

Über die Entstehung des Kreatins im Tierkörper.

Von

K. Inouye.

(Aus dem physiologischen und dem pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. August 1912.)

Über die physiologische Bedeutung des Kreatins resp. Kreatinins wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Seiten gearbeitet. Namentlich ist nach den Versuchen von R. Gottlieb und Stangassinger anzunehmen, daß der Kreatinstoffwechsel ein außerordentlich komplizierter Vorgang ist, wobei der Auf- und Abbau sowie die Umwandlung der einen Substanz in die andere in ausgiebiger Weise nebeneinander vor sich gehen, und daß das Kreatin eine ungleich größere Rolle im Eiweißstoffwechsel spielt, als man früher angenommen hat. Man kann deshalb aus dem Kreatininwerte im Harn weder einen direkten Aufschluß über den Umfang des Kreatinstoffwechsels noch des Eiweißzerfalls erhalten.

Indessen liegen nur wenige Arbeiten vor, die eine Aufklärung der Vorgänge bei der Entstehung des Kreatins zum Ziele haben.

W. Czernicki¹⁾ fand bei einem mit Glykocyamin gefütterten Kaninchen eine Vermehrung der Kreatinausscheidung im Harn.

Zum gleichen Resultate gelangten M. Jaffé²⁾ und G. Dorner³⁾ bei den größeren Versuchsreihen gleicher Anordnung; sie haben dabei die Auffassung vertreten, daß bei der Kreatinbildung im Organismus die Methylierung des Guanidinrestes eine Rolle spielt.

Dagegen hat sich E. Mellanby⁴⁾ auf Grund eigener Untersuchungen gegen diese Auffassung ausgesprochen.

Wenn man in Betracht zieht, daß das Auftreten des Guanidins im intermediären Stoffwechsel höchst wahrscheinlich ist,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 44, S. 294, 1905.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 403.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 223.

⁴⁾ Journal of physiology, Bd. 36, S. 447.

und daß den Methylierungsvorgängen im tierischen Stoffwechsel eine wichtige Rolle zukommen dürfte, wie dies neuerdings auch M. Schenck¹⁾ hervorhebt, so erscheint die Annahme von Jaffé wohl wahrscheinlich. Doch reichen die Guanidin- und Methylguanidinversuche von Jaffé und seinem Schüler²⁾ und E. Pommerenig³⁾ nicht aus, diesen Vorgang der Bildung von Kreatin zu beweisen.

Im allgemeinen können für die Entstehung des Guanidins im Organismus zwei Möglichkeiten in Betracht kommen: seine Bildung

1. über Arginin aus den einfachen Eiweißkörpern,
2. über Guanin aus den Nucleinsäuren.

Außerdem nehmen F. Kutscher und J. Otori⁴⁾ einen dritten Guanidinkern im Eiweißmolekül an, an den auch Jaffé für die Entstehung des Kreatins zu denken geneigt war.

Unter den oben genannten Entstehungsweisen des Guanidins scheint jedoch die erste am wahrscheinlichsten zu sein, wie jüngst auch A. Kiesel⁵⁾ erörtert hat.

Sonach liegt die schon wiederholt ausgesprochene Vermutung nahe, daß das Kreatin aus dem im Eiweißmolekül verbreitetsten Guanidinderivate, dem Arginin, unter Methylierung gebildet wird. Wenn auch Arginin im Tierkörper der ausgiebigen Wirkung der Arginase unterliegt, kann es gleichzeitig noch einen zweiten nach anderer Richtung gehenden Abbau erleiden.

Angesichts dieser Vermutung haben M. Jaffé⁶⁾ und van Hoogenhuyze und H. Verploegh⁷⁾ den Tieren Arginin oder argininreiche Nahrung gegeben, haben aber negative Ergebnisse erhalten.

Es erschien daher wünschenswert, die Frage einer erneuten Untersuchung zu unterwerfen. Zu diesem Zwecke habe

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 328.

²⁾ l. c.

³⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. 1, S. 561.

