

Die Adenosintriphosphorsäure im vitalen und postmortalen Blut

ULRIKE DECKART[†]

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
— Verkehrsmedizin (Prof. Dr. H. KLEIN) —

Eingegangen am 15. Januar 1967

In Untersuchungen über die Agonie — in den letzten Jahren vor allem von LAVES (1965) durchgeführt — ist die zentrale Bedeutung des Adenosintriphosphat zu erkennen. Da die ATP-Konzentration des postmortalen Blutes ein bedeutsamer Faktor für verschiedene supra- und postvitale Reaktionen ist, wurde zur Kennzeichnung des postmortalen Verhaltens, gleichzeitig als Grundlage einer exakten Bestimmung, der physiologische ATP-Gehalt des Blutes und die Frage des Abbaues, auch die vitale Blut zugesetzter ATP, untersucht.

Zur Charakteristik des Adenosintriphosphat, Bedeutung für supravitale Reaktionen

Adenosintriphosphorsäure, ein Mononucleotid, 1929 von LOHMANN isoliert, konstituiert sich aus der Purinbase Adenin, dem Zucker Ribose und aus drei säure-anhydridartig gebundenen Phosphorsäuren. Die Vorstufen des ATP, die Adenosinmono-phosphorsäure (AMP) und die Adenosin-di-phosphorsäure (ADP) enthalten nur eine bzw. zwei Phosphorsäuren, die mit der OH-Gruppe in fünf Stellungen an der Ribose verestert sind. Das ATP wird im intermediären Stoffwechsel durch oxidative und glykolytische Phosphorylierung gebildet und enthält eine potentielle chemische Energie, die unmittelbar für die meisten biochemischen Reaktionen verwendet wird. Dabei reagiert nur die endständige Phosphatgruppe, die unmittelbar unter Bildung von ADP abgespalten wird. Dieses kann bei Energienahme wieder zu ATP phosphoryliert werden. Seine Bildung aus anorganischem Phosphat und der ubiquitären Adenylysäure über AMP und ADP erfolgt nur bei Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen. Das ATP hat als Energieträger eine zentrale Stellung im Stoffwechsel. Es dient als Phosphat- und Energieüberträger bei der Synthese von Nucleoproteiden, Purinen, Phosphatiden, Proteinen und Kohlenhydraten sowie als Aktivator beim Ana- und Katabolismus der Fettsäuren, bei der Bildung von aktiven Methylgruppen und aktiviertem Sulfat. Darüberhinaus bringt es die Aktin- und Myosinfibrillen zur Kontraktion und wirkt als Chelatbildner (Weichmacher). Weiterhin wirkt es aktivierend bei der Retraktion der Thrombocyten in Anwesenheit des contractilen Thrombocyten-Actomyosin in der letzten Phase der Blutgerinnung, das sich, wie beim Muskel, unter Anwesenheit von ATP kontrahiert.

Neben Hämoglobin, Nicht-Hämoglobin-Protein (Gerüsteiweiße, Phosphatide, Mucopolysaccharide), Lipoiden und Glutathion enthält der Erythrocyt eine geringe Menge von ADP und ATP (3 mmol/l), sowie 2,3-Glycerophosphat und eine Reihe von Fermenten. Die Energiebereitstellung für die Stoffwechselleistung des

Erythrocyten geschieht vorwiegend durch die (anaerobe) Glykolyse, das dabei erzeugte ATP bildet die Grundsubstanz zur Erhaltung des Erythrocytenaufbaues, der -Funktion und der Ionenzusammensetzung (STRAUB: Aufrechterhaltung der hohen K- und niedrigen Na-Konzentration) sowie des Wechselspiels mit dem umgebenden Plasma (aktiver Kationentransport).

Neben der schon beschriebenen Wirkung auf die Kontraktion und Erschlaffung der Myosinfaser, die auch therapeutisch durch Zufuhr von Reinsubstanz (Atriphos®) oder in Form von tierischen Organ- oder Herzmuskelextrakten (Embran®, Extractum Cor® usw.), in denen Adenylsäurederivate enthalten sind, erfolgt, haben diese Verbindungen eine stark gefäßerweiternde Wirkung. Ihr Angriffspunkt ist nur peripher an der glatten Muskulatur der Gefäße, der Bronchiolen und der inneren Organe.

Angewandte Methoden

Aus Gründen, die sich während der Untersuchungen ergaben, wird es notwendig sein, einige methodische Einzelheiten näher zu erläutern.

