute noch Gewebsextrakt hinzu — in Versuch 3 verwandten wir dazu das Lungenextrakt aus Versuch 1 —, so ist die Zunahme des Gesamtkreatinins in der gleichen Zeit eine geringere als ohne diesen Zusatz. Wenn man nicht annehmen will, daß durch den Organextrakt eine

Verhalten von Blut ohne Kreatinzusatz mit und ohne Lungenextrakt bei 37°

(je 170 ccm Flüssigkeit in den Autolyseproben).

Versuch Nr. 2 und Nr. 3.

Ver- such	Material	Zusatz von	Dauer des Versuches	Kreatin und Kreatinin zusammen in mg. Kreatinin
2 a	100 ccm defibr. Carotis-Blut vom Hunde	kein Zusatz	sofort untersucht	1.992
b	do.	kein Zusatz	4 Tage	4.309
3 a	35 ccm Extrakt aus Hundelunge entspr. 35 g Lunge	kein Zusatz	sofort untersucht	Spur
b	do.	100 ccm defibr. Caro- tis-Blut vom Hunde von Versuch 2 a	4 Tage	2.630

Behinderung der Kreatinbildung stattgefunden hat, so wäre daraus auf eine vermehrte Zerstörung des neugebildeten Kreatinins unter dem Einfluß des Organextraktes zu schließen.

Die Bestimmung des Kreatinins und Kreatins wurde in diesen Versuchen wieder mit Hilfe der Folin'schen kolorimetrischen Methode nach dem früher von uns geschilderten Verfahren¹⁾ ausgeführt.

An dieser Stelle sollen noch einige methodische Bemerkungen in Ergänzung der bereits gegebenen Vorschriften angeführt werden.

Das Eindampfen der Eiweißfiltrate, namentlich der Leberfiltrate soll auf stark siedendem Wasserbade nur unter Beobachtung gewisser Vorsichtsmaßregeln erfolgen, da sonst leicht die kolorimetrische Farbenreaktion störende rote Rückstände entstehen. Nach unserer Beobachtung bilden sich diese besonders an den Stellen, wo die Eindampfschalen an den eisernen Ringen des Wasserbades anliegen oder wo sie besonders starker Dampfwirkung ausgesetzt sind. Durch zweckmäßige Wahl der Wasserbäder und Schalen läßt sich dieser Übelstand verringern. Durch vorsichtige Behandlung konnten wir öfters, sogar beim Eindampfen der sonst am schwierigsten zu behandelnden Leberfiltrate, fast farblose oder doch nur wenig gefärbte Rückstände gewinnen. Auf einem auf 60° erwärmten Wasserbade die Filtrate von den Autolysaten zu konzentrieren, hat zwar den Vorteil, mit größerer Wahrscheinlichkeit farblose Rückstände zu erhalten, bringt aber auch die Gefahr mit sich, daß sich bei der viel länger dauernden Einwirkung warmen Wassers aus Kreatin Kreatinin bildet.

Die bei der Kreatinbestimmung zur Umsetzung des Kreatins in Kreatinin mit Salzsäure behandelten Proben wurden beim 3stündigen Erhitzen auf dem Wasserbade stets etwas gefärbt, meist rötlich bis deutlich rot. Beim späteren Eindampfen in offener Schale verliert sich in vielen Fällen die rötliche Farbe der sauren Lösung. Die Operation des Eindampfens darf dabei zur Vermeidung von Kreatininverlusten nur bis zum eben beginnenden Trockenwerden des Schaleninhaltes ausgedehnt werden. Nach einiger Übung kann man den richtigen Moment an der Beschaffenheit des restierenden Rückstandes feuchter Kochsalzkrystalle unschwer erkennen. Jedenfalls muß ein weiteres Erhitzen des schon trockenen Schaleninhaltes vermieden werden. (Die Kochsalzkrystalle rühren von dem beim Koagulieren der Eiweißsubstanz mit Essigsäure zugesetzten Kochsalze her.) Beim Eindampfen von Flüssigkeiten, die anorganische Salze in größeren Mengen nicht enthalten, wie z. B. von Harn, fügte ich, gewissermaßen als Indikator für die richtige Beendigung des Eindampfens, stets 1–2 g

¹⁾ Gottlieb und Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 1.

Kochsalz der einzudampfenden Flüssigkeit hinzu. Als Trockenrückstand bleibt in der Schale eine von der Einwirkung der Salzsäure auf organische Substanzen schwärzlich gefärbte Krystallmasse zurück, die bei der Aufnahme mit Wasser infolge der Ausscheidung der kohligen Bestandteile oft eine dunkel gefärbte Flüssigkeit gibt, eine rötliche aber, wenn Leber verarbeitet wurde. Die größere oder geringere Verkohlung hängt ab einerseits von der Anwesenheit von viel oder wenig gelöstem Eiweiß und anderer organischer Körper, andererseits von der Art der Salzsäureeinwirkung; sie ist intensiver, wenn man durch langdauerndes Erhitzen des Trockenrückstandes auf dem Wasserbade die letzten Reste Salzsäure wegbekommen will, als wenn man sich mit einem Trockenrückstande begnügt, der befeuchtet noch intensive Salzsäurereaktion zeigt. Besonders deutlich treten diese Unterschiede bei Filtraten von koaguliertem Blute in Erscheinung. Wir begnügten uns bei unseren Versuchen stets mit einem noch ausgesprochen salzsauren Trockenrückstand. Zur Bestimmung des Kreatiningehalts im Rückstande neutralisierten wir nach der Aufnahme in Wasser, vor Anstellung der Jaffeschen Reaktion vorerst die Flüssigkeit, um den späteren Zusatz der Alkalimenge bei Anstellung der Folinschen Bestimmung richtig bemessen zu können. Die kohligen Bestandteile lassen sich nach Anstellung der Jaffeschen Reaktion zum großen Teile durch Filtration entfernen. Feinste Kohlepartikelchen bleiben oft auch dann noch in Lösung; doch scheinen geringere Mengen einen Einfluß auf die kolorimetrische Vergleichung nicht auszuüben, namentlich dann nicht, wenn viel Kreatinin zur Bestimmung vorliegt, d. h. große Verdünnungen zur kolorimetrischen Analyse gewählt werden können. Die Verarbeitung recht dunkler Trockenrückstände aber verleiht der Farbflüssigkeit eine andere Nüancierung. Die kolorimetrische Analyse wird dadurch mit Fehlerquellen behaftet; es gelingt aber, den Grundton, wenn ich mich so ausdrücken darf, für die kolorimetrische Vergleichung herauszufinden. So konnten wir auch unter recht ungünstigen Bedingungen Analysenzahlen erhalten, die auf 0,3—0,5 mg stimmende Werte ergaben. Wir haben vergeblich versucht, die Ausscheidung der kohligen Bestandteile beim Eindampfen der salzsäurehaltigen Lösung durch vorherige möglichst vollkommene Enteiweißung zu verringern. Auch das Mastixverfahren von Michaelis und Rona¹⁾ hat sich hierfür nicht als geeignet erwiesen. Der in der Flüssigkeit gelöst bleibende Mastixanteil hinterläßt beim Eindampfen einen rötlichen Sirup, der eine richtige Einwirkung der alkalischen Pikrinsäure auf Kreatinin ausschließt. Es wurde dabei gar nicht untersucht, ob nicht von dem zur Enteiweißung erzeugten Niederschlage Kreatin mitgerissen wird, wie wir das gelegentlich eines Alaunbarytklärverfahrens beobachtet haben.

