

# ACTA BIOLOGIAE EXPERIMENTALIS

LITTERAE  
SOCIETATIS PHYSIOLOGORUM POLONORUM

REDACTORES:

K. BIAŁASZEWICZ (WARSZAWA), Z. MOCZARSKI (POZNAŃ),  
J. FEGLER (KRAKÓW), W. MORACZEWSKI (LWÓW),  
E. LEYKO (WILNO), ST. J. PRZYŁĘCKI (WARSZAWA)

VOL. XII, FASC. 1

AUXILIIS FUNDI CULTURAE NATIONALIS  
JOSEPHI PIŁSUDSKII

VARSOVIE  
RÉDACTION ET ADMINISTRATION:  
INSTITUT NENCKI (SOC. SCI. VARS.)  
8, RUE ŚNIADECKI  
1938

<http://rcin.org.pl>





[Department of Anatomy, College of Physicians and Surgeons, Columbia University].

**Richard Truszkowski <sup>1)</sup> and Raymund L. Zwemer.**

**Experimental alterations in blood potassium <sup>2)</sup>.**

Received for publication: 27.IX.1937.

Extensive studies of the blood chemical changes occurring in experimental adrenal insufficiency (Zwemer and Sullivan, 1934), and more detailed data on the potassium levels found (Truszkowski and Zwemer, 1936) led us to put forward the view (Zwemer and Truszkowski, 1936, 1937) that corticoadrenal insufficiency is associated with an inability normally to metabolize potassium. The experiments here reported extend the observations that prolonged high blood potassium is capable of producing effects comparable to the symptoms found in adrenal insufficiency and that certain preparations of cortin cause a definite but transient lowering of blood potassium in both normal and adrenalectomized cats, the later confirming Zwemer and Sullivan, 1934.

**Technique.**

Blood potassium was determined by the method of Truszkowski and Zwemer (1937), on 0.1 — 0.2 ml. samples of ear blood. The effects of bleeding and of excitement on blood potassium were thus obviated, since taking of ear blood involves a minimum of handling, as compared with the operations associated with the taking of heart blood. Duplicate determinations were performed on each sample, the values given being the means of two determinations, differing from each other by not more than 4%.

<sup>1)</sup> Now of the Dept. of Hormone and Vitamin Assay, State Hygiene Institute, Warsaw.

<sup>2)</sup> Presented before the Polish Physiological Society, Warsaw, 18.II.1937.

The cats were housed in metal cages, and were fed with canned salmon and milk. They were kept for at least a week before each experiment, in order to accustom them to the technique of blood sampling, and to rule out possible variations resulting from a change in diet and environment.

Two cortin preparations were examined, viz., Eschatin (Parke Davis), and an extract prepared in our laboratory according to the method of Zwemer (1931, 1935). The extracts were injected in the adductor magnus of one or both hind legs of fasting animals, and blood samples were taken immediately before, and at intervals following the injections. The importance of taking fasting animals was indicated by the work of the present authors (Zwemer and Truszkowski, 1936) on potassium tolerance in the human, and by blood potassium curves obtained after feeding a fasting normal and an adrenalectomized cat, which show that a prolonged rise in blood potassium follows a meal.

Normal ingestion of potassium salts is not believed significantly to raise plasma potassium (Peters and Van Slyke, 1931). On the other hand, intravenous injection of small amounts of potassium salts evokes very acute symptoms, which may lead to death from respiratory or cardiac failure within a few minutes. With non-lethal doses the symptoms rapidly regress and the plasma potassium is back to normal within six minutes (D'Silva, 1934).

In the present experiments, hypertonic KCl was therefore administered intraperitoneally, and samples of blood were taken for analysis at frequent intervals following injection. In this way a series of curves was obtained for different dosage levels; by repeating injections at intervals corresponding with the maxima on single injection curves it was found that high blood potassium levels could be maintained in normal cats for several hours. Amounts of KCl causing a barely perceptible rise in blood potassium of normal cats, however, leads to a considerable, prolonged and often fatal rise in adrenalectomized cats.

### Experimental Observations.

#### 1. Effect of feeding on peripheral blood potassium.

Food was withdrawn from cat 3630, ♂, at noon, October 5th. The blood potassium at 7:00 P. M. of the same day was 26.7 mg%, 27.0 mg% at 12:00 P.M., and 27.0 mg% at noon of the following day. Salmon was given at 1 P.M., about 60 g. being consumed during 10 minutes, after which food was again withdrawn. At 3 P.M. blood potassium amounted to 32.3, and at 5:30, when the experiment was concluded, to 30.4 mg%. It appears that, in normal cats, the fasting blood potassium level



is fairly constant, and that a significant rise takes place following ingestion of food containing potassium.

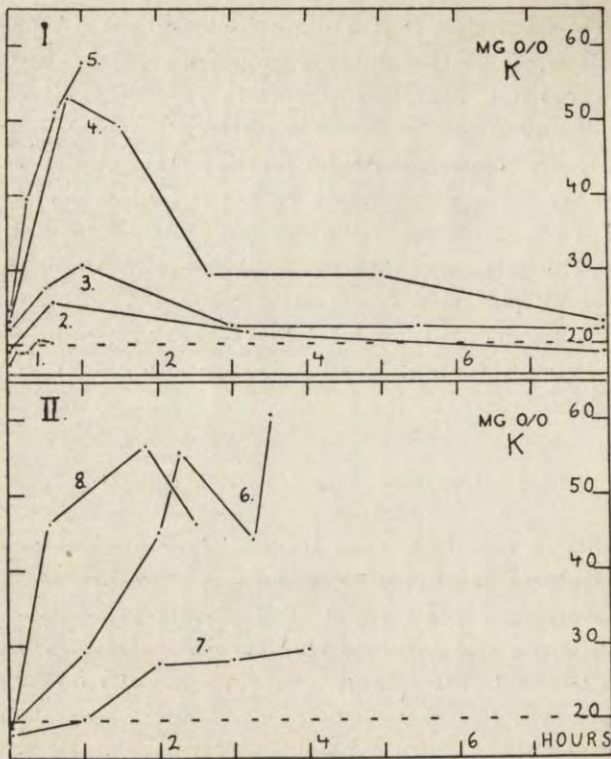
The second experiment of this type was performed on a bilaterally adrenalectomized cat (3646, ♂, operated November 9th, 1936). The blood potassium level of this cat was 31.4 mg% on November 11th, immediately before withdrawal of food, and was 35.4 mg% 24 hours later. An hour after consuming 60 g. of salmon the value was 32.8 mg%, rising to 39.8 and 39.5 mg% at the second and third hours after feeding.

These experiments indicate that similar precautions should be taken in constructing blood potassium curves as in the case of blood sugar curves.

## 2. Hyperpotassemia in normal animals.

a) *Single injection.* The simplest type of experiment were single injections of 10% KCl in various amounts per kilogram of body weight of the animal. The results of analyses of the blood potassium in a series of such animals are shown in curves 1 to 5 on Graph I. They range from an amount causing a barely perceptible rise, to one resulting in a fatal rise in blood potassium of over 100%, with typical circulatory failure, blood concentration and shock symptoms. With single injections into normal animals the high blood potassium values are of short duration and muscular weakness is rarely observed. There is a local irritative effect of intraperitoneal KCl which may result in vomiting and diarrhea even though no rise in blood potassium occurs; it appears within 10 minutes of the injection, which may be as little as 1 ml. of 10% KCl.

b) *Repeated injections.* The cumulative action of sub-lethal injections repeated at frequent intervals is shown in the blood potassium curves of 3 cats (Graph II). Although the individual doses produce small and non-symptom-provoking rises in normal animals the residual effect of previous doses soon result in a fatal outcome. This residual effect is even apparent when the repeat injections were given 24 hours apart. The effects of repeated daily injections of sub-lethal amounts were also observed. For example, cat 3618 was given 17 daily

**Graph I.***Single injections of K to normal cats.*

- Curve 1. Cat 3618 was given 100 mgm. KCl/Kgm. i. p. No symptoms. K stayed within normal limits for 30 minutes.
- Curve 2. Cat 3620 had no observable symptoms but a slight blood K rise after a single injection of 200 mgm. KCl/Kgm.
- Curve 3. Cat 3620 received 250 mgm. KCl/Kgm. i. p. No observable symptoms. Peak of 30.5 at 1 hour.
- Curve 4. Cat 3633 injected with 400 mgm. KCl/Kgm. i. p. There was vomiting and diarrhea, but no hind leg weakness. Peak rise of 53.3 mgm. at 50 minutes.
- Curve 5. Cat 3637 given 1000 mgm. KCl/Kgm. i.p. The blood K rose steadily until death, and vomiting, diarrhea, excessive salivation, hind leg weakness, prostration and convulsions appeared in the order given.

**Graph II.***Repeated K injections to normal cats.*

- Curve 6. Cat 3618 had been used for the study of daily K injections and then rested. Three injections of 200 mgm. KCl/Kgm. each at hourly intervals proved fatal 1 1/2 hours after the final injection and profound muscular weakness appeared 15 minutes after the third injection.
- Curve 7. Cat 3622 was given 4 injections of 200 mgm. KCl/Kgm. at hourly intervals and died when being picked up for the fifth. No very striking rise in blood K had occurred. Another normal animal (not shown on Graph) received 7 such injections before muscular weakness was apparent and subsequently recovered.
- Curve 8. Cat 3619 shows that 9 small injections of 125 mgm. KCl/Kgm. repeated at 15 minute intervals are as effective in raising blood K to fatal levels as as a single large injection (cf. curve 5, cat 3637).



injections of 100 mg. KCl per Kg. Its blood potassium rose from 16.8 to 28 mg% indicating that although the effects of a single injection were no longer evident after 2 hours (curve I) yet repeated daily injections impaired the cat's ability normally to regulate its potassium. After a rest period of 3 weeks with no injections the basal blood potassium had returned to 17.8 mg%. In addition to small but definite rises in the basal blood potassium level of cats, sudden deaths sometimes follow injection of an amount that had previously given no demonstrable clinical effects. This when coupled with the autopsy findings of marked corticoadrenal depletion according to Z w e m e r's (1936) classification, strengthened the view that the potassium regulating mechanism can be exhausted by repeated burdens.

Since the toxic levels of blood potassium in the single injection type of experiments were somewhat higher than those found in adrenal insufficiency (T r u s z k o w s k i and Z w e m e r, 1936), it remained to determine the effect of maintaining a moderately high blood potassium over a number of hours with subsequent recovery. This was best realized when the residual effect of previous KCl injections was coupled with the cumulative effect of repeated injections (Curves 10 and 11, Graph III). The gradual raising of blood potassium by spaced injections, and its maintenance at a high level for 24 hours was most effective in reproducing the muscular weakness of advanced adrenal insufficiency. The asthenia appeared first in the hind legs, then rapidly increased in severity and extent until the entire system was involved. The symptoms regressed with a slow return to a lower blood potassium level.

### 3. Adrenalectomized cats given potassium.

The complete absence of corticoadrenal tissue has been associated with an increased susceptibility to potassium administration (Z w e m e r and T r u s z k o w s k i, 1936a, 1937; A l l e r s, N i l s o n and K e n d a l l, 1936). In Graph IV are presented 4 curves giving direct quantitative comparison of the effects of KCl injection to normal and adrenalectomized cats. An injection of 150 mg. KCl per Kg. body weight, which

gave a barely demonstrable rise in a normal animal (Curve 1); resulted in a prolonged high blood potassium when given to an animal two days after adrenalectomy (Curve 13). The cat had fully recovered from the operation and was in aparent good health and eating well. Slightly larger amounts when given on the II, IV and VI day after adrenalectomy resulted in fatal rises in blood potassium (Curves 14, 15, 16).

The above observations afford presumptive, although not conclusive evidence that interference with the potassium regulating mechanism permits accumulation of potassium in the plasma to levels which we have herein found to exert the well-known toxic effects on muscle, nerve and circulation. The exact time and cause of death seems to be dependent on inherent weakness of some one organ or system which gives way first. This varies with the species and individual.

By appropriate intraperitoneal administration of potassium salts based on the above data, we have been able to induce in large numbers of normal mice, rats, guinea pigs and cats, a variety of effects ranging from mild anorexia, through prolonged muscular asthenia to complete shock.

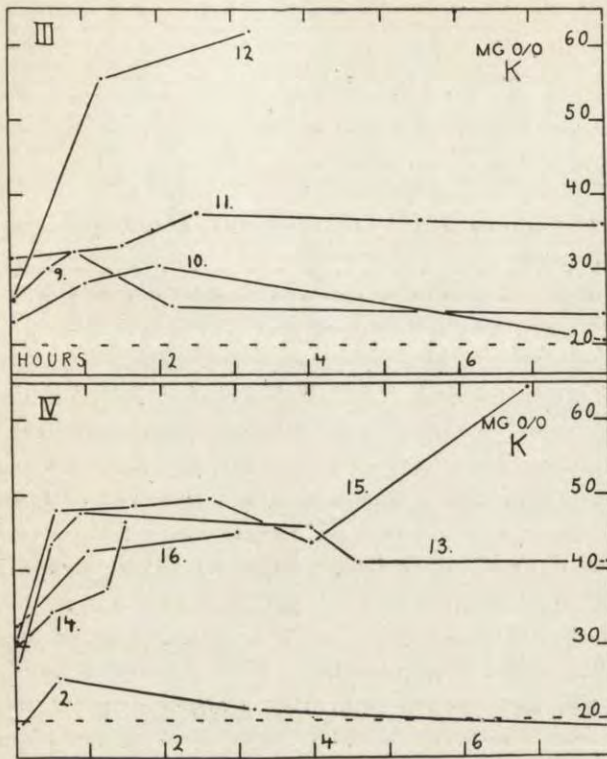
#### 4. Effect on blood potassium of injections of cortin.

a) The results obtained in adrenalectomized cats are illustrated by curves shown in graph V.

Cat 3645, ♂, had a blood potassium of 22.4 mg% on November 9th, when bilateral adrenalectomy was performed. The potassium level was 37.7 mg% on November 11th, and 34.8 mg% on November 12th, when extract (0.5 ml. per kg.) was injected. The blood potassium fell to a minimum of 30.5 mg% at the end of the first hour, thereafter rising to a maximum of 41.1 mg% 4 hours after the injection. An hour later potassium had fallen to 32.6 mg%.

Cat 3645 was again given extract (1 ml. per kg.) on November 16th, 7 days after adrenalectomy. The blood potassium fell from the initial value of 46.4 mg% to 34.2 and 34.5 mg% 30 and 60 minutes later, rose to 39.3 mg% after 2 hours, and again fell to a constant value of about 35 mg% after 5 hours.





**Graph III.**

*Effect of previous history on single potassium injection.*

Curve 9. Cat 3607. A cat with one adrenal removed and that had a respiratory infection was given 200 mgm. KCl/Kgm. The response corresponds to that of a normal cat given 250 mgm. KCl/Kgm. (Curve 3).

Curve 10. Cat 3620. The blood K had returned to normal from a K injection given 2 hours before. A second injection of 200 mgm. KCl/Kgm. gave a much greater response and a more prolonged rise.

Curve 11. Cat 3620 in another experiment was given the second injection of 200 mgm. KCl/Kgm. one hour after the first, when the blood K was still high. A persistent high blood K and muscular asthenia similar to that of adrenal insufficiency was observed in this case for 24 hours.

Curve 12. Cat 3604 had been injected with daily doses of 1.5 ml. 10% KCl until an abscess developed. It was then decided to give a large single injection of 400 mgm. KCl/Kgm. and follow the blood K. Muscular weakness appeared in the hind limbs after 20 minutes and increased rapidly in severity, the animal being prostrate in 1 hour and 15 minutes after the injection. It died after 3 hours and 15 minutes with blood K of 61.9 mgm.%.  
 this case for 24 hours.

**Graph IV.**

*Single injections of KCl to adrenalectomized cats.*

Curve 13. Cat 3628 received 150 mgm. KCl/Kgm. on second day post operation while in good condition and eating well. In less than 1 hour it exhibited profound muscular weakness which lasted for 3 hours, when asthenia gradually disappeared. Anorexia however persisted for some days.

Curve 14. CaCt 3629 in poor condition second day post operation was given 200 mgm. KCl/Kgm. It was prostrate in 30 minutes and dead in one hour and a half.

Curve 15. Cat 3611 on the sixth day post operation was injected with 200 mgm. KCl/Kgm. Gradually increasing muscular weakness progressed until complete prostration 1 hour and 45 minutes after the injection. Two hours later a remission of symptoms occurred (cf. cat 3628) and the cat took a few steps and drank some milk. Muscular prostration however returned and the cat died 7 hours after the injection.

Curve 16. Cat 3621 was given 250 mgm. KCl/Kgm. on the fourth day post operation, when its blood K had risen to 32.8 mgm%. The injection was followed within 20 minutes by prostration which steadily increased in gravity until death.

Curve 2. Included for the sake of comparison. Normal cat 3620 after 200 mgm. KCl/Kgm.

Twenty hours after the injection blood potassium was again 46.6 mg%.

Cat 3646, ♂, was bilaterally adrenalectomized on November 9th, when the blood potassium was 35.9 mg%. On November 11th the value was 31.4, on November 12th 35.4 before, and 39.5 mg% after feeding, and on November 16th, immediately before injection 54.9 mg%. The blood potassium fell to 40.0 mg% an hour after injection of 0.5 ml. per kg. body weight of Eschatin. A rapid rise to 55.6 mg% then followed (3 hours after injection), after which blood potassium again fell to 44.1 mg%, at the fifth hour. Twenty hours later the value was 48.7 mg%.

A further injection of 2 ml. per kg. was made on November 18th. Blood potassium fell from the initial value of 26.4 mg% to 22.6 mg% 5 and 6 minutes later. Thirty minutes later a value of 25.3 mg% was found, and, after a slight drop at 1 hour 15 minutes, rose gradually to 29.8 mg% at 4 hours 15 minutes after injection.

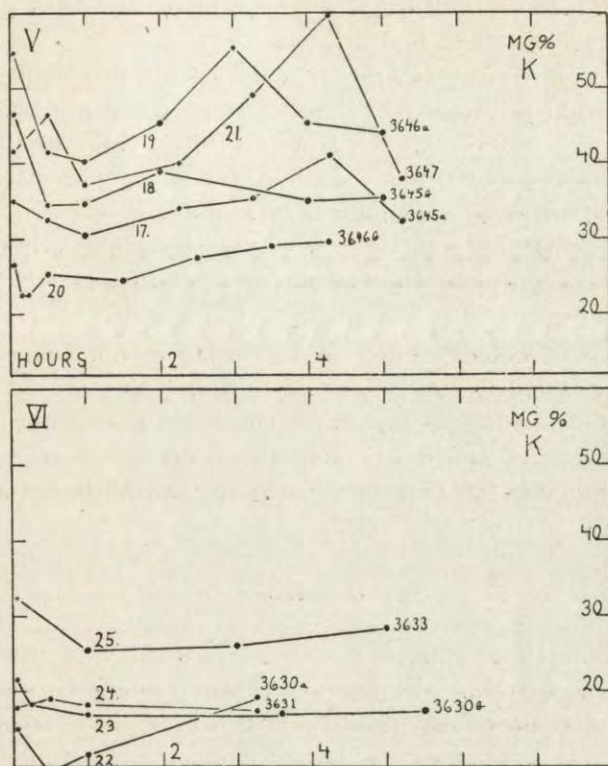
Cat 3647, ♂, adrenalectomized November 9th, had a blood potassium of 24.7 mg% before the operation. On November 12th extract was given (0.5 ml. per kg.), following which blood potassium rose from 41.1 mg% initially to 46.2 mg% 30 minutes later, and then fell to 38.3 mg% at the end of an hour. It then again rose, at first gradually (40.0 mg% after 2 hours, 20 minutes), and then rapidly, to a second maximum of 63.5 mg% 4 hours, 15 minutes after the injection. An hour later a sample of heart blood gave a value of 37.5 mg%.

b) The blood potassium of normal cats after injection of adrenal cortex extract.