1. *Entnahme des Untersuchungsmaterials.* Zur Bestimmung der Normalwerte des ATP-Gehaltes wie zu Untersuchungen über den Abbau in vitro zugesetzten ATP in Abhängigkeit von der Zeit diente aus der V. cubitalis entnommenes Blut. Die Personen befanden sich zur Zeit der Blutentnahme unter Grundumsatzbedingungen. Zur Verhinderung der Gerinnung wurde das Blut sofort mit Liquemin® (= Heparin, Deutsche Hoffmann La Roche) versetzt. Zur Feststellung des ATP-Spiegels im Leichenblut erfolgten drei Punktionen der V. femoralis durchschnittlich in Abständen von 6 Std.

2. *ATP-Bestimmung.* Der ATP-Gehalt des Blutes wurde in allen Fällen nach der Methode von BÜCHER und SCHUART gemäß dem Prinzip des optischen Testes nach WARBURG durchgeführt. Die Messungen wurden am Spektralphotometer Zeiss MQ4 oder Photometer Eppendorf vorgenommen.

3. *Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes im Blut.* Zur Durchführung des enzymatischen Tests muß das jeweilige Untersuchungsmaterial enteiweißt werden. Dazu wurde zu 1 ml heparinisiertem Blut [0,9 ml Blut und 0,1 ml Liquemin® (= 500 IE Heparin)] in einem Zentrifugengläschen 1 ml eiskalte 6 %ige Perchlorsäure gegeben. Nach sorgfältigem Umrühren mit einem Glasstab und 10 min langem Stehenlassen in Eis wurde 10 min lang bei 4000—5000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dekantiert und nach Temperieren auf ca. + 23° C zum Test eingesetzt. Das Reaktionsgemisch enthält 0,10 m Triäthanolaminpuffer pH 7,6, $4 \cdot 10^{-3}$ m Magnesiumsulfat, $6 \cdot 10^{-3}$ m D-(—)-3-Phosphoglycerat, Aqua bidest. ad 50 ml. Nacheinander wurden in die Cuvette pipettiert 2,40 ml Reaktionsgemisch, 0,04 ml $1,2 \cdot 10^{-2}$ m reduz. Nicotin-amin-adeninindinucleotid (NADH₂), 0,20 ml Überstand. Zur Kontrolle sorgfältigen Arbeitens wurde nach Einfüllen des Puffers in die Cuvette die Lichtmarke des Photometers bei offenem Strahlengang auf Null eingestellt und jeweils nach Einpipettieren der DPNH-Lösung und des Überstandes, nach sorgfältigem Umrühren mit einem Glasstäbchen, die Extinktion abgelesen und notiert. Die Reaktion wurde durch Einbringen des Enzymgemisches = 0,04 ml GAPDH/PGK in die Cuvette gestartet. In Abständen von einer Minute wurde die Extinktion abgelesen. War die Reaktion nach 3—4 min nicht beendet, so wurde graphisch auf die Zeit t_0 , d. h. den Start der Reaktion, extrapoliert, dieser Wert der weiteren Berechnung zu Grunde gelegt.

4. *Inkubation von ATP in Blut.* a) ATP-Stammlösung: Zur Herstellung der ATP-Stammlösung wurde ein kristallisiertes ATP-Natrium-Salz (ATP-Na₂H₂-3H₂O/Molekulargewicht 605,2) verwendet. Es wurden 300 mg ATP-Na-Salz in 10 ml Aqua bidest. gelöst. Die Stammlösung wurde für jeden Versuch frisch hergestellt.

Die dann zu erwartende Endkonzentration bei sofort nach der ATP-Zugabe abgestoppter Reaktion (Röhrchen 1 = Ausgangs- oder Nullwert, s. unten), müßte 3,0 mg zugesetzter, und x mg im verwendeten Blut ursprünglich vorhandener ATP sein. b) Durchführung der Inkubation: Die Reaktionsansätze in den einzelnen Zentrifugenröhren wurden wie folgt hergestellt:

1. Röhrchen (Nullwert): 1 ml eiskalte Perchlorsäure, 1 ml heparinisiertes Blut, 0,01 ml 3 g-%ige ATP-Stammlösung.
2. Röhrchen: 1 ml heparinisiertes Blut, 0,01 ml 3 g-%ige ATP-Stammlösung, nach 5 min Zugabe von 1 ml Perchlorsäure.
3. Röhrchen: 1 ml heparinisiertes Blut, 0,01 ml 3 g-%ige ATP-Stammlösung nach 10 min Zugabe von 1 ml Perchlorsäure.
4. Röhrchen: 1 ml heparinisiertes Blut, 0,01 ml 3 g-%ige ATP-Stammlösung, nach 20 min Zugabe von 1 ml Perchlorsäure.
5. Röhrchen: 1 ml heparinisiertes Blut, 0,01 ml 3 g-%ige ATP-Stammlösung, nach 40 min Zugabe von 1 ml Perchlorsäure.