¹⁾ Michaelis und Rona, Biochemische Zeitschrift, Bd. II, S. 219; Bd. III, S. 109.

Bei rötlicher Eigenfarbe der Lösungen steht uns zur möglichsten Ausgleichung der durch die Nüance bedingten Fehler die bereits früher erwähnte Differenzbestimmung¹⁾ zur Verfügung. Bei dieser Bestimmung gingen wir in der Weise vor, daß wir in einer Probe den durch die Nüance vorgetäuschten Kreatiningehalt ermittelten und diesen Wert nach Anstellung der Jaffeschen Reaktion von der in einer zweiten Probe ermittelten Kreatininzahl in Abzug brachten. Die rote Eigenfarbe dürfte aber auch nur dann bei der Analyse in Rechnung zu ziehen sein, wenn die geringe vorhandene Kreatininmenge die Verdünnung der Folinschen Farblösung auf ein größeres Flüssigkeitsvolumen verbietet. Sind aber bei großen Kreatininmengen auch große Verdünnungen etwa 1—4 l möglich, so braucht die Eigenfarbe wohl kaum mehr berücksichtigt zu werden. Wir sind uns wohl bewußt, daß bei der kolorimetrischen Kreatininbestimmung in bereits ursprünglich nüancierten Lösungen stets ein gewisser Fehler entstehen muß. Trotzdem dünken uns solche Analysen noch mindestens ebensogut quantitativ verwertbar wie etwa die frühere Bestimmung des Kreatinins als Chlorzinkverbindung, namentlich dann, wenn man diese Verbindung aus unreinen Lösungen niederschlagen hatte. Im Rahmen dieser Arbeit glauben wir den durch die Eigenfärbung bedingten Fehler durch Zusatz großer Kreatinmengen (125 mg) zu den Autolysaten verringert zu haben, da dann bei der späteren kolorimetrischen Kreatininbestimmung Verdünnungen von 1—2 l gewählt werden konnten.

An dieser Stelle soll weiter noch einiges über die kolorimetrische Kreatininbestimmung nach Folin angefügt werden:

Bekanntlich kann bei der kolorimetrischen Bestimmung des Kreatinins unter Verwendung alkalischer Pikrinsäure durch verschiedene Stoffe Kreatinin vorgetäuscht werden. Man ist in solchen Fällen geneigt, entstandene Analysenunstimmigkeiten auf Kosten der zur Umwandlung des Kreatins in Kreatinin verwendeten Methode zu setzen. Wir haben gefunden, daß Kreatin in organischen Gemischen durch 3stündiges Erhitzen auf dem Wasserbade bei einer Säurekonzentration von 2,2% Salzsäure und nachfolgendem Eindunsten der sauren Lösung am vollständigsten (im Vergleiche zu anderen Konzentrationen) in Kreatinin umgesetzt werden kann. Wir haben ferner gefunden, daß bei länger dauernder (3 Stunden) Einwirkung von Wasserbadtemperatur gelöstes Kreatin bzw. Kreatinin am wenigsten bei einer Säurekonzentration von 2,2% Salzsäure zerstört wird. Dieser Befund zeigt uns, daß wir die Wirkungen des Katalysators (Salzsäure) nur durch Vergrößerung des Volumens 2%iger Salzsäure, nicht aber durch Erhöhung der Konzentration steigern sollen. Am vorzuziehendsten dürfte es sich also unter besonderen Verhältnissen (große

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 14. Anm.

Kreatinmengen, kleine Kreatinmengen) gestalten, die Menge 2,2%iger Salzsäure für eine quantitative Invertierung von Kreatin in Kreatinin zu variieren. (Die Umsetzung des Kreatins in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten wurde aus Gründen einer einfacheren analytischen Handhabung in 150—200 ccm 2,2%iger Salzsäure bewirkt.) Nach unseren Erfahrungen resultieren bei genauer Einhaltung der von uns gegebenen Vorschriften für die Umwandlung von Kreatin in Kreatinin stets in zahlreichen Kontrollen gut übereinstimmende Kreatinzahlen und sehen wir deshalb in dieser Methode ein Verfahren, das zum mindesten für vergleichende Versuche vorzüglich geeignet ist. Wir glauben, im Gegensatz zu Weber,¹⁾ daß die Umsetzung des Kreatins in Kreatinin bei richtiger Handhabung der Methode mit genügender Genauigkeit erfolgt und daß die Werte für das Gesamtkreatinin sogar insofern mehr Vertrauen verdienen als die kolorimetrische Bestimmung des präformierten Kreatinins, als durch die Salzsäurebehandlung verschiedene Stoffe aus der Reaktionslösung entfernt werden, die neben dem Kreatinin reduzierend auf alkalische Pikrinsäure einwirken können.

Eine Trennung des Kreatinin bildenden Fermentes von den zerstörenden Fermenten in Organextrakten ist bis jetzt nicht zufriedenstellend geglückt. Es wird dadurch das weitere Studium des anhydrierenden Fermentvorganges, sowie der Kreatase und Kreatinase, wegen des gleichzeitigen Ineinandergreifens dieser Prozesse bedeutend erschwert. Unter bestimmten Bedingungen gelingt es aber doch, z. B. bei Extrakten aus Hundeleber die ausgiebige Zerstörung zugesetzten Kreatins neben sehr geringer Kreatininbildung zu demonstrieren, während bei Nierenextrakten im Anfang der Autolyse eine viel energischere Umwandlung von Kreatin in Kreatinin stattfindet. Wie aus später angeführten Beispielen hervorgeht, besitzen Extrakte aus Hundeleber ein bedeutend größeres Zerstörungsvermögen für gebildetes und zugesetztes Kreatin und Kreatinin als z. B. Nierenextrakte. Bei letzteren ist aber neben der Zerstörung stets eine Anhydrierung des vorhandenen Kreatins und zwar in größerem Umfange als bei der Leber nachweisbar und die Umwandlung in Kreatinin geht dabei der Zerstörung beider Körper zeitlich voran. Dies zeigt das Beispiel Nr. 34 aus unserer ersten Kreatinarbeit,²⁾ in welchem Nierenextrakt in 14 Stunden 12% Kreatinin aus

¹⁾ Weber, Arch. f. exp. Pharm. u. Path., Bd. LVIII, S. 93.

²⁾ Gottlieb u. Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 1

Kreatin gebildet und nur 18% davon zerstört, aber nach 178 Stunden alles Kreatin vernichtet hat.

