

Theoretisches und Experimentelles zur Frage der Kreatinbildung im tierischen Organismus.

Versuche über Kreatinbildung aus Betain und Cholin.

Von

Otto Riesser.

Aus dem Institut f. mediz. Chemie und experimentelle Pharmakologie zu Königsberg. Pr.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. Juni 1913.)

Es ist der Frage nach der Bedeutung des Kreatins und des Kreatinins für den tierischen Organismus ergangen, wie so manchem anderen wichtigen Problem der Biologie: je näher wir mit der Häufung des experimentellen Materials und der Verbesserung der Methodik des Rätsels Lösung zu kommen schienen, um so ferner rückte das Ziel, bis schließlich, statt des einen Problems eine Vielheit voneinander fast ganz unabhängiger Fragen uns gegenüberstand. Erst in den letzten Jahren haben die neuen Ideen und exakten Experimente einiger Forscher dem alten Problem neue Richtung und neue Grundlagen gegeben. Es wird daher nicht überflüssig sein, auf Grund des so gewonnenen Standpunkts eine Sichtung des reichhaltigen Materials vorzunehmen.

Als in der Mitte des vorigen Jahrhunderts Liebig das Kreatin als einen regelmäßigen Bestandteil des Muskels entdeckte und fast gleichzeitig das regelmäßige Vorkommen von Kreatinin im Harn sichergestellt hatte, schien das Problem relativ einfach zu liegen. Der leichte Übergang von Kreatin in Kreatinin, besonders bei saurer Reaktion, war bekannt. Nichts lag also näher, als anzunehmen, daß das Kreatin im Muskel gebildet oder abgelagert werde und nach Umwandlung in Kreatinin, sei es im Muskel selbst oder in einem anderen Organ, zur Ausscheidung kommt. Liebig's berühmter Versuch am gehetzten Fuchs, dessen Muskeln die zehnfache Menge

an Kreatin enthielten, wie diejenigen zahmer Tiere, wies der Forschung den Weg. Sarokin, Szelkow, Monari bestätigten Liebig's Ergebnisse in Versuchen an durch Arbeit ermüdeten oder tetanisierten Muskeln. Indessen diese Befunde blieben nicht unwidersprochen. Vor allem hat Voit¹⁾ auf Grund seiner eingehenden Versuche jede Vermehrung des Kreatins im Muskel nach Arbeit oder Tetanisierung entschieden in Abrede gestellt und Nawrocki²⁾ kam zu ganz ähnlichen Resultaten. Dieselben widerspruchsvollen Ergebnisse finden wir bei der Durchsicht der Arbeiten über die Abhängigkeit der Kreatininausscheidung von der Tätigkeit der Muskeln. Während Voit,³⁾ Hofmann,⁴⁾ sowie Oddi und Tarulli⁵⁾ eine Vermehrung der Kreatininausscheidung unter jenen Bedingungen entschieden in Abrede stellen, geht aus den Zahlen von Grocco,⁶⁾ Moitessier,⁷⁾ und von Gregor⁸⁾ das Gegenteil hervor. Beachtenswert erscheint die von Gregor gegebene Kritik der von Voit und Hofmann erzielten Ergebnisse. Gregor weist nämlich darauf hin, daß unter der zweifellos berechtigten Annahme einer allmählichen Ausscheidung neugebildeten Kreatins auch die Zahlen jener Autoren eine deutliche Vermehrung der Kreatininausscheidung nach Muskelarbeit erkennen lassen. Man hat später diese Diskrepanz der Versuchsergebnisse auf die Mängel der damaligen Methodik zurückgeführt. In der Tat bietet die Neubauersche Methode der Ausfällung des Kreatinins als Chlorzinkdoppelsalz nicht die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung; daß sie bei sorgfältiger Arbeit indessen für vergleichende Untersuchungen nicht wertlos ist, läßt sich nicht ernstlich bestreiten. Dennoch hat die Unvollkommenheit der Methodik die Kreatinforschung stark gehemmt. Als daher

¹⁾ Zeitschr. f. Biol., Bd. 4, S. 77 (1868).

²⁾ Centralbl. f. die mediz. Wissensch., 1866. S. 625.

³⁾ l. c.

⁴⁾ Virchows Archiv, Bd. 48, S. 358 (1869).

⁵⁾ Boll. dell'Acad. Med. di Roma, Bd. 19 (1893).

⁶⁾ Ann. di chim. e di farm., Bd. 4, S. 211 (1886).

⁷⁾ Compt. rend. Soc. biol., Bd. 43, S. 573 (1891).

⁸⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 31, S. 98 (1900).

im Jahre 1904 Folin¹⁾ seine neue, exakte und äußerst bequeme kolorimetrische Methode für die Bestimmung des Kreatinins bekannt machte, ging man mit erneuter Hoffnung an die Bearbeitung der alten Fragen. Folin's Methode beruht bekanntlich auf der von Jaffe angegebenen Reaktion des Kreatinins mit Pikrinsäure und Natronlauge. Die Intensität der hierbei auftretenden Rotfärbung, bedingt durch Reduktion der Pikrinsäure zu Pikraminsäure, ist proportional der Menge der vorhandenen Kreatininmenge und kann in geeigneter Weise leicht zu kolorimetrischem Vergleich benutzt werden. Die Einfachheit der Methode hat oft vergessen lassen, daß sie infolge der großen Empfindlichkeit der Reaktion auch mit zahlreichen Fehlerquellen belastet ist, die man kennen muß, um sie zu vermeiden. Die in der ersten Freude über das schöne neue Rüstzeug der Forschung angestellten Experimente lassen mitunter die nötige Vorsicht in der Beurteilung der Ergebnisse vermissen. Man erkennt bei Durchsicht der neueren Arbeiten deutlich das erfolgreiche Bestreben, die Methode so sicher als möglich zu gestalten. Es ist dennoch auch heute noch nicht überflüssig, immer wieder auf die Fehlerquellen und auf die Mittel zu ihrer Vermeidung hinzuweisen. Ich werde im praktischen Teil dieser Arbeit hierauf zurückkommen.

Das Problem des Zusammenhanges zwischen Muskelarbeit und Kreatinbildung bzw. Kreatininausscheidung beherrscht zunächst auch die neueren Arbeiten. Hinter den zahlreichen Untersuchungen über das Harnkreatinin sind die Arbeiten über das Verhalten des Muskelkreatins merkwürdigerweise stark zurückgeblieben. Erst im Jahre 1908 hat S. Weber²⁾ mit der neuen Folin'schen Methode Muskelversuche angestellt. Er wies nach, daß überlebende Herzen von Katzen und Hunden bei der Durchströmung im Langendorfschen Apparat Kreatin an die Durchströmungsflüssigkeit abgeben, und zwar nur bei kräftiger Aktion. Schwach oder gar nicht pulsierende Herzen gaben wenig oder gar kein Kreatin ab. Auch Howell und

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 223 (1904).

²⁾ Archiv f. experim. Path. u. Pharm., Bd. 58, S. 93 (1908).

Duke¹⁾ haben die Anwesenheit von Kreatin in der Durchströmungsflüssigkeit überlebender Herzen beobachtet. Der von S. Weber erbrachte Nachweis, daß die durch Ischiadicusdurchschneidung gelähmten Muskeln von Hunden weniger Kreatin enthalten als die ungelähmten gleichnamigen Muskeln desselben Tieres, unterstützt die Annahme einer Kreatinbildung bei Muskel-tätigkeit. Indessen hat Weber selbst, ebenso wie später Pekelharing und van Hoogenhuyze,²⁾ die am Kaninchenmuskel zu ganz analogen Resultaten kamen, diesen Versuchen keinen großen Wert eingeräumt, da die stets nach Nervendurchschneidung eintretende Degeneration des Säugetiermuskels eine in ihrer Wirkung auf den Kreatingehalt nicht bekannte Komplikation bedeutet. Bei einem Hunde, der nach schweren Cinchoninkrämpfen eingegangen war, fand Weber eine Abnahme des Muskelkreatins; auch dieser Versuch ist, wegen der Schwere der Vergiftung, vielleicht nicht ohne weiteres brauchbar. Direkter hat Mellanby³⁾ in seiner reichhaltigen Arbeit die Frage zu lösen gesucht, indem er den Kreatingehalt überlebender Froschmuskeln vor und nach der Tetanisierung untersuchte; eine Vermehrung des Kreatins konnte er dabei nicht feststellen. Indessen sind, worauf Cathcart und Graham-Brown⁴⁾ aufmerksam machen, Mellanbys Zahlen für den Kreatingehalt der tetanisierten Muskeln regelmäßig, wenn auch nur wenig, höher als diejenigen für das Kreatin der nicht tetanisierten. Die genannten beiden Autoren fanden in eigenen Experimenten etwas deutlichere Zunahmen. Wurde indessen der Muskel *in situ* gereizt, also bei erhaltener Zirkulation, so sank der Kreatingehalt. Dasselbe Resultat erhielten die Verfasser bei der Tetanisierung von Kaninchenmuskeln am lebenden, narkotisierten Tier. Mellanby, der Experimente der gleichen Art an Kaninchen anstellte, fand ebenfalls etwas geringere Werte im tetanisierten Muskel, aus denen er jedoch, wohl wegen der sehr geringen Unterschiede,

¹⁾ Amer. Journ. of Physiol., Bd. 23, S. 174 (1908).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 64, S. 262 (1910).

³⁾ Journ. of Physiol., Bd. 36, S. 447 (1908).

⁴⁾ Biochemical Journal, Bd. 4, S. 420. †

nicht auf eine wirkliche Verminderung des Muskelkreatins schließt. Mit Recht machen Pekelharing und van Hoogenhuyze¹⁾ darauf aufmerksam, daß bei diesen Experimenten eine verstärkte Blutdurchströmung in den gereizten Muskeln anzunehmen ist und damit eine einfache Vergleichung mit dem ruhenden Muskel unsicher gestaltet.

Man sieht jedenfalls, daß auch die Folinsche Methode nicht ohne weiteres die Widersprüche aufhebt, die sich bei der Untersuchung des Kreatingehalts tätiger Muskeln jetzt wie in den älteren Arbeiten einstellten. Eine neue von Pekelharing und van Hoogenhuyze²⁾ i. J. 1910 aufgestellte Theorie der Kreatinbildung am Muskel ist geeignet, diese Widersprüche aufzuklären. Darüber hinaus kommt ihrer Lehre eine so erhebliche prinzipielle Bedeutung für das gesamte Problem der Kreatinbildung zu, daß eine eingehende Besprechung ihrer Versuchsergebnisse erforderlich ist. Sie gehen davon aus, daß ein grundlegender Unterschied anzunehmen ist zwischen der schnellen Muskelkontraktion und jenem ständigen, wenn auch in seiner Intensität wechselnden, Spannungszustand der Muskeln, der als Tonus bezeichnet wird. Sei es, daß verschiedene Muskelfasern, oder daß verschiedene Innervation diesen beiden Prozessen zugrunde liegt, jedenfalls haben wir ein Recht anzunehmen, daß jene zwei so verschiedenartigen Lebensäußerungen der Muskelzellen von verschiedenen chemischen Prozessen begleitet sind. Die Verfasser stellten daher die Arbeitshypothese auf, daß die Kreatinbildung eine Funktion des Tonus, aber nicht der schnellen Muskelkontraktion ist. Man darf diese Anschauungsweise als die physiologische Präzisierung der schon von Shaffer³⁾ i. J. 1908 aufgestellten Theorie betrachten. Dieser Autor kam auf Grund seiner sehr zahlreichen Untersuchungen an Kranken der allerverschiedensten Art zu dem Schluß, daß die bei allen bettlägerigen Patienten beobachtete mehr oder minder starke Herabsetzung der Kreatinin-ausscheidung nicht von der Art der Krankheit abhängt, sondern

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 64, S. 262 (1910).