These four curves are given in graph VI, and in 3 cases the blood potassium was temporarily lowered.

Cat 3630, ♂, initial blood potassium 21.5 mg%, was given an injection of 1 ml. per kg. of Eschatin. Blood potassium fell



**Graph V.**

*Effect of adrenal cortex extract on blood K of adrenalectomized cats.*

Curve 17. Cat 3645 received 0.5 ml. adrenal cortex extract per Kgm. body weight on the second day after adrenalectomy.

Curve 18. The same cat received 1.0 ml. per Kgm. seven days after adrenalectomy.

Curve 19. Cat 3646 was given 0.5 ml. extract per Kgm. seven days after adrenalectomy.

Curve 20. Two days later only a transient effect was obtained with 2 ml. per Kgm.

Curve 21. Cat 3647 was injected with 0.5 ml. adrenal cortex extract on the third day after adrenalectomy.

**Graph VI.**

*Adrenal cortex extract to normal cats.*

Curve 22. In cat 3630 the blood K fell about 20% after 1 ml. of extract per Kgm. body weight.

Curve 23. The injection of 1 ml. per Kgm. of another extract lowered the blood K about 30% in the same cat.

Curve 24. Cat 3631 was given a similar injection but no significant change in blood potassium was found.

Curve 25. In cat 3633 a 20% drop in blood K followed injection of 1 ml. per Kgm. of adrenal cortex extract of the same type as that used in the two previously mentioned animals.

to a minimum of 17.0 mg% an hour later, and then gradually rose to 22.0 mg% 22 hours later.

The same cat was injected with 3.4 ml. of cortin (Z w e m e r), the equivalent of 20 gm. of fresh gland per kg. of body weight. Blood potassium fell from an initial value of 14.1 mg% to a minimum of 9.6 mg% 30 minutes later, thereafter slowly rising to 19.0 mg% at 3 hours, 20 minutes.

Cat 3631, ♂, was given a similar injection, but no significant changes in blood potassium were observed.

Cat 3633, ♂, was similarly injected with 1 ml. of cortin per kg. body weight. This cat had a blood potassium of 33.0 mg% on August 25th, and an initial value of 32.0 mg% immediately before the injection. The blood potassium level fell to 25.4 mg% at one hour, and thereafter gradually rose to a constant value of 37.0 mg% at 7, 12, and 25 hours after the injection.

#### Discussion.

A number of authors have expressed the view that certain of the symptoms of adrenal insufficiency might be due to the effects of high blood potassium. However, little evidence is available as to whether the levels of blood potassium found in adrenal insufficiency actually are toxic. In particular, no method has been described whereby high blood potassium levels could be maintained over a period of hours.

The blood potassium curves and protocols here reported indicate the course of events associated with high blood potassium following potassium injections. The experiments with adrenalectomized animals confirm the view put forward by Z w e m e r and T r u s z k o w s k i (1936—1937) that an integral, and possibly the most important, feature of the syndrome of corticoadrenal insufficiency is the inability to deal adequately with potassium, whether exogenous or endogenous, entering the blood stream. A further conclusion to be drawn is that a condition of corticoadrenal insufficiency may be diagnosed on the basis of a blood potassium curve, following the introduction of potassium salts. The use of this procedure in



human cases is reported elsewhere (Zwemer and Truszkowski, 1936b). Single isolated potassium determinations do not appear to be of much diagnostic value, since the blood potassium level at any one moment depends on many factors of which corticoadrenal regulation is only one.

The production and maintenance of high blood potassium in unoperated animals would appear to depend to a large extent on exhaustion of the adrenal cortex by previous excessive demands; their clinical and blood chemical response to small injections of potassium salts then corresponds to that of adrenalectomized animals.

In 8 of 9 experiments injections of adrenal cortex extract were followed by a transient fall in blood potassium, which reached its maximum 30 to 60 minutes after injection. In the case of adrenalectomized cats this fall was followed by a rise to above the initial value, reaching a maximum at the 3rd or 4th hour after the injection. Thereafter, blood potassium again fell to values equal to or lower than the initial. However in no case did the blood potassium values return to normal in adrenalectomized cats following injections of cortical extracts in the given dosages, nor were the behaviour of the animals or their survival time significantly affected by a single injection.

As might be expected, the effect of cortin on normal animals is small. However, cat 3633, which had initially a high blood potassium, exhibited a prolonged and relatively considerable fall in blood potassium following injection.

#### Summary.

1°. Experiments are presented which illustrate the effect of single intraperitoneal injections of 10 per cent KCl on the blood potassium, and the clinical manifestations in normal animals; the injections ranged from one giving a barely perceptible effect to a lethal dose.

2°. The residual effects of previous potassium administration have been demonstrated by repeated injections at both short and long intervals, and by following the effect of injections in animals that had previously been given potassium.

3°. When the results with normal animals are compared with those obtained in adrenalectomized cats after potassium injection, it is found that adrenalectomy impairs the ability to eliminate potassium from the blood stream.

4°. The anorectic, muscular and shock symptoms which accompany the experimental hyperpotassemia are comparable to those of corticoadrenal insufficiency, provided blood potassium is maintained at high levels over several hours by appropriately spaced injections of potassium salts.

5°. Adrenal cortex extracts cause a fall in blood potassium in normal and adrenalectomized cats.

6°. The transient nature of the action of cortin on blood potassium and the subsequent violent fluctuations in adrenalectomized cats, suggest why frequent small injections have been found to be more effective and safer than large single injections.

#### References.

- Allers, W. D., H. W. Nilson and E. C. Kendall, *Proc. Mayo Clinic*, 11, 283, 1936. D'Silva, J. L., *Jour. Physiol.*, 82, 393, 1934. Peters, J. P. and D. D. Van Slyke, *Quantitative Clinical Chemistry*, p. 770, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1931. Truszkowski, R. and R. L. Zwemer, *Biochem. Journ.*, 30, 1345, 1936. Truszkowski, R. and R. L. Zwemer, *Biochem. Journ.*, 31, 229, 1937. Zwemer, R. L., *Amer. Journ. Path.*, 12, 107, 1936. Zwemer, R. L., F. J. Agate, Jr. and H. A. Schroeder, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 28, 721, 1931. Zwemer, R. L. and C. W. Jungelut, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 32, 1583, 1935. Zwemer, R. L. and R. C. Sullivan, *Endocrinology*, 18, 97, 1934. Zwemer, R. L. and R. Truszkowski, *Science*, 83, 558, 1936 (a). Zwemer, R. L. and R. Truszkowski, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 35, 424, 1936 (b). Zwemer, R. L. and R. Truszkowski, *Endocrinology*, 21, (Jan). 40, 1937.



[Laboratoire de Physiologie de l'Institut Nencki, Varsovie].

**J. Konorski et L. Lubińska.**

**A propos de l'action de la strychnine sur la préparation neuro-musculaire <sup>1)</sup>.**

Nous avons constaté à l'occasion des recherches sur la curarisation magnésienne ('36 et '37) le fait suivant:

Un nerf moteur du muscle strié de Chat ou de Grenouille contient des fibres motrices qui sont toujours plus ou moins hétérogènes au point de vue d'excitabilité. Le fait est banal en ce qui concerne la rhéobase. Nous avons trouvé que les chronaxies de différentes fibres présentent une dispersion assez importante, et que toujours les fibres à rhéobase élevée ont des chronaxies plus petites que les fibres à rhéobase basse. Ces relations, qui seront analysées dans un mémoire prochain, doivent être prises en considération si l'on veut éviter une source d'erreur importante dans l'étude des changements d'excitabilité nerveuse au cours d'une curarisation.

Considérons, en effet, dans une préparation normale, l'observation de la secousse liminaire. Elle est toujours relativement grande si on applique la stimulation indirecte. Il n'est guère possible d'obtenir alors une secousse à peine perceptible. Lorsque la transmission neuro-musculaire est perturbée par un agent quelconque dont l'action est en voie de développement, l'amplitude des secousses liminaires (de même que celle des maximales) diminue rapidement. A un moment donné il faut augmenter le nombre de fibres motrices mises en jeu pour obtenir une contraction perceptible du muscle. Si ces nouvelles fibres ont des paramètres d'excitabilité différents de ceux des fibres ayant fonctionné au départ, on observe une variation, qui

---

<sup>1)</sup> Présenté dans la séance de la Société Polonaise de Physiologie du 3.VI.1937.

est uniquement l'indice des troubles de la transmission neuromusculaire et qui ne signifie nullement qu'il y ait un changement d'excitabilité du nerf. C'est la réaction propre de ce dernier et non l'action qu'elle exerce sur le muscle, qui seule pourrait fournir dans ces conditions des renseignements corrects sur l'excitabilité du nerf.

Comme le magnésium étudié précédemment n'agissait que sur l'élément musculaire de la préparation, nous avons voulu étudier à ce point de vue un poison curarisant qui agit sur le nerf et nous avons choisi la strychnine.

#### Technique.

Nos expériences ont été faites de février à mai sur les Grenouilles vertes (*Rana esculenta*) capturées en septembre. Les préparations de sciatique-gastrocnémien séjournaient après l'opération de 2 à 5 heures dans le liquide de Ringer. On les transportait ensuite dans une chambre humide en ébonite. La partie de la chambre destinée au nerf était divisée en plusieurs compartiments, communiquant par les encoches qui laissaient passer le nerf. Deux électrodes en argent chloruré aboutissaient à chaque compartiment. Elles ne touchaient pas le fond et on posait le nerf sur ces électrodes. La chambre musculaire était munie d'un orifice laissant passer le fil qui reliait le tendon du muscle au myographe sensiblement isométrique. Une lame de verre recouvrait la chambre humide en la protégeant contre la dessiccation. Nous obtenions dans ces conditions, même sans faire passer de l'oxygène, une très bonne stabilité de la préparation (sauf quelques journées très chaudes lorsque la température du laboratoire atteignait 30°). On observait parfois une légère tendance de la rhéobase à monter. L'élévation excédait rarement cependant 15% en plusieurs heures. Comme les segments de temps comprenant une série complète de mesures étaient beaucoup plus brefs, la variation spontanée pouvait être considérée comme insignifiante.

Nous avons employé les solutions de nitrate de strychnine dans le liquide de Ringer. Les concentrations variaient de 0.03 à 0.2 p. c.

Dans certaines expériences le muscle était simplement suspendu dans l'air humide en dehors des périodes du bain strychnique, dans d'autres, il plongeait dans du Ringer pur, qu'on remplaçait au moment voulu par du Ringer strychnique. L'action de la strychnine continuait d'ailleurs de s'exercer et la curarisation de progresser même lorsqu'on retirait l'alcaïoïde de la chambre musculaire.

Quant au nerf, lorsqu'il n'était pas soumis à l'action de la strychnine, il restait dans l'air dans la plupart d'expériences. Dans quelques-unes cependant on suspendait une goutte de Ringer sur l'entre-croisement du



nerf et de l'électrode (cathode) pour les mesures préliminaires et on la remplaçait ensuite par une goutte de Ringer strychnine. Les résultats obtenus par les deux procédés étaient sensiblement identiques.

### Partie expérimentale.

Pour distinguer dans les changements d'excitabilité nerveuse ce qui revient aux modifications purement apparentes de ce qui correspond aux changements réels, nous avons institué trois séries d'expériences: 1-°. On soumettait à l'action de la strychnine une zone limitée du tronc nerveux (d'une dizaine de mm environ) dont on mesurait ensuite la rhéobase et la chronaxie et on les comparait aux valeurs observées avant l'action de strychnine. 2-°. On faisait agir la strychnine sur le muscle, seul, en mesurant l'excitabilité du nerf et on suivait le progrès de la curarisation en enregistrant la hauteur des secousses musculaires. 3-°. On faisait agir la strychnine à la fois sur le muscle et sur une partie du nerf et on mesurait l'excitabilité de la partie empoisonnée et de la partie intacte du nerf.

A. *Action de la strychnine sur le tronc nerveux.* Les principaux résultats de cette série d'expériences sont rassemblés dans le tableau I.

### T a b l e a u I.

Influence locale de la strychnine sur l'excitabilité du nerf moteur. Rhéobases et chronaxies initiales égales à 100 pour faciliter la comparaison de différentes expériences.

N° de l'expérience	Concentration en p. c.	Durée du bain de strychnine en minutes	Rhéobase	Chronaxie	Remarques
11/A	0.05	15	102	100	
20/A	0.05	30	83	100	
21/A	0.05	35	103	96	
17/A	0.1	15	123	100	L'immersion ultérieure du muscle dans la strychnine amène une curarisation complète en 15 minutes.
25/A	0.2	10	113	100	L'immersion ultérieure du muscle dans la strychnine amène une curarisation complète en 10 minutes.
1/A	0.2	15	125	100	
2/A	0.2	18	120	100	
7/A	0.2	30	138	87	
3/A	0.2	40	140	100	
23/A	0.2	50	127	118	

Après s'être assuré de la stabilité de la préparation pendant un temps de l'ordre de l'heure, on versait la solution de R i n g e r + strychnine dans un des compartiments de la chambre nerveuse et on retirait ce liquide au bout de 10 à 50 minutes, après quoi on mesurait l'excitabilité du segment empoisonné. On voit que dans 10 expériences sur 11 il n'y avait aucune diminution de chronaxie. La rhéobase montait, au contraire, plus ou moins chaque fois. Une seule expérience aberrante présentait une réduction assez importante de chronaxie. Une immersion du muscle pour les durées semblables aboutit à la disparition d'excitabilité indirecte.

Si on faisait agir la strychnine sur le nerf plus longtemps, ou, surtout, si on répétait l'immersion, on observait généralement des variations de chronaxie à côté de celles de rhéobase. Nous donnons quelques exemples des expériences comportant plusieurs immersions dans le tableau II.

T a b l e a u II.

Influence locale de la strychnine sur l'excitabilité du nerf moteur. Plusieurs immersions. Rhéobases et chronaxies initiales égales à 100 pour faciliter la comparaison de différentes expériences.

N° de l'expérience	Concentration en p. c.	Nombre d'immersions	Durée totale des bains en minutes	Rhéobase	Chronaxie	Remarques
2/A, B	0,2	2	47	150	92	
26/A, B, C, D	0,2	4	77	220	125	Température du laboratoire 30°C
7/A, B, C, D	0,2	4	110	320	71	
27/A, B, C	0,2	3	123	350	110	température du laboratoire 30°C
3/A, B	0,2	2	133	400	80	

En ce qui concerne les secousses maximales, leur amplitude ne variait pas. Les temps que duraient nos observations était insuffisant pour produire un bloc, même partiel, de conduction dans le gros tronc nerveux (v. C o p p é e et P e u g n e t '36).

B. *Muscle seul plongé dans le bain de strychnine.* L'ensemble de phénomènes que l'on observe dans cette série d'expériences diffère considérablement de ce qu'on voyait dans la série qui vient d'être décrite. L'amplitude des secousses maximales déclanchées par la stimulation indirecte



diminue presque aussitôt le bain commencé. La diminution s'accroît de plus en plus et aboutit, suivant la concentration de l'alcaloïde, soit à une curarisation complète soit à un niveau stable correspondant à une fraction d'amplitude observée au départ. La curarisation s'établit en général rapidement (v. le tableau III), les fins rameaux nerveux intramusculaires étant atteints beaucoup plus vite que le tronc nerveux. Ces relations apparaissent avec le plus de netteté dans deux expériences du tableau I (17/A et 25/A) où après avoir soumis à l'action de la strychnine une zone du tronc nerveux et après en avoir mesuré l'excitabilité, on a introduit la solution strychnique dans la chambre musculaire. Une curarisation complète s'est établie en 15 minutes dans le premier cas et en 10 dans le second.

Le tableau III contient les dernières valeurs des rhéobases et des chronaxies qu'on réussissait à mesurer avant la disparition de la transmission neuro-musculaire. On constate un accroissement de la rhéobase et une diminution de la chronaxie. L'allure des changements est cependant différente de ce qu'on observait à la suite d'action directe du poison sur le tronc nerveux. 1°. L'accroissement de la rhéobase ne dépasse jamais la marge d'excitation, tandis qu'il pouvait la dépasser largement dans les expériences de la première série. La diminution de la chronaxie correspond à celle que l'on obtient lorsqu'on passe aux secousses maximales. 2°. Les variations de la rhéobase et de la chronaxie apparaissent toujours simultanément, tandis que dans le cas d'action sur le nerf l'élévation de la rhéobase précède de beaucoup la baisse de la chronaxie. 3°. Les variations de la rhéobase et de la chronaxie sont en rapports étroits avec le progrès de la curarisation, c'est à dire avec la diminution d'amplitude des secousses maximales. L'étendue de ces variations ne dépend par contre ni de la concentration de la strychnine ni de la vitesse du développement de la curarisation.

Les changements d'excitabilité nerveuse n'apparaissent dans ces conditions que lorsque la transmission neuro-musculaire est très gênée. Nous donnons à titre d'exemple le procès-verbal d'une expérience où la dilution du bain des strychnine était suffisamment grande pour déterminer l'évolution lente des phé-

nomènes. L'amplitude des secousses maximales à chaque instant peut être considérée comme mesure du degré de curarisation.

T a b l e a u III.

Les variations apparentes d'excitabilité nerveuse lorsque le muscle seul est plongé dans le bain de strychnine. Rhéobases et chronaxies initiales égales à 100 pour faciliter la comparaison de différentes expériences.

N° de l'ex- périence	Concen- tration en p. e.	Durée du bain de strychnine en minutes	Rhéobase	Chronaxie	Remarques
9/B	0.03	44	154	73	curarisation presque complète
20/B	0.05	15	119	95	curarisation complète
14/A	0.1	11	130	67	" "
23/B	0.2	28	131	77	" "
5/A	0.2	5	120	78	" "
6/C	0.2	5	187	—	curarisation complète avant qu'on eût le temps de mesu- rer la chronaxie.

Quant à la chronaxie du muscle, mesurée dans quelques expériences, elle restait invariable même après la disparition complète de la transmission neuro-musculaire.

Exp - ce du 16 mars 1937.