Wir haben uns in der eingangs zitierten Arbeit¹⁾ auf den Nachweis beschränkt, daß in Organextrakten anhydrierendes Ferment, Kreatase und Kreatinase an der Anhydrierung und Zerstörung des Kreatins kräftig mitwirken. Zum Verständnis der Wirkungsweise der genannten Fermente erschien es aber notwendig, die Bedingungen für ihre optimale Wirksamkeit zu ermitteln.

Zunächst legte ich mir die Frage vor, in welcher Weise die Wirkungsintensität der genannten Fermente in Organextraktlösungen, denen Kreatin zugesetzt war, durch ruhiges Stehen der Reaktionsflüssigkeiten, durch Schütteln mit Luft oder durch Durchleiten von Luft bzw. Sauerstoff beeinflußt werden. Die Versuchsanordnung zur Entscheidung dieser Frage wurde in folgender Weise getroffen: Abgemessene Proben von neutral gegen Lackmus reagierenden Leberextrakten vom Hunde wurden mit Kreatinzusatz je 48 Stunden unter den aus nachstehender Tabelle (S. 302) ersichtlichen Bedingungen autolysiert. Die Extrakte waren vor Fäulnis durch reichlichen Toluolzusatz geschützt, die Proben mit Luft- oder Sauerstoffdurchleitung außerdem noch dadurch, daß der passierende Gasstrom mit Toluoldämpfen gesättigt war.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung finden sich in nachstehender Tabelle zusammengestellt.

Von einer Bestimmung des in den Leberextrakten vor dem Versuche vorhandenen Kreatin- und Kreatiningehaltes resp. von der Ermittlung der auf alkalische Pikrinsäure reduzierend wirkenden Substanzen wurde in diesen Versuchen Abstand genommen, da eine Kenntnis dieser Werte für einen Vergleich der fermentativen Veränderung des zugesetzten Kreatins unter verschiedenen Versuchsbedingungen nicht nötig erschien. Bei der späteren kolorimetrischen Bestimmung des Kreatins und Kreatinins wurden die Filtrate von den Leberkoagulis in zwei Teile geteilt und diese auf Kreatin und Kreatinin untersucht.

¹⁾ Gottlieb u. Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 1.

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37° unter verschiedenen Versuchsbedingungen

(je 35 cem Extrakt, entsprechend 35 g Hundeleber; je 120 cem Flüssigkeit in den einzelnen Proben; 48stündige Autolyse). Versuch Nr. 4 und 5.

Nummer des Versuches	Extrakt aus	Kreatinzusatz		Versuchsbedingungen	Gefundenes Kreatinin						Reaktion des Autolysates
		in mg Kreatinin ausgedrückt	in mg Kreatinin		Kreatinin als solches in mg	Kreatininvermehrung in mg	Kreatinin- des Kreatinins in %	Kreatin und Kreatinin zusammen in mg	Abnahme des Kreatin- plus Kreatinin- wertes in mg	in %	
4a	Hundeleber I	125	107,85	Ruhiges Stehen	1,800	1,800	1,67	51,428	56,422	52,32	schwach sauer
b	do.	125	107,85	Mäßiger Luftstrom durchgeleitet	4,438	4,438	4,12	67,460	40,390	37,45	sauer
c	do.	125	107,85	Mäßiger Sauerstoffstrom durchgeleitet	9,204	9,204	8,53	80,000	27,850	25,83	?
5a	Hundeleber II	125	107,85	Ruhiges Stehen	0,771	0,771	0,72	13,065	94,785	87,89	schwach sauer
b	do.	125	107,85	Mit Luft auf der Maschine geschüttelt	1,635	1,635	1,52	16,875	90,975	84,35	?
c	do.	125	107,85	Mäßiger Luftstrom durchgeleitet	4,500	4,500	4,17	49,080	58,770	54,49	?
d	do.	125	107,85	Mäßiger Sauerstoffstrom durchgeleitet	8,438	8,438	7,82	50,628	57,122	52,96	amphoter

Der Bereitung der Leberextrakte hat eine recht sorgfältige Reinigung der Leber von Galle voranzugehen, wenn man auf möglichst gering gefärbte Rückstände der eingedampften Leberfiltrate rechnen will. Freilich führt auch diese Vorschrift nicht immer zum Ziel. Für die Herstellung der Extrakte selbst gelten die früher¹⁾ gemachten Angaben.

Aus den Protokollen der Versuche 4 und 5 (S. 302) geht hervor, daß die Kreatase, besonders aber die Kreatinase ihre größte Wirksamkeit bei ruhigem Stehen der Fermentlösungen entfalten und daß ihre Tätigkeit bei Schütteln der Lösungen mit Luft, Luft- bzw. Sauerstoffdurchleitung verringert wird. Durch Untersuchungen Nasses²⁾ ist es schon bekannt, daß Fermentreaktionen durch größere Menge Sauerstoff gehemmt werden können; auch für die kreatinzerstörenden Fermente scheint dies bis zu einem gewissen Grade zuzutreffen.

Diese Hemmung tritt besonders deutlich hervor, wenn wir den zerstörenden Einfluß des Sauerstoffs auf reine Kreatinlösungen prüfen und die dabei erhaltenen Zahlen bei Verwertung der einschlägigen Fermentversuche mit in Rechnung ziehen. In einem Versuche, in dem wir einen mäßigen Sauerstoffstrom durch körperwarme Kreatinlösung hindurchperlen ließen, wurde nämlich festgestellt, daß in einer 120 ccm betragenden Lösung von 125 mg Kreatin (entsprechend 107,85 mg Kreatinin) 14,17% des Kreatins in der gleichen Zeit zerstört und dabei nur 2,42% des zugefügten Kreatins in Kreatinin umgewandelt wurden.

Das kreatininbildende Ferment dagegen würde in unseren Versuchen 4 und 5 nach Maßgabe der starren Zahlen — die uns über die intermediären Reaktionsverhältnisse selbst nicht aufzuklären vermögen — für die maximale Leistungsfähigkeit eine energische Bewegung seiner Lösung durch den Sauerstoffstrom beanspruchen. Aus dieser Folgerung würde sich ergeben, daß die zwei Fermentgruppen, die anhydrierende und die zerstörende, gerade entgegengesetzte Reaktionsbedingungen für ihre optimale Leistung beanspruchen. Allein schon aus dem Befunde, daß gerade die Proben mit den niedrigsten Kreatininwerten auch die niedrigsten Gesamtwerte,

¹⁾ Gottlieb u. Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 15.

²⁾ Nasse, Pflügers Arch., Bd. XV, S. 471.

umgekehrt aber die Versuche mit den größten Kreatininzahlen auch die größten Gesamtzahlen aufweisen, dürfte sich eine andere Erklärung herleiten lassen. Und diese einfachste Erklärung wäre, wie uns dünkt, die, daß sich der Abbau des Kreatins vorzugsweise über das Kreatinin vollzieht, wie das bereits auch früher¹⁾ als eine wahrscheinliche Vermutung ausgesprochen wurde.