³⁾ Amer. Journ. of Physiol., Bd. 23, S. 1 (1908).

lediglich von dem Darniederliegen der «potential efficiency of the muscle.» «The amount of creatinine excreted,» so schreibt er, «is an index of their efficiency — not the amount of work which the muscles are doing at the time, but the amount of work they are capable of doing. Und weiter unten: The amount of creatinine excreted bears a direct relation to the potential efficiency of muscle. Eine große Zahl eigener Beobachtungen und von Angaben anderer Autoren (Spriggs,¹⁾ sowie Benedict u. Myers,²⁾ die bei Frauen niedrigere Kreatininwerte fanden, als bei Männern) dient der durchaus beweiskräftigen Bestätigung von Shaffers Anschauung.

Es erscheint von großem Interesse, daß dieselbe Anschauung, zu der Shaffer auf Grund seiner Beobachtungen über die Kreatininausscheidung von Kranken kam, nunmehr durch Pekelharing und van Hoogenhuyze durch das physiologische Experiment, also auf ganz anderem Wege und auf Grund rein physiologischer Betrachtungen, bestätigt und präzisiert wird. Die Versuche der holländischen Forscher gewinnen dadurch besonders an Wert, daß sie auf den verschiedensten Wegen zum gleichen Ziele führen. In einer ersten Versuchsreihe wurde durch Kombination von Hirnstammdurchschneidung und einseitiger Durchtrennung der sensiblen Hinterwurzeln nach dem Vorgang Sherringtons bei Katzen die «Enthirnungsstarre» auf der einen Körperseite erzeugt. Die Muskeln dieser Seite geraten in dauernde tonische Verkürzung, während auf der andern Seite, deren zugehörige Wurzeln durchtrennt sind, normaler Tonus bestehen bleibt. Nach $1\frac{3}{4}$ — $3\frac{1}{2}$ Stunden wurden die Tiere entblutet und gleiche Stücke der beiderseitigen Ellbogenstrecker untersucht. In sämtlichen 5 Versuchen war der Kreatingehalt in den tonisch kontrahierten Muskeln erhöht. Aufhebung des Muskeltonus durch Ischiadicusdurchschneidung ergab beim Froschmuskel, mit und ohne Aufhebung der Zirkulation, starke Kreatinabnahme. Degenerationserscheinungen spielten selbst drei Tage nach Ischiadicusdurchschneidung beim Frosch keine Rolle. Die direkte Reizung des Froschmuskels

¹⁾ Quarterly Journal of medicine (Oxford), 1907, S. 63.

²⁾ Amer. Journ. of Physiol., Bd. 18, S. 377.

hingegen vom Ischiadicus aus, sei es durch intermittierendes Tetanisieren oder durch rhythmische Schließungs- und Öffnungs-Induktionsschläge führte, im Gegensatz zu den Angaben von Brown und Cathcart, nicht zur Erhöhung des Kreatingehalts. Endlich wurde die bekannte tonisierende Wirkung ganz verschiedener Substanzen, wie Veratrin, Nikotin, CaCl_2 , NaCNS u. a. auf den in Ringer-Lösung überlebenden Froschmuskel untersucht. Die Reizung der in solchen Lösungen befindlichen Muskeln bewirkt tonische Kontraktion mit stets eintretender, starker Kreatinvermehrung, während bei gleicher Versuchsanordnung, jedoch ohne Zusatz der wirksamen Substanzen, lediglich Zuckungen und keine Kreatinvermehrung auftrat. Auch bei der Wärmestarre und bei der Totenstarre, deren Analogie mit dem Tonus von den Physiologen häufig behauptet worden ist, wurde Kreatinvermehrung festgestellt.

Übersieht man von dem neu gewonnenen Standpunkt aus die Resultate früherer Untersuchungen über das Verhalten des Muskelkreatins nach Reizung oder Arbeit, so erklären sich, worauf Pekelharing und van Hoogenhuyze hinweisen, die Widersprüche sehr wohl durch die Nichtberücksichtigung des Tonuszustands des Muskels. Je nach der Versuchsanordnung mag das eine Mal hauptsächlich erhöhter Tonus, das andere Mal nur einfache Kontraktion vorgelegen haben, oder aber es handelte sich, was in den Versuchen mit künstlicher Reizung wohl meist der Fall war, um eine konkurrierende Beeinflussung beider Muskelaktionen. Je nachdem mußte das Maß der Kreatinbildung wechseln. Auch willkürliche Muskelaktionen, wie sie in ihrer Wirkung auf die Kreatininausscheidung am Menschen häufig studiert wurden, müssen demnach durchaus nicht alle gleichwertig sein für das Verhalten des Muskelkreatins und sollten nur da zu einer Vermehrung des Kreatins und damit vielleicht zu einer Vermehrung des Harnkreatinins führen, wo, z. B. durch besonderen Aufwand koordinierender Muskeltätigkeit, auch der Tonus wesentlich erhöht wird.

Auch für die Beurteilung der zahlreichen Arbeiten, die sich mit dem Einfluß der Muskelarbeit auf die Kreatininausscheidung befassen, wird man die Tonustheorie von Pekel-

haring und Hoogenhuyze zugrunde legen dürfen. Weber¹⁾ fand beim Hunde nach Cinchoninkrämpfen, wo eine Wirkung auf den Tonus wohl in Betracht kommt, Steigerung der Kreatininausscheidung, während starke Arbeit im Tretrade die Menge des Harnkreatinins nicht vermehrte. Hoogenhuyze und Verploegh²⁾ haben in ihren ausgedehnten Selbstversuchen einen Einfluß der Muskelarbeit (Marschieren, Radfahren, Hanteln) auf die Kreatininausscheidung nicht konstatieren können: dagegen ist es von Interesse, daß, wie ein Überblick über die Zahlen ihrer sorgfältigen Versuche beweist, die Kreatininausscheidung im Schlaf, also während eines Zustandes von vermindertem Tonus, regelmäßig erheblich geringer ist als am Tage. Auch Pekelharing und Harking³⁾ haben in Versuchen an Harking selbst einen Einfluß starker Marschleistungen auf die Kreatininausscheidung vermißt. Dagegen gelang es, durch mehrstündiges Strammstehen in militärischer Haltung, also durch eine Übung, die eine dauernde tonische Kontraktion bedingt, regelmäßig die Kreatininausscheidung in die Höhe zu treiben. Einnahme von Colapräparaten, sowie von Alkohol gab, nach Hoogenhuyze und Verploegh, mit der «Erhöhung der Intensität der Lebenserscheinungen,» die wohl zweifellos mit einer Tonuserhöhung der Muskulatur einhergeht, Vernichtung der Kreatininausscheidung, BrK-Gaben setzen sie herab. Endlich sei auf die von denselben Forschern angeführten, wenn auch selbst heute nicht ganz eindeutigen Kreatininbestimmungen bei einer Reihe von Kranken mit ausgedehnten Muskellähmungen hingewiesen: die Kreatininausscheidung war hier außergewöhnlich niedrig.

Die Grundlage aller bisher erörterten Versuche und ihrer theoretischen Deutung ist die Anschauung vom genetischen Zusammenhang des Harnkreatinins mit dem Muskelkreatin, die Annahme also, daß eine vermehrte Kreatinbildung in einer vermehrten Kreatininausscheidung ihr notwendiges Korrelat habe. Diese Grundanschauung, die angesichts der nahen Ver-

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 415 (1905).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 207 (1911).

wandschaft der beiden Substanzen fast ein logisches Postulat scheinen mochte, ist durch Folins¹⁾ Untersuchungen, die erste Anwendung seiner neuen Bestimmungsmethode, schwer erschüttert worden. Aus seinen Ergebnissen zog Folin den Schluß, daß ein Zusammenhang zwischen Muskelkreatin und Harnkreatinin überhaupt nicht bestehe. Dieser Satz ist die Folgerung aus zwei in ihrem Wert nicht gleichen Beobachtungen. Durch die erste, und weitaus die wichtigste überhaupt auf dem uns interessierenden Gebiet, stellte Folin fest, daß die Kreatininausscheidung bei kreatinfreier Kost unabhängig ist von der Menge und Art des aufgenommenen Eiweißes, eine Konstante also, die lediglich individuell, und zwar in offensichtlicher Abhängigkeit vom Körpergewicht, variiert. Damit erhält die Kreatininausscheidung die Bedeutung eines Ausdrucks endogener Stoffwechselforgänge und tritt in gewisse Analogie mit der Ausscheidung der endogenen Harnsäure. Diese außerordentlich wichtige Entdeckung Folins ist von allen nachfolgenden Untersuchern bestätigt worden und darf heute als eine feste Grundlage unseres Wissens gelten.

Die zweite hierher gehörige Beobachtung Folins betrifft die Ausscheidung per os gegebenen Kreatins. Gemäß der alten Anschauung muß Kreatin im Körper in Kreatinin übergeführt werden; erscheint doch im Harn des Menschen unter normalen Verhältnissen nur Kreatinin und kein Kreatin. Folin prüfte experimentell die Richtigkeit dieser Annahme, indem er Kreatin per os gab, in der Erwartung, eine Vermehrung der Kreatininausscheidung feststellen zu können, wie sie Meissner in seinen Untersuchungen aus dem Jahre 1868,²⁾ also mit der alten Methodik, bewiesen zu haben glaubt. Indessen blieb in Folins Versuchen die Kreatininausscheidung auch nach Einnahme von Kreatin konstant und das Kreatin selbst erschien nur zum Teil als solches im Harn wieder; bei ungenügender Eiweißnahrung wurde sogar die gesamte Menge des eingegebenen Kreatins retiniert, ohne daß die N-Ausscheidung im Harn eine ent-

¹⁾ Amer. Journ. of Physiol., Bd. 13, S. 45, 66, 117 (1905).
Hammarsten-Festschrift, 1906, S. 1.

²⁾ Zeitschrift f. rat. Medizin, Bd. 31, S. 330 (1868).

sprechende Erhöhung erfuhr. Kreatin ist demnach, nach Folins Meinung, als eine Art Nahrungsstoff anzusehen, Kreatinin dagegen, das bei Einnahme per os regelmäßig fast quantitativ im Harn erscheint, wäre als ein Endprodukt endogener Zellstoffwechselfvorgänge zu betrachten.

Es ist begreiflich, daß Folins radikale Trennung der Kreatin- von der Kreatininbildung revolutionierend wirkte. Eine Fülle von Arbeit wurde in der Folgezeit geleistet, um jene Resultate zu bestätigen oder zu widerlegen. Im allgemeinen war die Opposition stärker vertreten, und man darf heute sagen, daß sie den Sieg behielt. Unbedingt auf Folins Standpunkt steht af Klercker,¹⁾ der in Selbstversuchen, und zwar bei Einnahme des kreatinreichen Fleischextrakts sowie reinen Kreatins, zu den gleichen Resultaten wie Folin gelangte. Demgegenüber betont Weber,²⁾ daß in einem Selbstversuch nach Einnahme von Fleischextrakt mehr Kreatinin im Harn erschien, als in dieser Form genossen war, daß das Mehr also auf einer Umwandlung von Kreatin in Kreatinin beruhen müsse. In den sorgfältigen Versuchen von van Hoogenhuyze und Verploegh³⁾ erscheint nach Einnahme von je 2 g Kreatin in einer großen Zahl von Versuchen regelmäßig ein allerdings sehr kleiner Teil als Kreatinin im Harn, und auch Plimmer, Dick und Lieb⁴⁾ haben Kreatininvermehrung im Harn unter den gleichen Bedingungen gefunden. Eine mehr oder minder große Retention des Kreatins im Organismus wird auch von den erwähnten Autoren, wie überhaupt von allen, die Versuche mit Einführung von Kreatin, sei es per os, sei es parenteral, vornahmen, bestätigt.