⁴⁾ Zentralbl. f. Physiol., 1904, S. 248; Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 107; vgl. auch J. Seemann, Zeitschr. f. Biol., Bd. 69, S. 333.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 169.

⁶⁾ l. c.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 415.

ich in der vorliegenden Arbeit einerseits Versuche über Leberautolyse mit und ohne Argininzusatz angestellt, andererseits das überlebende Organ mit einer Arginin enthaltenden Flüssigkeit durchleitet und geprüft, ob dabei Kreatin auf Kosten des zugesetzten Arginins gebildet wird.

Experimentelles.

Das zu den Versuchen angewandte Arginin stellte ich aus Edestin dar. Als das Versuchsorgan kam die Leber von Katzen zur Anwendung, die immer 3 Tage vor der Verblutung gehungert hatten, um den normalen Gehalt des Organs an Kreatin möglichst in allen Versuchen gleich zu halten.

Bestimmt wurde stets die Summe des Kreatins nach dem von R. Gottlieb und R. Stangassinger¹⁾ mitgeteilten Verfahren, nur bediente ich mich des neuen Kolorimeters von Autenrieth-Koenigsberger. Die Anwendbarkeit des Apparates habe ich durch eine besondere Versuchsreihe geprüft.

Autolyseversuche.

Für das erste Stadium der Autolyse haben Gottlieb und Stangassinger¹⁾ die Neubildung von Kreatin aus einer unbekanntem Muttersubstanz konstatiert. An diesen Befund anschließend habe ich zuerst Autolyseversuche ausgeführt, wobei ich prüfte, ob sich die normale Zunahme des Kreatins durch den Zusatz von Arginin verstärken läßt.

Die Versuchsordnung war die gleiche wie bei den genannten Autoren. Das Leberextrakt, welches ich sogleich nach dem Verbluten und einmaliger Kochsalzdurchspülung des Tieres aus dem herausgenommenen Organ durch Verreiben mit Quarzsand und Zentrifugieren herstellte, wurde in zwei gleiche Portionen geteilt. Zu einer Portion wurde das Arginincarbonat, in einer kleinen Menge physiologischer Kochsalzlösung gelöst, zugesetzt und gut umgeschüttelt, während der anderen Portion die gleiche Menge reiner Kochsalzlösung hinzugefügt wurde. Von jeder Portion wurden mehrere Proben von gleichem Volumen abgemessen und unter Zusatz von Toluol in den Brut-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 1.

schränk gestellt. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit wurde je eine Probe von den beiden Portionen herausgeholt und sofort auf den Gehalt an Gesamtkreatinin untersucht. Die Kontrollversuche stellte ich durch die sofortige Untersuchung des Extraktes mit oder ohne Zusatz an.

Die Ergebnisse sind in Form einer Tabelle wiedergegeben.

Tabelle I.

Nummer des Versuchs	Jede Probe entspricht Leber-substanz von g	Zu-gesetztes Arginin-carbonat in g	Dauer der Autolyse in Std.	Ge-fundenes Gesamt-kreatinin in mg	
I	a	20	} sofort ver- arbeitet	4,61	} Kontrollversuche
	b	20		0	
	c	20	20	5,90	} Autolyseversuche mit Zusatz
	d	20	20	5,85	
	e	20	20	5,31	} Autolyseversuche ohne Zusatz
	f	20	20	4,37	
II	a	13,3	sofort ver- arbeitet	4,1	Kontrollversuch
	b	13,3	20	6,9	} Autolyseversuche mit Zusatz
	c	13,3	20	7,2	
	d	13,3	20	5,8	} Autolyseversuche ohne Zusatz
	e	13,3	20	5,9	
III	a	17,9	} sofort ver- arbeitet	3,8	} Kontrollversuche
	b	17,9		0	
	c	17,9	23	4,5	Autolyseversuch mit Zusatz
	d	17,9	23	2,6	Autolyseversuch ohne Zusatz

Bei Betrachtung der Tabelle ergibt sich, daß die unter Zusatz von Arginin autolysierten Portionen in allen drei Versuchen ausnahmslos einen größeren Wert zeigen als die ohne Arginin. Dieses Verhalten tritt am auffallendsten im Versuch III zum Vorschein; während die Probe d sich schon im abnehmenden Stadium befindet, enthält die Probe c noch immer mehr Kreatinin wie die frischen sofort verarbeiteten Proben.