Auch ein später noch zu besprechender Versuch (8a, b) spricht in diesem Sinne. Es zeigte sich nämlich, daß ein Extrakt, in dem 63% des zugesetzten Kreatins zerstört waren, nur 1 $\frac{1}{2}$ % Kreatinin enthielt, während eine zweite Probe desselben Extraktes, die nur 21% Kreatin zerstört hatte, noch 4% Kreatinin aufwies. Es stützen diese Befunde die Annahme, daß in den Leberversuchen, die wir unter verschiedenen Versuchsbedingungen angesetzt hatten, bei Gegenwart von Abbauf fermenten aus dem jeweils ermittelten Kreatiningehalt nicht unmittelbar auf die größere oder geringere Tätigkeit des anhydrierenden Fermentes geschlossen werden darf.

Aus anderen Experimenten, die die Einwirkung von Nierenextrakt auf Kreatininlösung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen verfolgen, geht es sogar zahlenmäßig hervor, daß auch das kreatininbildende Ferment bei ruhigem Stehen seiner Lösungen stärker wirkt als unter der Einwirkung eines Sauerstoffstromes. Als treffendes Beispiel hierfür haben wir folgenden Versuch Nr. 6 (S. 305) ausgewählt.

Diese Untersuchungen über die Beeinflussung der Fermenttätigkeit bei ruhigem Stehen der Reaktionslösungen, bei Luft- bzw. Sauerstoffdurchleitung ergeben somit, daß das anhydrierende Ferment und die Zerstörungsfermente bei ruhigem Stehen der Reaktionslösung die größte Wirksamkeit entfalten.

Der vorseits skizzierte Versuch (Nr. 6) mit einem Extrakt aus Hundenieren ist auch noch in anderer Beziehung bemerkenswert. 35 g Niere zerstörten nämlich während 48stündigem ruhigem Stehen bei 37° nur 17,7% des zugefügten Kreatins

¹⁾ Gottlieb u. Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 29.

Verhalten von Nierenextrakt mit Kreatinzusatz bei 37° unter verschiedenen Versuchsbedingungen

(je 35 cem Extrakt, entsprechend 35 g Hundeniere; je 120 cem Flüssigkeit in den einzelnen Proben; 48stündige Autolyse).

Versuch Nr. 6.

Num- mer des Ver- suches	Extrakt aus	Kreatinzusatz		Versuchs- bedingungen	Gefundenes Kreatinin					Reaktion des Autolysates	
		in mg Krea- tinin ausge- drückt	in mg		Kreatinin- vermehrung in mg	in % des Krea- tins	Kreatin und Kreatinin zu- sammen in mg	Abnahme des Kreatin- plus Kreatininwertes in mg	in mg		
6 a	Hundeniere	125	107,85	Ruhiges Stehen	39,036	39,036	36,20	88,776	19,074	17,69	minimal basisch
b	do.	125	107,85	Mäßiger Sauerstoffstrom durchgeleitet	24,922	24,922	23,11	89,007	18,843	17,47	schwach sauer

und wandelten 39% desselben in Kreatinin um, während der korrespondierende Leberversuch, der unter gleichen Bedingungen mit 35 g Leber desselben Hundes ausgeführt wurde, 87,9% Zerstörung und nur 1% Kreatininbildung aufwies. Der Extrakt der Hundeniere wirkt also in erster Linie auf zugesetztes und vorhandenes Kreatin anhydrierend, in zweiter Linie erst zerstörend, während dem Leberextrakt von vornherein ein größeres Zerstörungsvermögen zukommt.

Die einzelnen Extraktproben, die anfangs neutrale Reaktion hatten, zeigten bei ihrer Entnahme aus dem Thermostaten nach 48 stündiger Versuchsdauer bald neutrale, bald alkalische, bald saure Reaktion, wie das bei der verschiedenen Behandlung (ruhiges Stehen, Luftschüttelung, Luft- bzw. Sauerstoffdurchleitung) auch nicht anders zu erwarten war. Durch eine titrimetrische Bestimmung der auftretenden Alkaleszenz oder Acidität wäre zwar der Einfluß der Reaktion auf den Fermentvorgang festzustellen gewesen, jedoch erschien ein solches Verfahren bei den Organextrakten nicht einwandfrei. Da nach den bisherigen Erfahrungen die Säuerung allein (auch ohne Fermentwirkung) kreatininbildend wirkt, suchte ich dieselbe durch Zugabe von alkalisch reagierendem Baryumcarbonat zu den Autolyseproben auszuschalten. Es wurde den einzelnen Versuchen ca. 1 g Baryumcarbonat zugefügt: die bei der Autolyse entstehenden Säuren wurden dann gebunden und die Reaktion des Autolysates war alkalisch.

Nachstehende Beispiele in Versuch 7 zeigen den Einfluß, den schwach alkalische Reaktion auf die besprochenen Fermentvorgänge ausübt; zur besseren Vergleichung habe ich die entsprechenden Versuche mit demselben Extrakte, die ohne Zusatz von Baryumcarbonat behandelt wurden, mit aufgezählt.

Die Versuchsreihe lehrt, daß alkalische Reaktion die Abbaufemente schädigt, die schwach saure Reaktion aber deren Wirksamkeit begünstigt. Besonders deutlich ist das in dem Versuche 7a ausgesprochen, wo die Reaktion des Autolysates in dem einen Fall eine schwach saure, in dem anderen Falle eine alkalische war. Demgemäß läßt sich, wohl infolge der ge-

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37° unter verschiedenen Versuchsbedingungen (je 35 ccn Extrakt, entsprechend 35 g Hundeleber; je 120 ccn Flüssigkeit in den einzelnen Proben; 48stündige Autolyse).
Versuch Nr. 7.

Nummer des Versuches	Extrakt aus	Kreatinzusatz		Versuchsbedingungen	Gefundenes Kreatinin						Reaktion des Autolysates
		in mg	in mg		Kreatinin als solches in mg	Kreatininvermehrung		Kreatin und Kreatinin zusammen in mg	Abnahme des Kreatinwertes		
						in mg	in %		in mg	in %	
7 a	Hundeleber II	125	107,85	Ruhiges Stehen mit BaCO ₃ -Zusatz	4,339	4,02	28,828	79,022	73,27	basisch	
				ohne	0,771	0,72	13,065	94,785	87,89	schwach sauer	
b	do.	125	107,85	Auf der Schüttelmaschine mit BaCO ₃ -Zusatz	1,869	1,73	18,875	88,975	82,50	basisch	
				ohne	1,635	1,52	16,875	90,975	84,35	schwach sauer	
c	do.	125	107,85	O-Durchleiten mit BaCO ₃ -Zusatz	12,657	11,74	50,628	57,122*	52,96	basisch	
				ohne	8,438	7,82	50,628	57,122	52,96	amphoter	

ringeren fermentativen Zerstörung, auch eine größere Kreatininzunahme in den alkalischen Autolyseproben konstatieren, als bei den Versuchen ohne Baryumcarbonatzusatz. Die stärkere Zunahme des Kreatinins bei alkalischer Reaktion dürfte aber nur zum Teile auf ein geeigneteres Milieu für die Wirksamkeit des anhydrierenden Fermentes zurückzuführen sein und dürfte auch auf die Kreatininbildung aus zugesetztem Kreatin unter dem Einfluß des Alkalis selbst zu beziehen sein.