Man sollte indessen allen Versuchen, in denen das Kreatin per os zugeführt wurde, nur einen beschränkten Wert zuschreiben. Einmal kennen wir das Schicksal des Kreatins im Magendarmkanal nicht. Daß im Darm das Kreatin einer bakteriellen Zerstörung anheimfallen kann, beweisen die Ergebnisse

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 3, S. 45 (1907).

²⁾ l. c.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 57, S. 161 (1908).

⁴⁾ Journ. of Physiol., Bd. 39, S. 98 (1909/10).

von T wort und Mellanby¹⁾ die durch Bakterien des Darms extra corpus eine Kreatinzerstörung herbeiführen konnten. Vor allem aber sollte man die Umwandlung eines im endogenen Zellstoffwechsel und nicht bei der Verdauung entstehenden Produkts nicht durch Fütterungs-, sondern allein durch Injektionsversuche zu entscheiden suchen. Derartige Versuche hat zuerst Lefmann²⁾ an Hunden angestellt. Auch hier erschien nur ein kleiner Teil des eingeführten Kreatins im Harn wieder. Eine Vermehrung des Kreatins glaubt Lefmann aus seinen Zahlen nicht erkennen zu können. Dieser Schluß ist indessen, worauf van Hoogenhuyze und Verploegh³⁾ hinweisen, ganz unberechtigt. Lefmanns Zahlen zeigen im Gegenteil fast in allen seinen Versuchen eine nicht unerhebliche Vermehrung der Kreatinin-ausscheidung nach Kreatininjektionen. Besonderen Wert für die vorliegende Frage muß den Untersuchungen von Pekelharing und van Hoogenhuyze⁴⁾ zugeschrieben werden. Sie injizierten Kaninchen und Hunden Kreatin, wobei sie die Vorsicht gebrauchten, die jedesmalige Dosis in einzelnen Portionen einzugeben. Dabei fanden sie neben einer wechselnden Zunahme der Kreatinausscheidung eine Vermehrung des Harnkreatinins. Wurde jedoch die gesamte Kreatindosis auf einmal injiziert, so blieb häufig die Kreatininvermehrung aus, während die Kreatinausscheidung relativ hoch war, eine Beobachtung, welche die negativen Ergebnisse anderer Autoren zu erklären geeignet ist. Eine Bestätigung der Befunde von Pekelharing und van Hoogenhuyze finden wir in einer Arbeit von Towles und Voegtlin,⁵⁾ die sogar nicht nur einen Übergang von Kreatin in Kreatinin, sondern auch den umgekehrten Vorgang in mehreren ihrer Versuche feststellten.

Auf einem anderen Wege haben Gottlieb und Stangassinger⁶⁾ die Möglichkeit eines Übergangs von Kreatin in Krea-

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. 44, S. 43 (1912)

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 57, S. 476 (1908).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 110 (1909).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 395 (1910).

⁵⁾ Journ. of Biol. Chem., Bd. 10, S. 479 (1912).

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 1 (1907). — Stangassinger, ebenda, Bd. 55, S. 295 (1908).

tinin innerhalb des Organismus zu beweisen gesucht. Sie überließen verschiedene Organe der antiseptischen Autolyse mit Zusatz von Kreatin und konnten nachweisen, daß eine Reihe von Organen, insbesondere Muskel und Leber, die Umwandlung des Kreatins in Kreatinin auf fermentativem Wege bewerkstelligen kann: gleichzeitig wird, besonders im Leberbrei, Kreatin bei der antiseptischen Autolyse zerstört. Mellanby¹⁾ hat zwar die Ergebnisse von Gottlieb und Stangassinger in Zweifel gezogen. Indessen die Versuche, die Rothmann²⁾ unter sorgfältigster Kontrolle der Antisepsis ausführte, sowie die Nachprüfung, die van Hoogenhuyze und Verploegh in ihrer großen Arbeit³⁾ anführen, bestätigen die Ergebnisse von Gottlieb und Stangassinger vollauf. Endlich haben diese beiden Forscher auch in Durchblutungsversuchen an der Leber⁴⁾ dieselben Resultate erhalten, wobei jedoch zu bemerken ist, daß die von ihnen gewählte Durchblutungszeit von 3½ Stunden eine zu lange ist, um mit Sicherheit noch von einem Überleben der Leber sprechen zu können.

Beweisender aber als Wahrscheinlichkeitsgründe und beweisender selbst als die Ergebnisse der unter mehr oder weniger von den natürlichen Vorgängen abweichenden Verhältnissen angestellten Experimente spricht die Logik der zahlenmäßig feststellbaren Tatsachen für den genetischen Zusammenhang zwischen Muskelkreatin und Harnkreatinin. Im Hunger steigt, wie von Dorner⁵⁾ am Kaninchen, von Cathcart⁶⁾ und von Benedict und Diefendorf⁷⁾ am Menschen gefunden wurde, die Kreatinausscheidung mächtig an, während gleichzeitig die Kreatininausscheidung, wenn auch nicht im gleichen Maße, abfällt. Sehr deutlich ist dieser Parallelismus im Hungerversuch am Menschen, den Benedict und Diefendorf beschreiben: mit dem Ansteigen des Kreatins sinkt die Menge des Kreatinins.

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 57, S. 131 (1908).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 57, S. 161 (1908).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 322 (1908).

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 225 (1907).

⁶⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 6, S. 109 (1907).

⁷⁾ Amer. Journ. of Physiol., Bd. 18, S. 362 (1907).

so daß das Gesamtkreatinin kaum geändert ist. Ganz ähnliche Zahlen finden sich in Cathcarts Versuch am Hungerkünstler Beauté. Wenn häufig im Hungerzustande mehr Kreatin ausgeschieden wird, als der Abnahme des Kreatinins entspricht, so muß auf die Ergebnisse von Demant¹⁾ und ihre Bestätigung durch Mendel und Rose²⁾ hingewiesen werden, die eine Vermehrung des Muskelkreatins im Hunger fanden. Unter normalen Ernährungsbedingungen gehen Muskelkreatin und Harnkreatinin indessen offensichtlich parallel. Unter den Bedingungen des erhöhten Tonus steigt, wie wir sahen, nicht nur der Kreatin-gehalt des Muskels (Pekelharing und van Hoogenhuyze l. c.), sondern ebenfalls der Kreatiningehalt des Harns (Pekelharing und Harking l. c.), und auch in den Versuchen Jaffes³⁾ über die Kreatinbildung durch Methylierung des Glykocyamins ist mit dem Kreatin-gehalt des Muskels auch die Kreatininausscheidung erhöht. Gegenüber den zahlreichen Versuchen, welche die Möglichkeit einer über das Normale hinausgehenden Kreatinspeicherung im Muskel beweisen und zu denen auch meine eigenen Untersuchungen einen Beitrag liefern, müssen die Experimente Mellanbys,⁴⁾ die das Gegenteil sicherstellen sollen, als unzureichend bezeichnet werden. Mellanby fand nämlich nach Verfütterung von Kreatin an junge Hühnchen keine Erhöhung des Kreatin-gehalts der Muskulatur. Daß die Verfütterung gerade für die Entscheidung dieser Frage ungeeignet ist, liegt auf der Hand. Auf Grund des sonstigen reichhaltigen und zuverlässigen Materials müssen wir daran festhalten, daß unter gewissen Bedingungen eine Erhöhung des Muskelkreatin-gehalts und als Folge davon eine Erhöhung der Harnkreatininausscheidung stattfindet.

Am überzeugendsten wirkt die von Myers und Fine⁵⁾ als Ergebnis ihrer zahlreichen Bestimmungen des Muskel- und Harnkreatinins verschiedener Tierarten gegebene Zusammen-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 3, S. 381 (1879).

²⁾ Journ. of Biol. Chem., Bd. 10, S. 255 (1911).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 430 (1906).

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ Journ. of Biol. Chem., Bd. 14, S. 9 (1912).

stellung des Prozentgehaltes der Muskulatur an Kreatin einerseits und des Kreatininkoeffizienten, d. h. der in Milligrammen ausgedrückten Menge der pro Kilogramm Körpersubstanz im Harn ausgeschiedenen Kreatinins, andererseits. (Vgl. Tab. 1.)

Tabelle 1

(nach Myers und Fine, Journal of Biol. Chem., Bd. 14, S. 19).

Tierart	Prozentgehalt der Muskeln an Kreatin	Kreatinin-koeffizient	Verhältnis der Muskelkreatinzahlen	Verhältnis der Harnkreatin-zahlen
Kaninchen . . .	0,52	14,3	1,4	1,7
Mensch	0,39	9,0	1,05	1,07
Hund	0,37	8,4	1,0	1,0

Es ergibt sich aus dieser Zusammenstellung mit überraschender Klarheit, daß die Kreatininausscheidung genau dem Kreativegehalt der Muskeln entspricht. Weiterhin ergab sich aus einer großen Zahl von Experimenten an Kaninchen, daß selbst bei der gleichen Tierart die Kreatininausscheidung dem Gehalt des Körpers an Kreatin proportional ist. In diesen Feststellungen darf man wohl die Krönung der Beweise sehen, aus denen mit Sicherheit der genetische Zusammenhang zwischen Harnkreatinin und Muskelkreatin hervorgeht, und so gelangen wir, als Resultat umfangreicher Forscherarbeit, zur einfachen, logischen und schon von Liebig aufgestellten Theorie zurück.

Nach Erledigung dieser Hauptfrage gewinnt die Frage nach dem Ort der Umwandlung von Kreatin in Kreatinin an Interesse, umsomehr, als diese Frage mit derjenigen nach der Rolle des Kreatins im Stoffwechsel eng verknüpft ist. Nach den Versuchen von Gottlieb und Stangassinger (l. c.) sollte man der Leber hier eine wesentliche Bedeutung zuschreiben. Zweifellos ist der Zustand dieses Organes von Einfluß auf Art und Größe der Kreatin- und Kreatininausscheidung. Bei experimenteller Schädigung der Leber durch Phosphor¹⁾ oder

¹⁾ Forschbach, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 58, S. 113 (1908). — Lefmann, Diese Zeitschrift. Bd. 57, S. 476 (1908).