Man könnte vielleicht angesichts der verhältnismäßig geringen Zunahme des Kreatins und mit Rücksicht auf die auch

in den Kontrollversuchen vorkommenden Schwankungen einwenden, daß der Mehrgehalt in den Argininproben von Zufälligkeiten herrühren könnte.

Aber die Versuche sind in beachtenswerter Weise jedesmal nach derselben Richtung ausgefallen. Die Unterschiede sind zu groß und zu deutlich, als daß man sie als Versuchsfehler betrachten könnte. Außerdem erklärt sich die relativ geringe Größe der Zunahme von Kreatin nach dem Zusatz daraus, daß neben den Vorgängen, die zu seiner Entstehung führen, bei der Autolyse auch Vorgänge der Zerstörung vor sich gehen. Auf diesen Umstand werde ich später wieder zurückkommen.

Man ist daher wohl berechtigt, die Ergebnisse so zusammenzufassen, daß das zugesetzte Arginin bei der Autolyse des Leberextraktes zum Teil in Kreatin umgewandelt wird.

Durchleitungsversuche.

Um die Ergebnisse der Autolyseversuche zu ergänzen, habe ich Durchleitungsversuche an der isolierten Leber angestellt. Die Versuche hatten zum Ziele, zu untersuchen, in welchem Ausmaß die überlebende Leber unter den Versuchsbedingungen der Durchleitung das zugesetzte Arginin in Kreatin umzuwandeln vermag.

Zum Vergleiche mit den nach der Durchleitung erhaltenen Werten muß man einen zuverlässigen Wert für das in der Leber präformierte Gesamtkreatinin zugrunde legen können. Daher habe ich zunächst mehrere Gesamtkreatininbestimmungen an der Leber von Katzen, die 3 Tage lang gehungert hatten, ausgeführt. Die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle II.

Versuchsnummer	Gewicht der Leber in g	Gefundenes Gesamtkreatinin in mg	Berechnete Menge Gesamtkreatinin pro 100 g Lebersubstanz in mg
1	59	18,5	31,36
2	72	16,8	23,33
3	60	19,1	31,83
4	53	14,6	27,63
im Durchschnitt			28,54

Die Methodik der Durchleitung war im wesentlichen die von M. Kasztan¹⁾ angewandte.

Gleich nach dem Verbluten und Durchspülen mit Ringerscher Lösung von der Carotis aus wurde die Leber unter den bekannten Kautelen herauspräpariert, in den Apparat gebracht und von der Vena portae aus zuerst mit reiner Ringerscher Lösung eine kurze Zeit lang durchleitet. Wenngleich der eigentliche Versuch immer erst begonnen wurde, nachdem ich mich durch eine kurze Probedurchleitung von der Dichtigkeit des Organs überzeugt hatte, fingen die Gefäße doch nach 1 1/2—2 Stunden stets an durchlässig zu werden. Darin liegt ein großer Nachteil der Anwendung von Ringerscher Lösung zur Durchleitung. Um dadurch bedingte Verluste zu vermeiden, wurde die zu durchleitende Leber auf eine kleine Schale gelegt und die herausgesickerte Flüssigkeit mittels einer Pipette abgesaugt und wieder in das Reservoir zurückgegossen.

Als Durchleitungsflüssigkeit wandte ich mit Sauerstoff gesättigte Ringersche Lösung an, um möglichst einfache Bedingungen der Analyse zu erhalten. Ich war bei Anwendung der Ringer-Lösung von dem verschiedenen Kreatingehalt des Blutes und seinen Veränderungen unabhängig. Hingegen bin ich mir wohl bewußt, daß die Durchleitung mit Blut weit günstigere Bedingungen für das Fortbestehen der vitalen chemischen Vorgänge in der überlebenden Leber dargeboten hätte.