Die genauere Festlegung der optimalen Reaktionsbedingungen für die Fermente, insbesondere den Einfluß des Alkalis auf die Kreatininbildung in reinen Kreatinlösungen werde ich nach Abschluß diesbezüglicher Untersuchungen noch ausführlich besprechen. Jedenfalls erscheinen mir eiweißreiche Organextrakte nicht geeignet, den Einfluß der Reaktion auf die Wirksamkeit des anhydrierenden kreatininbildenden Fermentes zu prüfen, da selbst reine Kreatinlösungen durch Wasser im Sinne einer Kreatininbildung beeinflußt werden.

Im weiteren beschäftigte ich mich mit der Frage, in welcher Weise die Wirksamkeit unserer Fermente in Organextraktlösungen bei Zusatz verschiedener Antiseptica beeinflußt wird. Nachstehende Versuche seien hierüber angeführt (Versuch 8, S. 309).

Wir erkennen aus diesen Beispielen die schon oft beobachtete Tatsache, daß das chemisch indifferente Toluol im Vergleiche zu den anderen herangezogenen Antiseptica auf Fermente am wenigsten schädigend einwirkt. Wir haben uns deshalb ausschließlich des Toluols für unsere experimentellen Untersuchungen bedient. Bei seiner Anwendung ist dafür Sorge zu tragen, daß der Organextrakt nicht bloß mit einer Toluolschicht oben bedeckt, sondern durch kräftiges Schütteln der Flüssigkeit auch wirklich mit diesem Antiseptikum gesättigt ist. Nur durch eine derartige Arbeitsweise kann Fäulnis mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Verwendung von Chloroform als Konservierungsmittel setzt die Wirksamkeit der Kreatase und Kreatinase bedeutend herab, das alkalisch reagierende Fluornatrium hebt anscheinend sogar die Fermentwirkung auf. In dem Versuche mit Fluornatrium ergab sich nämlich durch die

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37° unter Zusatz verschiedener Antiseptica

(je 35 ccm Extrakt, entsprechend 35 g Hundeleber; je 120 ccm Flüssigkeit in den einzelnen Proben; 48stündige Autolyse).

Versuch Nr. 8.

Num- mer des Ver- suches	Extrakt aus	Kreatinzusatz		Angewandtes Antiseptikum	Gefundenes Kreatinin					Reaktion des Autolysates	
		in mg	in mg Krea- tin ausge- drückt		Kreatinin als solches in mg	Kreatinin- vermehrung in mg	Kreatinin- in %	Kreatin und Kreatinin zu- sammen in mg	Veränderung ¹⁾ des Kreatin- plus Kreatininwertes in mg		in %
8 a	Hunde- leber III	125	107,85	Toluol	1,543	1,543	1,43	40,000	— 67,850	— 62,91	sehr schwach sauer
b	do.	125	107,85	Chloroform	4,262	4,262	3,95	85,264	— 22,586	— 20,94	stark sauer
c	do.	125	107,85	0,4% Fluor- natrium	2,000	2,000	1,85	111,720	+ 3,870	+ 3,59	stark alkalisch

¹⁾ In dem Stab der Tabelle bedeutet + Zunahme, — Abnahme des Kreatin- und Kreatininwertes.

Analyse eine größere Kreatinmenge, als dem Extrakte ursprünglich zugefügt war. Auf diese Erscheinung werden wir später noch zu sprechen kommen. Die Beispiele mit Chloroform- bzw. Fluornatriumzusatz lassen weiter auf eine bedeutend stärkere Fermenttätigkeit für die Kreatininbildung schließen. Wahrscheinlich ist aber die Vergrößerung der Kreatininwerte zum Teil auch dem Einflusse der verschiedenen Reaktionen zuzuschreiben, die den Extrakten bei der Autolyse mit Chloroform und Fluornatrium erteilt wurden. Während nämlich der mit Toluolzusatz autolytierte Extrakt nur ganz schwach sauer gegen Lackmus reagierte, erwies sich der Extrakt mit überschüssigem Chloroform stark sauer, der mit Fluornatrium stark alkalisch. Ob nun das Fluornatrium als solches die drei Fermente in ihrer Wirksamkeit hemmte, oder ob das Ausbleiben einer Fermentwirkung die Folge der durch das Fluornatrium bedingten stark alkalischen Reaktion war, muß dahingestellt bleiben. Auch äußerlich war die mit Fluornatrium autolytierte Probe von jenen mit Toluolzusatz angesetzten Versuchen verschieden; diese hatten nämlich bei 48stündiger Aufbewahrung im Brutschranke eine grau-grüne Farbe angenommen, während jene noch die ursprünglich hellrote Farbe des Extraktes aufwies. Eine Aufhebung der autolytischen Vorgänge durch die starke Alkaleszenz im Fluornatriumversuche ist aber in diesem Versuche ganz wohl möglich, da nach Wieners¹⁾ Untersuchungen derartige Prozesse bereits bei einer Alkaleszenz von 0,2–0,4% Natronlauge vollständig aufhören.

Man hat öfters die Aufhebung von Fermentvorgängen beim Zusatz geringer Mengen von Protoplasmagiften beobachtet und diese Erscheinung zum Nachweis der Fermentnatur der betreffenden Vorgänge verwertet. In folgender Tabelle S. 311 sind einige Versuche angeführt, die die Einwirkung eines solchen Giftes — wir haben Cyankalium gewählt — auf unsere Fermente illustrieren.

Das anhydrierende Ferment und die Abbaufemente wurden schon durch Zusatz ganz geringer Mengen Cyankalium geschädigt.

¹⁾ Wiener, Zentralblatt f. Phys., Bd. XXIX. S. 349, 1895.

Verhalten von Leberextrakten mit Kreatinzusatz bei 37° bei Gegenwart von Cyankalium

(je 35 ccm Extrakt entsprechend 35 g Hundeleber; je 120 ccm Flüssigkeit in den einzelnen Proben; 48stündige Autolyse).
Versuch Nr. 9 und 10.