Hydrazinvergiftung¹⁾ steigt die Kreatinausscheidung mächtig an, und die gleiche Beobachtung haben Hoogenhuyze und Verploegh²⁾ sowie Mellanby (l. c.) in Fällen schwerer, carcinomatöser Leberschädigung gemacht. Es ist schwer, aus diesen Befunden irgendwelche bindenden Folgerungen für die Frage der Bedeutung der Leber im Kreatinstoffwechsel zu ziehen. Man mag an eine Beeinträchtigung der Umwandlung des Kreatins in Kreatinin denken, oder die schwere Schädigung des Stoffwechsels durch den Ausfall der Leberfunktion in Parallele zu dem Hungerzustand setzen, der ja ebenfalls Kreatinausscheidung bedingt. Man wird aber nicht vergessen dürfen, daß man angesichts der zahlreichen Beziehungen, die wir zwischen der Funktion der Leber und derjenigen anderer Organe annehmen müssen, aus den Erscheinungen bei schwerer Leberschädigung nur mit größtem Vorbehalt auf Funktionen der Leber selbst schließen darf. Da wo eine direkte Schädigung der Leber selbst vermieden wurde, nämlich bei Ausschaltung der Leber durch die Ecksche Fistel, ergab sich in der Tat kein prinzipieller Unterschied des Kreatinstoffwechsels im Vergleich zu Tieren mit normal funktionierender Leber. Am deutlichsten geht das aus den Versuchen von Towles und Voegtlin (l. c.) hervor, die sowohl an gefütterten wie an hungernden Eck-Fistel-Hunden arbeiteten. Ihre Versuche deuten nicht auf eine ausschlaggebende Rolle der Leber für den Kreatinstoffwechsel. Bei einem gut ernährten Eckfistelhund war sogar nicht einmal eine Ausscheidung von Kreatin vorhanden.

Einen neuen und sehr interessanten Gesichtspunkt bringen die Untersuchungen von Cathcart,³⁾ sowie von Mendel und Rose⁴⁾ in die Diskussion dieser Frage. Cathcart fand in Versuchen am Menschen, Mendel und Rose beobachteten es beim Kaninchen, daß die Vermehrung der Kreatinausscheidung im Hunger sofort sistiert wird, wenn Kohlenhydrate verabreicht werden, während Fett und Eiweiß die Kreatinausscheidung un-

¹⁾ Underhill u. Kleiner, Journ. of Biol. Chem., Bd. 4, S. 165 (1908).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 57, S. 161 (1908).

³⁾ Journ. of Physiol., Bd. 39, S. 320 (1909).

⁴⁾ Journ. of Biol. Chem., Bd. 10, S. 213 (1911).

beeinflusst lassen. Gleichzeitig mit der Erniedrigung der Kreatinausscheidung fällt die Menge der Gesamt-N-Ausscheidung im Harn. Cathcart und Taylor¹⁾ haben diesen wichtigen Befund durch Versuche an mit Phlorrhizin vergifteten Hunden ergänzt. Regelmäßig trat gleichzeitig mit der Zuckerausscheidung, und nur so lange, als diese andauerte, Kreatin im Harn auf. Dasselbe haben Krause und Cramer²⁾ gefunden; auch erbrachten sie den Nachweis, daß bei Diabetes mellitus in einer Reihe von Fällen, die sie untersuchten, regelmäßig Kreatin im Harn auftrat. Man gelangt daher zu dem Schluß, daß ein enger Konnex besteht zwischen der Menge der Kohlenhydrate, die dem Körper zur Verfügung steht, und der Kreatinausscheidung oder der Kreatinbildung. Daß man direkt an die Kreatinbildung denken darf, geht auch aus der Tatsache hervor, daß im Phlorrhizindiabetes mit dem Kreatin auch das Kreatinin vermehrt ist. Sobald, sei es im Hunger, sei es bei Phlorrhizindiabetes oder bei Diabetes mellitus der Kohlenhydratvorrat des Körpers unter ein gewisses Maß sinkt, beginnt eine vermehrte Bildung von Kreatin. Man begreift nun auch, wie Cathcart ausführt, die Kreatinausscheidung, die bei experimenteller oder pathologischer Schädigung der Leberzellen selbst auftritt, wenn man bedenkt, daß die normale Funktion der Leberzellen für den normalen Ablauf des Kohlenhydratstoffwechsels unerlässlich ist.

Diese Beobachtungen bringen einen neuen und zwar energetischen Gesichtspunkt für die Erkenntnis der Rolle des Kreatins im tierischen Stoffwechsel. Man mag annehmen, daß die Gegenwart von Kohlenhydraten in genügender Menge den endogenen N-Stoffwechsel in gewissen Grenzen hält, während beim Fehlen dieser für den Energiebedarf so wichtigen Stoffe, sei es Eiweiß, seien es andere Zellenbestandteile unter Bildung von Kreatin zersetzt und zu energetischen Zwecken verwandt werden. Zu erörtern wäre aber wohl auch die Frage, ob nicht etwa der Vorgang der Kreatinbildung selbst Energie zu liefern vermag, z. B. indem dabei als Nebenprodukte Substanzen ge-

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. 41, S. 276 (1910).

²⁾ Journ. of Physiol., Bd. 40, LXI (1910).

liefert werden, die vom Organismus energetisch verwertet werden können. Der Mangel an leicht verbrennlichen Kohlenhydraten könnte dann zu einer Mehrproduktion von Kreatin führen. Die energetische Betrachtungsweise wird besonders im Zusammenhang mit der Tonustheorie bedeutsam. Denn die Annahme einer Bildung von Kreatin beim Tonus führt von selbst zu der Vorstellung, daß die Quelle der für die Aufrechterhaltung oder Erhöhung des Tonus erforderlichen Energie mit dem Vorgang der Kreatinbildung aufs engste verknüpft sein kann.

Die letzten Erörterungen zeigen uns die Grenze, bis zu der uns die Erforschung des Kreatinstoffwechsels führen kann und die wir erst überschreiten können, wenn auch die Frage der Kreatinbildung selbst endlich einmal restlos geklärt sein wird. Hier gewinnt das Problem seine rein chemische Seite, und jeder Erklärungsversuch wird von der Betrachtung der Konstitution des Kreatins ausgehen müssen. Die Anschauung, daß die Kreatinbildung mit dem Zerfall der Nucleinsubstanzen in Konnex stehen könne, darf heute als völlig verlassen außer Erörterung bleiben. Zwar ist eine Ableitung des Kreatins vom Guanin chemisch denkbar; indessen haben wir keinen einzigen Anhaltspunkt für die Annahme einer vitalen Reaktion dieser Art. Experimentell haben Forschbach,¹⁾ Dorner (l. c.), sowie Lefmann (l. c.) die Frage studiert und gefunden, daß weder bei Leukämie, selbst bei beträchtlicher Vermehrung der ausgeschiedenen Harnsäure, noch bei Thymusfütterung eine Erhöhung der Kreatininausscheidung eintrat. Dagegen gilt heute die Abstammung des Kreatins vom Eiweiß als unbestrittene Tatsache, obwohl in Wahrheit nicht ein einziger unbedingt sicherer Beweis dafür erbracht ist. Was wir bestimmt wissen, ist nur, daß die Kreatinbildung von der Zersetzung des Nahrungseiweißes unabhängig ist, während sie in Beziehung steht zum endogenen Stoffwechsel. Als einzige Richtungslinie der Forschung bleibt demnach die allerdings sehr suggestive Tatsache, daß dem Guanidinkern des Kreatins als einzig sonst bekannte Guanidinquelle des tierischen Organismus ein Baustein des Eiweißes,

¹⁾ Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmak., Bd. 58, S. 113 (1908).

das Arginin, entspricht. Der oxydative Abbau des Arginins *in vitro* kann zur Guanidinbuttersäure führen,¹⁾ deren weiterer Abbau zu Guanidinessigsäure ebensogut denkbar ist. Durch Jaffes (l. c.) schöne Untersuchungen, die von Dorner (l. c.) vollauf bestätigt wurden, ist sichergestellt, daß sowohl *per os* als *subcutan* zugeführte Guanidinessigsäure (Glykocyamin) im Organismus des Kaninchens zu Kreatin methyliert wird, das im Muskel gespeichert und im Harn ausgeschieden wird. Dennoch hat Jaffe den Gedanken an eine Entstehung des Kreatins im Organismus aus Arginin auf dem skizzierten Wege nicht für wahrscheinlich gehalten. Es ist nämlich bisher nicht gelungen, Guanidinessigsäure oder -buttersäure als Zwischenprodukt des Argininabbaus im Organismus aufzufinden. Wichtiger aber als dieses negative Ergebnis ist die von Kossel und Dakin²⁾ zuerst beobachtete, überaus leichte Aufspaltung des Arginins in Harnstoff und Ornithin, die am intensivsten in der Leber, fast gar nicht freilich im Muskel zutage tritt. Man könnte also immerhin annehmen, daß im Muskel ein anderer und zwar oxydativer Abbau des Arginins stattfindet, der dann über die Guanidinbuttersäure zum Kreatin zu führen vermag. Und es mag hierfür die Abhängigkeit der Kreatininausscheidung von der zur Verfügung stehenden Sauerstoffmenge angeführt werden, wie sie aus der Abnahme des Harnkreatinins im Hochgebirge von van Hoogenhuyze und Verploegh³⁾ abgeleitet wird. Daß die Hexonbasen im Muskel ein ganz besonderes Verhalten zeigen, wird durch die großen im Muskel gespeicherten Mengen von Carnosin, des Histidyl-Alanins, nahegelegt, die der Menge des Kreatins durchaus nicht nachstehen. Demgegenüber muß wiederum auf Jaffes Einwurf hingewiesen werden, der auf Thompsons⁴⁾ Versuche über das Schicksal oral und *subcutan* eingeführten Arginins aufmerksam macht: fast die gesamte Menge des aus Arginin entstehenden Harnstoffs, bei *subcutaner* Zufuhr sogar 100^{0/0},

¹⁾ Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 415 (1901).

²⁾ Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 321 (1904); Bd. 42 S. 181 (1904).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 101 (1909).

⁴⁾ Journ. of Physiol., Bd. 32, S. 137; Bd. 33, S. 106 (1905).

erschien im Harn wieder. Da auch die Pflanzen nach Kiesel¹⁾ Arginin glatt in Harnstoff und Ornithin spalten können, so erscheint diese Argininspaltung als ein fundamentaler biologischer Vorgang von allgemeiner Verbreitung. Die Injektion von Arginin bei Kaninchen ergab in Jaffés Versuchen keine Vermehrung des Gesamtkreatinins im Harn; eine Nachprüfung dieser Versuche mit Hilfe der Folinschen Methode wäre allerdings sehr erwünscht. Endlich seien die neuesten Versuche in dieser Richtung, von Inouye,²⁾ erwähnt. Inouye unternahm Durchströmungsversuche an der überlebenden Leber mit Ringer-Lösung, der Arginin zugesetzt war, und fand eine Zunahme des Gesamtkreatinins gegenüber den Kontrollproben, die zwar absolut nur gering, relativ aber nicht unbedeutend war. Auch in seinen Autolyseversuchen ist eine regelmäßige, wenn auch geringe Zunahme des Gesamtkreatinins bei Zugabe von Arginin bemerkbar. Man wird dem Verfasser recht geben, wenn er aus diesen Versuchen die Möglichkeit einer Überführung von Arginin in Kreatin durch die Leber ableitet. Man erkennt indessen aus der vorsichtigen Fassung dieser Folgerung, daß er eine Lösung der Frage mit diesen Versuchen durchaus nicht gegeben zu haben glaubt. Versuche am durchbluteten überlebenden Muskel scheinen mir unerläßlich, obwohl mir die Schwierigkeiten einer ausreichenden Kontrollmöglichkeit aus eigenen Versuchen bekannt sind. Auch darf man gerade bei solchen Versuchen nicht außer acht lassen, daß etwa aus dem Arginin entstehende einfachere Guanidinosäuren aller Wahrscheinlichkeit nach, wenigstens in Form ihrer Anhydride, ebenfalls die Jaffesche Reaktion geben und daher bei Folins Methode mitbestimmt werden könnten; vom Glykoeyamidin ist es ja bekannt, daß es jene Reaktion, wenn auch schwächer, gibt.