Heure	Rhéobase en cinquan- tièmes de volt	Chronaxie en millièmes de $\mu$ F	Hauteur de la secousse en mm
15 <sup>9</sup>	20	70	16
15 <sup>12</sup>	Strychnine à 0.05 p. e. dans le liquide de Ringer introduite dans la chambre musculaire.		
15 <sup>32</sup>	Strychnine rejetée et remplacée par du Ringer pur dans la chambre musculaire. (Le nerf est suspendu pendant toute la durée de l'expérience dans l'air humide).		
15 <sup>35</sup>	19.5	75	11
15 <sup>37</sup>	20	70	
15 <sup>43</sup>	21	70	8.5
15 <sup>46</sup>	22	70	3.5
15 <sup>54</sup>	23.5	65	1
15 <sup>59</sup>	25	60	0.5
16 <sup>4</sup>	28	55	trop faible pour être inscrit
16 <sup>8</sup>	Disparition complète de l'excitabilité indirecte.		

L'ensemble de résultats de cette série d'expériences amène à conclure que nous avons affaire ici aux changements apparents d'excitabilité nerveuse. Ces pseudo-changements sont déterminés, ainsi que nous l'avons montré dans le travail précédent, par des troubles de la transmission neuro-musculaire. Ceci



est d'autant plus facile à admettre ici que la région cathodique du nerf n'a pas du tout été soumise à l'action de l'alcaloïde.

C. *Muscle et nerf plongés dans la solution strychnique.* Si la préparation neuro-musculaire toute entière est plongée dans le bain strychnique, on peut s'attendre à des résultats complexes où interviendront à la fois les pseudo-variations dues aux troubles de la transmission neuro-musculaire et les variations réelles dues à l'action directe de la strychnine sur l'endroit empoisonné du tronc nerveux auquel on applique le stimulus. Il est clair que le résultat global dépendra surtout de la vitesse d'établissement de la curarisation. Si elle est grande, l'action directe sur le nerf n'a pas le temps de se développer, si, au contraire, la curarisation progresse lentement, on peut discerner l'influence locale de la strychnine.

Pour analyser ces effets complexes nous avons eu recours aux deux procédés: 1°. On comparait les changements d'excitabilité nerveuse obtenus après l'action de la strychnine à la marge d'excitation et à la chronaxie des secousses maximales déterminées au préalable avant le bain de strychnine. 2°. On plongeait dans le bain de strychnine le muscle et une partie du nerf. Une autre partie restait en dehors du bain et servait de témoin. Les mesures sur le témoin ont alors été faites aussi loins que possible de la portion empoisonnée.

T a b l e a u IV.

Nerf et muscle plongés dans le bain de strychnine. Dans les deux premières expériences on mesurait préalablement à l'action de strychnine la rhéobase et la chronaxie des secousses maximales. Dans les deux dernières — on laissait une partie du nerf en dehors du bain de strychnine. Elle servait de témoin. Les rhéobases et les chronaxies initiales au seuil sont égales à 100 pour faciliter la comparaison de différentes expériences.

N° de l'expérience	Concentration	Durée du bain de strychnine en minutes	Curarisation totale apparaît après la fin du bain en minutes	Témoin		Après strychnine	
				Rhéobase	Chronaxie	Rhéobase	Chronaxie
				Seuil des secousses maximales			
19/A	0.05	16	0	133	79	130	82
24/A	0.25	5	28	122	83	130	66
				Partie normale du nerf		Partie empoisonnée du nerf	
12/A	0.05	20	36	140	78	145	79
16/A	0.033	30	42	158	76	163	61

Nous donnons dans le tableau IV deux exemples de chaque série de ces expériences. Les expériences 19/A et 12/A ont abouti à la curarisation totale avant que l'action locale de la strychnine ait pu se manifester. Dans les deux autres expériences les changements d'excitabilité nerveuse étaient plus profonds que les variations apparentes dues à la curarisation. L'action directe de la strychnine sur le tronc nerveux s'y est surajoutée aux pseudo-variations.

#### Résumé et conclusions.

1°. Nous avons retrouvé à la suite de nombreux auteurs, M. L a p i c q u e ('07), L. et M. L a p i c q u e ('13), B r e m e r et R y l a n t ('25), K n o e f f e l ('36) et autres, que la strychnine, agissant localement sur un segment du nerf de Grenouille, y détermine un accroissement de la rhéobase et une diminution de la chronaxie. Cette dernière apparaît d'ailleurs beaucoup plus tard que l'élévation de la rhéobase. (Tableaux I et II).

2°. Lorsqu'on ne fait agir la strychnine que sur le muscle d'une préparation neuro-musculaire, on observe *sur le nerf* une variation des paramètres d'excitabilité. Elle consiste, comme dans le cas d'action locale sur le nerf, en un accroissement de la rhéobase et une diminution de la chronaxie. Ici, cependant l'évolution des phénomènes est différente et généralement beaucoup plus rapide. Les changements de la rhéobase sont rigoureusement synchrones à ceux de la chronaxie et sont étroitement liés au degré de la curarisation. Ils ne dépendent pas de la concentration de strychnine pourvu que celle-ci soit suffisante pour curariser la préparation. (Tableau III).

L'ensemble de ces faits amène à conclure au caractère apparent des variations d'excitabilité nerveuse que l'on observe dans ces conditions. Ces variations apparentes sont dues à l'hétérogénéité des fibres motrices contenues dans le tronc nerveux (en ce qui concerne leur excitabilité (K o n o r s k i et L u b i Ń s k a '37). C'est grâce à cette hétérogénéité préexistante que la méthode d'observation de la secousse musculaire prise pour indice d'activité du nerf devient inadéquate dès qu'une curarissa-



tion partielle fait mettre en jeu lors d'une stimulation des unités motrices autres que celles qui ont fonctionné au seuil dans la préparation normale.

3°. Lorsque c'est la préparation neuro-musculaire toute entière qui est plongée dans le bain de strychnine, et si l'on observe les secousses liminaires, il apparait en premier lieu des pseudo-variations d'excitabilité nerveuse, auxquelles peuvent ou non, suivant les circonstances, s'ajouter des variations réelles.

#### Bibliographie.

- Bremér F. et Rylant P. 1925. L'action locale de la strychnine sur les nerfs et sur les centres. *C. R. Soc. Biol.* 92, 1329. — Coppée G. et Peugeot H. B. 1936. Action du sulfate de strychnine sur les nerfs périphériques. *C. R. Soc. Biol.* 123, 283. — Kmœfel P. K. 1936. Strychnine and the chronaxie. *Amer. J. of Physiol.* 117, 638. — Konorski J. et Lubińska L. 1937. Sur le caractère apparent des troubles de l'excitabilité nerveuse pendant la curarisation partielle par l'ion magnésien. *Arch. Intern. Physiol.* 44, 249. — Konorski J. and L. Lubińska, 1936. An attempt to analyse „magnesium narcosis”, Part III. *Acta Biol. Exper.* 10, 251. — Lapique L. et M. 1913. Action locale de la strychnine sur le nerf; hétérochronismes non curarisants; poisons pseudo-curarisants. *C. R. Soc. Biol.* 74, 1012. — Lapique M. 1907. Action de la strychnine sur l'excitabilité du nerf moteur. *C. R. Soc. Biol.* 62, 1062.

[Biologisches Institut der Universität Wilno].

Jan Dembowski.

### Über die Rhythmik der Parameciumteilungen.

Eingegangen am 29.IX.1937.

Der vorliegende Aufsatz bildet einen Bericht über die Kollektivarbeit, welche von Mitarbeitern des Biologischen Institutes der Universität Wilno ausgeführt wurde. Es nahmen daran folgende Personen Teil: P. Borenstein, M. Chejfec, S. Dembowska, W. Górski, J. Kagan, A. Lubocka, E. Petrusiewiczowa, H. Rozetówna, A. Strokowski, R. Szlepówna, S. Wawrzyńczyk und der Leiter des Institutes. Der ganze Plan der Arbeit, die Methodik einzelner Experimente, Ausführung und Kontrolle der Versuche, sowie deren Deutung alles dies ist ein Werk des Kollektivs, welcher als der eigentliche Verfasser der Arbeit zu gelten hat.

#### Das Problem.

Im Jahre 1932 veröffentlichte Adolph eine interessante Arbeit über den Tagesrhythmus in den *Paramecium*teilungen. In Einzelkulturen, auf einer jede 24 Stunden gewechselten Heuinfusion gezüchtet, fand er stets, dass unabhängig von der Tagesstunde, in welcher der Versuch angestellt wurde, das Maximum der Teilungszahl auf Nachtsstunden (18 bis 1) entfällt. Wilczyński und Lebiéd', welche diese Versuche mit ähnlicher Methode, allerdings in einigen Fällen unter Anwendung einer Reinkultur von *Bacterium coli* als Nahrung, wiederholten, konnten keine solche Regelmässigkeit feststellen, vielmehr waren die Maxima der Teilbarkeitskurve ganz zufällig auf verschiedene Tagesstunden verteilt. Vieveger und Szulzingerówna prüften diese Frage an *Colpidium*



*colpoda*, ebenfalls an Heuinfusionskulturen unter täglichem Wechsel des Mediums. Auch sie fanden keine Regelmässigkeit im Teilungsrhythmus. Zugleich stellten sie entgegen A d o l p h fest, dass die Lage der Teilungsmaxima mit der Stunde der Versuchaufstellung unmittelbar zusammenhängt. Bei dem grossen biologischen Interesse der ganzen Frage haben wir eine erneute Prüfung derselben unternommen.

#### Material und Methode.

Die Versuche wurden an *Paramecium caudatum* ausgeführt. Unsere erste Sorge war: die Vervollkommnung der Methode. Die Heuinfusion hat eine schwankende Zusammensetzung und dieselbe lässt sich nicht standardisieren. Wir arbeiteten teils mit reinen Kulturen von *B. coli* von konstanter Konzentration, teils mit quantitativ vorbereitetem Aufguss aus getrockneten Salatblättern. Als besonders wichtig hatte sich die Berücksichtigung des „lag-period“ (R o b e r t s o n) erwiesen. Kommen die Tiere in ein neues Medium, so reagieren sie mit Aufhaltung der Teilungsprozesse, was mehrere Stunden andauert. Dann kommt eine vermehrte Teilbarkeit, welche bald abklingt. Es entsteht die Möglichkeit, dass die Teilungsrhythmen in den Versuchen von A d o l p h in der Rhythmik der Methode ihren Grund hatten, weil ja dieser Verfasser, wie auch seine Nachfolger, das Kulturmedium jede 24 Stunden wechselte. Wir wandten eine arhythmische Methode an. Wir unterbrachten Einzeltiere in einer grösseren Flüssigkeitsmenge (0.15 bis 0.3 ccm) und wir verschafften ihnen eine Nahrungskonzentration, welche für mehrere Tage ausreichte. Dann aber wurde das Medium nicht weiter gewechselt. In anderen Versuchen wurde zwar das Medium gewechselt, doch geschah dies in vom Tagesrhythmus sehr abweichenden Fristen (je 2 bzw. je 4 Stunden), wobei der Wechsel ein teilweiser war, indem wir etwa 10% der Flüssigkeit absaugten und durch frische Nahrung ersetzten. Ein besonderer Vorteil unserer Arbeit bestand darin, dass jeder Versuch von mehreren Personen zugleich kontrolliert wurde, was die Dauer der Kontrolle wesentlich kürzte und eine öftere Ausführung derselben ermöglichte.

#### Die Versuche.

V e r s u c h I. Am 30.III an 300 Einzeltieren angestellt. Nahrung *B. coli* (20000 Bakterien im 1 ccm), Versuchsbeginn um 7 Uhr. Kontrolle jede Stunde durchgeführt. Fand man zwei Infusorien in einem Versuchsgefäss, so entfernte man eines davon. Ebenso verfahren wir in allen Versuchen der ersten Gruppe. Infolge einer schwachen Teilbarkeit, wurde der Versuch nach zwei Tagen abgebrochen.

Das Resultat zeigt die Tabelle I. Es ist dies eine reduzierte Tabelle mit Klassenspielraum von 6 Stunden. Der Verlauf des Versuchs ist typisch.

Zunächst sind keine Teilungen vorhanden (Lagerperiode), dann kommt ein Maximum während der Nacht (genauer zwischen 21 und 1), schliesslich klingt die Teilbarkeit ab. Ein Maximum am zweiten Tage ist überhaupt nicht aufgetreten. Der Versuch liefert demnach ein Maximum in den von A d o l p h angegebenen Tagesstunden.

V e r s u c h II. Angestellt am 2.IV um 15 Uhr. 300 Individuen. dieselbe Technik. Resultat auf Tab. I und Kurve II. Wiederum sehen wir eine Lagerperiode und ein Maximum, diesmal in den Tagesstunden (genauer zwischen 9 und 15).

Tabelle I.

Tagesstunden.

Nr.	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7
	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13
I	0	24	47	49	14	7	4	12	—	—	—	—	—
II	—	0	0	27	58	82	43	47	29	34	26	—	—
III	3	1	10	55	55	43	32	29	33	33	24	28	—
IVa	1	9	21	15	19	21	16	29	6	3	0	6	5
IVb	—	5	11	23	22	23	20	16	17	9	15	10	5
IVc	—	—	0	2	22	15	24	17	13	13	12	1	11
IVd	8	8	20	19	34	20	27	17	15	19	13	11	13
IVe	0	5	15	24	11	19	25	27	12	1	1	5	—
IVf	1	0	2	2	2	11	8	20	8	11	5	11	3

Absolute Anzahl der Teilungen in verschiedenen Tagesstunden.

V e r s u c h III. Angestellt am 17.IV um 7 Uhr. 300 Infusorien, dieselbe Technik. Resultat auf Tab. I und Kurve III. Ein Vergleich der Kurven II und III zeigt sehr deutlich, wie sich das Maximum mit einer Verschiebung des Versuchsbeginns ebenfalls verschiebt. Der Befund von V i e w e g e r und S z u l z i n g e r ó w n a wird also von uns bestätigt. Das Maximum entfällt abermals auf Nachtsstunden (genauer zwischen 3 und 7).

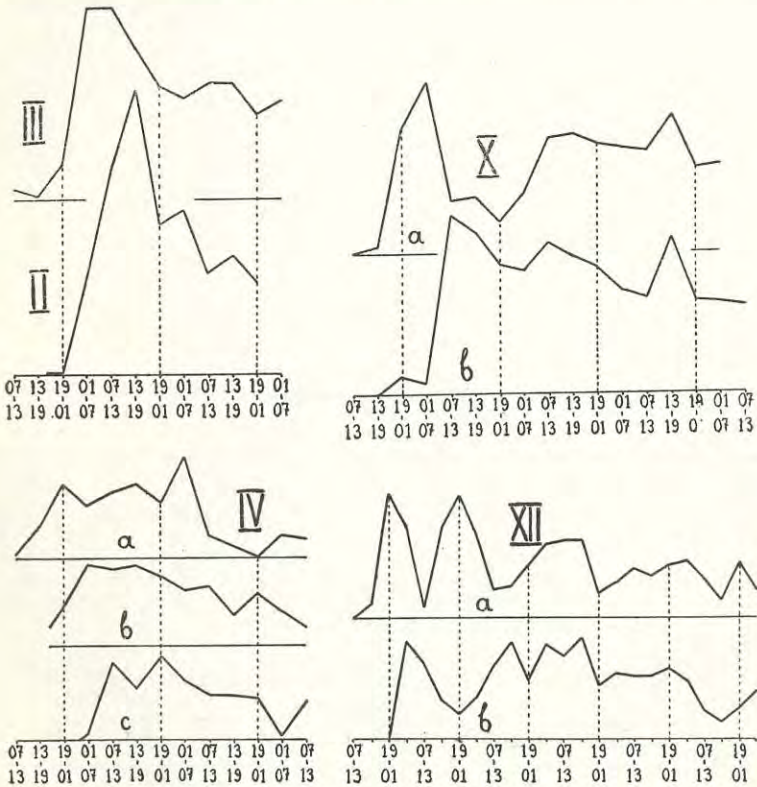
V e r s u c h IV S e r i e f. Angestellt am 1.V um 7 Uhr. 50 Infusorien, dieselbe Technik. Resultat auf Tab. I. Man erhielt eine lange Lagerperiode, das erste Maximum ziemlich undeutlich, jedenfalls in den Tagesstunden.

In allen besprochenen Versuchen dienten die *B. coli* als Nahrung. Im Wasser aufgeschwemmt, sterben die Bakterien massenhaft ab, wobei sie zum Boden fallen. Die Nahrungsvorräte des Mediums vermindern sich rasch, woraus sich die schwache Teilbarkeit der Infusorien ergibt. Anders die Salatkulturen. 2 g getrockneter Salatblättern wurden in einem Gaze-säckchen 5 Minuten lang im siedenden Wasser gehalten, dann kam das Säckchen in 200 ccm kalten Leitungswassers. Nach 24—48 Stunden wurde der erhaltene Aufguss 5-mal mit Leitungswasser verdünnt. In einem sol-



chen Medium überleben die Bakterien und sie vermehren sich. Der Aufguss kommt für alle nachfolgenden Versuche in Betracht.

V e r s u c h IV. Am 1.V in mehreren Serien zu je 50 Infusorien aufgestellt. Serien a), b) und c) stellten wir in drei verschiedenen Tagesstunden, und zwar der Reihe nach um 7, 14 und 19 Uhr an. Resultat auf Tab. I und Kurven IV. Mit der Verschiebung der Anstellungsstunde verschiebt sich auch entsprechend das erste Maximum. Und zwar liegt bei a) das Maximum zwischen 21-1 Uhr, bei b) zwischen 1 und 5, bei c) zwischen 7 und 11. Ausser diesen obligaten Maxima, welche das Ende der Lagerperiode bezeichnen, ist der Verlauf der Kurven unregelmässig, eine Rhythmik ist an denselben nicht zu erkennen.



Serie d) unterscheidet sich durch die Methode. 24 Stunden vor der Anstellung bekam die Massenkultur frische Nahrung zugegossen. Dann nahmen wir etwas Massenkultur in ein grosses Uhrglas, mit einer Kapillarpipette sogen wir Flüssigkeit ohne Infusorien ein und diese Flüssigkeit brachten wir in die Versuchsgläser. Dann kamen Einzeltiere aus demselben Uhrglas hinein. Die Methode hatte zum Zweck jeden Wechsel des Mediums

zu vermeiden. Trotzdem ist es uns nicht gelungen die Lagperiode wöllig auszuschalten. Versuchsbeginn um 7 Uhr. Die Maxima erschienen zwischen 21-1, dann zwischen 7-11, wiederum 21 und zwischen 15 und 17. Eine Rhythmik ist nicht erkennbar.

In der Serie e) sogen wir jede 4 Stunden etwa 0,015 ccm der Flüssigkeit aus den Versuchsgefäßen ab und füllten dieselben mit frischem Aufguss nach. Versuchsbeginn um 7 Uhr, das erste Maximum um 1, das zweite zwischen 21 und 3.

V e r s u c h X. Angestellt am 8.VI in zwei Serien. Serie a) bestand aus 200 Infusorien, Versuchsbeginn um 7 Uhr, Serie b) ebenfalls aus 200 Tieren, Beginn um 15 Uhr. 24 Stunden vor Beginn jeder Serie bekam die Urmassenkultur frische Nahrung zugegossen. Bei Aufstellung zentrifugiert man in einer Portion der Kultur die Infusorien ab, die Flüssigkeit brachte man in die Versuchsgefäße und man setzte Einzeltiere aus derselben Massenkultur hinein. Es handelte sich wiederum um Vermeidung des Mediumwechsels und somit des Lag. Dieses letztere ist uns abermals nicht gelungen, die Lagperiode war deutlich. Der Versuch dauerte 4 volle Tage, jede 4 Stunden wechselte man das Medium teilweise ab. Wie aus der Tab. II und Kurven X ersichtlich, zeigt der Verlauf des Versuches keinerlei Rhythmik. Die Abhängigkeit der Lage des ersten Maximum von der Stunde des Versuchsbeginns tritt ganz klar zutage. Von zweitem Tage an verlaufen die beiden Kurven annähernd parallel. Die Tiere beider Serien befanden sich unter denselben Aussenbedingungen, offenbar deshalb glich sich deren Verhalten allmählich aus.