Nummer des Versuches	Extrakt aus	Kreatinzusatz		Zusatz von Cyankalium	Gefundenes Kreatinin						Reaktion des Autolysates
		in mg	in mg		Kreatinin als solches in mg	Kreatininvermehrung in mg	Kreatinin- und Kreatinin zusammen in mg	Veränderung des Kreatininwertes in mg	Veränderung des Kreatininwertes in %		
9 a	Hundeleber V	125	107,85	kein Zusatz	18,496	18,496	17,15	80,000	- 27,850	- 25,82	minimal basisch
b	do.	125	107,85	35 ccm 1%ige Cyankaliumlösung	11,368	11,368	10,54	86,400	- 21,450	- 19,89	basisch
10 a	Hundeleber III	125	107,85	kein Zusatz	1,543	1,543	1,43	40,000	- 67,850	- 62,91	sehr schwach sauer
b	do.	125	107,85	24 ccm 5%ige Cyankaliumlösung	—	—	—	117,824	+ 9,974	+ 9,35	stark alkalisch

Fügten wir dann größere Mengen des Giftes zu den Autolyseproben, etwa wie im Beispiele Nr. 10 so viel, daß eine 1% Cyankalium enthaltende¹⁾ Reaktionslösung entstand, so konnten nach der Autolyse fast dieselben Mengen Kreatin wiedergefunden werden, als zugesetzt waren. Die Gesamtzahl zeigt sogar, daß bei der Autolyse eine Vergrößerung des Kreatinwertes eingetreten ist. Dieser Beobachtung sind wir schon einmal begegnet und werden ihre Ursache an späterer Stelle darin kennen lernen, daß im autolysierten Leberextrakt sich auch Kreatin neu bilden kann. Da wir die Größe solcher Kreatinneubildung nicht kennen, so dürfen wir aus dem zitierten Versuche nur folgern, daß 1%ige Cyankaliumlösung recht bedeutend die kreatin- bzw. die kreatininzerstörenden Fermente schädigt.

Bei Beurteilung dieses Experimentes mit Zusatz von 1% CNK ist ferner noch zu berücksichtigen, daß schon durch Erhöhung des Salzgehaltes, vor allem durch Erhöhung der Basizität, ganz veränderte Versuchsbedingungen für die Fermente geschaffen werden. Denn schon durch Zusatz geringer Mengen indifferenten Stoffe, wie Chlornatrium, Harnstoff, wird eine Schädigung des anhydrierenden Fermentes, der Kreatase und Kreatinase hervorgerufen. Dies erhellt aus nachstehenden Beispielen Versuch 11, 12, 13:

Die höhere Kreatininzahl in der mit Zusatz von 2% Harnstoff autolysierten Leberextraktprobe des Versuches 12 dürfte sich wahrscheinlich aus der Schädigung der Kreatinase herleiten lassen. Besonders hervorgehoben zu werden verdient die Beobachtung, daß schon Harnstoffzusatz von nur 1% die

¹⁾ Cyankalium gehört zu den Stoffen, die alkalische Pikrinsäure zu Pikraminsäure reduzieren und durch den bei dieser Reaktion auftretenden roten Farbenton der Lösung Kreatinin vortäuschen. Die deshalb notwendige Entfernung der Blausäure aus den für die Kreatininbestimmung vorgesehenen Proben geschah durch Behandlung des Koagulumfiltrates mit Kohlensäure während seiner Konzentration auf dem Wasserbade; ein gleiches Verfahren in den Proben für die Gesamtbestimmung (Kreatin + Kreatinin) anzuwenden, wäre wegen der späteren Salzsäureeinwirkung zum Zwecke der Überführung von Kreatin in Kreatinin überflüssig.

Verhalten von Leberextrakten mit Kreatinzusatz bei 37° bei Zusatz von Harnstoff und Kochsalz

(je 35 ccm Extrakt entsprechend 35 g Hundeleber; je 120 ccm Flüssigkeit in den einzelnen Proben; 48stündige Autolyse).

Versuch Nr. 11, 12, 13.

Num- mer des Ver- suches	Extrakt aus	Kreatinzusatz		Zusatz des indifferenten Stoffes	Gefundenes Kreatinin					Reaktion des Autolysates	
		in mg Krea- tinin ausge- drückt	in mg		Kreatinin- als solches in mg	Kreatinin- vermehrung in mg	Kreatinin- und Kreatinin zu- sammen in mg	Veränderung des Kreatin- plus Kreatininwertes in mg	in %		
11a	Hunde- leber VI	125	107,85	kein Zusatz	3,682	3,682	3,41	96,720	- 11,130	- 10,32	minimal basisch
b	do.	125	107,85	1 % Harnstoff	3,116	3,116	2,89	124,616	+ 16,766	+ 15,85	minimal basisch
12a	Hunde- leber III	125	107,85	kein Zusatz	1,543	1,543	1,43	40,000	- 67,850	- 62,91	sehr schwach sauer
b	do.	125	107,85	2 % Harnstoff	3,240	3,240	3,00	120,000	+ 12,150	+ 11,27	sauer
13a	Hunde- leber IV	125	107,85	kein Zusatz	2,700	2,700	2,50	75,348	- 32,502	- 30,14	sehr schwach sauer
b	do.	125	107,85	5 % Kochsalz	2,614	2,614	2,43	93,912	- 13,938	- 12,63	sehr schwach sauer

Kreatinasewirkung empfindlich beeinträchtigt. Denn durch den Salzgehalt, insbesondere aber durch den Harnstoffgehalt des Harns kann darnach die weitere Tätigkeit der Abbaufemente im Harne verringert werden.

Aus den verschiedenen in dieser Abhandlung angeführten Leberversuchen, die in nachstehendem S. 315 tabellarisch zusammengestellt sind, sind die großen Unterschiede in der fermentativen Leistung der einzelnen Leberextrakte ersichtlich.

Die in diesen Versuchen festgestellte Zunahme des Kreatinins bewegte sich meist zwischen 0,8 und 3,8 mg pro 35 g Leber; nur in einem Beispiele gelang es, eine Zunahme von 17,15% an Kreatinin nachzuweisen. Dieser Befund zeigt deutlich, daß auch in der Leber nennenswerte Anhydrierung des zugesetzten Kreatins stattfindet, die nur gewöhnlich infolge der starken Kreatinasewirkung der Leber nur in geringerem Grade hervortreten kann.

Die Schwankungen, die sich für die Wirksamkeit der Abbaufemente beim Vergleiche der Gesamtzahlen ergeben, sind sehr große. Wir haben Fälle, in denen 88% des zugefügten Kreatins zerstört wurden, und wieder andere, in denen das zugesetzte Kreatin durch die Analyse vollständig wiedergefunden wurde. Wie lassen sich diese widersprechenden Befunde erklären? Abgesehen von individuellen Schwankungen hängt dieses unterschiedliche Verhalten der Leberextrakte auch von dem Ernährungszustande der Tiere ab. Aus der letzten Kolonne der Zusammenstellung ist ersichtlich, daß die zur Bereitung der Extrakte verwendeten Lebern, in denen wir kräftige Zerstörung von Kreatin nachweisen konnten, von Hunden stammten, die 1—2 Tage gehungert hatten; die Lebern dagegen, die nur eine geringe Abnahme von Gesamtkreatinin nach der Autolyse aufwiesen, waren Hunden entnommen, die 4 Stunden nach Verabreichung von Fleischkost — also während der Verdauung — durch Verbluten getötet waren. Da die Leber der Futtertiere sowohl, wie die der Hungertiere pro 35 ccm Extrakt (= 35 g Leber¹⁾) nur ein paar Milligramm von präformiertem

¹⁾ Die Methodik der Kreatinbestimmung in der Leber bedarf noch besonderer Erläuterung: Abgewogene Mengen Leber (auf Gramme genau

Verhalten von Leberextrakten mit Kreatinzusatz bei 37°.
 (Je 35 cem Extrakt entsprechend 35 g Hundeleber; je 120 cem Flüssigkeit in den einzelnen Proben; 48stündige Autolyse).
 Tabellarische Zusammenstellung.