Jaffe hat noch auf die Möglichkeit verwiesen, die sich aus Versuchen von Otori³⁾ ergibt, daß nämlich im Eiweiß neben dem Arginin noch ein weiterer Guanidin- oder Methylguanidinkern enthalten ist. In der Tat gibt Otori an, daß er

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 169 (1911).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 81, S. 71 (1912).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 86 (1904).

bei der oxydativen Spaltung von Pseudomucin erheblich mehr Guanidin erhielt, als dem Gehalt dieses Eiweißkörpers an Arginin entsprechen könnte. Indessen erscheint es mir höchst unwahrscheinlich, daß Substanzen von so charakteristischem Verhalten wie die Guanidinderivate, vor allem wenn sie in nicht unbeträchtlichen Mengen im Eiweiß vorkommen sollten, der Forschung entgegen sein sollten. Auch zeigt die Anwendung der neuen, von van Slyke ausgearbeiteten Methoden auf die Analyse der Proteine, daß dem alten hydrolytischen Verfahren wesentliche Bausteine des Eiweißes nicht entgangen zu sein scheinen. Dennoch könnte das Guanidin, das nach den Ergebnissen von Kutscher und seinen Schülern aus Nucleinsäure, sowie aus dem Argininkomplex der Eiweißkörper bei der Oxydation mittels Ca-Permanganat entsteht¹⁾ und in ähnlicher Weise vielleicht auch intravital auf oxydativem Wege gebildet werden könnte, zum Kreatin in Beziehung stehen, indem es mit dem Essigsäurerest zum Glykocyamin zusammentritt, oder nach vorangehender Methylierung zum Methylguanidin, direkt Kreatin bildet. In dieser Hinsicht ist die Auffindung von Methylguanidin im Fleischextrakt,²⁾ aber auch im frischen Fleisch³⁾ von Bedeutung, sowie der von Achelis⁴⁾ und von Kutscher und Lohmann⁵⁾ zuerst erhobene, sowie von Engeland⁶⁾ bestätigte Befund des Vorkommens von Methylguanidin im Harn. Daß diese Substanz ebensogut auch ein Abbauprodukt des Kreatins sein könnte, liegt auf der Hand; wird doch Kreatin bei der Oxydation mittels HgO relativ leicht in Methylguanidin umgewandelt (Gulewitsch).⁷⁾ Bisher ist es auch weder Jaffe noch Dorner (l. c.) gelungen, durch Injektion von Methylguanidin

¹⁾ Kutscher und Seemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 36, S. 3023 (1903). — Kutscher und Zickgraf, Sitzungsber. d. Akad. der Wissensch. zu Berlin, Bd. 28. — Kutscher und Schenck, Ber. der Deutsch. chem. Ges., Bd. 38, S. 455 (1905).

²⁾ Kutscher, Zentralbl. f. Physiol., 1905.

³⁾ Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 414 (1906).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 10 (1906).

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 49, S. 81 (1906).

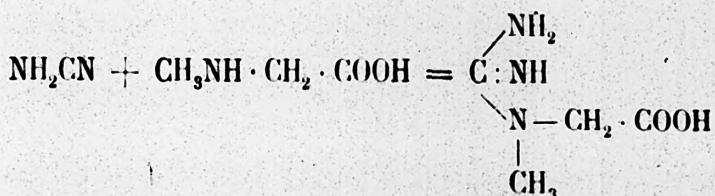
⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 57, S. 49 (1908).

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 472 (1906).

eine Vermehrung des Kreatinins im Harn zu erhalten, und einige von mir selbst mit Guanidin und Methylguanidin unternommene Versuche zeigten das gleiche negative Ergebnis. Die große Giftigkeit der Substanzen und die hierdurch bedingte mangelhafte Nahrungsaufnahme der Tiere bringen in die Versuche eine große Unsicherheit.

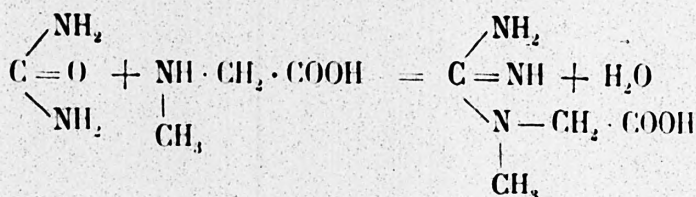
Alle diese Versuche, besonders die mit Arginin, bedürfen zweifellos noch weiterer Prüfung. Besonders verweise ich auf die Notwendigkeit, den Gehalt der Muskeln an Kreatin nach Injektion von als Vorstufe des Kreatins in Betracht kommenden Substanzen systematisch zu untersuchen. Wie ich weiter unten zeigen werde, und wie inzwischen in der interessanten Arbeit von Myers und Fine (l. c.) bestätigt wurde, ist der Gehalt der Muskeln von Kaninchen ein so auffallend konstanter, daß jede Beeinflussung mit Hilfe der Folin'schen Methode aufs exakteste zu erkennen sein muß.

Es gibt nun noch eine Theorie von der Entstehungsweise des Kreatins im Organismus, die bisher weder theoretisch erörtert noch experimentell studiert wurde und die dennoch einer näheren Prüfung wert erscheint. Dazu muß man sich allerdings frei machen von der Meinung, daß der Guanidinkern des Kreatins durchaus von einem präformierten Guanidinkern abstammen müsse. Bekanntlich beruht die Synthese des Kreatins, wie sie von Volhard ausgeführt wurde, auf dem Zusammentritt des Methylglykokolls (Sarkosins) mit Cyanamid nach folgender Gleichung:



Schon Jaffe bezeichnet es als naheliegend, an eine Entstehung des Glykocyamins aus Cyanamid und Glykokoll im Tierkörper zu denken, eine Idee, deren experimentelle Prüfung durch die Giftigkeit des Cyanamids vereitelt werde. Nun ist es aber gar nicht nötig, an das Cyanamid zu denken, sondern man wird dieselbe Reaktion auch mit dem Harnstoff selbst

zunächst theoretisch ableiten können, da Harnstoff unter Abgabe von H_2O in Cyanamid übergehen kann.



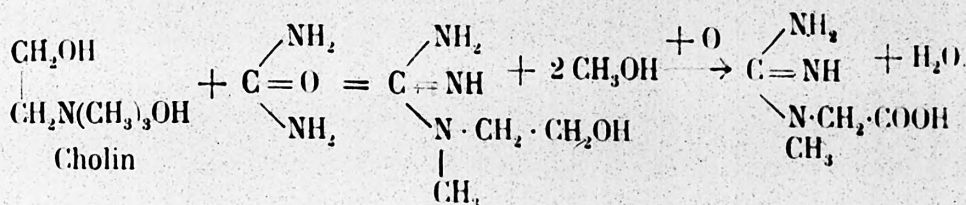
Nimmt man die prinzipielle Möglichkeit einer solchen Reaktion als gegeben an, so wären in der Entstehung des Glykocamins aus Glykokoll und Harnstoff mit nachträglicher Methylierung oder der direkten Synthese aus Sarkosin und Harnstoff Bildungsweisen des Kreatins gegeben.

Ich habe mich zunächst bemüht, für die Möglichkeit eines vitalen Vorgangs dieser Art Beweise zu erbringen, und zwar durch Verfolgung der Kreatininausscheidung nach Verfütterung oder Injektion von Glykokoll und Sarkosin, mit und ohne Harnstoffzusatz, bei kreatinfrei ernährten Hunden und bei Kaninchen, sowie durch Versuche über den Einfluß dieser Substanzen auf den Kreatingehalt der zerriebenen Muskulatur frisch getöteter Kaninchen. Die sehr zahlreichen Versuchsreihen ergaben so wenig einheitliche Resultate, daß ich von einer Wiedergabe in extenso vorläufig absehen möchte. Es kommt hinzu, daß die Methodik dieser meiner älteren Versuche nach meinen heutigen Erfahrungen nicht einwandfrei ist. Ich beabsichtige eine Wiederholung und Fortsetzung dieser Versuche und will die bisherigen Resultate kurz dahin zusammenfassen, daß Glykokoll weder im Fütterungs- oder Injektionsversuch, noch im Versuch mit Muskelbrei einen Einfluß auf Kreatinbildung bzw. Kreatininausscheidung zeigte. Dagegen fand sich bei den Versuchen mit Sarkosin in 50% der Versuche eine merkliche Vermehrung. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Ergebnisse werden bestätigen lassen. Wie weiter unten gezeigt wird, habe ich in einem Versuch nach Injektion von Sarkosin auch den Kreatingehalt der Muskulatur untersucht, ohne indessen eine Vermehrung feststellen zu können. Von einer weiteren Verfolgung der Sarkosinfrage sah ich deshalb vorläufig ab, weil der weitere Ausbau der Theorie mich zu einer a priori interessanteren

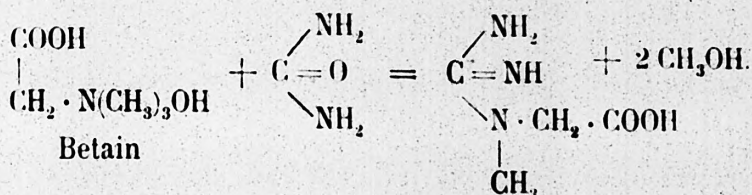
Fragestellung führte, deren experimentelle Prüfung sehr bald erheblich bessere und stetigere Resultate gab.

Es liegt nämlich nahe, den oben für das Sarkosin angegebenen Reaktionsverlauf auch auf zwei andere, vom Glykokoll sich ableitende Substanzen von physiologischer Bedeutung auszudehnen, das Cholin und das Betain. Die Reaktion mit dem Harnstoff müßte ähnlich wie beim Sarkosin verlaufen, nur daß statt H₂O Methylalkohol abgespalten wird.

Die Gleichungen lauten:



und

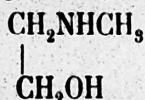


Man erkennt leicht das Interessante einer auf dieser Grundlage aufgestellten Arbeitshypothese. Das Cholin ist ja als Baustein der Lipoide Bestandteil aller lebenden Zellen und seine Oxydierbarkeit zu Betain bekannt. Die Aussicht, die Kreatinbildung mit dem Lipoidstoffwechsel in irgend einen Zusammenhang bringen zu können, hat zweifellos viel Verlockendes. Die intermediäre Entstehung von Methylalkohol, dessen Oxydation zu Ameisensäure im Tierkörper bekannt ist, bietet besonders im Zusammenhang mit der energetischen Betrachtungsweise der Kreatinbildung interessante Ausblicke. Auch sei darauf hingewiesen, daß in den Muskeln der Avertebraten zwar kein Kreatin, dagegen häufig Betain gefunden worden ist, und dasselbe gilt für den Dornhai, als einen der niedersten Repräsentanten der Wirbeltierreihe, in dessen Muskeln kaum Kreatin und statt dessen Betain vorkommt.¹⁾ Der Gedanke liegt nahe, daß bei diesen Tieren die Kreatinbildung nicht zu-

¹⁾ Suwa, Pflügers Archiv, Bd. 23, S. 421 (1909).

stande kommt, so daß das oxydierte Cholin, das Betain, als solches im Muskel gespeichert wird.

