

Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse.

III. Mitteilung.¹⁾

Von

A. Rothmann, Assistent des Instituts.

(Aus dem pharmakologischen Institute der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1908.)

In einer größeren Arbeit über Kreatin und Kreatinin berichtet E. Mellanby²⁾ auch über das Verhalten der beiden Körper bei der Autolyse. Er kommt dabei zu Resultaten, die in Widerspruch stehen zu den von Gottlieb und Stangassinger erhaltenen Ergebnissen. Aus den früheren Mitteilungen derselben geht hervor, daß Kreatin und Kreatinin bei der Autolyse der Organe zerstört oder weiter umgewandelt werden, daß aber einzelnen Organen auch die Fähigkeit zukommt, Kreatin und Kreatinin zu bilden. Gleichzeitig beobachteten sie die Entstehung von Kreatinin aus zugesetztem Kreatin. Im Gegensatz zu diesen Befunden behauptet Mellanby:³⁾ «In all autolysis experiments kept rigorously clear of bacterial action and where precautions were taken to prevent the conversion of creatin and creatinin by heating, creatin and creatinin have remained unaffected.»

Aus diesen Befunden Mellanbys ergibt sich vor allem der Einwand, daß die in den Versuchen von Gottlieb und Stangassinger beobachtete Zerstörung resp. Umwandlung zugesetzten Kreatins nicht auf den Vorgängen der Autolyse, sondern auf Bakterienwirkung beruht. Um diesen Einwand zu prüfen, habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Gottlieb

¹⁾ Vgl. R. Gottlieb und R. Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 1, und R. Stangassinger, Bd. LV, S. 295.

²⁾ Journal of Physiology, Bd. XXXVI, S. 447.

³⁾ loc. cit., S. 465.

die früher mitgeteilten Autolyseversuche unter sorgfältigstem Ausschluß von Bakterien und unter ständiger Kontrolle von bakteriologischer Seite nochmals wiederholt und dabei auch die methodischen Einwände Mellanbys berücksichtigt.

Ich gehe zunächst auf diejenigen meiner Versuche ein, die sich auf die Veränderung des Gesamtkreatinins (Kreatin plus Kreatinin) bei der Autolyse beziehen. Zur Bestimmung des Gesamtkreatinins haben Gottlieb und Stangassinger das Kreatin durch 3stündiges Erhitzen in einer Konzentration von 2,2% Salzsäure auf siedendem Wasserbad in Kreatinin umgewandelt. Dies Verfahren hat sich auch in meinen Versuchen sehr gut bewährt. Es muß aber betont werden, daß die zur quantitativen Umwandlung von Kreatin in Kreatinin nötige Säuremenge je nach dem chemischen Milieu, in dem sich das Kreatin befindet, verschieden stark bemessen werden muß. So macht schon Jaffé¹⁾ darauf aufmerksam, daß das Kreatin im Harne durch die Gegenwart anderer Körper vor dem zerstörenden Einfluß der siedenden Säure geschützt wird, und daß deshalb eine energischere Einwirkung der Salzsäure zur Umwandlung des Kreatins im Harne anwendbar ist und erst zur vollständigen Überführung in Kreatinin führt, als bei reinen Kreatinlösungen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Gottlieb und Stangassinger.²⁾ Im Vergleich zu reinen Kreatinlösungen konnte die Säure bei der Behandlung der Autolyseproben längere Zeit hindurch einwirken, um Kreatin in Kreatinin überzuführen, ohne daß durch Zersetzung Verluste eintraten. Man muß demnach das Optimum der Säurekonzentration, sowie die Art und Dauer der Einwirkung für die verschiedenen Versuchsbedingungen immer erst ermitteln, und die von Gottlieb und Stangassinger gegebene Vorschrift läßt sich nicht ohne weiteres auf die Kreatininbestimmung, z. B. in Fleischextraktlösungen und Harn übertragen.³⁾ Für die Bestimmung des Kreatinins im Blut

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 436.

²⁾ loc. cit., Bd. LII, S. 13.

³⁾ Vgl. S. Weber, Physiologisches zur Kreatinfrage, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. LVIII, S. 98, und Dreibholz, Zur Frage der Kreatinausscheidung im Harn, Inaug.-Diss., Greifswald 1908.

und in den Filtraten von den Eiweißkoagulis der Autolyseversuche ergibt die 3stündige Erhitzung in einer Konzentration von 2,2%iger Salzsäure und das Einengen der sauren Flüssigkeit auf dem Wasserbad bis auf ein ganz geringes Volumen gute Resultate. Ich fand bei der methodischen Nachprüfung dieser Vorschrift stets 95—99% des vorhandenen Kreatins als Kreatinin wieder. Als Belege führe ich die folgenden Analysen in Rinderblut an. Da das präformierte Kreatinin und Kreatin 1 mg oder höchstens 2 mg pro 100 ccm Blut niemals übersteigt, so sind von dem zugesetzten Kreatin 95—99% wiedergefunden worden.