Die Menge der zur Durchleitung angewandten Lösung betrug jedesmal 1 Liter. Ich ließ dieselbe Flüssigkeit wiederholt durch die Leber strömen. Ich durchleitete aus zwei Reservoiren; durch eine einfache Hahndrehung wird das erste Reservoir vor seinem Leerlaufen ausgeschaltet und das andere zur Durchleitung verwendet. Die Temperatur der Leber und der Durchleitungsflüssigkeit war konstant, nämlich 37° resp. 39°. Der Durchleitungsdruck betrug 20—25 mm.

Nach der Durchleitung wurden die Leber und die Flüssigkeit getrennt bearbeitet.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Für die Diskussion der Versuchsergebnisse muß daran erinnert werden, daß ich nicht Blut, sondern Ringersche Lösung zur Durchleitung verwandte. Während sich in den Durchleitungsversuchen von Gottlieb und Stangassinger bei Verwendung von Blut als Durchleitungsflüssigkeit nebeneinander Kreatin-

¹⁾ Archiv f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 63, S. 405.

Tabelle III.

Num- mer des Ver- suchs	Ge- wicht der Leber in g	Zuge- setztes Arginin in Form des Car- bonats in g	Dauer der Durch- leitung in Std.	Gefundenes Gesamtkreatinin		Differenz zwisch. dem Kreatininwert des an- gewandten Leberge- wichts vor der Durch- leitung u. der nach der Durchleitung vorhan- denen Gesamtmenge		
				aus Leber in mg	aus Durch- leitungs- flüssig- keit in mg	in mg	in %	
1	75	1,0	3 1/2	25,33	29,64	+ 33,56	+ 156,0	Haupt- ver- suche
2	49	1,0	3 1/2	7,00	13,30	+ 7,0	+ 52,6	
3	55	1,0	3	6,40	22,80	+ 13,5	+ 86,0	
4	80	1,5	3 1/2	6,86	21,05	+ 5,0	+ 18,2	
5	60	0	3 1/2	6,26	7,11	- 3,7	- 2,14	Kontroll- ver- suche
6	53	0	3 1/2	0,70	1,20	- 13,93	- 92,1	
7	114	0	3	19,17	25,55	+ 12,18	+ 37,4	

bildung aus unbekanntem Vorstufen und Kreatinzerstörung nachweisen ließ, habe ich die Versuchsbedingungen so gewählt, daß, abgesehen von dem Argininzusatz, keinerlei Vorstufen in der Durchleitungsflüssigkeit in Betracht kommen konnten. Allerdings konnten solche Muttersubstanzen des Kreatins auch in der Leber enthalten sein. Die andere Quelle der Vorstufen, die Gottlieb und Stangassinger besonders in dem Blute gefütterter Tiere nachweisen konnten, habe ich durch die Verwendung der Ringerschen Lösung bei meinen Versuchen ausgeschaltet. Demgemäß hatte ich erwartet, daß ohne den Zusatz von Arginin als Vorstufe die Kreatinzerstörung immer über die Bildung vorwiegen und stets eine Abnahme des Gesamtkreatinins bei der Durchleitung mit reiner Ringerscher Lösung ergeben würde. Dies trifft auch für zwei meiner drei Kontrollversuche ohne Zusatz zu (Versuch V und VI): in der Ringerschen Lösung und in der Leber zusammengenommen findet sich in diesen beiden Fällen weniger Kreatin und Kreatinin, als dem Durchschnittswerte für das angewandte Gewicht der Hungerleber entsprechen würde. Ein dritter Versuch (Nr. VII) fällt aber aus der Reihe. Bei diesem Versuche war aber die Leber eine pathologische: sie hatte zahlreiche korngroße Cysten in sich und war infolgedessen stark hypertrophisch, wie schon