Tabelle II.

Tagesstunden.

Nr.	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7
	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	13	19	1	7	
Xa	0	2	36	49	15	16	9	17	33	34	31	30	29	39	24	25	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Xb	—	0	5	3	51	46	37	35	43	39	36	29	27	44	26	26	25	—	—	—	—	—	—	—	—
XIIa	0	4	36	26	3	26	35	24	8	9	15	21	22	22	7	10	14	12	15	16	11	5	16	8	
XIIb	—	—	1	28	22	11	7	12	21	28	17	27	24	29	15	19	18	18	20	17	8	5	9	14	

V e r s u c h XII. Am 22.VI in zwei Serien zu je 100 Infusorien angestellt. Es war dies der längste Versuch, welcher 6 volle Tage andauerte. Die Serie a) begann um 7 Uhr, die Serie b) um 19 Uhr. Man kontrollierte die Tiere jede 3 Stunden. Die Infusorien entstammten einer wilden Kultur, welche draussen angelegt und gepflogen war, ohne die stabilisierten Laboratoriumsbedingungen zu kennen. Die Tiere in zentrifugierter Kulturflüssigkeit, jede 3 Stunden ein teilweiser Mediumwechsel. Resultat auf Tab. II und Kurven XII. Auf der oberen Kurve sieht man eine gewisse Rhythmik, indem die meisten Maxima auf die Tagesstunden 19-1 entfallen. Doch ist dies keinesfalls regelmässig. Diese Verhältnisse werden auf der unteren Kurve geradezu umgekehrt: in den meisten Fällen entspricht den Tages-



stunden 19-1 eine Erniedrigung der Kurve. Die Abhängigkeit des ersten Maximums sowie des ganzen Kurvenverlaufs von der Stunde des Versuchsbeginns ist nochmals ganz offenbar. Auch hier sieht man vom vierten Versuchstage ab eine Parallelität beider Kurven.

Für die Versuche I-X stellen wir in der Tab. III die mittlere Anzahl der Zellteilungen pro 100 Individuen berechnet in 2-Stundenperioden zusammen. Die Tabelle bezieht sich auf das Verhalten von rund 1600 Individuen. Für den Versuch XII wird dasselbe in 3-Stundenperioden zusammengestellt. Man erhält ein echtes Plateau, in welchem praktisch genommen keine Bevorzugung irgendwelcher Tagesstunde zu sehen ist.

Tabelle III.

Tagesstunden.

Nr.	7	9	11	13	15	17	19	21	23	1	3	5
	9	11	13	15	17	19	21	23	1	3	5	7
I — X: %	6	5	5	5	4	4	4	4	5	6	5	5

Tagesstunden.

Nr.	7	10	13	16	19	22	1	4
	10	13	16	19	22	1	4	7
XII: %	8	7	6	9	8	8	9	9

Mittlerer Prozent der Teilungen zu verschiedenen Tagesstunden. Oben für Versuche I—X, unten für XII.

Die besprochenen Versuche lassen folgende Schlüsse zu:

1) In allen Fällen folgt der Versuchsaufstellung eine Lagperiode von mehreren Stunden, nach welcher eine vermehrte Teilbarkeit und somit ein Maximum der zugehörigen Kurve auftritt.

2) Die Lage des ersten Maximums ist von der Stunde des Versuchsbeginns unmittelbar abhängig.

3) Keine bestimmte Tagesstunde wird bevorzugt.

Die Versuche der zweiten Gruppe hatten eine andere Methodik. Hier wurden die Teilungen nur einmal, und zwar am Ende des Versuches gezählt. Stets handelte es sich um Tiere des wilden Stammes.

Versuch V. Aufgestellt am 11.V. Die erste Serie aus 200 Tieren kam in die Versuchsgefäße mit zentrifugiertem Kulturmedium um 20 Uhr, die zweite Gruppe von 200 Tieren — um 8 Uhr des nächsten Tages.

Nach 12 Stunden seit der Aufstellung zählte man die Infusorien. Die Tiere der ersten Serie verblieben somit unter den Versuchsbedingungen eine Nacht, diejenigen der zweiten einen Tag. Sollten die Teilungen in den Nachtsstunden häufiger sein, so dürfte das die Endzahl der Infusorien zugunsten der Nachtserie verschieben. Aus der Tab. IV ersehen wir, dass das Resultat dieser Erwartung gerade entgegengesetzt war: die Tagserie ist der Nachtserie überlegen.

Tabelle IV.

Nr.	Aufstellung	Anfangszahl	Endzahl	Temp.
V	N	200	261	16°
	T	200	347	
VI	NTN	200	433	18 — 20°
	TNT	200	524	
IX	NTN	200	347	3 — 17°
	TNT	200	235	
XI	LNTN	200	400	17 — 25°
	LTNT	200	418	

Überwiegen der Nacht — 1441 Tiere  
 „ des Tages — 1524 „

V e r s u c h VI. Am 13.V um 19 Uhr und am 14.V um 7 Uhr aufgestellt. Dieselbe Technik, doch zählte man die Tiere nach 36 Stunden. Die erste Serie verblieb im Versuch die Reihenfolge: Nacht-Tag-Nacht, die zweite: Tag-Nacht-Tag. Man sollte in der ersten Serie mehr Infusorien erwarten. Und nochmals war das Resultat ein umgekehrtes.

V e r s u c h IX. Aufgestellt am 31.V um 20 Uhr und am 1.VI um 8 Uhr. Dieselbe Technik, doch standen die Versuchsgefäße draussen und sie waren bedeutenden Temperaturschwankungen ausgesetzt. Diesmal waren die Tiere der Nachtserie zahlreicher.

V e r s u c h XI. Aufgestellt am 16.VI um 8 und um 20 Uhr. Zählung nach 48 Stunden. Die vorigen Versuche haben die Lagperiode nicht genügend berücksichtigt. Sollte dieselbe einige 12 Stunden dauern, so könnte dies die Bedingungen in Versuchen VI und IX einigermaßen ausgleichen. In einer Serie verbrachten die Tiere im Versuch die Reihenfolge Lag-Tag-Nacht, in der zweiten Lag-Nacht-Tag. Bei neuer Versuchsanstellung waren es aber respektive: Lag-Nacht-Tag-Nacht, bzw. Lag-Tag-Nacht-Tag, also ein Überwiegen der Nacht bzw. des Tages. Das Resultat zeigte fast eine vollkommene Gleichheit beider Serien. Fasst man alle Versuche der zweiten Gruppe zusammen, so ist die Anzahl der Tiere in Serien mit Überwiegen der Nacht fast dieselbe wie in denjenigen mit Überwiegen des Tages. Es ist keine Spur der Überlegenheit der Nachtsstunden in bezug auf die Anzahl von Teilungen zu bemerken.



### Besprechung der Ergebnisse.

Wollen wir nun unsere Ergebnisse mit denjenigen unserer Vorgänger vergleichen. A d o l p h wechselte jede 24 Stunden das Medium seiner Tiere, und jedem solchen Wechsel musste notwendigerweise eine Lagperiode folgen. Wir stellen hier einige charakteristische Beispiele aus seiner Arbeit zusammen.

Vers. I Ser. 1:	Beginn	9 Uhr,	Maxima	24 — 12 — 24 — 21 Uhr
„ „ „ 2:	„	9 „	„	24 — 21 — 21 Uhr
„ II:	„	18 „	„	6 Uhr
„ III Ser. 1:	„	12 „	„	21 — 21/24 — 21 Uhr
„ „ „ 2:	„	15 „	„	24 Uhr
„ „ „ 3:	„	18 „	„	3 — 21 — 21 Uhr

Die Regelmässigkeit der Erscheinung ist offenbar. Nur das Maximum um 12 Uhr in der ersten Zeile ist hier unverständlich. Hatte man, wie sonst, das Medium um 9 Uhr gewechselt, so konnte das Maximum nicht um 12 auftreten, eine so kurze Lagperiode kommt nach unseren Erfahrungen nie vor. Indem aber dieser Gipfel auch den Schlüssen des Autors widerspricht, da ja die Teilungen in den Nachtsstunden ihr Maximum aufweisen sollten, wird es wahrscheinlich richtiger dieses Maximum als zufällig zu betrachten. Sonst sehen wir überall ein regelmässiges Auftreten der Lagperiode, welche sofort nach dem Mediumwechsel eintritt und 9 bis 15 Stunden dauert. Auch die Verschiebung des ersten Maximums in Anhängigkeit von dem Versuchsbeginn tritt ganz deutlich hervor. Die ganze Arbeit von A d o l p h, deren faktische Ergebnisse wir nunmehr voll bestätigen, bezieht sich nur auf die Lagperiode, weiter enthält sie nichts. Am Ende der deutschen Zusammenfassung formuliert A d o l p h folgenden Satz: „alle oben erwähnten Tatsachen dagegen veranlassen den Verfasser einen hypothetischen Faktor anzunehmen, der rhythmisch im Tageszeitraume den Teilungsverlauf der Protoplastenzelle... beeinflusst“ (S. 234). Auch diesen Schluss bestätigen wir. Doch ist der betreffende Faktor nicht mehr hypothetischer Natur, wir sind in der Lage denselben zu nennen. Es ist dies der rhythmische Wechsel des Mediums. Die Rhythmik der Ergebnisse von A d o l p h hat in der Rhythmik seiner Me-

thode ihren Grund. Die Rhythmik wird den Tieren aufgezwungen.

Die Kurven, welche die Arbeit von *W i l c z y ń s k i* und *L e b i e d'* begleiten, können von zwei grundverschiedenen Standpunkten betrachtet werden. Einmal handelt es sich um rein variations-statistische Feststellungen. Von diesem Gesichtspunkte aus sind die Schlüsse der Verff. völlig berechtigt, denn tatsächlich ist diesen Kurven keinerlei Regelmässigkeit zu entnehmen. Es treten da mehrere Gipfel auf, die auf verschiedene Tagesstunden ganz phantastisch verteilt sind. Für die statistische Betrachtung sind ja alle Gipfel gleichberechtigt. Doch lassen die Kurven auch eine physiologische Deutung zu. Auf Grund unserer Ergebnisse haben wir die klare Möglichkeit wesentliche Gipfel der genannten Kurven von den zufälligen zu unterscheiden. Als wesentliche Gipfel bezeichnen wir solche, für deren Auftreten ein genügender physiologischer Grund angegeben werden kann. Dieser Grund besteht im Vorhandensein einer Lagperiode. Sobald man das Medium regelmässig jede 24 Stunden wechselt, so muss nach jedem Wechsel eine Lagperiode eintreten, welcher ein Maximum der Kurve nachfolgt. Stelen wir den Kurven von *W i l c z y ń s k i* und *L e b i e d'* entnommene Daten zusammen.

Kurve	I:	Beginn	21 Uhr,	Maxima:	3 — 3 — 3 Uhr
„	III:	„	9 „	„	18 Uhr
„	IV:	„	9 „	„	15 Uhr
„	V:	„	9 „	„	18 — 15 Uhr
„	VI:	„	9 „	„	21 — 18 — 15 Uhr
„	VII:	„	9 „	„	12 — 15 Uhr.

Also überall tritt eine Lagperiode auf, in einigen Versuchen mit grosser Regelmässigkeit. Die Kurve II übergehen wir, da sich dieselbe auf eine Massenkultur bezieht. In der Tabelle stellen wir demnach die wesentlichen Gipfel der Kurven zusammen. Alle anderen Gipfel, obwohl den aufgezeigten an Höhe oft überlegen, müssen als zufällig gelten, da weder wir, noch *W i l c z y ń s k i* und *L e b i e d'* für deren Auftreten irgendwelchen genügenden Grund angeben können. Gibt man das zu, so erweist sich, dass *W i l c z y ń s k i* und *L e b i e d'*



in ihren Versuchen die Resultate von A d o l p h bestätigt hatten. Es ist dies übrigens begreiflich. Sie wandten doch prinzipiell dieselbe Methode an: in den meisten Versuchen handelte es sich um eine ganz ähnlich zubereitete Heuinfusion, die Art der Aufstellung und der Kontrolle der Versuche war dieselbe, ganz abenso hatte man das Medium rhythmisch gewechselt und man arbeitete mit demselben *Paramecium caudatum*. Bei der Ähnlichkeit der Methode ist auch eine Ähnlichkeit der Resultate zu erwarten, was tatsächlich zutrifft.

Was die Ergebnisse von V i e w e g e r und S z u l z i n g e r ó w n a anbelangt, so ist ein Vergleich derselben mit den unserigen etwas schwer, da die Verff. mit *Colpidium* arbeiteten, welche sich bedeutend öfter teilen. Auch der Vergleich der Lagperiode von *Colpidium* mit derjenigen von *Paramecium* steht noch aus. Doch stimmen wir diesen Verff. vollkommen darin zu, dass das Auftreten der Kurvengipfel mit der Stunde des Versuchsbeginns zusammenhängt.

Tabelle V.

	B. Coli		Salatwasser				
	Lag	1-2	Lag	1-2	2-3	3-4	4-5
n	653	204	609	630	516	257	89
M	23.3	23.5	18.4	21.0	20.0	21.2	22.3
$\sigma$	7.5	7.5	7.4	6.2	8.2	8.7	8.2

Noch eine andere Regelmässigkeit ist den Kurven von W i l c z y n s k i und L e b i e d' zu entnehmen. Man bemerkt darin eine gewisse Tendenz zum Verschieben der Maxima, die intermaximalen Zeiträume scheinen kleiner als 24 Stunden zu sein. So sehen wir aufeinanderfolgende Maxima um 18 und um 15 Uhr, oder um 21 — 18 — 15 Uhr. Ähnlich bei A d o l p h sahen wir zugehörige Maxima um 24 — 21 — 21 Uhr oder um 24 — 21 — 21 Uhr usw. auftreten. Diese Erscheinung findet ihre einfache Erklärung. Vergleicht man die Länge des Intervalls zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen, so ergibt sich, dass die Mittelwerte der so erhaltenen Variabilitätsreihen ziemlich konstant sind. Dies zeigt die Tab. V. 1—2 be-

deutet in derselben die Zeitspanne zwischen der ersten und zweiten Teilung, 3 — 4 zwischen der dritten und der vierten Teilung usw. Aus Raummangel führen wir nur das allgemeine Ergebnis an. Es bedeuten in der Tabelle:  $n$  — die Anzahl der berücksichtigten Individuen,  $M$  — den Mittelwert,  $\sigma$  — die Streuung. Der Mittelwert schwankt zwischen 20 und 23,5 Stunden ohne 24 Stunden zu erreichen. Dies bedeutet, dass unter Temperaturen, mit welchen sowohl wir, wie Adolph sowie Wilczyński und Lebieď zu tun hatten, die Dauer des Teilungszyklus von *Paramecium* weniger als 24 Stunden beträgt. Das erklärt die soeben erwähnte Verschiebung der Maxima. Zugleich wird dadurch ein regelmässiger Tagesrhythmus der Teilungen ganz unwahrscheinlich.

In derselben Tabelle sehen wir ferner Werte für die Dauer der Lagperiode, als Zusammenstellung der Zeitspanne zwischen dem Versuchsbeginn und der ersten Teilung aller Einzeltiere. Die Dauer der Lagperiode erweist sich als derselben Grössenordnung, wie die Dauer des Intervalls zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen. Diese Feststellung zieht weittragende biologische Konsequenzen nach sich, welche sich auf das Wesen der Lagperiode beziehen. Es wird wahrscheinlich, dass dieselbe in einem Rückgang aller Prozesse, welche die Zellteilung vorbereiten, besteht, wobei die Einzeltiere, unabhängig von ihrem momentanen Teilungszustand, gewissermassen gleichgeschaltet werden. Die Prüfung dieser interessanten Hypothese soll aber weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.

#### Zusammenfassung.

1°. In bezug auf die Teilungsfrequenz wird keine bestimmte Tagesstunde von *Paramecium* bevorzugt.

2°. Ein Wechsel des Mediums bedingt das Eintreten einer mehrere Stunden währenden Lagperiode, nach deren Abklingen die Zellteilungen häufiger werden. Die Lage der Maxima der Teilungskurven ist von der Stunde des jeweiligen Mediumwechsels direkt abhängig.

3°. Die Teilungsrhythmik in den Versuchen von Adolph sowie von Wilczyński und Lebieď ist eine Folge der rhythmischen Methode.



4°. Unter den in Frage kommenden Temperaturgrenzen teilt sich *Paramecium* etwas häufiger, als in 24-stündigen Abständen, was einen Tagesrhythmus der Teilungen unwahrscheinlich macht.

5°. Die Dauer der Lagperiode ist derselben Größenordnung wie die Dauer des Intervalls zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen.

#### Literatur.

- A d o l p h W. 1932. Studien über Rhythmik der Protistenteilungen. I. Über tagesperiodischen Rhythmus in der Fortpflanzung von *Paramecium caudatum*. Acta Biol. Experiment. 7 (232). V i e w e g e r T. et M. S z u l z i n g e r ó w n a. 1936. Sur le rythme journalier dans la multiplication des infusoires. Ebenda 10 (37). W i l c z y ń s k i J. und B. L e b i e d'. 1933. Über die Tageskurve der Paramecienteilungen. Ebenda 8 (268).

[Universitäts - Institut für Teoretische Physik in Kopenhagen und Medizinisch-chemisches Institut der Universität in Lwów].

**G. Hevesy, T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Ostern und J. K. Parnas.**

### **Untersuchungen über die Phosphorübertragungen in der Glykolyse und Glykogenolyse <sup>1)</sup>.**

I. Einleitung. Von *G. Hevesy* und *J. K. Parnas*.

Die Untersuchungen, über die im Folgendem berichtet wird, schliessen einerseits an die Untersuchungen über die Verteilung des Phosphors im Organismus an, die unter Anwendung von radioaktivem Phosphor als Indikator von *G. von Hevesy* <sup>2)</sup> und seinen Mitarbeitern durchgeführt werden, andererseits an die Untersuchungen des Laboratoriums von *Parnas* <sup>3)</sup> über den Phosphorumlauf in der Glykogenolyse und den Mechanismus der an der Glykolyse teilnehmenden Koenzyme. Das Ziel dieser Arbeiten ist, die Teilvorgänge der Glykogenolyse, an welchen Phosphatgruppen teilnehmen, unter Anwendung von radioaktivem Phosphor zu untersuchen und sicher-zu-stellen. Das Bild über den Phosphatumschlag, das seit 1934 entwickelt worden ist, erscheint zwar wirklich schlüssig, und ein Referent <sup>4)</sup> konnte kürzlich bemerken, dass die Arbeiten und Resultate der Heidelberger, Lemberger und Stockholmer Schule auf diesem Gebiet von einer fast erstaunlichen Übereinstimmung sind. Nichtdestoweniger erschien es wünschenswert — da dies heute möglich erscheint — die neuartigen Reaktionen der intermolekularen Phosphatübertragungen durch Beweise von einem höheren Sicherheitsgrad zu

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 1 Dezember 1937 von *J. K. Parnas*.