Tabelle I.

Gesamtkreatininbestimmungen im Rinderblut und Hundeleber mit Kreatinzusatz.

Nr.	Menge des defibr. Blutes resp. Leber	Zugesetztes Kreatin		Gesamtkreatinin in mg	Wiedergefundenes Kreatinin	
		in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt		in mg	in %
I	100 ccm	ohne Zusatz		1,16	—	—
II	>	25	21,564	21,83	20,67	95,8
III	>	25	21,564	21,77	20,61	95,6
IV	>	12,5	10,782	11,46	10,30	96,4
V	>	25	21,43	22,13	20,97	97,6
VI	>	25	21,43	22,06	20,88	97,0
VII	50 ccm Leberextrakt = 65 g Leber	ohne Zusatz		5,45	—	—
VIII	>	50	43,14	48,50	43,05	99,2
IX	>	50	43,14	48,10	42,65	98,4

Für die Zuverlässigkeit der Methode der Gesamtbestimmung sprechen ferner eine große Zahl von Parallelbestimmungen, welche ich mit verschiedenen Portionen des gleichen Blutes vorgenommen habe und die recht befriedigende Übereinstimmung zeigen. In der folgenden Tabelle gebe ich einige Gesamtbestimmungen wieder:

Tabelle II.

Gesamtkreatininbestimmungen im Hundeblood.

Nr.	Material	Gefundenes Gesamtkreatinin in mg
I	100 ccm defibr. Carotisblut vom Hunde	1,968
II	100 > desselben Blutes	1,972
III	100 > defibr. Pfortaderblut	1,602
IV	100 > desselben Blutes	1,542
V	100 > defibr. Carotisblut	2,185
VI	100 > desselben Blutes	2,20

Nachdem ich mich so von der Zuverlässigkeit der Methode überzeugt hatte, wiederholte ich die Versuche über das Verhalten von zugesetztem Kreatin bei der Autolyse von Blut, Leber und Niere. Es wurde dabei mit noch größerer Sorgfalt als bei den früheren Versuchen Bakterienwirkung ausgeschlossen. Herr Prof. O. Neumann am hiesigen hygienischen Institut hatte die große Freundlichkeit, die von uns jeweils angesetzten Proben durch Abimpfen auf Freisein von Bakterien zu prüfen. Wir sprechen ihm auch an dieser Stelle nochmals unseren Dank aus.

In den früheren Versuchen wurde durch gründlichen Toluolzusatz nach der Bereitung der Organextrakte für möglichste Abwesenheit von Bakterien gesorgt. Doch mußten bei unserem Verfahren einer nicht aseptischen Entnahme der Organe, ihrer Zerkleinerung und Verreibung mit Quarzsand bakterielle Verunreinigungen hineingelangen und man erwartete, daß die Sättigung mit Toluol ausreichen würde, um eine Entwicklung der hineingelangten Keime hintanzuhalten. Vor dem Hineingelangen weiterer Keime schützte ein reichlicher Toluolüberschuß, der als deckende Schicht auf der Autolyseprobe stand. Daß in der Tat Bakterienwirkung auf diese Art hintangehalten wurde, dafür sprach die Abwesenheit von Fäulnisgeruch. Ein solcher trat auch in den früheren Versuchen nur sehr selten ein, und solche Versuche wurden verworfen. Dennoch war es nicht ausge-

schlossen, daß in den Autolyseproben bei der Verarbeitung der Organe anaerobe Keime unterhalb der Toluolschicht zur Entwicklung gelangten und Veränderungen des Kreatins vor-täuschten, die nicht von der Autolyse, sondern von dem Lebens-prozeß der Bakterien herrührten. Dieser Einwand scheint aber nur bei den Autolyseversuchen möglich. Die weitgehende Verände-rung des Gesamtkreatinins, die Gottlieb und Stangassinger schon bei einer 2—4 stündigen Durchleitung von Leber und Niere und bei sofortiger Verarbeitung des durchgeleiteten Blutes beobachteten,¹⁾ läßt sich bei der Kürze der Versuchszeit wohl kaum durch Bakterienwirkung erklären. Dennoch hielt ich es nicht für überflüssig, die Autolyseversuche mit einer peinlichen Vermeidung von Bakterienwirkung zu wiederholen. Ich bringe im folgenden ein Beispiel meines Vorgehens in etwas ausführ-licher Darstellung.