Die vorbereiteten Zentrifugenröhren wurden, wie oben angegeben, weiterbehandelt. Der nach Zentrifugieren dekantierte Überstand (pH 2) wurde mit KOH neutralisiert: 1 ml des dekantierten Überstandes wurde mit ca. 0,15 ml in KOH neutralisiert, 10 min in Eis stehengelassen (Ausfällung von KClO_4), anschließend 10 min lang bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert, nach Dekantieren des Überstandes 0,2 ml zum Test angesetzt.

5. *ATP-Bestimmung im Leichenblut.* Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden von jeder Leiche drei Blutproben entnommen. Zur Enteiweißung wurden 1 ml Blut 2 ml eiskalter Perchlorsäure zugesetzt, da bei der üblichen Zugabe von 1 ml Perchlorsäure kein klarer Überstand zu erzielen war. Die Weiterbehandlung erfolgte wie zur Bestimmung des physiologischen ATP-Gehaltes.

6. *Berechnung.* a) Normalwerte. Neben der bekannten Berechnung des ATP-Gehaltes in mg-% müßte, zum Ausgleich der Zugabe von 0,1 ml Liquemin auf 1 ml Blut, folgende Zwischenrechnung eingeschaltet werden: Die gefundene Extinktionsdifferenz Δ_E entspricht 0,9 ml Blut; sie muß mit 1,1 multipliziert werden, um auf 1 ml Blut bezogen zu sein: wenn Δ_E mit 0,035 in 0,9 ml Blut ermittelt wurde, beträgt die ATP-Konzentration: $0,035 \cdot 1,1 \cdot 380,9 = 14,67 \text{ mg\% ATP}$.

b) Abbau zugefügter ATP. Da es sich bei der dem Blut zugefügten Menge nicht um reine ATP, sondern um ihr mit 3 Mol Wasser kristallisiertes Di-Natrium-Salz mit der Summenformel $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ handelt, muß der für die Berechnung von reiner ATP in 1 ml Blut angegebene Faktor von 380,9 umgerechnet werden. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes von ATP als freie Säure (MG 507,0) und von $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (MG 605,2) ergibt sich ein Korrekturfaktor von 454,7. Um absolute Werte angeben zu können, wurde die durch Neutralisation mit ca. 0,15 ml in KOH hervorgerufene Verdünnung des Überstandes durch einen Korrekturfaktor von 1,18 berücksichtigt. Wenn Δ_E 0,562 ermittelt wurde, beträgt die ATP-Konzentration:

$$0,562 \cdot 1,18 \cdot 454,7 = 301,5 \text{ mg pro 1 mg Blut.}$$

Die ursprünglich im Patientenblut vorhandene Menge ATP konnte vernachlässigt werden, da für einen Versuchsgang stets Blut vom gleichen Patienten verwendet wurde, die Ausgangsbedingungen für die Röhrchen 1 bis 5 jedesmal konstant waren.

c) Leichenblutbestimmungen. Da bei den Leichenblutbestimmungen mit 2 ml Perchlorsäure enteiweißt wurde, statt wie vorgeschrieben mit 1 ml, mußte die gefundene Extinktionsdifferenz Δ_E mit 1,5 multipliziert werden.

Einzelergebnisse

1. *Normalwerte.* Zur Bestimmung des physiologischen ATP-Gehaltes im menschlichen Vollblut wurde Blut von 50 Personen im Alter von 18—65 Jahren aus der Armvene entnommen. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 1. *Normalwerte bei 50 Personen unter Grundumsatzbedingungen*

ATP-Gehalt in mg-% im Bereich von			
0—10	10—20	20—30	30—40
5,56	10,05	20,53	30,58
7,96	10,05	20,94	31,42
	10,47	21,36	31,42
	10,89	22,40	32,68
	12,56	23,04	33,51
	12,56	23,46	34,35
	12,98	23,88	37,29
	13,40	25,40	37,70
	13,82	25,97	39,80
	13,82	26,39	42,05
	14,24	26,39	44,41
	14,66	27,65	
	14,66	28,91	
	15,08	28,91	
	15,50	29,74	
	17,17	29,74	
	18,43		
	18,85		
	18,85		
	18,86		
	19,69		

Der Mittelwert aller untersuchten Fälle beträgt 22,4 mg-% ATP, die mittlere Abweichung beträgt $S = \pm 4,7$.