<sup>2)</sup> *Chievitz D.* und *Hevesy G.* Nature, 136, 754, 1935; *G. Hevesy* und *E. Lundsgaard*, Nature, 140, 275, 1937; *L. Hahn u. G. Hevesy*, Skand. Arch. f. Physiologie, 77, 148, 1937.

<sup>3)</sup> *J. K. Parnas*, *Ergebn. d. Enzymforschung*, 6, 1937.

<sup>4)</sup> *F. Chrometzka*, *Ann. Rev. of. Biochem.* 6, 215, 1937.



stützen, als dies bis jetzt möglich war. In der Lehre von dem intermediären Stoffwechsel der Fettsäuren und ihrer Abbauprodukte, sowie der Steroide geschieht diese Festigung durch die Arbeiten von R. Schönheimer und seinen Mitarbeitern<sup>5)</sup>, unter Anwendung von bezeichneten Stoffen, in welchen Wasserstoff teilweise durch Deuterium ersetzt ist. An die Stelle von Versuchen mit fremden, aber den natürlichen Bestandteilen des tierischen Organismus analog gebauten Stoffen, treten jetzt Versuche an natürlichen Bestandteilen und Teilnehmern des Stoffwechsels, die durch das Wasserstoffisotop gezeichnet sind. In analoger Weise wurde in unseren Versuchen Phosphat verwendet, welches durch einen geringen Gehalt an radioaktivem künstlichen Phosphor bezeichnet war. Zur Anwendung gelangte der radioaktive Phosphor  $P^{32}_{15}$ , der aus Schwefel durch Bestrahlung mit Radium-Beryllium gewonnen wurde. Herrn Professor Dr. Niels Bohr danken wir dafür, dass er uns das Radiumpräparat zur Verfügung gestellt hat.

Der aktive Phosphor, der eine Halbwertszeit von 14 Tagen hat, wurde in Phosphorsäure übergeführt, diese in Natriumphosphat, und mit  $Na_2HPO_4$  verdünnt. Dieses Natriumphosphat, das im Institut für theoretische Physik in Kopenhagen dargestellt worden ist, wurde im Institut für medizinische Chemie in Lwów in organische Phosphorverbindungen übergeführt, die als Intermediärprodukte der Glykogenolyse oder Glykolyse in Frage kommen. Diese Synthesen wurde ausschliesslich durch enzymatische Reaktionen bewirkt, und der Verlauf dieser Reaktionen verschaffte schon in gewissen Punkten die gewünschten Beweise für den Verlauf der Reaktionen; die erhaltenen Phosphorverbindungen, die radioaktiven Phosphor enthielten, wurden dann weiteren Umsetzungen unterworfen. So z. B. wurde aus aktivem Natriumphosphat unter Anwendung der Methode von C. Neuberger<sup>6)</sup> in der Modifikation von P. Ostern<sup>7)</sup> Phosphoglycerinsäure dargestellt, die aktiv

5) R. Schönheimer und D. Rittenberg, Journ. Biol. Chem. 113, 505, 1936; 114, 381, 1936.

6) C. Neuberger und M. Kobel, Angew. Chemie, 46, 711, 1933.

7) P. Ostern und A. J. Guthke, Z. f. physiol. Chemie, 248, 155, 1937.

war; aus dieser wurde der bezeichnete Phosphor nach der Methode von Ostern und Baranowski<sup>8)</sup> auf Adenylsäure übertragen, deren Reaktionsprodukt, die Adenosintriphosphorsäure ihre beiden labilen Phosphatgruppen durch radioaktiven P bezeichnet enthielt. Dies ist ein Beispiel: wir hatten die folgenden Intermediärprodukte und Koenzyme der Glykogenolyse mit radioaktivem Phosphor zur Verfügung:

1. Embden-Ester, dargestellt von P. Ostern und J. Guthke nach der Methode von Ostern, Guthke und Terszakowé.

2. Phosphoglycerinsäure, dargestellt von T. Baranowski nach der oben angegebenen Methode.

3. Hexosediphosphorsäure (Harden-Young-Ester) dargestellt von T. Baranowski aus dem Ansatz, aus welchem Phosphoglycerinsäure dargestellt worden ist.

4. Adenosintriphosphorsäure mit aktiven labilen Phosphorsäureresten und inaktivem Phosphor in dem Adenylsäurerest, dargestellt nach der oben erwähnten Methode von T. Baranowski.

5. Adenylsäure, dargestellt von P. Ostern und T. Baranowski nach der Methode von P. Ostern (Phosphorylierung von Adenosin durch Phosphat und Acetonhefe in Gegenwart von Toluol<sup>9)</sup>).

Es steht natürlich nichts im Wege, durch enzymatische Synthesen die Reihe dieser Produkte zu erweitern, z. B. aktives Phosphokreatin aus aktiver Phosphoglycerinsäure und Kreatin darzustellen; oder Adenosintriphosphorsäure mit labilen inaktiven Phosphatresten und aktiver fester Phosphatgruppe aus inaktiver Phosphoglycerinsäure und aktiver Adenylsäure darzustellen.

Die Aktivität der Produkte wurde im Institut für theoretische Physik in Kopenhagen am Geigerschen Zähler gemessen, wir danken Frl. Hilde Levi für die Ausführung der Messungen. Zuerst wurden die Messungen an Veraschungsprodukten

<sup>8)</sup> Biochem. Z. 281, 158, 1935.

<sup>9)</sup> P. Ostern und G. Terszakowé. H. S. Z. f. physiol. Chemie, 250, 155, 1937.



der aus Lemberg übersandten Präparaten ausgeführt, die zum Teil Bariumsalze waren. Später gingen wir zu einer anderen Methode über, um gleichmässige Messungen zu haben. Es wurde aus Lwów der zu messende Phosphor stets in Form von Magnesiumammoniumphosphat übersandt, welches entweder durch totale Hydrolyse oder Veraschung der betreffenden Phosphorverbindung erhalten wurde, oder durch Partialhydrolyse, oder fraktionierte Fällung. Um z. B. den Phosphor der Adenosintriphosphorsäure zu charakterisieren, wurde durch 7 Minuten Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° Phosphat abgespalten, als Ammoniummagnesiumphosphat gefällt, und dieses Phosphat erwies sich genau so aktiv wie dasjenige, welches nach Veraschung derjenigen Phosphoglycerinsäure erhalten worden ist, die zur Synthese der Adenosintriphosphorsäure gedient hatte. Wir fassen die hauptsächlichlichen Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen im Folgendem zusammen, mit der Bemerkung, dass sie Ergebnisse von Vorarbeiten sind, die zur Ausarbeitung der Methode geführt haben und dass die Untersuchungen weiter fortgeführt werden.

II. Die Bildung des Embden-Esters aus Glykogen und aktivem Phosphat in autolysierten und dialysierten Extrakt aus Kaninchenmuskeln (*P. Ostern* und *J. Guthke*).

Die Synthese wurde nach der Methode von *Ostern*, *Guthke* und *Terszakowé* ausgeführt, als Anfangsgehalt an freiem Phosphat wird der analytisch bestimmte Gehalt nach Zusatz des Phosphats in Rechnung gestellt: die Verdünnung durch das eigene Phosphat des Extrakts wird also in Rechnung gestellt. Der erhaltene Embden-Ester enthält in seinem Phosphor die gleiche Aktivität, wie der Phosphor des Ansatzes. Dadurch wird sicher erwiesen, dass der Phosphor des Embden-Esters aus dem anorganischen Phosphat des Ansatzes stammt, und aus keiner anderen Quelle.

III. Wird die Phosphorsäuregruppe des Embden-Esters im Verlauf der Glykogenolyse auf Adenylsäure übertragen, wie dies im Schema der Glykogenolyse von *Parнас* und *Ostern* angenommen wird? (*P. Ostern* und *J. Guthke*).

Zum frischen Froschmuskelbrei wird mit aktivem Phosphor gezeichneter Embden-Ester zugleich mit inaktiver Adenosintri-

phosphorsäure und Adenylsäure hinzugefügt; die in der nachfolgenden Verarbeitung aus der Adenosintriphosphorsäure abgespaltenen (8 Minuten Hydrolyse) Phosphatreste erweisen sich aktiv. Damit ist die obengestellte Frage positiv beantwortet.

IV. Wird in der Synthese der Adenosintriphosphorsäure aus Adenylsäure und Phosphoglycerinsäure der Phosphor aus dem Donator auf den Akzeptor direkt übertragen, oder geht der Phosphor intermediär durch den Zustand eines anorganischen Phosphats? (*T. Baranowski*).

Die Synthese wurde mit aktiver Phosphoglycerinsäure in einem phosphatarmen Muskelextrakt durchgeführt. Die als Bariumsalz isolierte Adenosintriphosphorsäure war, wie gewöhnlich, mit anorganischem Phosphat verunreinigt. Dieses Phosphat konnte entweder aus dem Muskelextrakt stammen, oder aus der Adenosintriphosphorsäure abgespalten sein, oder aber ein Intermediärprodukt zwischen Phosphoglycerinsäure und Adenosintriphosphorsäure. Das anorganische Phosphat wurde als Magnesiumammoniumsalz gefällt, und sowohl mit demselben Salz aus Phosphoglycerinsäure, als auch der labilen Phosphatreste der Adenosintriphosphorsäure verglichen. Im Verhältnis gleicher Gewichte erwies es sich nur halb so aktiv, wie die labilen Phosphorsäurereste der Adenosintriphosphorsäure. Dadurch erscheint es ausgeschlossen, dass anorganisches Phosphat in dem Ansatz ein Intermediärprodukt zwischen der Phosphoglycerinsäure und der Adenosintriphosphorsäure sein könnte.

V. Ist die Adenylsäure im glykogenolytischen Umsatz ein Phosphatdonator, und ist sie es in der alkoholischen Gärung? (*Baranowski* und *Ostern*).

Wenn man zu einem frischen Muskelbrei aktive Adenylsäure hinzufügt, so wäre nach Ablauf der Glykogenolyse, wenn der grösste Teil des Phosphors in Freiheit gesetzt ist, ein Gehalt an aktivem anorganischen Phosphat zu erwarten, und analog wäre in Gärungsansätzen mit Acetonhefe — nach von *Ostern* entwickelten Vorstellungen — zu erwarten, dass ein Teil des aktiven Phosphors aus der Adenylsäure in den leichtabspaltbaren Phosphatfraktionen zu finden sein wird. Letzteres ist in der Tat der Fall: das Verhältnis des aktiven Phosphors in der 30 Minuten bei 100° in 1 n HCl abspaltbaren Fraktion zu der schwer-



hydrolysierbaren (welche auch die Adenylsäure enthält) ist etwa wie 1:2. Der anorganische Phosphor im Muskelversuch erwies sich schwach aktiv, und bei dieser Gelegenheit wurde festgestellt, dass Ammoniummagnesiumphosphat, das aus einer Lösung gefällt ist, die entweder Inosinsäure, oder Adenylsäure enthält, in bedeutendem Grad mit dem Nukleotid verunreinigt ist; dies wurde sowohl durch die Orcinprobe, als auch durch die Purinstickstoffbestimmung festgestellt. Es gelang bis jetzt nicht, ein Ammoniummagnesiumphosphat zu bekommen, das pentosefrei wäre; dans aber die Adenylsäure als Phosphatdonator an der Glykogenolyse nicht teilnimmt, geht daraus hervor, dass man Ammoniummagnesiumphosphat von der gleichen Aktivität bekommt, ob man die aktive Adenylsäure bei der Herstellung des Muskelbreis zusetzt, oder aber später, nach Ablauf der Glykogenolyse.

[Institut für medizinische Chemie der Universität Lwów].

P. Ostern, T. Baranowski u. J. Terszakowec.

## Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die alkoholische Gärung<sup>1)</sup>

- I. Enzymatische Synthese von Muskeladenylsäure.
- II. Mechanismus der Reaktion.
- III. Bedeutung der Reaktion für die alkoholische Gärung.

### I.

Den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen bildete folgende Beobachtung: Wird frische untergärige Bierhefe oder Azetontrockenhefe unter Zusatz von Toluol mit Phosphat und Adenosin geschüttelt, so verschwindet das anorganische Phosphat und es entsteht Adenylsäure und Adenosintriphosphorsäure. Aus 2 g Adenosin wird nach hydrolytischer Spaltung der gebildeten Adenosintriphosphorsäure 1 g oder mehr Adenylsäure gewonnen. Diese Adenylsäure ist mit der Muskeladenylsäure (Adenosin-5-Phosphorsäure) identisch, was durch den Mischschmelzpunkt mit reiner Muskeladenylsäure, durch Desaminierbarkeit mit Muskelbrot und durch die P a r n a s — K l i m e k'sche Reaktion bewiesen worden ist. In Anbetracht der hohen Ausbeute bildet diese Synthese einen gangbaren Weg für die Darstellung der Muskeladenylsäure. Sie ist unseres Wissens die erste enzymatische Synthese eines Nukleotids.

Die Phosphorylierung von Adenosin durch Hefeenzyme ist streng spezifisch: unter denselben Bedingungen, unter denen Adenosin glatt phosphoryliert wird, tritt in Gegenwart der äquivalenten Menge von Guanosin oder d-Ribose kein Schwund von anorganischem Phosphat ein. Die Anlagerung von Phosphat an

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 1. Dezember 1937.



Adenosin findet spezifisch nur am Kohlenstoff 5 der d-Ribose statt: es entsteht keine Hefeadenylsäure (Adenosin-3-phosphorsäure).

## II.

Die oben beschriebene Synthese von Muskeladenylsäure aus Adenosin lässt sich mit den meisten gebräuchlichen Enzympräparaten aus Hefe nicht durchführen. Mazerationsaft nach Lebedew und Hefedialysate sind inaktiv; aber auch gewöhnliche Trockenhefe sowie selbst ganz frisch bereitete Azetontrockenhefe versagen manchmal vollständig und bilden aus Phosphat und Adenosin keine Adenylsäure. Diese Beobachtungen sowie die Spezifität der Reaktion legten den Gedanken nahe, dass die Phosphorylierung des Adenosins keine gewöhnliche Veresterung mit anorganischem Phosphat ist, sondern eine komplexe Reaktion, in welcher ausser Phosphat noch andere Stoffe teilnehmen. Diese Annahme konnte folgendermassen bewiesen werden:

Wenn man aktive Azetontrockenhefe mit Jodazetat (m/400) oder durch Phlorrhizin (m/100) vergiftet, so wird die Synthese von Muskeladenylsäure aufgehoben. Durch Zusatz von Fluorid (n/50 und n/25) wird dagegen die Reaktion nur verlangsamt. Von diesen drei Giften übt bekanntlich nur Phlorrhizin einen unmittelbar hemmenden Einfluss auf Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen aus.

Jodazetat vergiftet die durch Cozymase vermittelten Oxydoreduktionen und die mit ihnen verbundenen Phosphorylierungen, an welchen die Cozymase teilnimmt. Fluorid hebt die Phosphatübertragung aus Phosphoglycerinsäure auf. Aus der Wirkung der drei Gifte musste also geschlossen werden, dass die Synthese von Adenylsäure aus Adenosin eine mit einer Oxydoreduktion verbundene Phosphorylierung ist; dies liess sich auch unmittelbar nachweisen. Dialysierte Azetontrockenhefe bildet aus Adenosin und Phosphat keine Adenylsäure, wohl aber nach Zusatz von Hexosediphosphat. Noch ergiebiger-etwa ums Doppelte-wird

die Synthese, wenn man ausser Fruktosediphosphorsäure Azetaldehyd und anorganisches Phosphat zum Gärgut hinzufügt. Jodazetat und Phlorrhizin unterdrücken die Reaktion vollständig, Fluorid ist dagegen nahezu ohne Einfluss. Vorbedingung für die Synthese von Adenylsäure aus Adenosin ist also in den oben gewählten Anordnungen die Gegenwart von Fruktosediphosphorsäure und ihr ungehinderter oxydoreduktiver Zerfall. Dieser Befund macht es erklärlich, dass alle diejenigen Enzympräparate, welche weder Hexosediphosphorsäure noch ihre Vorstufen enthalten und inaktiv sind, durch Zusatz von Hexosediphosphat reaktiviert werden können<sup>1)</sup>.

So z. B. erwies sich im Versuch XX vom 24/XI. 1937 eine frisch bereitete Azetontrockenhefe völlig inaktiv und synthetisierte aus Adenosin und Phosphat keine Adenylsäure; nach Zusatz von Fruktosediphosphorsäure fand eine erhebliche Phosphorylierung statt, wobei über 30% des zugesetzten Adenosins in Adenosintriphosphorsäure übering.

Die durch die oxydoreduktive Spaltung von Fruktosediphosphorsäure vermittelte Phosphorylierung von Adenosin ist aber nicht der einzige Reaktionsweg, auf dem aus Adenosin in der Hefe die Adenylsäure aufgebaut wird. Setzt man nämlich zu dialysierter Azetontrockenhefe Adenosin und Phosphoglycerinsäure hinzu, so erfolgt ebenfalls eine Synthese von Adenosintriphosphorsäure. Diese Reaktion wird durch Jodazetat nicht gehemmt, durch Fluorid dagegen aufgehoben. Adenosin kann also als Akzeptor von Phosphat aus Phosphobrenztraubensäure wirken. Es bestehen demnach zwei verschiedene Mechanismen der Phosphorylierung von Adenosin, ganz ähnlich denjenigen, welche C. u. T. Mann für die Phosphorylierung der Adenylsäure gefunde haben. In den Versuchen dieser Autoren entstand nämlich die Adenosintriphosphorsäure sowohl in einer durch Fluorid nicht hemmbaren Reaktion aus Hexose-

---

1) Ein Teil des gebundenen Phosphats stammt in solchen Versuchen immer aus Hexosediphosphat, der andere aus anorganischen Phosphat.



diphosphat und Adenylsäure, als auch in einer durch Fluorid hemmbaren Reaktion zwischen Phosphoglycerinsäure und Adenylsäure.

### III.

Aus den in den vorangehenden Kapiteln beschriebenen Versuchen ergeben sich wichtige Folgerungen für die Hefeglykolyse. Als phosphorylierendes Coenzym gilt sowohl im Schema von Parnas und C. u. T. Mann als auch in dem Schema von Meyerhof das System Adenylsäure — Adenosintriphosphorsäure. Aus unseren Versuchen geht hervor, dass in der Hefe auch das Adenosin als phosphatübertragendes Coenzym fungiert. Dadurch unterscheidet sich die Hefeglykolyse sehr wesentlich von der Muskelglykolyse. In dieser erfolgt nämlich der Abbau von Adenosintriphosphorsäure nur bis zu der Adenylsäurestufe und das Adenosin hat keinerlei koenzymatische Wirkung. Im Gegensatz dazu vermag in der Hefezelle die Adenylsäure als Phosphatdonator zu wirken. Dies geht unter anderem aus einem Versuch hervor, in welchem wir nach Zusatz von Adenylsäure und Embden-Ester zu dialysierter Azetontrockenhefe die Bildung von Fruktosediphosphorsäure beobachteten. Dieser Versuch ist besonders interessant im Zusammenhang mit der von O. Warburg<sup>1)</sup> in der Hefezelle entdeckten Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphorylierung, welche dann von Meyerhof und D. M. Neeham auch im Muskel gefunden und genauer studiert worden ist.