Hund von 17 kg, am Abend vorher zuletzt gefüttert, in Morphinum-narkose durch Verbluten getötet. Die vorher rasierte Haut wird vor dem Verbluten mit Alkohol gereinigt, die Carotis mit sterilen Instrumenten bloßgelegt; das Blut fließt aus steriler Kanüle und Glasröhre direkt in sterile Glasgefäße ein, die reichlich mit Toluol und mit Glasperlen be-schickt waren, und wird durch Schütteln defibriniert und mit Toluol ge-sättigt. In gleicher Weise werden Leber und Niere mit sterilen Instru-menten entnommen, sogleich in sterile Gefäße mit steriler physiologischer Kochsalzlösung und Toluolschicht versenkt. Die Apparate zur Zerkleinerung der Organe und die Koliertücher sind gleichfalls vorher sterilisiert.

Zur Bereitung der Organextrakte wurden die Organe durch die Fleischhackmaschine getrieben, aus der der Organbrei in Toluolkochsalzlösung aufgefangen wurde. Sodann wurde der Organbrei mit Quarzsand gründlich verrieben und dieser dünn-flüssige Brei blieb 1—2 Stunden im Eisschrank; darnach wurde er durch Tücher koliert. Die Menge zugesetzter Flüssigkeit betrug im Verhältnis zum Organgewicht 1 : 1.

Die Resultate des Versuches stelle ich in folgenden Ta-bellen zusammen. Alle Proben haben sich als bakterienfrei erwiesen.

¹⁾ Gottlieb u. Stangassinger, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 322.

Tabelle III.

Verhalten von Hundeblut mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 100 ccm Blut mit Toluol versetzt).

Nr.	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
	in mg	in mg Kreatinin aus- gedrückt		Gesamt- kreatinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %
I	125	107,85	sofort unter- sucht	102,00	—	—
II	125	107,85	68 Stunden	100,00	2,00	1,96
III	125	107,85	116 >	76,76	25,24	24,74
IV	125	107,85	140 >	77,42	24,58	24,10
V	125	107,85	17 Tage	76,08	26,92	26,47

Tabelle IV.

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 50 ccm Leberextrakt, entsprechend 66 g Leber vom Hund).

Nr.	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
	in mg	in mg Kreatinin aus- gedrückt		Gesamt- kreatinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %
I	62,5	53,925	sofort unter- sucht	57,9	—	—
II	62,5	53,925	n. 68 Stunden	47,8	10,1	17,44
III	62,5	53,925	116 >	36,16	21,74	37,63
IV	62,5	53,925	140 >	47,92	9,98	17,23

Tabelle V.

Verhalten von Nierenextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 40 ccm Extrakt, entsprechend 21 g Niere vom Hund).

Nr.	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
	in mg	in mg Kreatinin aus- gedrückt		Gesamt- kreatinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %
I	62,5	53,925	sofort unter- sucht	56,6	—	—
II	62,5	53,925	68 Stunden	50,0	6,6	11,6
III	62,5	53,925	116 >	43,2	13,4	23,7

Die bakteriologische Untersuchung der einzelnen Proben hat nun ergeben, daß selbst bei einem so sorgfältigem Vorgehen eine Infektion des Versuchsmaterials bei der Entnahme und Verarbeitung der Organe nicht immer zu vermeiden war. Bei einzelnen Proben — sie bildeten aber nur die Ausnahmen — wuchsen einige wenige Kolonien, dieselben waren aber immer nur am ersten Tage nachweisbar und nach 2—3tägiger oder längerer Einwirkung des Toluols waren die Proben bis auf 2 Ausnahmen immer steril. Diese beiden Ausnahmefälle verrieten sich bei längerem Stehen auch deutlich durch Fäulnisgeruch; sie wurden nicht verarbeitet.