2. *Abbau zugefügter ATP.* In folgenden Versuchen soll geprüft werden, ob dem menschlichen Vollblut zugefügte ATP nach 40 min Inkubationsdauer abgebaut wird. Dabei entspricht Röhrchen 1 ATP-Bestimmung bei sofort abgestoppter Reaktion, Röhrchen 2 bei einer Inkubationsdauer von 5 min, Röhrchen 3 von 10 min, Röhrchen 4 von 20 min und Röhrchen 5 von 40 min. Für je einen Versuchsgang wurde dabei Blut von je einem Patienten verwendet (Versuchsnummer 1—10). Bei allen Versuchsgruppen fanden sich in den Röhrchen 1—5 ATP-Werte in gleicher Höhe. Die Ergebnisse der Einzelmessungen lagen im Bereich der physiologischen Streubreite (Tabelle 2).

3. *Beeinflussung des ATP-Gehaltes durch zugesetztes Heparin.* Zur Durchführung der Untersuchungen mußte die Blutgerinnung unter-

Tabelle 2

Versuchsnummer	0 min	5 min	10 min	20 min	40 min
1	—	2559,3	2411,8	2575,3	2747,1
2	3079,7	2977,8	3069,0	3063,0	—
3	2682,7	2688,1	2682,7	2672,0	2661,2
4	3015,4	3058,3	2895,7	2929,5	3047,5
5	2714,9	2784,6	3031,4	2859,7	—
6	3004,6	2993,9	2897,3	3058,3	3004,6
7	2988,5	3299,7	2999,2	3004,6	3004,6
8	3085,1	3063,6	3085,1	3074,4	3042,2
9	3133,4	3144,1	3160,2	3138,7	3138,7
10	2215,9	2285,6	2291,0	2269,5	2296,4

bunden werden. Unter Citratusatz ist ein ATP-Verlust der Erythrocyten bekannt (MOTTHADEDIN). Deshalb wurde Heparin (Liquemin®) dem Blut zugefügt. Es geht mit Eiweißen salzartige Bindungen ein: als Heparin-Albumin-Komplex hemmt es die Blutgerinnung durch Einwirkung auf Thrombin. Damit wird die unmittelbare Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin sowie des Prothrombins in Thrombin verhindert. Deshalb war zu überprüfen, ob Heparin den physiologischen ATP-Gehalt des Blutes bzw. einen ATP-Zusatz zu beeinträchtigen vermag. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Bei Versuch 1 und 2 wurden 150 μ ATP direkt in die Cuvette pipettiert, in 3 und 4 wurden 0,01 ml 3%iger ATP-Stammlösung einem ml Blut zugefügt, bis zu 40 min inkubiert, dann enzymatisch bestimmt. Der ATP-Gehalt wird bei der Inkubation im Blut durch Heparin nicht beeinflußt. Damit können die Befunde von HORN und BRUNS bestätigt werden.

Tabelle 3. Beeinflussung des ATP-Gehaltes im Blut durch Zusatz von Heparin

Versuch	0 min	5 min	10 min	20 min	40 min
1. Ohne Liquemin, ohne Blut	145	—	—	—	—
2. Mit Liquemin, ohne Blut	140	—	—	—	—
3. Ohne Liquemin, mit Blut	2414	2440	2442	2420	2420
4. Mit Liquemin, mit Blut	2218	2285	2292	2270	2298

4. *ATP-Gehalt im Leichenblut.* Um zu prüfen, wieweit eine Zu- oder Abnahme der ATP-Konzentration, eine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Todeszeit in Betracht kommt, wurden ATP-Bestimmungen im Blut von 28 Leichen durchgeführt. Unabhängig von der Zeit des eingetretenen Todes (die in einigen Fällen nicht ermittelt werden konnte)

erfolgten Blutentnahmen aus der V. femoralis. Aus äußersten Umständen konnte die Entnahme des Blutes nicht in konstanten Zeitabständen erfolgen; sie wurde im allgemeinen dreimal von der gleichen Leiche entnommen. Im äußersten Fall lag das Zeitintervall von der ersten bis zur letzten Entnahme bei 28, im geringsten bei 6 Std. Die Einzelwerte der ATP-Bestimmung sind in Tabelle 4 und der graphischen Darstellung