Betrachten wir den oben skizzierten Vorgang vom Standpunkt des Chemikers, so wird man in erster Linie den Nachweis erwarten müssen, daß Cholin oder Betain ihre Methylgruppen leicht abspalten, eventuell unter Bildung von Methylalkohol. Schmilzt man Betainchlorid mit überschüssigem Harnstoff, so sieht man sofort kleine Tröpfchen am Rande des Reagenzglases auftreten: gleichzeitig entweichen brennbare Gase. Schmilzt man am Rückflußkühler und nimmt nach dem Erkalten mit Wasser auf, so gibt die Lösung kräftige Jodoformreaktion. Destilliert man die wässrige Lösung der Schmelze am absteigenden Kühler, so geben gleich die ersten Anteile des Destillats die Jodoformprobe. Da Harnstoff beim Erhitzen teilweise Cyanamid liefert und Betain offensichtlich seine CH_3 -Gruppen zum Teil abgibt, so sind die Bedingungen zu einer Synthese nach obiger Gleichung an und für sich gegeben. Einige Versuche, aus der verschieden stark und lange erhitzten Schmelze Kreatin oder Kreatinin zu isolieren, sind mir bisher nicht gelungen. Daß im Organismus eine Abspaltung der Methylgruppen des Cholins erfolgen kann, geht aus der interessanten Arbeit von v. Hoesslin¹⁾ aus Hofmeisters Laboratorium hervor. v. Hoesslin fand nach Verfütterung, besonders aber nach subcutaner Injektion von Cholinbromid eine Erhöhung der Ameisensäureausscheidung, die nach subcutaner Zufuhr etwa 71% der Methylgruppen des zugeführten Cholins entsprach. In der Diskussion seiner Versuchsergebnisse weist v. Hoesslin darauf hin, daß durch Abspaltung von Methylgruppen die Verbindung



aus dem Cholin entstehen könne, die ihrerseits mit einem «Guanidinrest» zur Vorstufe des Kreatins zusammentreten könnte. Einer experimentellen Verfolgung dieser Theorie mag damals wohl das Fehlen geeigneter Bestimmungsmethoden im Wege gestanden haben. Daß auch die CH_3 -Gruppen des Betains einer

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. 8. S. 27 (1906).

ähnlichen Abspaltung und Oxydation unterliegen können, ist a priori wahrscheinlich. Ein von mir ausgeführter orientierender Versuch spricht entschieden für diese Möglichkeit (Tabelle 2).

Tabelle 2.

Ameisensäureausscheidung
nach Injektion von Betainchlorid (mit NaOH neutralisiert).

Methodik siehe bei Pohl, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 31, S. 281 (1893),

Versuchstier: Kaninchen.

g Fütterung Hafer und Heu.

2 Vortage:	0,0398 g Na-Formiat	
2 Versuchstage:	0,0672 „	„ (Injektion von 8 g Betainchlorid, neutralisiert, innerhalb 48 Std.)
2 Nachtage:	0,0552 „	„
2 „	0,0388 „	„

Wie man sieht, ist eine Vermehrung recht deutlich, freilich steht sie nicht im Verhältnis zur Menge des injizierten Betains. Da die normalen Schwankungen der Ameisensäureausscheidung nicht bekannt sind, bedarf dieser Versuch einer weiteren Bestätigung. Sehr bemerkenswert sind die geringen Ameisensäurewerte, die mein Versuchstier normalerweise ausscheidet, täglich ca. 0,019 g Na-Formiat im Vergleich zu den hohen Werten von v. Hoesslin: 0,5—1,0 g. Ein zweites, gleichzeitig von mir untersuchtes Kaninchen schied bei gleicher Fütterung folgende 48stündige Mengen aus: 0,014, 0,013 g Na-Formiat. Hunde scheiden nach Pohl¹⁾ täglich wenige Milligramm bis 1 cg aus; in einem Kaninchenversuch dieses Autors beträgt der Wert 0,0082 g. Es liegt sehr nahe, die Verschiedenartigkeit der Fütterung als Erklärung heranzuziehen. Meine Versuchstiere erhielten Hafer und wenig Heu. v. Hoesslin gab fast ausschließlich Grünkohl oder Hafer plus Grünfutter. Hafer enthält kein Betain und wenig Cholin, Rüben und wohl auch anderes Grünfutter größere Mengen. Die Ameisensäureausscheidung in ihrer Abhängigkeit von methylierten Substanzen zu studieren, dürfte, auch im Hinblick auf die Fragen des Lecithinstoffwechsels, von Interesse sein; Untersuchungen dieser Art habe ich begonnen. Endlich habe ich mich noch eines

¹⁾ Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 31, S. 281 (1893).

andern Mittels bedient, um die leichte Abspaltung von Methylgruppen aus Cholin und Betain zu erweisen. Bekanntlich hat Hofmeister¹⁾ gezeigt, daß Natriumtellurit in einer Reihe von Organen unter gleichzeitiger Reduktion methyliert wird, wobei der äußerst widerwärtige, knoblauchartige Geruch des Tellurmethyls auftritt. Hofmeister hat, um die Quelle dieser Methylierung aufzufinden, eine Reihe methylhaltiger Substanzen im Reagenzglas bei Gegenwart eines Reduktionsmittels auf Natriumtellurit einwirken lassen, jedoch ohne positives Resultat. Es gelingt nun leicht, nachzuweisen, daß sowohl Cholin wie Betain das Tellur zu methylieren vermögen. Erwärmt man einige Krystalle Cholinchlorid mit einigen Körnchen Natriumtellurit und etwas Natriumformiat über kleiner Flamme vorsichtig bis zum Schmelzen, so tritt sehr schnell der abscheuliche Geruch nach Tellurmethyl auf. Auch mit Natriumamalgam erhält man das gleiche Resultat. Dieselbe Reaktion gibt auch Betain, und in Kontrollproben mit allen andern Mischungen: Formiat-Tellurit, Formiat-Cholin usw. erhält man negatives Resultat. Nur beim Erhitzen von Cholin mit Natriumtellurit tritt der Geruch ebenfalls auf: wahrscheinlich wirken irgend welche Zersetzungsprodukte des Cholin als Reduktionsmittel. Bei Gegenwart von wenig Wasser gelingt die Reaktion nicht. Diese Beobachtung macht es nicht unwahrscheinlich, daß auch die im Organismus oder in den überlebenden Organen von Hofmeister entdeckte Methylierung des Tellurs durch Methylgruppen des Cholins oder anderer, vielleicht in den Lecithinen vorhandener, tertiärer Ammoniumbasen zustande kommt.

Auf Grund der dargelegten Überlegungen und Vorversuche schien mir eine direkte Prüfung von Interesse, ob eine Kreatinbildung unter dem Einfluß von Cholin oder auch von Betain möglich ist. Versuche mit Zusatz von Betainchlorid (mit NaOH neutralisiert und mit Wasser bis zum Gehalt von 0,9% NaCl verdünnt) zu Muskelbrei, die ich schon gleichzeitig mit den Sarkosinversuchen anstellte, lieferten ebenfalls ganz wechselnde Ergebnisse; in zwei Versuchen merkliche Vermehrung, in drei Versuchen kein Einfluß. Ich wandte mich daher dem direkten

¹⁾ Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 33, S. 198 (1894).

Verfahren zu, das ja schon Jaffe mit Erfolg bei seinen Glykocyaminversuchen anwandte, indem ich versuchte, durch Injektion von Cholin oder Betain eine Vermehrung des Kreatingehalts der Muskeln zu erzielen. Schon die Versuche am Muskelbrei hatten mir die auffällige Konstanz der Kreatinwerte im normalen Kaninchenmuskel gezeigt. Bei Untersuchung der frischen Muskulatur, wobei die Methodik aufs strengste in allen Einzelheiten die gleiche blieb, wurde die Konstanz der Werte noch überraschender. Da für die Beurteilung der Versuche die genaue Kenntnis der Methodik unerlässlich ist, sei sie im folgenden beschrieben.

Die Tiere, die bis dahin in der üblichen Weise mit Hafer und Heu gefüttert waren, wurden aus der Carotis entblutet und sofort enthäutet. Die gesamte Muskulatur wurde schnell abpräpariert (mit Ausnahme der Bauchmuskeln), unter möglichster Reinigung von Fascien und vor allem von Fett. Die gesamte Masse wurde durch die Fleischmaschine geschickt und auf eine gründliche Mischung der verschiedenen Muskelanteile besonders geachtet. Von dem Brei wurden 3 Portionen zu 40 g auf einer guten Tariervage schnell abgewogen und jede Portion sofort in 150 ccm siedende 5%ige NaCl-Lösung gebracht. Nach Zusatz von etwas Essigsäure (15 bis 20 Tropfen 10%ige Lösung) wurde aufgekocht und sodann filtriert, die Hauptmenge der Koagula gleich noch einmal mit ca. 150—200 ccm Wasser aufgekocht und wieder filtriert. Koagula mitsamt dem Filter wurden dann mit einem Pistill gut verrieben und nun nochmals 3—4 mal mit erneuten Wassermengen ausgekocht, endlich auch auf dem Filter noch mit heißem Wasser ausgewaschen. Will man so lange auswachen, bis keine Spur NaCl im Waschwasser mehr nachweisbar ist, so muß man eventuell noch ein- oder zweimal öfter auskochen. Nötig ist es nicht; ich habe mich in einer Reihe von parallel durchgeführten Versuchen davon überzeugt, daß die nach viermaligem Auskochen erhaltenen Kreatinwerte, selbst wenn dann das Waschwasser nicht ganz NaCl-frei ist, genau übereinstimmen mit denen einer zweiten Probe, wo 6—7 mal, bis zur völligen NaCl-Freiheit, ausgekocht war. (S. z. B. Tab. 3, Versuch 17.)

Die wasserklaren, ganz schwach gelblich gefärbten Filtrate wurden auf dem Wasserbade eingeengt, dann in Erlenmeyer-Kolben übergeführt, auf 100 ccm gebracht und mit 9 ccm 25%iger HCl versetzt. Die hierbei regelmäßig auftretende geringe Flockung blieb unberücksichtigt. Die salzsauren Lösungen wurden 3 Stunden auf dem siedenden Wasserbade erhitzt, wobei die Färbung um eine Spur nachdunkelte, und nach dem Erkalten im Meßgefäß auf 150 ccm aufgefüllt. Je 4 ccm dienten zur Bestimmung nach Folin.

Ich verwandte das Kolorimeter von Autenrieth und Königsberger, das sich außerordentlich bequem handhabt und sehr gute Ablesungen gestattet. Der Ablesungsfehler beträgt höchstens 1 Teilstrich, entsprechend 0,2 mg Kreatinin. Einige tausend Bestimmungen mit diesem Apparat haben mir seine gute Verwendbarkeit bewiesen. Daß auch hier Übung im Ablesen erforderlich ist, bedarf kaum der Erwähnung. Die Eichung des Chromatkeils habe ich selbst mit Hilfe reinen Kreatins vorgenommen, das ich in genau der gleichen Weise wie bei den Muskelversuchen in Kreatinin überführte. Die Ablesung geschah stets an derselben Stelle des Laboratoriums bei zerstreutem, hellem Tageslicht; Sonnenlicht stört die Ablesung vollständig. Durch Kontrolle der Ablesungen durch andere, auch durch Ablesungen an Proben, deren Herkunft mir erst nach der Ablesung bekannt wurde, suchte ich die Objektivität der Ablesungen zu sichern. Es ist wichtig, daß alle Lösungen, auch das zum Verdünnen benutzte Wasser, gleiche Temperatur haben. In meinen Versuchen betrug die Temperatur der Lösungen 18—20°.