In den folgenden Tabellen stelle ich einige weitere mit bakteriologischer Kontrolle vorgenommene Autolyseproben zusammen. Dieselben zeigen in Bestätigung mit den von Gottlieb und Stangassinger gefundenen Ergebnissen stets eine Abnahme des Gesamtkreatinins, d. h. Zerstörung resp. Umwandlung des Kreatins in andere Substanzen. In einzelnen Fällen zeigt sich bei längerer Dauer der Autolyse wieder ein Wachsen des Gesamtwertes. Von besonderer Bedeutung scheint es zu sein, daß im Pfortaderblut schon nach 2tägiger Autolyse sich eine beträchtliche Zunahme des Gesamtkreatinins nachweisen läßt. Wir schließen daraus, wie auch Stangassinger, auf das Vorhandensein von Vorstufen im Darmblut.

Tabelle VI.

Verhalten von Hundeblood mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 50 ccm Hundeblood mit Toluol versetzt).

Nr.	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
	in mg	in mg Kreatinin aus- gedrückt		Gesamt- kreatinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %
I	50	43,14	sofort unter- sucht	40,04	—	—
II	50	43,14	n. 90 Stunden	28,92	11,12	27,77
III	50	43,14	> 160 >	32,78	7,26	18,13

Tabelle VII.

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 50 ccm Extrakt, entsprechend 60 g Leber vom Hund).

Nr.	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
	in mg	in mg Kreatinin aus- gedrückt		Gesamt- Kreatinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %
I	50	43,14	sofort unter- sucht	48,80	—	—
II	50	43,14	64 Stunden	37,50*	11,30	23,15
III	50	43,14	88 >	31,16	17,64	36,15
IV	50	43,14	160 >	36,04	12,76	26,14

Tabelle VIII.

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 50 ccm Extrakt = 33 g Leber vom Hund).

Nr.	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
	in mg	in mg Kreatinin aus- gedrückt		Gesamt- Kreatinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %
I	50	43,14	sofort unter- sucht	40,70	—	—
II	50	43,14	n. 90 Stunden	19,70	20,94	51,45
III	50	43,14	> 184 >	29,28	11,42	28,06

Tabelle IX.

Verhalten von Pfortaderblut bei 37°.

Nr.	Material	Dauer des Versuches	Gefundenes Gesamt- kreatinin in mg	Zunahme des Gesamtwertes	
				in mg	in %
I	100 ccm defibr. Pfortaderblut	sofort unter- sucht	0,890	—	—
II	>	2 Tage	1,584	0,694	77,97

Die von Mellanby behauptete Unveränderlichkeit des Kreatins bei der Autolyse dürfte durch diese bakteriologisch kontrollierten Versuche zurückgewiesen sein. Was nun die Entstehung von Kreatinin aus Kreatin anlangt, die Gottlieb und Stangassinger neben weitgehender Zerstörung des Kreatins beobachtet hatten, so macht Mellanby mit Recht den Einwand, daß auch bei der Verarbeitung der Proben schon Kreatinin entstehen kann. Gottlieb und Stangassinger dampften die Filtrate der Essigsäure-Kochsalzkoagulation unter Zusatz von Baryumcarbonat auf siedendem Wasserbad ein, während Mellanby durch Alkohol koaguliert und das Filtrat bei einer 37° nicht übersteigenden Temperatur eindampft, nochmals mit 75%igem Alkohol extrahiert und wieder abdampft. Es muß von vornherein zugegeben werden, daß der allerdings umständlicheren Methode von Mellanby der Vorzug gebührt. Bei einer Substanz, die schon durch Erhitzen ihrer neutralen wässerigen Lösung in ihr Anhydrid übergeführt wird, läuft man immer Gefahr, auch durch eine kurzdauernde Hitze-koagulation mit nachfolgendem Eindampfen bei höherer Temperatur eine Umwandlung herbeizuführen, welche die Veränderung bei der Autolyse vortäuscht. In der Tat habe ich bei methodischen Versuchen gefunden, daß der Kreatininwert bei Anwendung der Hitze-koagulation um 4—5% zu hoch ausfallen kann. Jedenfalls ist die Kreatininbestimmung nach dem Verfahren von Gottlieb und Stangassinger schwer zu beherrschen. Die von Mellanby angegebene Methode ergab auch mir korrekte Werte.

Tabelle X.

Kreatininbestimmungen im Rinderblut mit Zusatz von Kreatin und Kreatinin.