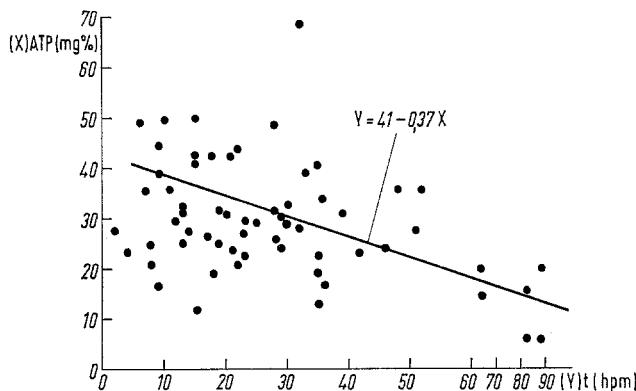


Abb. 1. Regression der ATP-Konzentration im Blut auf die Zeit nach dem Tode

(Abb. 1) angeführt. Da der ATP-Gehalt sowohl gleichbleibende, abfallende und ansteigende Werte hatte, war eine statistische Prüfung erforderlich.

A. Berechnung: Bis 28 Std nach dem Tode.

Es wurde geprüft, ob unabhängig von der Höhe des unbekannten ATP-Blutspiegels bei Eintritt des Todes und unabhängig von der nach dem Tode verstrichenen Zeit ein Konzentrationsabfall postmortal nachzuweisen ist. Da die Zeitabstände der Blutentnahmen nicht konstant gehalten werden konnten, mußten Gruppen für die statistische Prüfung gebildet werden: Gruppe A enthält die Meßwerte der jeweils ersten Blutentnahme, Gruppe B umfaßt Meßwerte von Blutentnahmen 5 bis 8 Std, Gruppe C von 10—18 Std, Gruppe D von 20—28 Std nach der ersten Entnahme. Es wurde geprüft, ob die Mittelwerte (\bar{x}) der einzelnen Gruppen (Stichproben) aus der gleichen Grundgesamtheit (μ) stammen; nacheinander wurden je zwei Gruppen (A mit B; A mit C; A mit D) nach dem *t*-Test verglichen.

Da bei Prüfung der Mittelwerte in allen drei Gruppen (A zu B; A zu C; A zu D) $t_{er} < t_{taf}$ ist, besteht bei Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1% in keinem Falle ein signifikanter Unterschied. Die Mittelwerte aller geprüften Stichproben entstammen einer Grundgesamtheit (μ), so daß die beobachteten Unterschiede zufällig sind, die

Tabelle 4. *ATP-Gehalt (mg-%) von Leichenbluten zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Tode*

Nr.	Todesursache	Entnahme (Std p.m.)	ATP- Konzentration (mg-%)	
1	Autounfall, Hirnhaut- blutung	74	14,3	
		82	15,5	
		88	19,9	
2	Autounfall, Schädelzertrüm- merung	64	19,8	Blutentnahme aus Bauch- höhle
		82	5,7	
		88	5,7	
3	Verkehrsunfall, Pneumonie	—	32,7	Todeszeit un- bekannt
			39,7	
			42,5	
4	Erhängung	4	23,1	—
		10	49,6	
		28	48,4	
5	Verkehrsunfall, Hirn- zertrümmerung	36	16,7	—
		48	35,4	
		52	35,4	
6	Eitriges Meningitis	17	42,3	—
		22	43,7	
		35	40,6	
7	Verkehrsunfall, peretrochan- täre Oberschenkelfraktur, Lungenembolie	9	16,6	—
		15	12,0	
		35	13,1	
8	Verkehrsunfall, Hirn- kontusion, Pneumonie	13	31,9	—
		19	31,4	
		39	30,9	
9	Verkehrsunfall, Schädelbruch	—	40,4	Todeszeit un- bekannt ^a
			36,6	
			28,0	
10	Oberschenkelfraktur, Pneumonie	23	29,5	—
		29	24,0	
		46	23,9	
11	Verkehrsunfall, Schädelbruch	22	20,4	—
		28	25,4	
12	Ertrinken	—	28,6	Todeszeit un- bekannt
			37,7	
			44,6	
13	Marasmus, Pneumonie	6	49,1	—
		12	29,2	
		32	68,4	