Extrakt aus	Kreatinzusatz		Gefundenes Kreatinin						Bemerkungen
	in mg	in mg ausgedrückt	Kreatinin als solches in mg	Kreatininvermehrung		Kreatinin und Kreatinin zusammen in mg	Veränderung des Kreatin- plus Kreatininwertes		
				in mg	in %		in mg	in %	
Hundeleber I	125	107,85	1,800	1,800	1,67	51,428	- 56,422	- 52,32	Versuche I—IV, VIII. Gut genährte, fleischgefütterte Hunde nach 30—40 stündigem Hunger getötet. Mit Hundekuchen 8 Tage gefüttertes Tier nach 30stünd. Hunger getötet. Versuche VI, VII. Tiere 4 Stunden nach verabreichter Fleischkost getötet. Vide sub I—f.
" II	125	107,85	0,771	0,771	0,72	13,065	- 94,785	- 87,89	
" III	125	107,85	1,543	1,543	1,43	40,000	- 67,850	- 62,91	
" IV	125	107,85	2,700	2,700	2,50	75,348	- 32,502	- 30,14	
" V	125	107,85	18,496	18,496	17,15	80,000	- 27,850	- 25,82	
" VI	125	107,85	3,682	3,682	3,41	96,720	- 11,130	- 10,32	
" VII	125	107,85	3,684	3,684	3,42	108,000	+ 0,150	+ 0,14	
" VIII	125	107,85	3,154	3,154	2,92	61,278	- 46,572	- 43,18	

Kreatinin enthielt, spielt ein geringer Mehrgehalt des frischen Organes bei der großen Menge zugefügten Kreatins für die Beurteilung der Zerstörungsfähigkeit der Leber keine Rolle. Das unterschiedliche Verhalten der Leber von Futter- und Hungertieren dürfte aber auch nicht auf einen größeren oder geringeren Vorrat von Abbauf fermenten zurückzuführen sein, sondern dürfte auf einer in der Leber des gefütterten Tieres deutlicher angesprochenen, wenn auch verschieden starken Kreatinbildung bei der Autolyse beruhen. Daß auch bei Hungerlebern autolytische Kreatinbildung stattfindet, ersehen wir aus einem früher zitierten Versuche (Versuch Nr. 12), wo wir bei der Autolyse eines Extraktes aus Hungerleber unter Zusatz von Harnstoff ein Mehr von 12 mg Kreatinin fanden. Gerade dadurch, daß wir durch Zusatz von Harnstoff und Cyankalium die Tätigkeit der Abbauf fermente schädigen können, haben wir ein Mittel in die Hand bekommen, die autolytische Kreatinbildung auch in der Leber nachweisen

wurden in einer Schale mit der Schere kleingeschnitten. Die zerkleinerte Leber wurde mit essigsauerm Wasser (700 ccm) und 5–10 g Kochsalz auf ein erwärmtes Wasserbad gesetzt, 10–12 Stunden bei 60–70° ausgezogen und für den Ersatz des verdampfenden Wassers Sorge getragen. Nach dieser Zeit wurden die Eiweißkörper auskoaguliert (eventuell nach Zusatz von Natriumcarbonat) und dieses Filtrat (I) wie früher behandelt. Das Koagulum selbst wurde zur vollständigeren Abgabe noch festgehaltenen Kreatins wieder mit 700 ccm Wasser und 2,2%iger Salzsäure 3 Stunden auf kochendem Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten erfolgte Neutralisation mit 10%iger Natronlauge und ganz schwaches Ansäuern mit Essigsäure; es wurde nun wieder erhitzt und heiß filtriert. Die Verarbeitung dieses Filtrates (II), in dem nun der Rest des Kreatins in Kreatinin umgesetzt ist, erfolgte nach früher gegebenen Grundsätzen. Der Gesamtwert des Kreatins stellt somit die Summe der aus Filtrat I und Filtrat II gewonnenen Kreatininzahlen dar. Es sei darauf hingewiesen, daß bei Untersuchung der Leber im Gegensatz zu den Leberextrakten die erzielten Eindampfrückstände ausnahmslos tief rot gefärbt waren. Der kolorimetrischen Analyse des Kreatingehaltes wurde deshalb die bereits früher geschilderte Differenzbestimmung zugrunde gelegt (vgl. S. 299). Bei einem derartigen Vorgehen gab z. B. die 235 g schwere Leber eines gutgenährten Hundes, der während der Verdauung getötet wurde, 17,376 mg Kreatin (in Kreatinin ausgedrückt) mit Hilfe der Folinschen Methode zu erkennen. Die zufälligerweise gleich schwere Leber eines anderen Hundes, der 1 Tag gehungert hatte, enthielt 22,86 mg Kreatin.

zu können. Wir dürfen aber vorläufig den Wert dieser den Zerstörungsvorgang hemmenden Substanzen nicht zu hoch für die quantitative Bestimmung des durch die Autolyse gebildeten Kreatinins einschätzen, da wir aus unseren Experimenten nicht erfahren, ob eine totale Aufhebung des fermentativen Zerstörungsvorganges durch Zusatz solcher Stoffe erzielt worden ist, oder ob nicht eine noch größere autolytische Kreatinbildung neben dabei einhergehender gleichzeitiger Kreatinzerstörung anzunehmen ist. Es enthält also auch die Leber, ebenso wie Muskel, Niere usw., geeignetes Material zur Bildung von Kreatin, die Leber gefütterter Tiere aber in reicherm Maße als die Hungerleber.

Derartige Unterschiede ließen sich auch beim Blut feststellen, wenn wir einerseits Blut von Futtertieren, andererseits Blut von Hungerhunden im Brutschranke aufbewahrten. Das Futterblut hat z. B. während seiner 4tägigen Autolyse den Kreatingehalt mehr als verdoppelt, das Hungerblut aber nur um die Hälfte vermehrt. Im folgenden Versuch 14 und 15 S. 318 geben wir dafür ein Beispiel.

Die mitgeteilten Zahlen beziehen sich auf Carotisblut. Noch größere Kreatininwerte treten aber auf, wenn wir das Pfortaderblut gutgefütterten Tiere der Autolyse überlassen. Aus der sich dabei (Versuch 16 S. 318) ergebenden Verdreifachung der Kreatininzahl können wir auf den verhältnismäßig größeren Reichtum des Pfortaderblutes an Vorstufen von Kreatin schließen. Auch die Anwesenheit einer größeren Menge von Wasser scheint die Kreatinneubildung bei der Autolyse des Blutes günstig zu beeinflussen, wie das aus dem mitangeführten Beispiel zu ersehen ist.