ihr außergewöhnlich hohes Gewicht anzeigt. Bekanntlich können nun pathologische Ergüsse manchmal Kreatin in nicht unbedeutender Menge enthalten. Wäre dies gerade bei diesem Versuche der Fall gewesen, was in einer Bildungsstätte des Kreatins durchaus im Bereiche der Möglichkeit liegt, so wäre die gefundene Zunahme an Gesamtkreatinin nur eine scheinbare und durch die Mitbestimmung dieses von den Cysten her stammenden Kreatinins vorgetäuscht. Sieht man auch von dieser Möglichkeit ab, so läßt sich der unerwartete Ausfall dieses Versuches auch dadurch erklären, daß eine so große hypertrophische Leber auch nach dreitägigem Hunger noch Vorstufen enthalten kann, aus denen bei der Durchleitung mit reiner Ringer-Lösung Kreatin abgegeben werden konnte.

Im Gegensatz zu den Kontrollversuchen ergaben die Versuche mit Argininzusatz ausnahmslos eine Zunahme des Gehalts an Kreatin und Kreatinin, die wenigstens in den Versuchen I und II beträchtlich ist gegenüber dem Gehalte des ganzen Systems an präformiertem Kreatin und Kreatinin in der Leber. In Versuch IV ist die Zunahme allerdings nicht so beträchtlich, daß sie nicht auch aus präformierten Muttersubstanzen in der betreffenden Leber erklärt werden könnte. Aus den Versuchen I, II und III scheint aber hervorzugehen, daß das Kreatin resp. Kreatinin während der Durchleitung aus dem zugesetzten Arginin gebildet wird.

Daß die Kreatinbildung aus Arginin, die wir aus unseren — leider wenig zahlreichen — Versuchen zu folgern geneigt sind, nicht in noch größerem Umfange nachweisbar ist, kann zweierlei Ursachen haben.

Zunächst ist der Vorgang des Kreatinstoffwechsels ein recht komplizierter. Durch das Ineinandergreifen der aufbauenden und zerstörenden Prozesse gestaltet sich die Kurve für den Kreatingehalt des überlebenden Organs sehr verwickelt, besonders in solchen Fällen, in denen das Organ von vornherein reich an Muttersubstanzen des Kreatins ist. Neben der Neubildung erfolgt sicher auch ausgiebige Zerstörung. Der Ausfall der Versuche hängt sonach im wesentlichen von der Dauer der Durchleitung ab. Den Maximalwert der Bildung könnte man

nur feststellen, wenn es möglich wäre, das Organ im günstigsten Zeitpunkt zu untersuchen. Trifft man einen niedriger liegenden Punkt der Kurve, so kann man möglicherweise ein entgegengesetztes Resultat erhalten, obwohl in Wirklichkeit vorher ein beträchtlicher Zuwachs stattgefunden hatte.

Weiterhin ist aber die Leber auch der Sitz einer intensiven Arginasewirkung, durch die die zugesetzte Muttersubstanz in anderer Richtung zerstört wird. Ein ansehnlicher Anteil des zugesetzten Arginins muß in Ornithin und Harnstoff gespalten werden.¹⁾ Dafür spricht der Befund bei den — leider infolge verschiedener Hindernisse gescheiterten — Versuchen, das gebildete Kreatinin als solches aus dem Rest der zur kolorimetrischen Untersuchung verwandten Lösung darzustellen; die Menge des Pikratniederschlags, in dem unzersetzt gebliebenes Arginin enthalten sein sollte, war immer sehr gering, während die Ornithinfraktion dagegen reichlich erhalten wurde.

In der Arginasewirkung der Leber ist wohl eine zweite Ursache zu suchen, warum man einen großen Zuwachs an Kreatin aus zugesetztem Arginin nicht erwarten können.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen lassen mit Berücksichtigung dieser Überlegungen den Schluß zu, daß sich ein Teil des Kreatins im Tierkörper unter Methylierung aus Arginin bildet, wenngleich diese Art der Umwandlung des Arginins nicht allzu umfangreich ist.

¹⁾ Vgl. W. H. Thompson, Journal of physiol., Bd. 32, S. 137; Bd. 33, S. 106.