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Nr.	Todesursache	Entnahme (Std p.m.)	ATP- Konzentration (mg-%)	
14	Arterielle Embolie	21	23,4	—
		27	23,7	—
		42	22,9	—
15	Keine Sektion	30	32,7	—
		36	33,7	—
		51	27,4	—
16	Herzinsuffizienz	2	27,4	—
		8	24,6	—
		23	22,3	—
17	Bronchialcarcinom	8	20,6	—
		14	27,9	—
		32	27,9	—
18	Keine Sektion	13	24,9	—
		19	24,9	—
19	Keine Sektion	9	44,6	—
		15	40,8	—
		33	38,9	—
20	Nephrolithiasis, Nephrektomie	11	35,5	—
		17	26,3	—
		35	22,3	—
21	Apoplexie	23	26,3	—
		29	30,4	—
22	Hirntumor	19	30,9	—
		25	29,1	—
23	Absturz aus großer Höhe, Schädelbruch	—	44,6	Todeszeit un- bekannt ^a
		—	13,7	
24	Bronchialcarcinom	7	35,4	—
		13	31,4	—
		30	29,0	—
25	Hypertonie, Embolie	9	38,9	—
		15	49,7	—
26	Nicht feststellbar	12	27,4	—
		18	18,8	—
		35	18,8	—
27	Gravidität mens VII—VIII, Lungenödem	22	33,7	—
		28	30,0	—
28	Apoplexie	15	42,3	—
		21	42,3	—

^a Bei unbekannter Todeszeit wurden die Blutentnahmen jeweils in Abständen von 6 Std vorgenommen.

Nullhypothese ($\bar{x} = \mu$) angenommen werden kann. Zwischen der 1. bis 28. Std nach der ersten Entnahme ist weder ein Anstieg noch Abfall der ATP-Konzentration im Leichenblut festzustellen gewesen.

B. Berechnung: Bis 88 Std nach dem Tode.

Der ATP-Gehalt des Blutes vor und zur Zeit des Todes ist nicht bekannt. Unter der Annahme, er liege im Normbereich (s. oben) wurde geprüft, ob eine lineare Abhängigkeit zwischen Konzentrationsänderung und Zeit nach dem Tode besteht. Während unter A die Berechnung bis 28 Std erfolgte, wurde ein Zeitraum bis maximal 88 Std nach dem Tode berücksichtigt.

Da für die Korrelationsrechnung pro Fall nur drei Wertpaare vorhanden waren, dienten zur Berechnung normierte Werte für x und y aus der graphischen Darstellung (Abb. 1), indem die jeweils bei $x: 10, 20, 30 \dots 90$ Std aus den Kurven abzulesenden Werte für y entnommen wurden. Die Werte für x und y sind somit interpolierte Werte.

Der Korrelationskoeffizient r ist $= -0,78$. Der Tafelwert zeigt bei 37 Freiheitsgraden einen Zufallshöchstwert des Korrelationskoeffizienten bei Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % von 0,32, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % von 0,52. Da der errechnete Wert für $r = -0,78$ ist, d.h. $r_{er} > r_{taf}$, besteht ein relativ strenger negativer signifikanter Zusammenhang zwischen x und y . Mit steigenden x -Werten nehmen die y -Werte ab. Mit zunehmender Zeit — allerdings nur unter Einschluß der Zeiten bis 88 Std — nach dem Tode ist eine Abnahme der ATP-Konzentration des Blutes verbunden.

Allgemeine Ergebnisse

Die postmortale ATP-Konzentration des Blutes wurde nicht bestimmt, um die Möglichkeit einer Berechnung der Todeszeit zu prüfen. Dies ist nicht möglich, nicht einmal, wie vielfache Untersuchungen erbrachten, zu erwarten (KLEIN, FAHRIG, WOLF, 1962), da eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Zeitpunkt des Herz- und Atemstillstandes und irgendeiner anderen Funktion nicht möglich ist. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen dies noch einmal. Obwohl die Bestimmung des normalen ATP-Gehaltes im Blut überwiegend aus methodischen Gründen durchgeführt wurde — um eine sichere Grundlage für die Untersuchung zu gewinnen — ist die Feststellung eines Mittelwertes von $22,4 \pm 4,7$ mg-% ATP bei einem Vergleich mit den bisher bekannten Werten aufschlußreich. Die Angaben von ROHDE-WALD (1958), HÖTZEL (1958), LAUDAN (1959) und DENNEMANN (1961) können ebenso als bestätigt angesehen werden wie frühere Untersuchungen (MOTTAHEDIN, 1959). Die Zuverlässigkeit der enzymatischen ATP-Bestimmung bestätigte sich außerdem in den Kontrolluntersuchungen: Die durch Benutzung heparinisierten Blutes exaktere Bestimmung wird durch Heparin (Liquemin) im Umfang der benutzten