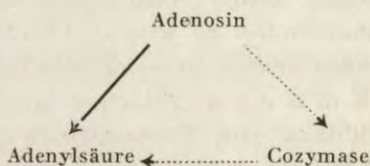
O. Warburg beschrieb folgende Reaktion in seinem Gärungstest:

- I. Hexosemonophosphorsäure + 2 Acetaldehyd + H<sub>2</sub>O = Brenztraubensäure + Phosphoglycerinsäure + 2 Alkohol (Nilsen'sche Reaktion)
  - II. Hexosemonophosphorsäure + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = Hexosediphosphorsäure + H<sub>2</sub>O (Harden'sche Reaktion).
- Summe: 2 Hexosemonophosphorsäure + 2 Acetaldehyd + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = Hexosediphosphorsäure + Brenztraubensäure + Phosphoglycerinsäure + 2 Alkohol (Warburg'sche Reaktion).

<sup>1)</sup> O. Warburg. Biochem. Ztschr. 287, 291, 1936.

Da der Warburg'sche „Gärungstest“ sowohl Adenosin-triphosphorsäure als auch Cozymase enthält, erscheint es wahrscheinlich, dass in diesem Versuch die Adenylsäure als Phosphatdonator gegenüber Hexosemonophosphorsäure gewirkt hat, das entstandene Adenosin aber durch die oxydoreduktive Phosphorylierung wieder zu Adenylsäure restituiert worden ist.

Zum Schluss möchten wir noch darauf hinweisen, dass in unseren Versuchen die Synthese von Adenylsäure und Adenosin-triphosphorsäure aus Adenosin 50% der Theorie nicht überstieg, obwohl Adenosin in der Hefezelle praktisch nicht desaminiert und nicht gespalten wird. Andererseits geht aus unseren präparativen Versuchen hervor, dass beinahe das gesamte Adenosin verschwindet. Eine naheliegende Deutung wäre, dass aus Adenosin neben Adenylsäure auch die Cozymase aufgebaut wird. Es wäre auch denkbar, dass die obenbeschriebene Synthese von Adenylsäure aus Adenosin auf dem Umweg über die Cozymase erfolgt, etwa nach folgendem Schema:



Versuche darüber sind im Gange.



(Medizinisch-chemisches Institut der Universität Lwów).

Zbigniew Augustin.

Vergleichende Untersuchungen über Anfangsvorgänge der Glykogenolyse im Muskel und im Herzen <sup>1)</sup>.

Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die vergleichende Untersuchung derjenigen Vorgänge, durch welche das Glykogen im Muskelgewebe in einfache Hexosederivate übergeführt wird, welche dann in dem glykolytischen Abbau umgesetzt werden. Am Skelettmuskel des Kaninchens und des Frosches verläuft die Glykogenolyse unter Bildung von Hexose-monophosphorsäure-ester: als erster Ester erscheint der von C. C o r i und G. C o r i <sup>1)</sup> beschriebene Glukose — 1 — Phosphorsäure-ester, der durch Enzyme, die im Muskel-extrakt enthalten sind, in den E m b d e n'schen Ester übergeführt wird. Dieser Vorgang erfolgt, wie P a r n a s und B a r a n o w s k i <sup>2)</sup> zuerst festgestellt haben ohne Mitwirkung von Adenosintriphosphorsäure durch Einwirkung von Phosphat auf Glykogen in einem autolysierten und dialysierten Muskelextrakt; P a r n a s und B a r a n o w s k i haben diesen Vorgang als Phosphorolyse des Glykogens bezeichnet und angenommen, dass der Umwandlung des Glykogens in E m b d e n - ester keine Hydrolyse des Polysaccharids vorangeht, sondern dass eine Einlagerung der Phosphatreste an diejenigen Stellen stattfindet, an welchen die Glukosereste im Glykogen zusammenhängen, unter direkter Bildung des C o r i - esters.

Die Vorstellung der direkten Phosphorolyse wird hauptsächlich dadurch gestützt, dass hydrolytische (enzymatische und che-

1) Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 1. Dezember 1937.

1) C. C o r i, G. C o r i, Proc. Sos. / Exper. Biol. and Med. 1936, 702—705. /c.

2) P a r n a s u. B a r a n o w s k i, C. r. Soc. Biol. 120, 307 (1935).

mische) Spaltungsprodukte des Glykogens durch im Muskel nachweisbare Enzyme nicht in Phosphorsäureester übergeführt werden können. Die Vorstellung wurde auch durch eine Arbeit von *M y s t k o w s k i*<sup>7)</sup> gestützt.

Verläuft dieser Vorgang in allen Muskelarten in der gleichen Weise? Es scheinen bedeutende Unterschiede zu bestehen<sup>3)</sup>, (*O s t e r n* u. *G u t h k e*) und die Frage war der Anfangspunkt dieser Untersuchung. In den Arbeiten von *C. C o r i* und *G. C o r i*, in welchen der obenerwähnte *C o r i*-ester entdeckt worden ist, wurde die Phosphorylierung des Glykogens nicht durch Muskelextrakt bewirkt, sondern durch den Rückstand aus dem ausgewaschenen Muskeln. Die Phosphorylierung erforderte die Anwesenheit von Muskeladenylsäure; nicht von Adenosintriphosphorsäure. Dies erschien im Widerspruch mit dem Befund von *P a r n a s* und *B a r a n o w s k i*, welche die Bildung des *E m b d e n*-esters in Muskel-extrakten beobachteten, in welchen sicher keine Adenylsäure enthalten war; später benutzten *O s t e r n*, *G u t h k e* und *T e r s z a k o w e ć*<sup>4)</sup> solche Extrakte zur präparativen Darstellung des *E m b d e n*-esters. Der scheinbare Widerspruch wurde durch *P a r n a s* und *M o c h n a c k a*<sup>5)</sup> aufgeklärt: sie fanden, dass die Phosphorolyse des Glykogens im Muskel-extrakt sowohl durch Adenylsäure, als durch Inosinsäure aktiviert werden kann; Inosinsäure kann also die Adenylsäure in dieser Funktion vertreten. In meinen ersten Versuchen über die Phosphorylierung des Glykogens durch Extrakte aus Herzmuskeln verwendete ich Extrakte, die aus Kalbsherzen in ähnlicher Weise dargestellt worden sind, wie die *M e y e r h o f s c h e* Extrakte aus Kaninchenmuskel. Solche Extrakte, in frischem Zustand, zersetzen das Glykogen in Gegenwart des Phosphats recht energisch, und es bildet sich Hexose-6-phosphorsäu-

<sup>7)</sup> *M y s t k o w s k i* E., *Acta Biol. Exper.* 11, N. 8, 1937, 16—19, und 197 — 219.

<sup>3)</sup> *O s t e r n* u. *G u t h k e*, *Acta Biologiae Exper.* II. Nr. 28, 1937, 175 — 177.

<sup>4)</sup> *O s t e r n*, *G u t h k e* u. *T e r s z a k o w e ć*, *H. S. Zeitschrift f. phys. chem.*, 243, 21, 1936.

<sup>5)</sup> *P a r n a s*, *Erg. d. Enzymf.* 1937, 110.



re-ester (E m b d e n - ester). Bei Autolyse und Dialyse verlieren indessen diese Extrakte ihre Aktivität schneller als Muskelextrakte; während man aus Kaninchenmuskeln nur nach langer Zeit oder nach Autolyse bei höherer Temperatur zu inaktiven Extrakten gelangt, bekommt man solche aus Kalbsherzen oder Ochsenherzen schon nach 20 — stündiger Dialyse bei Zimmertemperatur. Wenn zu solchen Extrakten Glykogen und Phosphat bei  $\text{pH} = 7$  zugesetzt wird, so verschwindet das Glykogen nicht. Wird nun Inosinsäure oder Adenylsäure zugesetzt, so verschwindet das Glykogen. Zwischen der Wirkung der Adenylsäure und der Inosinsäure zeigt sich aber ein sehr wesentlicher Unterschied. In Extrakten, welche durch Zusatz von Adenylsäure aktiviert werden, erfolgt Bindung von Phosphat, und das Glykogen geht in den schwerhydrolysierbaren E m b d e n - ester über; in Extrakten dagegen, die durch die Inosinsäure aktiviert worden sind, erfolgt keine Bindung von Phosphat, aus dem Glykogen entsteht dann ein phosphorfreies Kohlenhydrat, aus dem ein phosphorfreies Osazongemisch gewonnen wurde. Im Herzmuskel sind folglich Systeme enthalten, durch welche das Glykogen je nach dem aktivierenden Zusatz entweder in einfachere reduzierende Saccharide übergeführt, oder aber phosphorolytisch wird. Ich habe auch am Herzen von Pferden, Hunden, Kaninchen und Schweinen dieselbe Verhältnisse gefunden, wie am Kalbsherzen.

Der einzige Aktivator, welcher Phosphorolyse bewirkt, ist nach meinen bisherigen Beobachtungen die Adenylsäure oder Adenosintriphosphorsäure; für die hydrolytische Spaltung des Glykogens dagegen gibt es, neben der Inosinsäure, auch andere Aktivatoren. Wird zu einem inaktivierten Herzmuskelextrakt von Ochsen, der durch Veronalazetatpuffer auf  $\text{pH} = 7$  gebracht ist, Glykogen allein zugesetzt, so verfällt er der Amylase Wirkung und zerfällt. Setzt man dagegen zugleich mit dem Glykogen Phosphat hinzu, so unterbleibt die Aufspaltung des Glykogens: die Wirkung der Amylase (ich bezeichne das Enzym so, weil es Stärke aufspaltet, man kann es auch mit Winter<sup>6)</sup> Glykogenase nennen) wird also durch

<sup>6)</sup> Winter L., The Bioch. J. 31, 1937, 237.

Anwesenheit von Phosphationen aufgehoben. Diese jonale Wirkung des Phosphats wird entweder durch Inosinsäure überwunden, in deren Gegenwart die hydrolytische Aufspaltung des Glykogens stattfindet; wenn man aber Adenylsäure zusetzt, so erfolgt die Phosphorolyse des Glykogens. Die Phosphathemmung der diastatischen Aufspaltung des Glykogens wird aber nicht nur durch Inosinsäure aufgehoben, sondern auch durch  $\text{C h l o r j o n e n}$ . Zusatz von 1/600 normaler  $\text{MgCl}_2$  — oder  $\text{KCl}$ -Lösung zu einem Ansatz, in welchem die Aufspaltung des Glykogens durch 1/30 molares Phosphat gehemmt ist, hebt diese Hemmung auf. Ochsenherzen verhalten sich genau wie Kalbsherzen. Die eigentümliche Hemmung der hydrolytischen Aufspaltung des Glykogens durch Phosphat, welches in Gegenwart des eigentlichen Aktivators — Adenylsäure — an Glykogen gebunden wird; und die merkwürdige Aufhebung dieser Hemmung durch Inosinsäure, das gewebsendogene Umsetzungsprodukt der Adenylsäure, so wie durch das Chlorion, erscheinen sehr interessant, denn sie ergeben in Bezug auf den Zusammenhang der Gewebsreaktionen neue Perspektiven. Die Feststellung, dass Adenylsäure und Inosinsäure in Herzmuskelextrakten in qualitativ verschiedener Weise aktivieren, führte natürlich zu einer Wiederholung derjenigen Versuche, die von  $\text{P a r n a s}$  und  $\text{M o c h n a c k a}$  am Skelettmuskel des Kaninchens ausgeführt worden sind. Am Kaninchenmuskel bestätigte sich der frühere Befund von  $\text{P a r n a s}$  und  $\text{M o c h n a c k a}$ , dass nämlich sowohl Adenylsäure wie Inosinsäure die Phosphorolyse aktivieren. Extrakte aus Rindsmuskeln lassen sich durch Autolyse und lange Dialyse nicht inaktivieren, sie spalten Glykogen in Gegenwart von Phosphat allein, unter Bindung von Phosphor. In Veronalazetatpuffern zersetzen Rindsmuskelextrakte das Glykogen nicht, oder sehr wenig, und zwar unter Bindung des gewebeeigenen Phosphats. In solchen Extrakten, die die gewebeeigene Inosinsäure enthalten, ist also zur Glykogenolyse nur Phosphat nötig. Somit wurde die Abwesenheit der Amylase im Rindmuskel bestätigt. Kalbsmuskelextrakte verhalten sich dem Herzen ähnlicher, als den Rindermuskeln; sie lassen sich inaktivieren, was uns an Rindsmuskeln nicht gelingt. Man kann diese Extrakte mit Ade-



nylsäure reaktivieren, und dann wird das Phosphat an Glykogen gebunden, oder mit Inosinsäure aktivieren, aber nicht unter der Bindung des Phosphats. Nach noch längerer Dialyse wurden die Kalbsmuskelextrakte nur noch mit Adenylsäure aktiviert, aber nicht mit Inosinsäure.

Herrn Professor P a r n a s danke ich für die dieser Arbeit gewährte Förderung und Unterstützung.

[Institut de Physiologie des Animaux à l'Université de Varsovie].

**K. Białaszewicz et H. Głogowska.**

**Sur le métabolisme minéral au cours du développement embryonnaire du Poulet et sur les fonctions de l'allantoïde <sup>1)</sup>.**

L'état peu avancé de nos connaissances concernant le métabolisme des substances minérales au cours du développement embryonnaire des animaux <sup>2)</sup> nous a incité à entreprendre les présentes recherches. Nous avons voulu étudier la composition minérale du liquide allantoïdien dans les différents stades du développement de Poulet (race Rode-Island) et de préciser les fonctions de l'allantoïde en tant que réservoir urinaire de l'embryon.

Il fallait tout d'abord élaborer une technique permettant de déterminer le volume du liquide allantoïdien car il n'est guère possible de le recueillir quantitativement, surtout dans les stades plus avancés du développement. Notre technique consistait en principe en déterminations des rapports entre la quantité totale et la concentration d'un des constituants du liquide allantoïdien (de l'azote dans notre cas).

Nous procédions de façon suivante. On choisissait un endroit peu vascularisé de l'allantoïde que l'on coagulait au préalable en l'humectant de l'acide acétique glacial et on prélevait avec une pipette une certaine quantité (un volume ou un poids déterminé) du liquide. Celui-ci servait au dosage de l'azote (microméthode de Parnas-Wagner '21) et après l'incinération (à l'acide azotique suivant la technique de Białaszewicz '27, '29, '36) à ceux de sodium (Barrenschen et

---

<sup>1)</sup> Présenté dans la séance du 27.I.1938 de la Société Polonaise de Physiologie.

<sup>2)</sup> Comp. J. N e e d h a m: Chemical Embryology '31, 2, pp. 946—999 et les comptes rendus de cet auteur dans le „Annual Review of Biochemistry”, 1—6, 1932—1936.



Messiner '27), de potassium (Kramer et Tisdall '21) et de calcium (de Waard '19). On recueillait ensuite le reste du liquide allantoïdien en lavant à plusieurs reprises la cavité de l'allantoïde à l'eau distillée et en dosant l'azote dans les liquides des lavages. On calculait le volume du liquide allantoïdien d'après la formule  $(v \cdot N_c + N_r) / N_c$ , où  $v$  indique la quantité du liquide prélevé à la pipette,  $N_c$  — la concentration de l'azote dans ce liquide (en mg par  $\text{cm}^3$ ) et  $N_r$  — la quantité (en mg) d'azote dans le liquide des lavages.

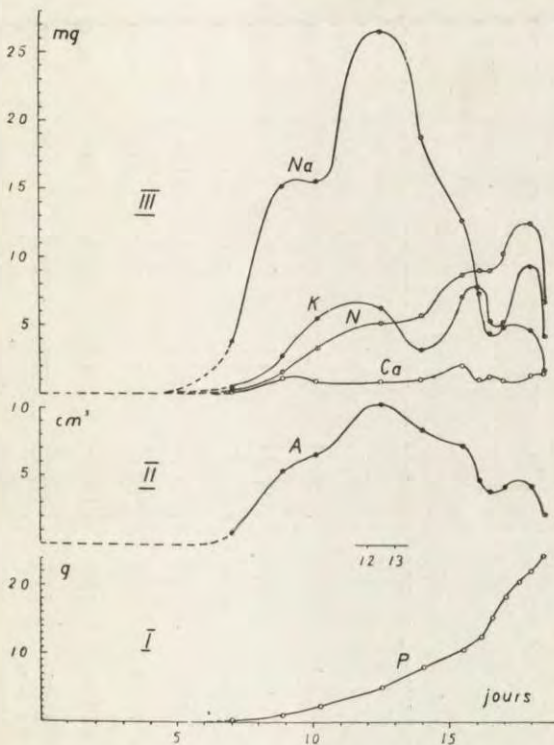


Fig. 1. I — poids de l'embryon (g), II — volume du liquide allantoïdien ( $\text{cm}^3$ ) et III — les quantités absolues (en mg) de l'azote (N), du sodium (Na), du potassium (K) et du calcium (Ca) dans le liquide allantoïdien depuis le septième jusqu'au dix-huitième jour de l'incubation. D'après les données du tableau I.

Les dosages effectués de façon que nous venons de décrire ont montré que volume du liquide allantoïdien est étroitement lié au stade du développement de l'embryon (fig. 1—II). La

T a b l e a u I.

Journée de l'incubation	Nombre d'embryons étudiés	Poids moyen de l'embryon $\epsilon$	Volume moyen du liquide allantoïdien cm <sup>3</sup>	Concentration moyenne des constituants du liquide allantoïdien				Quantité absolue des constituants du liquide allantoïdien			
				N mg %	Na mg %	K mg %	Ca mg %	N mg	Na mg	K mg	Ca mg
7.0	4	0.49	0.92	57.7	416.5	31.3	35.4	0.53	3.83	0.29	0.32
8.8	5	1.35	5.37	31.0	268.6	52.4	20.3	1.66	15.10	2.81	1.09
10.2	4	2.32	6.55	65.0	238.4	85.5	16.0	4.26	15.63	5.60	1.05
12.5	4	5.00	<b>10.27</b>	51.8	259.1	60.6	10.0	5.32	26.61	6.22	1.03
14.0	4	8.15	8.40	71.7	225.2	39.1	13.8	6.00	18.92	3.28	1.16
15.5	4	10.35	7.21	123.8	177.4	99.3	30.5	8.93	12.79	7.16	2.20
16.0	4	12.85	4.92	183.5	149.3	162.4	22.5	9.03	7.35	7.99	1.11
16.5	7	15.27	4.05	225.7	115.3	134.2	33.9	9.14	4.67	5.43	1.37
17.0	6	18.30	4.20	270.8	120.6	126.8	28.0	11.37	5.07	5.32	1.18
18.0	4	22.03	4.33	293.9	109.4	222.7	36.1	12.73	4.75	9.64	1.56
18.5	3	24.96	2.12	324.3	89.4	200.1	79.6	6.87	1.89	4.24	1.69



quantité du liquide croît progressivement depuis le moment de la formation de l'allantoïde jusqu'au 12-me ou 13-me jour du développement. Elle atteint alors un maximum net et commence ensuite à diminuer régulièrement jusqu'à la fin de l'incubation.