Es sei nun besonders darauf hingewiesen, daß für feinere vergleichende Bestimmungen die peinlich genaue Einhaltung gleicher Arbeitsweise, bis zu den Einzelheiten, unbedingt erforderlich ist. Vor allem muß man stets die gleiche Verdünnung des Muskelextrakts und stets den gleichen aliquoten Teil zur kolorimetrischen Bestimmung wählen. Selbst bei sorgfältigster Herstellung der Eichungskurve findet man sehr häufig, daß die bei Anwendung von z. B. 4 ccm einer Muskelkreatinlösung gefundene Menge mit der bei Anwendung

von 8 ccm derselben Lösung aus der Eichungskurve berechneten nicht genau übereinstimmt. Die Fehler können mitunter groß genug sein, um bei der nachher nötigen Multiplikation falsche Versuchsergebnisse herbeizuführen. Beim Harn ist der Fehler oft besonders groß. Man hat den Eindruck, daß irgendwelche im Muskelextrakt, besonders im Harn, anwesende Substanzen (Farbstoffe des Harns?) die an und für sich gute Proportionalität zwischen Kreatininmenge und Färbungsintensität beeinflussen. Meine Versuche zeigen, daß dieser Fehler durch Einhalten der obigen Bedingungen ganz zu vermeiden ist.

Der Gehalt normaler Kaninchenmuskeln an Kreatin.

Die mehrfach zitierte Arbeit von Myers und Fine gibt eine Übersicht über die von früheren Untersuchern gefundenen Werte. Sie zeigen annähernde Übereinstimmung, weisen aber immerhin noch Unterschiede auf, die nach meiner Anschauung lediglich auf der verschiedenen Bestimmungsweise der einzelnen Autoren beruhen. Überblickt man dagegen die Untersuchungsergebnisse von Myers und Fine und schaltet die vier niedrigen Werte aus, die diese Autoren selbst beanstanden, so finden wir in 12 von 17 Fällen genau den gleichen Wert 0,522% und zwar fast alle übereinstimmend bis auf die 3. Dezimale; die 5 übrigen Werte lauten: 0,540, 0,534, 0,494, 0,517, 0,516%. Demgegenüber stelle ich folgende Versuchsreihe an ausgewachsenen Kaninchen verschiedenen Gewichts (siehe Tabelle 3).

Man sieht also: Vollständige Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Myers und Fine und auffälligste Konstanz der Werte.

Versuche mit Injektion von Cholin.

Ich bediente mich einer von Kahlbaum bezogenen 25%igen Cholinlösung, die zum Zweck der Injektion mit HCl neutralisiert wurde. Kaninchen vertragen im allgemeinen Dosen von 0,5 g Cholin und 1,0 g pro Tag. Man ist aber immer der Gefahr ausgesetzt, auch einmal bei niedrigeren Dosen schwere Vergiftungen zu erhalten. Besonders häufig passiert es, daß Tiere, die am ersten Tage $2 \times 0,5$ g scheinbar anstandslos

Tabelle 3.

Ver- suchs- num- mer	Gewicht des Kaninchens g	Ablösungen am Kolori- meter für jede Muskel- portion	Kreatinin aus Kreatin in 40 g Muskel g	Kreatinin aus Kreatin in 100 g Muskel g	Kreatin in 100 g Muskel g	Bemerkungen
1	1670	1. 48 2. 47	0,182 (Mittel)	0,455	0,528	
5	1560	1. 48 2. 48 3. 48	0,180	0,450	0,521	
7	1480	1. 48 2. 48 3. 48	0,180	0,450	0,521	Erhielt 24 g Agfa-Lecithin in Dosen zu 1 g innerhalb 6 Tagen subcutan
8	2045	1. 48 2. 48	0,180	0,450	0,521	Erhielt subcutan 5 g Sarkosin in Dosen zu 1 g innerhalb 48 Std.
14	2120	1. 48 2. 46 ? ¹⁾	0,180 (0,188)	0,450 (0,470)	0,521 (0,545)	
17	2190	1. 48 2. 48 3. 48 4. 48	0,180	0,450	0,521	7mal ausgekocht

vertrugen und über Nacht mit bestem Appetit fraßen, nach der Injektion desselben oder gar einer geringeren Dosis am nächsten Morgen innerhalb 15—20 Minuten unter den Erscheinungen der Erstickung mit kurzen kaum 2 Minuten dauernden Krämpfen eingingen. Da ich einerseits naturgemäß die Dosis des Cholins nicht zu klein wählen wollte, andererseits jede Art von Krämpfen aus leicht ersichtlichen Gründen zu vermeiden hatte, so waren die Versuche ziemlich mühsam und wurden oft durch plötzlichen Tod der Tiere vereitelt. In den günstigen Fällen zeigten die Tiere außer sofort nach der Injektion einsetzendem Speichelfluß und einer etwa 2 Stunden dauernden Gedrücktheit und Freßunlust keinerlei Symptome, insbesondere keine sichtbare motorische Unruhe.

¹⁾ Ableseung zweifelhaft.

Tabelle 4.

Ver- suchs- Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Injektionsmenge und -art	Ablesungen am Kolorimeter für jede Portion	Kreatinin aus Kreatin in 40 g Muskel g	Kreatinin aus Kreatin in 100 g Muskel g	Kreatin in 100 g Muskel g	Prozent- zunahme gegenüber den Kontrollen	Absolute Zunahme (Muskula- tur=30% d. Körper- gewichts) g	Bemerkungen
2	1650	2,5 g Cholin in Dosen von 0,5 g innerhalb 48 Stunden	1. 42 2. 42 3. 42	0,208	0,520	0,603	+ 15,7	+ 0,54	
6	1485	2,25 g Cholin in Dosen von je 0,25 g inner- halb 48 Stunden	1. 48 2. 46/47	0,189 Mittel	0,473	0,549	?	?	
9	2150	3,45 g Cholin inner- halb von 4 × 24 Std. in Dosen von 0,5 g	1. 44/45 2. 44/45 3. 44/45	0,197	0,493	0,572	+ 9,8	+ 0,34	
11	2300	2,5 g Cholin in Dosen zu 0,5 g innerhalb 48 Stunden	1. 48 2. 48	0,180	0,450	0,521	0	0	
12	2330	1,75 g Cholin in 3 Dosen zu 0,5, 0,5 und 0,75 g innerhalb 24 Stunden	1. 45/46 2. 45/46 3. 45/46	0,193	0,483	0,560	+ 7,5	+ 0,28	Exitus 20 Minuten nach der letzten Dosis im Anfall; sofort verarbeitet
16	2000	1,7 g Cholinchlorid in Dosen zu 0,6, 0,6 und 0,5 g innerhalb 24 Stunden	1. 45 2. 45	0,195	0,488	0,566	+ 8,6	+ 0,35	Exitus im Anfall nach der 3. Dosis; sofort verarbeitet
18	2610	1,8 g Cholinchlorid in 3 Dosen zu 0,6 g innerhalb 24 Stunden	1. 48 2. 48 3. 48	0,180	0,450	0,521	0	0	Exitus im Anfall nach der 3. Dosis; sofort verarbeitet

Man ersieht aus den Versuchsprotokollen (s. Tab. 4), daß unter dem Einfluß des Cholins eine Vermehrung des Kreatingehalts der Muskeln in einigen Versuchen zutage tritt. Gegenüber der Konstanz der Ergebnisse bei normalen Kaninchen sind die Ausschläge sehr bemerkenswert. Mangelhafte Ernährung lag in keinem Versuch vor. Man könnte allerdings einwenden — und dieser Einwand gilt für alle derartigen Versuche —, daß die Jaffesche Reaktion vielleicht auch mit andern etwa aus dem Cholin entstehenden Substanzen eintritt. Cholin selbst gibt die Reaktion nicht. Gegen jenen Einwand spricht das Ergebnis eines Versuchs, wo ich auch das sogenannte präformierte Kreatinin bestimmte, d. h. diejenige Kreatininmenge, die man erhält, wenn man das Muskelextrakt mit BaCO_3 eindampft und dann nach Aufnehmen mit Wasser das Kreatinin nach Folin bestimmt. Dann müßte, wenn es sich nicht um eine Kreatinvermehrung, sondern um die Bildung anderer Substanzen handelte, die gesamte Vermehrung in dieser Fraktion erscheinen.

Tabelle 5.

Versuchs-Nr.	Injektion	Präformiertes Kreatinin in %	Gesamtkreatinin in %
1	—	0,094	0,455
2	2,5 g Cholin innerhalb 48 Stunden	0,075	0,520

Wie Tabelle 5 zeigt, ist in dem Cholinversuch Nr. 2 keine Spur einer Vermehrung des «präformierten Kreatinins» gegenüber dem normalen Werte vorhanden. Erst nach dem Erhitzen mit HCl tritt der Unterschied gegenüber der Kontrollprobe ein.

Ein weiterer Einwand betrifft die Frage, ob nicht etwa durch das Cholin eine Tonuserhöhung der Muskulatur oder eine andere toxische Wirkung auf den Stoffwechsel des Muskels ausgeübt wird. Dieser Einwand läßt sich nur durch Variation der Versuchsbedingungen, Versuche am durchbluteten überlebenden Muskel, wenn nicht ganz, so doch teilweise aus der Welt schaffen. Die Fortsetzung meiner Arbeiten wird hauptsächlich solche Versuche berücksichtigen.

Die beste Erwiderung auf jenen Einwand bieten indessen die Versuche mit Betain. Betain ist bekanntlich eine völlig unschädliche Substanz. Diejenigen Autoren, die, wie Kohlrausch,¹⁾ toxische Wirkungen des Betainchlorids beschrieben und diese auf das Betain zurückführten, haben offensichtlich übersehen, daß Betainchlorid in wässriger Lösung reichlich freie Salzsäure abspaltet, sodaß sie in ihren Versuchen einfach eine Wirkung freier HCl erhielten. Neutralisiert man Betainhydrochlorid mit NaOH, so kann man mehrere Gramm der Substanz täglich injizieren, ohne die geringste Einwirkung zu beobachten. Nur einmal, als ich 2 g mit Ammoniak statt mit NaOH neutralisierten Betainchlorids einem Kaninchen injizierte, bekam das Tier einen schweren Kollaps. Mehr als eine Stunde lag es mit starker Atemnot und rhythmisch wiederkehrenden krampfhaften Zwerchfellkontraktionen im Käfig; gleichzeitig trat Speichelfluß auf. Zur Beurteilung dieser Symptome muß daran erinnert werden, daß das Tier mit den 2 g Betainhydrochlorid 0,35 g NH_4Cl injiziert bekam, das bekanntlich eine toxische Wirkung ausübt und ebenfalls auf das Atemzentrum wirkt. Abgesehen von diesem einen Fall, der in der folgenden Tabelle nicht angeführt ist, war nie auch nur die geringste Wirkung des neutralisierten Betainchlorids zu merken. Die Tiere gediehen gut, fraßen und nahmen während des Versuchs an Gewicht zu (siehe Tabelle 6).

Wie die Tabelle zeigt, sind alle Betainversuche positiv verlaufen. Die Vermehrung ist allerdings nicht groß und steht nicht im Verhältnis zu der injizierten Menge des Salzes.

Zum Schluß seien noch zwei Versuche angeführt; der eine mit Sarkosin, der andere mit Lecithin-Agfa. Letzterer Versuch sollte eventuell Anhalt für die Annahme einer Bildung von Kreatin aus dem Cholin des Lecithins geben. Da das Agfa-Lecithin kein natives und vor allem kein Kaninchenlecithin ist und da wahrscheinlich auch für die Verwertung der Lipoide es durchaus nicht gleichgültig ist, ob diese Substanzen körpereigen sind oder nicht, vor allem ob sie ihre natürliche Zusammensetzung und Zersetzlichkeit noch besitzen oder schon

¹⁾ Centralbl. f. Physiol., Bd. 23, S. 143 (1909).