Konzentrationen nicht beeinflußt. Auch sehr hohe ATP-Konzentrationen, wie sie in den Versuchen über den Abbau zugesetzter ATP sich ergaben, konnten durch einfache Modifikation der enzymatischen Methode erfaßt werden. Bei Zugabe reiner ATP-Lösung zu heparinisiertem Blut findet kein ATP-Abbau statt. Die Abweichungen vom theoretischen Wert liegen innerhalb der üblichen Streuung der Methode. Im postmortalen Blut konnte ein Abfall erst nach sehr langen Zeiten beobachtet werden. Da die Ausgangskonzentration der ATP zum Zeitpunkt des Todes nicht bekannt war, dürfte eine quantitative Aussage kaum möglich sein. Wieweit in bestimmten Agonieformen die ATP-Konzentration sich verändert, ist unbekannt. Für die Zeit bis 28 Std nach dem Tode konnte aufgrund statistischer Berechnungen kein ATP-Abfall festgestellt werden. Die verhältnismäßig konstante ATP-Konzentration nach dem Tode könnte bedingt sein durch die noch ungestört weitergehende glykolytische Aktion der Erythrocyten bei ausreichender Glucosekonzentration. Ein gewisser Einfluß auf die absoluten Werte könnte auch die postmortale Verschiebung der einzelnen Blutelemente haben. Da es im vorliegenden Zusammenhang jedoch auf relative, nicht auf absolute Werte ankam, erschien es angängig, die Hämatokritwerte unberücksichtigt zu lassen. Nach DENNEMANN (1961) beträgt die Halbwertzeit des ATP-Abfalls im vital entnommenen und heparinisierten Blut 240 min, nach LACHEIN, GRADE und MATTHIES (1961) 174 min. Wieweit in diesen Bestimmungen, trotz schonender Bedingungen, nicht doch eine Hämolyse eintrat und die aus den Erythrocyten freigewordenen ATP-Asen für den ATP-Abbau verantwortlich sind, wäre zu prüfen. Für die postmortalen Reaktionen dürfte jedoch dieser geringe Abfall nicht entscheidend sein. Für die Zeit bis 28 Std nach dem Tode muß in jedem Falle nicht nur mit der Anwesenheit, auch mit der Wirksamkeit der noch vorhandenen ATP im Blut bei der Entwicklung postvitaler Reaktionen gerechnet werden.

Zusammenfassung

1. Als Grundlage einer sicheren Bestimmung der ATP-Konzentration des postmortalen Blutes wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: a) Die ATP-Konzentration wurde bei 50 Personen unter Grundumsatzbedingungen bestimmt; b) der Einfluß zugesetzten Heparins auf die Bestimmung der ATP-Konzentration wurde geprüft; c) der Abbau vitalem Blut zugesetzter ATP wurde überprüft.
2. Es wurde festgestellt: a) Die („physiologische“) ATP-Konzentration betrug unter Grundumsatzbedingungen $22,4 \pm 4,7$ mg-% ATP; b) die Zugabe von 0,1 ml Liquemin (Heparin) zu 1,0 ml Blut hat keinen Einfluß auf die Bestimmung; c) zu vitalem Blut zugesetzte ATP wird innerhalb 40 min nicht abgebaut.

3. Die Bestimmung der ATP-Konzentration im postmortalen Blut ergab wechselnde Werte; ihre statistische Auswertung erbrachte:

a) Bis über 28 Std nach dem Tode ist weder ein Anstieg noch ein Abfall der ATP-Konzentration festzustellen;

b) eine quantitativ nicht bestimmbarer Abnahme der ATP-Konzentration ist erst bei Einschluß der Bestimmungen von über 88 Std nach dem Tode nachweisbar.

4. Nach dem Tode kann mindestens bis zu 28 Std nicht mit einem ATP-Zerfall gerechnet werden, sodaß ihre Wirksamkeit bei supravitalen und postvitalen Reaktionen zu berücksichtigen ist.

Summary

1. To find a reliable method to determine the ATP-concentration of post-mortem blood, the following tests were carried through: a) the ATP-concentration of 50 persons was determined under conditions of basic metabolic rate; b) the effect of an addition of heparin on the determination of the ATP-concentration was studied; c) the decomposition of ATP added to vital blood was observed.

2. The results obtained were: a) the ("physiological") ATP-concentration under conditions of basic metabolic rate was 22.4 ± 4.7 mg-% of ATP; b) an addition of 0,1 mlit. of liquemin does not affect the determination; c) ATP added to vital blood is not decomposed within 40 min.

3. The determination of the ATP-concentration in post-mortem blood yielded varying values; the statistical evaluation showed that

a) up to 28 hrs. after death neither increase nor decrease in the ATP-concentration was noted;

b) a decrease in the ATP-concentration, which is not measurable quantitatively, is observed only if the determinations are continued over more than 88 hrs. after death.