On observe deux périodes nettement distinctes au point de vue du métabolisme de l'eau dans l'allantoïde: 1°. — période initiale, de *s é c r é t i o n*, lorsque l'embryon élimine continuellement de l'eau, et 2°. — période finale, de *r é a b s o r p t i o n*; cette dernière commence le treizième jour de l'incubation, lorsque l'embryon atteint le poids de 5 grammes environ. Une partie de l'eau sécrétée dans la période initiale subit une réabsorption à cette époque.

Le comportement des composés dissous dans le liquide allantoïdien est également différent au cours de ces deux périodes.

Pendant la première l'embryon élimine dans l'allantoïde, à côté de l'eau, certains sels minéraux en proportions qui correspondent à celles des liquides nutritifs (Na:K:Ca—100:7.5—23.4:8.5—3.8). Le liquide allantoïdien où dominent à ce moment les sels de sodium joue alors le rôle du milieu intérieur de l'embryon. Les produits caractéristiques du métabolisme protidique y sont éliminés faiblement d'abord et en quantités croissantes plus tard. Le liquide qui s'accumule dans l'allantoïde constitue de plus incontestablement un facteur mécanique facilitant l'accroissement de la membrane allantoïdienne en rapport avec sa fonction respiratoire.

Le treizième jour du développement constitue un revirement non seulement au point de vue des échanges d'eau, mais aussi en ce qui concerne les propriétés de la membrane allantoïdienne vis-à-vis des substances dissoutes. Les résultats de nos recherches indiquent nettement (tableau I, fig. 1—III) l'existence de deux espèces de substances. Les corps du premier groupe ne diminuent pas en quantité absolue au cours de la période de réabsorption, les autres subissent alors une diminution marquée.

Parmi les corps que nous avons étudiés il y avait deux qui subissaient la réabsorption: l'eau et les sels sodiques y dissous. L'utilisation de ces substances, très importantes dans le méta-

T a b l e a u II.

Numéro de l'embryon	Journée de l'incubation	Poids de l'embryon g	Volume du liquide du liquide allantoïdien cm <sup>3</sup>	N a			K			C a		
				dans l'embryon a <sub>1</sub> mg	dans l'allantoïde b <sub>2</sub> mg	Coefficient du rendement plastique $\frac{a_1}{a_1 + b_1} \cdot 100$ %	dans l'embryon a <sub>2</sub> mg	dans l'allantoïde b <sub>2</sub> mg	Coefficient du rendement plastique $\frac{a_2}{a_2 + b_2} \cdot 100$ %	dans l'embryon a <sub>3</sub> mg	dans l'allantoïde b <sub>3</sub> mg	Coefficient du rendement plastique $\frac{a_3}{a_3 + b_3} \cdot 100$ %
39	9	2.12	5.13	9.85	15.88	38.3	3.46	5.49	38.4	1.32	1.02	36.3
10	12	5.66	8.72	18.25	23.90	43.3	8.16	6.57	55.4	3.09	1.07	74.3
25	15	10.10	8.64	32.00	14.10	69.4	21.27	5.70	78.8	9.52	2.96	76.2
26	16	14.15	4.44	31.00	6.61	82.4	25.85	3.51	88.0	15.40	2.38	86.6
21	19	20.25	4.25	38.40	6.78	85.0	36.83	9.71	79.2	23.91	1.35	94.6



bolisme ultérieur de l'embryon, est très notable. Au dix-neuvième jour on ne trouve plus dans l'allantoïde que 35 p. c. de sodium et 20 p. c. d'eau qu'on y trouvait au début de cette période.

Les autres substances que nous avons dosées ne subissent pas de réabsorption, ou, pour être plus circonspect, sont sécrétées dans l'allantoïde à la même vitesse ou à une vitesse supérieure à celle de leur absorption. Ainsi la quantité du calcium dans le liquide allantoïdien atteint son niveau définitif au bout de 7 à 9 jours de l'incubation et ne varie plus jusqu'à la fin du développement. Le potassium est excrété abondamment entre le 9-me et le 12-me jour de l'incubation, les journées qui suivent il présente certaines variations avec une légère tendance à augmenter. Finalement la quantité absolue de l'azote provenant des déchets du métabolisme prodique, s'accroît régulièrement jusqu'au 18-me jour du développement, ensuite elle diminue brusquement (comme celle du potassium). Ce fait parle en faveur de la possibilité de réabsorption pendant les derniers jours de l'incubation de certains déchets azotés excrétés dans l'allantoïde dans les stades plus précoces.

Le comportement de ces deux catégories de substances fait ressortir une analogie profonde entre l'allantoïde du Poulet et le cloaque de l'animal adulte. Ce dernier organe, de même que l'allantoïde, est siège d'une réabsorption secondaire de l'excès de chlorure de sodium et de l'eau (K r y s z c z y ń s k i '32). Il joue ainsi un rôle complémentaire par rapport au rein. De plus, la perméabilité sélective et variable de la membrane allantoïdienne indique que cet organe ne constitue plus un réservoir urinaire au sens propre du mot. C'est pourquoi on ne peut admettre qu'avec réserve les résultats de certaines recherches sur le métabolisme des embryons, basées sur les dosages des déchets accumulés dans l'allantoïde.

En ce qui concerne le bilan du métabolisme minéral, on peut tirer des conclusions valables exclusivement pour les substances qui ne subissent pas une absorption secondaire dans l'allantoïde. Nos dosages des substances minérales (tableau II) effectués à la fois sur les embryons et sur le liquide allantoïdien permettent d'établir que le coefficient du rendement plastique (N e e d h a m '31), c'est à dire le pourcentage de rétention

dans le corps des substances absorbées par l'embryon est très élevé (37.4—88.0 p. c.) pour le potassium et (55.4—94.6 p. c.) pour le calcium et que ce coefficient croit à mesure que le développement progresse.

Ces faits démontrent qu'au cours du développement embryonnaire du Poulet le métabolisme minéral de certains éléments, en particulier celui de calcium à l'époque de la minéralisation du squelette, présente le rendement d'utilisation très élevé.

### Bibliographie.

- Barrenschen H. K. und L. Messiner. 1927. Kolorimetrische Mikrobestimmung des Natriums. *Bioch. Zeitschr.* 189 (308). — Białaszewicz K. 1927. Contributions à l'étude de la composition minérale des cellules-oeufs. *Publ. della Stazione Zoolog. di Napoli*, 8 (355). — Białaszewicz K. 1928. L'ultrafiltration appliquée aux recherches sur la répartition des électrolytes dans le cytoplasme. *Annales de Physiol.* 2 (190). — Białaszewicz K. 1929. Recherches sur la répartition des électrolytes dans le protoplasme des cellules ovulaires. „*Protoplasma*”, 6 (1). — Białaszewicz K. et Ch. Kupfer. 1936. *Arch. intern. de Physiol.* 42 (398). — Kramer B. and F. F. Tisdall. 1921. A clinical method for the quantitative determination of potassium in small amounts of serum. *Journ. of. biol. Chem.* 46 (339). — Kryszczyński E. 1932. Über die Resorption von mineralischen Bestandteilen des Harnes in der Vogelkloake. *Bull. de l'Acad. Polonaise des Sc. et des Lettres, Sér. B: Sciences Naturelles (II)*. — Neeham J. 1931. *Chemical Embryology*. Cambridge. — Parnas J. K. und R. Wagner. 1921. *Bioch. Zeitschr.* 125 (253). — Ward D. J. 1919. Eine Mikrobestimmung des Kalziums in Blut, Serum und anderen organischen Substanzen. *Bioch. Zeitschr.* 97 (176).



[Aus der Kontrollabteilung für Organpräparate der Städtischen Hygienischen Anstalt in Warschau].

Wojciech Zakrzewski.

**Apparat zum Messen der Augengewölbe bei den Untersuchungstieren und das physiologische Messen bei Kaninchen, Meerschweinchen und weissen Ratten<sup>1)</sup>.**

Bei der Erlangung von Glozaugen bei den Versuchstieren entweder durch Operation oder durch chronische Einführung eines Hormons (was das Thema unserer Arbeit ist), traf ich bei der Schätzung der Grösse des Augengewölbes auf grosse Schwierigkeiten; aus dem Schrifttum sind mir entsprechende Apparate unbekannt. Das Messen des Augapfels bei den Untersuchungstieren, besonders das Ergreifen der Höhenunterschiede der Augengewölbe, war bisher nicht notiert und zwar, weil die genauen Apparate für die Messung der menschlichen Augen nicht dafür geeignet sind. Der Apparat von Hertel eignet sich nicht zum Gebrauch bei kleinen Untersuchungstieren.

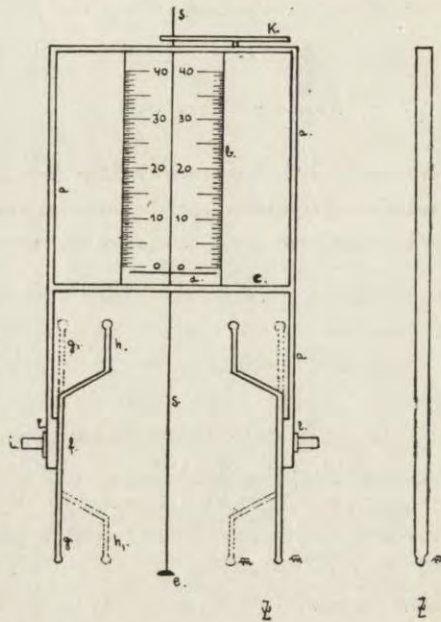
Diesem Mangel kann man durch den von mir hergestellten Apparat abhelfen<sup>2)</sup>.

Mein Apparat besteht aus einem dünnen Rahmen „a“ (Zeichnung 1) aus Duraluminiumblech (Breite 3 mm und Dicke 1 mm), verbunden in der Mitte durch eine Querleiste „c“ ausgeführt aus demselben Material. Zwischen der oberen Rahmenkante „a“ und der Leiste „c“ ist der Metallmasstab „b“ befestigt, mit einer Teilung bis zu 0.5 mm, was die Möglichkeit der Untersuchungen mit einer Genauigkeit bis zu 0.25 mm gibt. Der

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 4 November 1937.

<sup>2)</sup> Der Apparat wurde in der Firma: „Fr. Balukiewicz“ in Warschau ausgeführt.

Rahmen „a“ ist unten mit kleinen Aufsätzen beendet, durch welche die Gewindestützen „i“ hindurchgehen und Muttern „l“ besitzen. Mit Hilfe der oben genannten Stützen sind die Apparatfüsse „f“ befestigt, welche doppelte Enden besitzen. Das Brei-



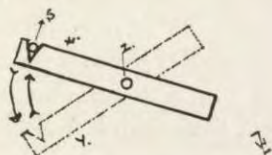
Zeichnung 1. Die Ansicht des Apparates von der Seite und von Vorne ( $\frac{1}{4}$  natürliche Grösse).

terstellen der Füsse in Position „g“ (46 mm), ist der Länge der Augenspalten bei Kaninchen und die schmalere Stellung der Füsse in Position „h“ (26 mm) ist der Länge der Augenspalten von Meerschweinchen und Ratten angepasst. Die Füsse des Apparates enden stumpf mit kleinen Kugeln „m“.

In der Mitte der oberen Blechkante „a“ und in der Leiste „c“ sind kleine runde Öffnungen gemacht, welche übereinander liegen und durch welche ein Stahldraht des Schiebers „s“ geht; dieser endet unten mit einem kleinen Aufsatz „e“. Dieser Aufsatz hat die Form einer kleinen, leicht gebogenen Mütze (vom Durchmesser 2 mm), welche bei der Untersuchung dicht an der Hornhaut liegt. Im Bezirk der Skala „b“ befindet sich beim Schieber ein kurzer Querdraht „d“, welcher die Teile der



Skala anzeigt und so befestigt ist, dass er, wenn Füße und Mütze des Schiebers auf einer wagerechten Ebene sich befinden, den Nullpunkt der Skala anzeigt.



Zeichnung 2. Die Klemme „k“ — die Ansicht von oben (natürliche Grösse)

Auf der oberen Rahmenkante „a“ befindet sich eine Metallklemme „k“, deren Aufgabe es ist, den Schieber „s“ während der Untersuchungen senkrecht festzuhalten und das Ablesen des Resultates nach der Entfernung des Apparates vom Tiere zu ermöglichen. Die Klemme „k“ (Zeichnung 2) ist ebenfalls aus Duraluminiumblech (von denselben Ausmassen wie oben), in der Form eines Rechtecks mit einem dreieckigen Ausschnitt am Ende nach der Innenseite hergestellt. Die Klemme kann man um eine Achse „z“ drehen. Ist die Klemme in der Lage „x“, so wird der Schieber in dem dreieckigen Ausschnitt festgehalten, befindet sich hingegen die Klemme in der Lage „y“, so wird der Druck vom Schieber gelöst und der Schieber kann in senkrechter Richtung verschoben werden.

Das Gewicht des auf diese Weise gefertigten Apparates beträgt 13.4 g und das Gewicht des Schiebers nur 297 mg.

Das Messen beruht auf der Feststellung der Höhe des Augengewölbes über dem Horizont des Kopfes. Wie ich oben erwähnte, beim Zurechtstellen der Füße und der Mütze des Schiebers auf einer Horizontalebene, zeigt der Querdraht des Schiebers auf dem Masstab den Nullpunkt, daher zeigt der Schieber die Grösse des Augengewölbes über dem Horizont des Kopfes und zeigt diese auf dem Masstabe an.

Der Grundsatz des Messens ist, dass die Mütze des Schiebers die Hornhaut bedecken soll, während dieser Zeit ruhen

die Füße des Apparates auf der oberen Seite des Kopfes des Tieres; dabei gibt es hier zwei Varianten: 1) die Füße des Apparates stellt man auf die Weise, dass sie auf der verlängerten Linie zu beiden Seiten der Augenlider ruhen, 2) die Füße des Apparates stellt man auf der Verbindungslinie beim Maulwinkel und *Incisura auris ant.* Die zweite Weise ist bequemer. Die Stellung der Füße des Apparates macht die Resultate von eventuellen Kürzungen der Augenlider bei Änderungen des Augengewölbes unabhängig, weil der Zentralpunkt — der Hornhaut immer unverändert bleibt und die Füße des Apparates immer in der gleichen Stellung und in der gleichen Spreizung auf der Haut des Kopfes ruhen, welcher an dieser Stelle sehr wenig Fleisch und Fettanlage besitzt. Das vergrößert ausgezeichnet die Genauigkeit des Messens, weil der Apparat sich auf dem harten Untergrund der Knochen stützt.

Bei der Untersuchung muss man daran denken, dass einzig Genauigkeit richtige und genaue Ablesung der Resultate gewährleistet, daher muss man sich eine der oben erwähnten Weisen aneignen und den Apparat auf die Weise halten, dass dieser mit dem eigenem Gewicht auf die Kopfhaut drückt.

Die Messungen führt man in folgender Weise aus: die Hornhaut des Tieres muss man 20 Minuten vor der Untersuchung betäuben, indem man in die Bindehaut 2—3 Tropfen einer 0.25%-igen wässerigen Perkainchlorhydratlösung tropft. Die Messungen ohne Betäubung ausgeführt geben grosse Untersuchungsfehler und können auch bei lebhaften Bewegungen des Tieres die Hornhaut verwunden.

Zur Ausführung der Messungen sind zwei Personen nötig. Eine von ihnen nimmt das Tier mit der einen Hand an den Hinterfüßen und mit der anderen an der Maulgegend; auf diese Weise ist das Tier unbeweglich und der Kopf bleibt in der Horizontallage. Die zweite Person nimmt den Apparat und führt das Messen gemäss einer der oben erwähnten Varianten aus. Den Apparat muss man senkrecht zu der oberen Seite des Kopfes stellen, wobei die Klemme „k“ zurückgeschoben werden muss, damit sie nicht den Schieber hemmt. Erst wenn der Schieber festgestellt ist, muss man mit der anderen Hand die



Tabelle I.

Zusammenfassung der Resultate der Untersuchung des Augengewölbes an Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen.

Versuchstier	Mittelwerte des Augengewölbes		Maximales Augengewölbe		Minimales Augengewölbe		Anzahl der Fälle in % mit demselben Niveau des Augapfels	
	L. Auge mm	R. Auge mm	L. Auge mm	R. Auge mm	L. Auge mm	R. Auge mm		
Meerschweinchen	♂	4.02	3.97	5.50	5.50	3.00	3.00	26
	♀	4.25	4.13	5.50	5.25	3.25	3.00	30
Ratten	♂	5.17	5.07	6.00	6.00	4.00	4.25	16
	♀	5.17	5.18	6.00	5.75	4.00	4.00	16
Kaninchen	♀	12.26	11.97	14.50	13.75	9.75	9.50	17

Klemme zurückschieben und den Schieber unbeweglich machen, nachher kann man den Apparat abnehmen und sich eventuell einer Lupe bedienend bequem das Resultat auf der Skala ablesen.

Ein Auge muss man mindestens dreimal messen, um die Höhe des Augengewölbes festzustellen, dabei dürfen die Resultate bei entsprechender Übung sich nicht mehr unterscheiden als um 0.25 mm. Bei jeder guten Messung bekommen wir grundsätzlich jedes mal dasselbe Resultat, — die eventuellen Abweichungen werden meistens durch Heruntergleiten der Mütze des Schiebers von der Hornhaut auf die harte Augapfelhaut, oder durch falsche Aufstellung der Füsse des Apparates hervorgerufen. Die Arbeit mit dem Apparat ist sehr einfach, sogar bei wenig Übung erhält man genaue Resultate, wenn man die oben erwähnte Vorsicht übt.

Weiter unten werden die Resultate bei dem Messen des Augengewölbes bei Meerschweinchen (100 Stück), Ratten (100 Stück) und Kaninchen (50 Stück) beschrieben. Zusammen wurden 500 Messungen ausgeführt.

Aus den Untersuchungen, die bisher an Augengewölben gemacht wurden, geht hervor, dass zu diesen Zwecken am meisten Meerschweinchen geeignet sind, weil: 1) sie die kleinste Differenz zwischen Maximal und Minimalaugengewölbe zeigen, 2) sie den grössten Prozentsatz (durchschnittlich 56%) der Individuen mit den gleichen Augengewölben besitzen, 3) sie bei der Untersuchung sehr ruhig sind, was die Arbeit merklich erleichtert, 4) sie die Augenlider nicht schliessen was die Genauigkeit der Messungen vergrössert, 5) sie eine grosse Kopfseitenfläche besitzen was das Zurechtstellen des Messapparates erleichtert.

Die Messungen bei den Ratten sind schwieriger, weil sie sehr unruhig sind und die Augenlider fest schliessen, was auch bei den Kaninchen bemerkt wird. Ausserdem besitzen diese Tiere eine stark entwickelte *Fossa temporalis*, was eine schwankende Aufstellung und sogar das Herabrutschen der Füsse des Messapparates bewirkt.