Tabelle 6.

Ver- suchs- Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Injektionsmenge und -art	Ableesungen am Kolorimeter für jede Probe	Kreatinin aus Kreatin in 40 g Muskel g	Kreatinin aus Kreatin in 100 g Muskel g	Kreatin in 100 g Muskel g	Prozentische Zunahme	Absolute Zunahme (Muskulatur = 30% des Körpergewichts) g
3	3600	4,8 g Betainchlorid, mit NaOH neutralisiert, in Dosen von 2, 2 u. 0,8 g innerhalb 12 Stunden	1. 44/45 2. 44/45	0,197	0,493	0,572	+ 9,8	+ 0,55
4	1400	8 g Betainchlorid, neutralisiert, in Dosen zu 1 und 2 g innerhalb 48 Stunden	1. 46 2. 46 3. 46	0,191	0,478	0,554	+ 6,3	+ 0,14
10	2600	8 g Betainchlorid, neutralisiert, in Dosen à 2 g innerhalb 24 Stunden	1. 46 2. 45 3. 46	0,192	0,480	0,557	+ 6,9	+ 0,18
13	2200	12 g Betainchlorid, neutralisiert, in 6 Dosen zu 2 g innerhalb 31 Stunden	1. 43 2. 44 3. 44	0,200	0,500	0,580	+ 11,3	+ 0,39
15	2210	9,5 g Betainchlorid, neutralisiert, in Dosen zu 2, 2,5 und 1 g innerhalb 31 Stunden	1. 45 2. 45 4. 45	0,195	0,488	0,566	+ 8,7	+ 0,3

verändert sind, so erwartete ich von diesem Versuch von vornherein nicht viel. Das Kaninchen erhielt innerhalb 6 Tagen 24 g Lecithin mit einem Cholingehalt von ca. 2,4 g.

Das Ergebnis ist denn auch ein negatives und der Kreatingehalt normal. Auch die Injektion von Sarkosin in Mengen von insgesamt 5 g führte in diesem einen Versuch nicht zur Vermehrung des Muskelkreatins (s. Tabelle 2, Versuche 7 und 8).

Kreatininausscheidung nach Injektion von Betain.

Zur Frage der Kreatininausscheidung nach subcutaner Zufuhr von Betain verfüge ich vorläufig nur über einen Versuch. Zur Technik vergleichender Kreatininbestimmungen im Kaninchenharn sei folgendes bemerkt: 1. Angesichts der unregelmäßigen Harnausscheidung sind beim Kaninchen 48 stündige Versuchsperioden den 24 stündigen vorzuziehen. Eine Gefahr, daß der am ersten Tage gelassene Urin am Folgetage schon Zersetzung des Kreatinins zeigt, ist, wie ich in mehreren Versuchen besonders feststellte, nicht zu befürchten. Dennoch tut man gut, die Harnportionen des ersten Tages in der Kälte aufzubewahren.

2. Es ist unbedingt nötig, den Harn stets auf das gleiche Maß zu verdünnen. Am besten wählt man die Verdünnung ziemlich groß, um nicht durch bei Kaninchen häufiger auftretende plötzliche Diuresen mitten in einer Versuchsreihe auf eine andere Verdünnung übergehen zu müssen. Bei Ernährung mit Hafer und Heu wählte ich die Verdünnung auf 400 ccm, wovon je 10 ccm zur kolorimetrischen Bestimmung dienten. Die Anordnung hat den Vorteil, daß die abgelesenen Zahlen der Skala direkt miteinander vergleichbar sind. Sie ist notwendig, weil, wie oben schon erwähnt, die Ablesungen bei verschiedenen konzentrierten Harnen nicht unmittelbar vergleichbar sind. Dagegen bekommt man genau übereinstimmende Werte, wenn man die doppelte Verdünnung herstellt und nunmehr auch die doppelte Anzahl Kubikzentimeter zur Bestimmung wählt.

Weiter muß man sich darüber klar sein, in welcher Weise eine etwa vermehrte Kreatinbildung im Muskel in der Kreatininausscheidung zum Ausdruck kommen kann. Auf Grund zahl-

reicher Untersuchungen dürfen wir annehmen, daß neu gebildetes Kreatin ganz oder zum größten Teil am Ort seiner Bildung, also im Muskel, gespeichert werden kann. Da nun das Muskelkreatin normalerweise als Kreatinin ausgeschieden wird, so wird voraussichtlich auch jenes Mehr als Kreatinin erscheinen müssen, wenn nicht etwa so viel Kreatin neu gebildet wird, daß der Organismus seine Umwandlung in Kreatinin nicht mehr bewältigen kann, sodaß Kreatin als solches im Harn erscheint. Eine weitere Konsequenz der Annahme einer Kreatinspeicherung des Muskels ist dann die Forderung, daß die Ausscheidung des über das normale Maß hinaus gebildeten Kreatins eine allmähliche ist. Ohne diese Annahme wäre die Tatsache einer Speicherung unverständlich. Ein Kaninchen von 2000 g Gewicht enthält mindestens 30% seines Gewichts an Muskelsubstanz. Da der Prozentgehalt der Muskulatur an Kreatin 0,521 g beträgt, so ist der Gesamtkreatingehalt des Körpers auf mindestens 3,1 g Kreatin zu schätzen. Hiervon werden täglich etwa 0,12 g (entsprechend 0,1 g Kreatinin) ausgeschieden, also knapp 4%. Nimmt man an, daß unter irgendwelchen experimentellen Bedingungen, z. B. nach Injektion von Betain, der Gesamtvorrat an Kreatin von 3,1 auf 3,4 g gestiegen ist und macht man die weitere Annahme, daß die prozentuale Menge des hiervon als Kreatinin ausgeschiedenen durch diesen geringen Zuwachs nicht beeinflußt wird, so sollte man nach dem Eintritt der angegebenen Vermehrung des Muskelkreatins am Folgetage eine Mehrausscheidung von 0,01 g Kreatinin erwarten, die dann mit der allmählichen Erschöpfung des Kreatinüberschusses im Muskel an den nächsten Tagen langsam herabgehen würde. Wahrscheinlich wird der Ausgleich doch ein wenig schneller verlaufen. Immerhin haben wir gar kein Recht, eine sofortige Vermehrung der Kreatininausscheidung in der Höhe des Gesamtbetrages des neu gebildeten Kreatins zu erwarten. Man hat früher offensichtlich diese Erwägung nicht in Betracht gezogen, wie ein Überblick älterer Arbeiten leicht erkennen läßt. Manche scheinbar negativ verlaufenen Versuche über die Beeinflussung der Kreatininausscheidung nach Arbeit gewinnen ein ganz anderes Gesicht, wenn die Ausscheidung mehrerer Tage beachtet wird. Man

erinnere sich an die Kritik, die Gregor an Voits und Hoffmanns Zahlen in diesem Sinne geübt hat. In Jaffes Versuchen tritt die langdauernde Ausscheidung von im Muskel abgelagertem Kreatinüberschuß besonders deutlich hervor. In mehreren seiner Versuche tritt noch in der zweiten viertägigen Periode eine starke Vermehrung des Harnkreatinins zutage. Ebenso finden wir in den Arbeiten der holländischen Schule stets eine Berücksichtigung des Faktors und in vielen ihrer Versuche den Beweis der Richtigkeit der Annahme. Betrachten wir von diesem Standpunkte aus den in Tabelle 7 niedergelegten Versuch über die Kreatininausscheidung nach der Injektion von Betain, so sehen wir folgendes: Nach der Betaininjektion steigt die Kreatininausscheidung merklich, wenn auch nicht erheblich, an: 10 Tage lang hält sie sich annähernd auf gleicher Höhe, fällt am 11. und 12. Tage ab und ist vom 13. Tage ab wieder normal. Das Tier nahm an Gewicht zu. Das Mittel der Ausscheidungen an 3×2 Vor- und 3×2 Nachtagen beträgt 0,17 g in 48 Stunden. An den 5×2 Tagen, die der Betaininjektion folgen, beträgt die Gesamtausscheidung 0,96 g Kreatinin. Die Vermehrung gegenüber der Durchschnittsausscheidung im gleichen Zeitraum beträgt 0,11 g Kreatinin = 0,13 g Kreatin. Das entspricht der Größenordnung nach der geringsten von mir beobachteten Kreatinvermehrung im Muskel nach Betaininjektion. Nach der Injektion der NaCl- bzw. NH_4Cl -reichen Betainlösungen trat merkliche Diurese ein. Daß diese allein die Vermehrung des Kreatinins nicht bedingt, geht aus einer großen Anzahl von Beobachtungen hervor, die ich machte, und von denen hier nur zwei angeführt seien.

I. Kaninchen, 3000 g.

17. III. 105 ccm Urin, präformiertes Kreatinin 0,208 g.

19. III. 225 „ „ „ „ „ 0,182 g.

Also sogar eine Abnahme des Kreatininwertes, trotz Diurese.

II. Kaninchen, 2300 g.

19. IV. 70 ccm Urin (Hafer-Heufütterung), präformiertes Kreatinin 0,158 g.

Tabelle 7.

452

Otto Riesser,

Datum	Urinmenge von je 2×24 Stunden ccm	Ver- dünnung ccm	Zur Be- stimmung an- gewandt ccm	Ableseung am Kolori- meter	Präfor- mierles Kreatinin in g	Ableseung nach dem Erhitzen mit HCl	Gesamt- Kreatinin in g	Gewicht des Kaninchens in g	Bemerkungen
22. III.	nicht gemessen	201	5	50	0,183	50	0,183	2345	Futter dauernd: Hafer, Heu, Wasser Vom 27. -- 30. erhält das Tier insgesamt 15 g Betainchlorid, neutrali- siert mit NaOH, zum Teil mit NH ₃
24.	,	201	5	54	0,165	54	0,165	2290	
26.	,	201	5	54	0,165	54	0,165	2450	
28.	Diurese ca. 300 ccm	400	10	45	0,208	44	0,212	2340	
30.	370	500	12,5	1. 51 2. 51	0,178	51	0,178	2270	
1. IV.	190	405	10	1. 50 2. 50	0,184	1. 47/48 2. 47	0,200	2370	
3.	155	400	10	47	0,198	47	0,198	2440	
5.	145	400	10	48	0,192	—	—	2550	
7.	145	400	10	52	0,174	52	0,174	2580	
9.	90	400	10	54	0,164	53	0,168	2645	
11.	85	200	5	54	0,164	54	0,164	2715	

21. IV. 560 ccm Urin (Fütterung mit 600 ccm Milch), präformiertes Kreatinin 0,158 g.

Trotz äußerst stark vermehrter Durchspülung des Körpers bleibt die Kreatininausscheidung konstant. Weitere Versuche über die Beeinflussung der Kreatininausscheidung durch Betain- oder Cholininjektion sind im Gang. Auch der Einfluß injizierter NaCl- und NH_4Cl -Lösungen bedarf kontrollierender Untersuchung.

Meine bisherigen Untersuchungen beanspruchen keineswegs den Wert eines Beweises für die Möglichkeit einer Kreatinbildung aus Cholin bzw. Betain. Sie ermuntern indessen dazu, die Untersuchungen nach dieser Richtung fortzusetzen. Dabei werde ich die Argininfrage nicht vernachlässigen und besondere Versuche über die Beeinflussung des Muskelkreatins wie des Harnkreatinins durch Arginininjektion auf Grund der nunmehr zu klareren Resultaten führenden Versuchsanordnung anstellen.