Die Kreatinneubildung in autolysierten Organen erschwert auch die Entscheidung, ob der Abbau des Kreatins sich über das Kreatinin vollzieht. Anscheinend ließe sich durch einen einfachen Vergleich der unter analogen Verhältnissen in einem Falle mit Kreatin, im anderen Falle mit Kreatinin beschickten Organexaktproben ein sicheres Urteil über diese Frage gewinnen. Dieser Vergleich spricht in der Mehrzahl der Fälle im Sinne einer leichteren Zerstörbarkeit des Kreatinins, solange wir die

Verhalten des Blutes hungernder und gefütterter Hunde bei 37°.

Versuch Nr. 14 und 15.

Versuch	Material	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
			Kreatin und Kreatinin zusammen in mg	Vermehrung des Kreatin-u. Kreatininwertes	
				in mg	in ‰
14 a	Hungerblut (Carotisblut) 100 ccm	sofort untersucht	1,490	—	—
b	do. + 70 ccm H ₂ O	4 Tage	2,219	0,729	48,93
15 a	Futterblut (Carotisblut) 100 ccm	sofort untersucht	1,992	—	—
b	do. + 70 ccm H ₂ O	4 Tage	4,309	2,317	116,31

Verhalten des Pfortaderblutes vom gutgefütterten Hunde bei der Autolyse.

Versuch Nr. 16.

Versuch	Material	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
			Kreatin und Kreatinin zusammen in mg	Vermehrung des Kreatin-u. Kreatininwertes	
				in mg	in ‰
20 a	Pfortaderblut vom Hunde 100 ccm	sofort untersucht	1,282	—	—
b	do.	4 Tage	3,375	2,093	163,26
c	do. + 70 ccm H ₂ O	4 Tage	3,971	2,689	209,75

mit Kreatininzusatz autolysierten Proben nur auf noch als solches vorhandenes Kreatinin untersuchen. Behandeln wir aber diese Extrakte zur Prüfung auf ihren Kreatin- plus Kreatinin-gehalt mit Salzsäure, so können wir neben dem Kreatinin auch noch ganz erhebliche Mengen Kreatin nachweisen. Nachstehende Beispiele (Versuche 17—20) S. 320 sollen dies illustrieren.

Die einfachste Erklärung der Tatsache, daß bei der Autolyse der mit Kreatinin beschickten Extraktproben auch Kreatin auftritt, dürfte darin zu suchen sein, daß während der Autolyse Kreatinbildung stattfindet. Wie groß dieselbe aber sein kann, erfahren wir aus den angeführten Beispielen nicht. Allem Anscheine nach dürften nicht unbedeutende Mengen gebildet werden, wie uns der Versuch 20 mit einer Kreatinzunahme von 35 mg pro 35 ccm Extrakt angibt. Berücksichtigen wir dann noch, daß auch das autolytisch gebildete Kreatin wie das fertig zugesetzte der Umwandlung in Kreatinin, resp. der Zerstörung unterliegt, so könnte die Kreatinneubildung doch eine ansehnliche Größe erreichen. Es bleibt aber unentschieden, ob außer diesem Prozesse nicht auch noch ein reversibler Fermentvorgang mit in Frage kommt, nämlich die Bildung von Kreatin aus Kreatinin. Unter normalen Bedingungen würde dann das Kreatinin bildende Ferment anhydrierend auf Kreatin einwirken, nach dem Überschreiten gewisser Konzentrationsgrenzen für Kreatinin aber wieder Kreatin zurückbilden, wie ähnliche reversible Fermentvorgänge schon mehrfach beschrieben worden sind. Das Hervortreten der Kreatinbildung aus Kreatinin könnte dadurch bedingt sein, daß entweder fertig zugesetztes Kreatinin sich anders als Kreatinin in statu nascendi verhält, oder daß durch den großen Überschuß fertig zugesetzten Kreatinins die physiologischen Bedingungen für die Tätigkeit des anhydrierenden Ferments verändert werden.

Die wesentlichen Ergebnisse vorliegender Untersuchungen sind in folgenden Sätzen zusammengefaßt:

1. Anhydrierendes Ferment, Kreatase und Kreatinase entfalten ihre größte Wirkung bei schwach saurer Reaktion. Alkalizusatz schädigt die Abbaufemente. Ruhiges Stehen der Reaktionslösung begünstigt die fermentativen Vorgänge. Toluol als

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatin- und Kreatininzusatz bei 37°
 (mit je 35 ccm Extrakt, entsprechend 35 g Leber vom Hungerhunde; je 120 ccm Flüssigkeit in den einzelnen Proben;
 48stündige Autolyse).

Versuch Nr. 16—19.

Extrakt aus	Zugesetztes		Gefundenes Kreatinin											
	Kreatin in mg Krea- tinin ausge- drückt	Kreatinin in mg	Kreatinin als solches in mg	Kreatinin- vermehrung in mg	Kreatinin- zerstörung in %	Kreatin und Kreatinin zu- sammen in mg	Abnahme des Kreatin-plus Kreatinin- wertes in mg	in %	Zunahme an Kreatin aus- gedrückt in mg Kreatinin					
Hundeleber (V. 17)	125	107,85	nichts zugefügt	1,543	1,543	1,43	—	—	40,000	67,850	62,91	—	—	18,912
do.	nichts zugefügt	107,85	nichts zugefügt	40,000	—	—	67,850	62,91	58,912	—	—	—	—	—
Hundeleber (V. 18)	125	107,85	nichts zugefügt	2,700	2,700	2,50	—	—	75,348	32,502	30,14	—	—	—
do.	nichts zugefügt	107,85	nichts zugefügt	80,000	—	—	27,850	25,82	102,856	—	—	—	—	22,856
Hundeleber (V. 19)	125	107,85	nichts zugefügt	18,496	18,496	17,15	—	—	80,000	27,850	25,82	—	—	—
do.	nichts zugefügt	107,85	nichts zugefügt	70,344	—	—	37,526	34,89	85,072	—	—	—	—	14,748
Hundeleber (V. 20)	125	107,85	nichts zugefügt	3,154	3,154	2,92	—	—	61,278	46,512	43,18	—	—	—
do.	nichts zugefügt	107,85	nichts zugefügt	76,240	—	—	31,610	29,31	101,248	—	—	—	—	35,008

Antiseptikum schädigt sie am wenigsten. Durch Protoplasma-
gifte, ferner durch Harnstoff und Kochsalz in größerer Konzen-
tration werden die Fermente in ihrer Wirkung gehemmt.

2. Bei der Autolyse der Leber und des Blutes vom Hunde
wird im Beginn Kreatin gebildet. Das Blut und die Leber ge-
fütterter Hunde enthalten zur Kreatinbildung geeignetes Material
in größerer Menge als Blut und Leber von Hungertieren.

3. Leberextrakte zerstören zugesetztes Kreatinin in aus-
giebiger Weise. Dabei wird auch Kreatin in ansehnlicher Menge
nachweisbar.