Nr.	Menge des defibr. Rinderblutes in ccm	Kreatinzusatz		Kreatinin-zusatz in mg	Gefundenes Kreatinin in mg	Gefundenes Gesamtkreatinin in mg	Wiedergefundenes Kreatinin	
		in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt				in mg	in %
I	100	—	—	—	—	1,16	—	—
II	100	50	43,14	—	Spuren	44,26	43,10	99,8
III	100	50	43,14	—	>	44,14	42,98	99,6
IV	50	—	—	10	9,95	—	9,95	99,5
V	50	—	—	10	10,03	—	10,03	100,0

Der von Mellanby angegebenen Methode der Alkoholkoagulation gebührt somit für die Kreatininbestimmung der Vorzug, während für die Bestimmung des Gesamtkreatinins das schnellere Verfahren der Hitzekoagulation nach Gottlieb und Stangassinger ausreichend ist. Ich benutzte deshalb Mellanbys Methode, um die Resultate von Gottlieb und Stangassinger über die Entstehung von Kreatinin aus Kreatin bei der Autolyse der Organe mit Kreatinzusatz nochmals nachzuprüfen.

Ich gebe einen solchen Versuch wieder.

Tabelle XI.

Verhalten von Nierenextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(mit je 40 ccm entsprechend 30 g Niere vom Hund).

Probe	Kreatinzusatz		Dauer des Ver- suches	Gefundenes Kreatinin					
	in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt		Krea- tinin als sol- ches	Kreatinin- vermehrung		Ge- samt- krea- tinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %		in mg	in %
I.	100	86,28	sofort untersucht	2,512	—	—	87,56	—	—
II.	100	86,28	48 Std.	7,168	4,656	5,39	71,36	16,20	18,5
III.	100	86,28	48 >	6,922	4,41	5,23	69,22	18,32	20,9

Auch bei Anwendung der Methode Mellanbys tritt also Kreatinin in nachweisbarer Menge bei der Autolyse auf. Danach wird man wohl auch die Resultate der früheren Versuche im wesentlichen für richtig halten müssen, nur ist es möglich, daß sowohl die Menge des präformierten Kreatinins als die Werte des bei der Autolyse neu entstandenen Kreatinins um einige Prozente zu hoch erscheinen.

Worauf es beruht, daß die Versuche Mellanbys sowohl in bezug auf die fermentative Zerstörung des Kreatins bei der Autolyse, wie auch in bezug auf Kreatininbildung negativ ausgefallen sind, entzieht sich unserer Beurteilung. Ich hielt es jedenfalls nicht für überflüssig, einige Versuche möglichst unter Einhaltung der von Mellanby mitgeteilten Bedingungen anzustellen.

Tabelle XII.

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(mit je 20 ccm entsprechend 12 g Leber einer Katze).

Probe	Kreatinzusatz		Dauer des Ver- suches	Gefundenes Kreatinin					
	in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt		Krea- tinin als sol- ches	Kreatinin- vermehrung		Gesamt- krea- tinin in mg	Abnahme des Gesamtwertes	
					in mg	in %		in mg	in %
I.	nichts zuge- fügt		sofort untersucht	Spuren	—	—	Spuren	—	—
II.	50	43,14	48 Std.	1,356	1,356	3,14	24,92	18,22	42,23
III.	50	43,14	48 >	1,472	1,472	3,41	23,82	19,31	44,76

Tabelle XIII.

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 30 ccm Extrakt entsprechend 16 g Leber einer Katze).

Nr.	Kreatinzusatz		Physio- logische Kochsalz- lösung in ccm	Leber- ex- trakt in ccm	Dauer des Ver- suches	Gesamt- kreatinin- bestim- mung	Abnahme des Gesamt- wertes	
	in mg	in mg Kreatinin ausge- drückt					in mg	in %
II.	50	43,15	25	30	Tage	35,21	6,33	15,1
III.	50	43,15	25	30		33,75	7,79	18,3

Tabelle XIV.

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°
(je 30 ccm Extrakt entsprechend 17 g Leber einer Katze).

Nr.	Kreatinzusatz		Physio- logische Kochsalz- lösung in ccm	Leber- ex- trakt in ccm	Dauer des Ver- suches	Gesamt- kreatinin- bestim- mung	Abnahme des Gesamt- wertes	
	in mg	in mg Kreatinin ausge- drückt					in mg	in %
II.	50	43,15	25	30	Tage	35,20	7,34	17,2
III.	50	43,15	25	30		35,84	6,70	15,7

Während ich mit diesen Untersuchungen beschäftigt war, erhielten wir Kenntnis von der Dissertation von Van Hoogenhuyze, Utrecht 1908, in der die Autolyseversuche von Gottlieb und Stangassinger gleichfalls einer Nachprüfung unterzogen worden sind. Auch dieser Autor konnte bei der Autolyse von Organen Zerstörung von Kreatin und Zunahme des Kreatinins nachweisen.