4. At least up to 28 hrs. after death an ATP-decomposition is not to be expected, hence its effect must be taken into account regarding supravital reactions.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. P. WOLF, Darmstadt, und Frau Dr. rer. nat. S. LEONHÄUSER, Mannheim, danke ich für vielfache Anregungen.

ULRIKE DECKART†

Die im Entwurf vorliegende Arbeit wurde nach dem frühen Tode von ULRIKE DECKART, Assistentin am Josefskrankenhaus Heidelberg, abgeschlossen durch Prof. Dr. H. KLEIN, Heidelberg, Voß-Straße 2.

Literatur

ALBAUM, H. G., and R. LIPSHITZ: Determination of adenosine triphosphate based on deamination rates. Arch. Biochem. 27, 102 (1950).

BALDWIN, E.: Biochemie. Budapest 1960.

- BOETTGE, K., K. H. JAEGER u. H. MITTENZWEI: Das Adenylsäuresystem. Neue Ergebnisse und Probleme. *Arzneimittel-Forsch.* **7**, 24 (1957).
- BÜCHER, SCHUART: Unveröffentlicht (Testanleitung zu „Boehringer, ATP-Test“, C. F. Boehringer u. Söhne, Mannheim).
- DENNEMANN, H.: Enzymatische Bestimmung von Adenosintriphosphat im Vollblut. *Z. ges. exp. Med.* **134**, 335 (1961).
- DRABIKOWSKI, W.: The binding of adenosine triphosphate by native and by modified proteins. *Acta biochim. pol.* **7**, 127 (1960).
- HEYDE, W.: Moderne biochemische Erkenntnisse über Dextrose und deren Bedeutung für die Therapie. In: *Schriftenreihe des Instituts für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen*, **3**, 7 (1960).
- HÖTZL, H. A.: Über das Verhalten verschiedener Fermente und Substrate im Blute Leberkranker vor, während und nach periduraler Anästhesie. *Ärztl. Wschr.* **13**, 726 (1958).
- HORN, H. D., u. F. H. BRUNS: Der Inhibitor-Effekt des Heparins auf verschiedene DPN- und TPN-abhängige Enzyme und auf die Pyruvatkinaise. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **65**, 407 (1959).
- JUDAH, J. D.: Oxidative phosphorylation. *J. Pharm. Pharmacol.* **11**, 1 (1959).
- KALCKAR, H. M.: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. I. Determination of hydroxypyurine compounds. *J. biol. Chem.* **167**, 429 (1947).
— II. Determination of adenine compounds. *J. biol. Chem.* **167**, 445 (1947).
— III. Studies of the enzymes of purine metabolism. *J. biol. Chem.* **167**, 461 (1947).
- KARLSON, P.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart 1962.
- KLEIN, H., H. FAHRIG u. H. P. WOLF: Die Bestimmung der Alkoholdehydrogenase-Glutaminsäureoxalässigsäure-Transaminase-Aktivität der menschlichen Leber nach dem Tode. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **52**, 615 (1962).
- LACHHEIN, L., K. GRADE u. H. J. MATTHIES: Der Ribosestoffwechsel und ATP-gehalt normaler und methämoglobinhaltiger kernloser Erythrocyten. *Acta biol. med. germ.* **7**, 434 (1961).
- LAUDAHN, G.: Fermentaktivitäten und Konzentration von Stoffwechselzwischenprodukten im Blut bei Leber- und Herzkrankheiten. *Klin. Wschr.* **37**, 850 (1959).
- LAVES, W.: Agonie. *Münch. med. Wschr.* **1965**, 113—118.
- LEUTHARDT, F.: *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*. Berlin 1957.
- LOHMANN, K.: Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* **17**, 624 (1929).
- MOTTAHEDIN, M.: Untersuchungen zur Bestimmung von ATP im Blut unter verschiedenen Bedingungen. *Med. Diss. Heidelberg* 1959.
- RAPOPORT, S. M.: *Medizinische Biochemie*. Berlin 1962.
- ROHDEWARD, M., u. M. WEBER: Über den papierchromatografisch ermittelten Gehalt von Phosphorverbindungen in der säurelöslichen Fraktion des menschlichen Blutes. 2. Untersuchungen an Blut von Kindern. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **311**, 239 (1958).
- STRAUB, B. F.: *Biochemie*. Budapest 1960.

Anfragen an: Professor Dr. H. KLEIN
69 Heidelberg, Voss-Str. 2