Man muss hinzufügen, dass für die biologische Untersuchung, deren Gegenstand die Vergrösserung des Augengewölbes sein soll (Exophthalmus), Meerschweinchen zu vermei-



den sind, bei welchen zu Anfang das Augengewölbe 4.50 mm überschreitet, und zwar nach den obigen Ausführungen daher, weil bei solchen Untersuchungstieren das Glotzen schwächer hervortritt und dadurch der Untersuchungsfehler vergrössert wird.

Zusammenfassend ist zu hervorzuheben:

1°. Die beschriebene Einrichtung stellt einen neuen Apparat für die Laboratoriumsuntersuchungen dar, welcher das Messen des Augengewölbes bei kleinen Untersuchungstieren erlaubt.

2°. Der genannte Apparat erlaubt das Augengewölbe bei den Untersuchungstieren bis 0.25 mm genau zu messen und da bei der Vergrösserung des Augapfels (Exophthalmus) zum Beispiel bei Meerschweinchen ein Unterschied von 2 mm und mehr erreicht wird, beträgt also der Untersuchungsfehler maximal 15%.

3°. Die Leichtigkeit des Messens und des Ablesens des Resultates ermöglicht grosse Genauigkeit, sogar bei kleiner Übung des Untersuchenden.

4°. Wie aus den Messungen an normalen Tieren hervorgeht, sind die Meerschweinchen von den übrigen Untersuchungstieren für diesen Zweck die besten, weil sie weitgehende Gleichheit der Augengewölbe zeigen und der anatomische Kopfbau und ihr ruhiges Verhalten die Genauigkeit der Messungen vergrössern.

Jan Miodoński.

**Über die monaurale akustische Isolation und deren physiologischen Grenzen<sup>1)</sup>.**

Zur monauralen Höruntersuchung eignen sich nur die Methoden und die Instrumente, welche sich der Luftleitung bedienen. Die Untersuchung der Knochenleitung ist in dieser Hinsicht unbrauchbar. Bei monauraler Hörschärfemessung tritt das Problem der Isolation des anderen, nicht untersuchten Ohres, hervor. Bei der Hörschärfemessung des schlechter hörenden Ohres tritt immer das in Verlegenheit versetzende Problem des Überhörens auf, wenn das andere Ohr über eine viel grössere Hörschärfe verfügt. Zur Lösung des Überhörproblems gibt der Autor folgendes Verfahren an:

Die Schallsender des S — Audiometers von Schwarz sind in Kästchen, die aus Insulite und Watte gebaut sind, verschlossen. Aus den Kästchen ragen kurze Metallröhren hervor, die in der Nähe der Metallpartie der Schallsendermembran enden. Ist die äussere Mündung des Rohres mit einem Gummikorken verstopft, so hört der Beobachter, der in nächster Nähe der Rohrmündung seinen Kopf hält und die Ohren mit den Fingern zugestopft hat, die vom Schallsender in der Stärke von 70 Phon angegebenen Töne nicht. Mit Hilfe von 2 so isolierten Schallsendern wurde eine Reihe von Versuchen angestellt. Unter anderem wurde festgestellt:

Bei der Anwendung einer dickwandigen gläsernen Olive, an das Ende der Metallröhre des Schallsenders angesetzt — die Olive steckt gleichzeitig luftdicht im äusseren Gehörgang des untersuchten Ohres — wurden bei gesunden Personen Schwellenwertkurven gewonnen, die

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 21. Januar 1938.



sich genau mit der idealen Schwellenhörkurve decken.

Bei radikal Labyrinthectomierten (Neumann II) — wenn die Olive im Gehörgange der labyrinthectomierten Seite steckte — wurden kleine Überhörkurven aus dem gesunden Ohre gewonnen. Die untere Grenze dieser Überhörkurve beginnt in der Gegend E und endet bei  $c^1$ . Der Gipfelpunkt dieser Kurve fällt gewöhnlich auf die Gegend  $c^2$  und beträgt ca 44 Phon. Wurde die gläserne dickwandige Olive an ihrem Ende zugeschmolzen, so gewinnt man bei oben beschriebenem Experiment keine Überhörkurve.

Aus obigen Experimenten geht hervor, dass die gewonnene Überhörkurve dadurch entsteht, indem die Luftschwingungen im äusseren Gehörgange die Wände des äusseren Gehörganges und die benachbarten Gewebe in Mitschwingung bringen, was sich weiter durch die Gewebe des Schädels auf das Labyrinth der gesunden Seite fortpflanzt. Es ist dies also eine physiologische Überhörkurve vom Schädelbau abhängig. Sie muss immer entstehen, sobald die Luftschwingungen im äusseren Gehörgang eine entsprechend grosse Amplitude von oben erwähnten Frequenzen erreicht. Diese Kurve hängt also nicht von irgend einem technischen Fehler ab, sondern sie ist lediglich vom Schädelbau abhängig und zeigt die Grenzen der physiologischen Isolation beider Ohren an.

[Physiologisches Laboratorium des Medizinischen Luftfahrtinstitutes].

**Franciszek Krajewski.**

**Die Einwirkung des niedrigen Atmosphärendruckes und der Einatmung verschiedener Gasmischungen auf die Sekretions-tätigkeit der Magendrösen <sup>1)</sup>.**

Der Verfasser untersuchte die Sekretionstätigkeit der Magendrösen im niedrigen Atmosphärendruck: in hypoxämischen Bedingungen, während der Einatmung reines Sauerstoffes oder eines Sauerstoffes der 10% CO<sub>2</sub> enthielt. Einige Experimente wurden an nüchternen Hunden ausgeführt, in anderen bekamen die Hunde Gemüsesaft oder Histamin.

Die Experimente wurden an Hunden mit isolierten kleinen Magen nach Heidenhain-Pawlow ausgeführt. Die Methoden der Experimente sind genau im ersten Teil dieser Arbeit, welcher der Einwirkung der Einatmung verschiedener Gasmischungen auf die Magensekretion im gewöhnlichen Atmosphärendruck galt, beschrieben.

Der Verfasser hat 33 Experimente in der pneumatischen Kammer ausgeführt und seine Ergebnisse mit denen der 10 Experimente, die im gewöhnlichen Atmosphärendruck gemacht waren, verglichen.

Es zeigte sich, dass

a) während des Ruhezustandes des Magens

1. die allmähliche Herabsetzung des Atmosphärendruckes während der Einatmung der verdünnten Luft in einer Höhe von 4000 m die Magensekretion im Vergleich zu der Sekretion im gewöhnlichen Atmosphärendrucke verringert, auf

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 27.1.1938.



grösseren Höhen aber steigert; dagegen während der Einatmung des reinen Sauerstoffes — im allgemeinen — die Sekretion zunimmt; die Acidität des Magensaftes während der Einatmung der verdünnten Luft auf grösseren Höhen herabgesetzt und während der Einatmung reines Sauerstoffes — vergrössert ist.

2. die Einatmung der verdünnten Luft in einer Höhe von 7000 m (307 mm Hg) die Tätigkeit der Magendrüsen im Vergleich zu der Sekretion im gewöhnlichen Atmosphärendrucke verringert; die Einatmung des reinen Sauerstoffes die Sekretion fast nicht ändert, aber eine Ausscheidung der Salzsäure hervorruft; die Hinzufügung von 10% CO<sub>2</sub> die Sekretion des Magensaftes, der keine Salzsäure enthält, etwas steigert.

b) nach Verabreichung von Gemüsesaft

1. die Einatmung der verdünnten Luft in einer Höhe von 5000 m (405 mm Hg) die Sekretionsperiode verkürzt, die Menge des Magensaftes, der keine freie Salzsäure enthält, stark vermindert, das höchste Niveau der allgemeinen Acidität herabsetzt und die Sekretion des Schleimes im Vergleich zu der Sekretion, die der Gemüsesaft während der Einatmung der gewöhnlichen Luft hervorruft, beträchtlich vergrössert.

2. die Einatmung des Sauerstoffes in einer Höhe von 5000 m die Sekretionsperiode verkürzt, die Menge und die Acidität des Magensaftes vergrössert, die Sekretion des Schleimes im Vergleich zu der Magendrüsensekretion während der Einatmung der verdünnten Luft nicht verändert.

3. die Einatmung der verdünnten Luft in einer Höhe von 7000 m die Sekretionsperiode verlängert, die Menge und die Acidität des Magensaftes verringert, die Sekretion des Schleimes und den Magensafteweissgehalt im Vergleich zu der Sekretion während der Einatmung der gewöhnlichen Luft erhöht.

4. die Einatmung reines Sauerstoffes in einer Höhe von 7000 m die Sekretionsperiode verkürzt, die Menge des Magensaftes verringert, seine Acidität erhöht, den Magensafteweissgehalt im Vergleich zu der Sekretion, die durch Gemüse-

saft hervorgerufen ist während der Einatmung der verdünnten Luft, herabsetzt.

5. die Einatmung des Sauerstoffes mit Zusatz von 10% CO<sub>2</sub> in einer Höhe von 7000 m die Sekretionsperiode verkürzt, die Menge und die Acidität des Magensaftes bedeutend steigert und die Sekretion des Schleimes im Vergleich zu der Sekretion nach Gemüsesaft während der Einatmung der verdünnten Luft vermindert.

6. die Einatmung von Sauerstoff mit Zusatz von 10% CO<sub>2</sub> in einer Höhe von 7000 m die Sekretionsperiode verkürzt, die Menge des Magensaftes vermindert, seine Acidität erhöht, die Sekretion des Schleimes nicht ändert und den Magensafteweissgehalt und die Verdauungskraft des Pepsins herabsetzt.

c) nach subkutaner Histamininjektion

1. die Einatmung der verdünnten Luft in einer Höhe von 7000 m die Sekretionsperiode verkürzt, die Menge des Magensaftes verringert, bei zwei Hunden die Acidität des Saftes erhöht und sie bei einem Hunde herabsetzt, die Sekretion des Schleimes steigert und den Magensafteweissgehalt und die Verdauungskraft des Pepsins im Vergleich zu der Sekretion nach Histamin während der Einatmung der gewöhnlichen Luft verringert.

2. die Einatmung des Sauerstoffes in einer Höhe von 7000 m die Sekretionsperiode nicht ändert oder etwas verkürzt, die Menge des Magensaftes verringert, bei zwei Hunden die Acidität des Saftes erhöht und bei einem sie nicht ändert, die Sekretion des Schleimes steigert, den Magensafteweissgehalt im Vergleich zu den Experimenten mit Histamin während der Einatmung der verdünnten Luft herabsetzt.

3. die Einatmung des Sauerstoffes mit Zusatz von 10% CO<sub>2</sub> in einer Höhe von 7000 m bei zwei Hunden die Sekretionsperiode verkürzt und sie bei einem Hunde verlängert; bei zwei Hunden die Acidität des Magensaftes herabsetzt; bei einem Hunde sie fast nicht ändert; die Menge des Schleimes vergrössert, den Magensafteweissgehalt und die Verdauungskraft des Pepsins im Vergleich zu der Sekretion nach



Histamin während der Einatmung der verdünnten Luft — vergrössert.

4. die Einatmung des Sauerstoffes mit Zusatz von 10% CO<sub>2</sub> in einer Höhe von 7000 m bei einem Hunde die Sekretionsperiode verlängert und sie bei zwei Hunden nicht ändert; die Menge des Magensaftes bei zwei Hunden vergrössert und sie bei einem Hunde fast nicht ändert; bei zwei Hunden die Acidität des Saftes erniedrigt und sie bei einem Hunde fast nicht ändert; den Magensafteweissgehalt vergrössert und die Sekretion des Schleimes im Vergleich zu der Sekretion nach Histamin während der Einatmung reines Sauerstoffes — verkleinert.

In einer Höhe von 7000 m ändert die Einatmung von 1) reinen Sauerstoffes oder verdünnter Luft bei nüchternen Hunden, 2) verdünnter Luft bei Hunden, die Gemüsesaft bekamen und 3) verdünnter Luft oder Sauerstoffes bei Hunden, denen Histamin eingespritzt war, — fast nicht die Menge des Chlorgehaltes im Blute, erhöht die Alkalireserve, den Bluteiweissgehalt und den Prozentsatz der Blutkörperchen.

Wir sehen also, dass die Magendrüsensekretion vom Atmosphärendruck und von der Zusammensetzung der eingeatmeten Luft abhängt. Die Ursache dieser Erscheinungen liegt wahrscheinlich in der veränderten Spannung des vegetativen Systems und in der Veränderung der Funktion der Schleimhaut des Magens, die durch den Mangel an Sauerstoff und — möglicher Weise — an CO<sub>2</sub> in der Einatemungsluft, also auch im Blute, hervorgerufen wird. Die Richtung der Veränderung in der Spannung des vegetativen Systems hängt von der Höhe und den individuellen Eigenschaften der Hunde ab. Die mangelhafte partielle Spannung der Gase im Blute wirkt — wahrscheinlich — auf die vegetativen Nerven auch mittels ihrer Nervenzentren.

[Institut für physiologische Chemie der Universität J. Piłsudski, Warschau].

E. Hofer.

Über künstliche Lecithino-Proteine <sup>1)</sup>).

III Teil. Lecithino-Serumalbumin.

IV Teil. Extrahierbarkeit von Lecithin aus künstlichen Lecithino-Ovalbuminen durch Äther-Äthanol-Mischung <sup>2)</sup>).

III Teil.

v. Przytycki und Hofer ('36) haben vor zwei Jahren künstliche Lecithinoproteine erhalten. Als Protein wurde Ovalbumin benutzt. Diese Lipoproteine waren in vielen Eigenschaften den natürlichen Lipoproteinen aus Serum ähnlich.

Es wurde versucht ein ähnliches Lecithino-Protein durch das Lösen von Lecithin in Äthanol mit Serumalbumin zu erhalten und seine Eigenschaften zu prüfen. Zu einer 4 mal durch fraktioniertes Ausfällen mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gereinigter und dann elektrodialysierter 3% Serumalbuminlösung wurde Lecithin zugesetzt. Das Lecithin (Merck, in zwei Versuchen aus Serum) wurde in Äthanol gelöst und in einem feinen Strom in die Albuminlösung eingeführt.

Die erhaltene Lösung wurde entweder durch pH-Änderung oder durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bzw. durch  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ausgefällt. Dieselbe Manipulation wurde 2—3 mal wiederholt. Gleichzeitig wurden dieselben Manipulationen mit dem Serumalbumin-Äthanol durchgeführt.

Die Proteine wurden von den Ausfällungsmitteln befreit, getrocknet und in 4 Teile getrennt. In den zwei Portionen wurde

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 27.1.1938.

<sup>2)</sup> Die Arbeiten wurden dank der Stiftung F. Wiślicki ausgeführt.



**Tabelle I.**  
Lecithino - Serumalbumin.

№ Versuch	pH 1)	Untersuchtes Präparat	Lecithingehalt in %	
			vor der Extraction	nach im Soxhlet
1	3	Ausgangsprotein = reines Serumalbumin	—	4.2
1	3	Lecithino - Serumalbumin . . . . .	—	15.5
1	3	(300 cc. Lösung + 20 cc. 5% Lecithin)	—	19.2
1	8	" " "	—	11.0
1	8	" " "	—	17.1
2	—	Ausgangsprotein . . . . .	3.9	3.8
2	3	Lecithino - Serumalbumin + 20 cc. L. . .	24.7	14.6
2	3	" " "	24.1	15.1
2	8	" " "	26.5	10.7
2	8	" " + 40 cc. L. . .	54.0	19.1
3	—	Ausgangsprotein . . . . .	4.6	4.6
3	3	Lecithino - Serumalbumin + 20 cc. L. . .	29.5	14.1
3	3	" " "	21.0	12.4
3	8	" " 40 cc. L. . . .	35.0	30.6

das Lecithin sofort nach K u m a g a w a - S u t o bestimmt. In den zwei anderen Teilen wurde das Proteinpulver im Soxhlet-Apparat mit Äther oder Petroläther 24 Std. extrahiert. Der Rückstand in der Hülse wurde auf das Lecithin untersucht.

Die in der Tabelle I angegebenen Resultate beweisen, dass auch das Serumalbumin mit Lecithin Verbindungen gibt die durch Ätherextraktion im Soxhlet nicht spaltbar sind.

Das vom Überschuss von Lecithin befreite Symplex ist gut lösbar, es opalisiert und ist gut durch harte Filter filtrierbar.

#### Literatur.

v. Przyłęcki u. Hofer. Bioch. Z. 288 (1936) 303.

#### IV Teil.

M a c h e b o e u f und S a n d o r haben im 1932 nachgewiesen, dass wenn zu dem Serum ein gleiches Volumen von Äther und verschiedene Mengen von Äthanol zugesetzt werden, die Lipide der Lipoproteine nur teilweise in Äther übergehen. Maximal kann 50% der Lipide extrahiert werden. Es wurde in dieser Arbeit das Verhalten der künstlichen Lecithino-Proteine, die wir nach der schon beschriebenen Methode bereitet haben untersucht.

Lecithino-Proteine aus Lecithin (Merck) und Ovalbumin wurden bei verschiedenen pH und bei Salz An- oder Abwesenheit bereitet. Gleichzeitig wurden Lecithin Suspensionen bei pH 2.5 oder 7.0 in H<sub>2</sub>O oder 1% KCl untersucht.

Zu 25 cc. der wässrigen Lösung wurde das gleiche Volumen Äther und 2—5 cc. Äthanol zugesetzt. Das System wurde vorsichtig mehrere Male umgerührt und 24 Std. stehen gelassen. Die obere Schicht wurde abgetrennt und im Äther nach dem Abdampfen, sowie in den wässrigen Lösungen das Lecithin (P —) bestimmt.

### I. Systeme ohne Protein (Tabelle I).

Das Verhalten des Lecithins hängt stark von dem pH der Lösung und der Salzanwesenheit ab. Die Zahlen der Tabelle I beweisen, dass das Lecithin bei pH 2.5 sowohl bei Salz An- oder Abwesenheit sehr leicht und vollständig in die Ätherschicht übergeht.

Tabelle I.

Extrahierbarkeit des Lecithins aus wässriger oder KCl Lösung.

pH.	cc. alkoholischer 5% Lecithinlösung	mg Lecithin in 25 cc. Äther	mg Lecithin in 20 cc. Ätherauszug aus	
			wässriger Lösung	1% KCl Lösung
2.5	0.5	19	14	21
	2.0	76	72	73
	3.0	96	100	97
7.0	0.5	19	1	14
	2.0	75	3	65
	3.0	96	5	95

Bei pH 7 wurden sehr verschiedene Resultate erhalten. Das Extrahieren hängt stark von der Salzanwesenheit ab. So z. B. bei pH 7 wird das Lecithin nur in sehr geringer Menge aus wässrigen Lösungen extrahierbar. Es wurde z. B. aus einer 0.1% Lecithinlösung nur 5% der anwesenden Menge extrahiert.

Aus einer 1% KCl Lösung geht aber auch bei pH 7 die ganze Menge des Lecithins in die Ätherschicht über.



## II. Systeme die eine 1% Ovalbuminlösung bilden.

Ganz andere Resultate wurden bei Proteinanwesenheit erhalten (Tab. II). Bei pH 3 ohne Salze wird das Lecithin mit Protein so stark gebunden, dass nur Spuren von Lecithin in Äther übergehen.

Tabelle II.

Extrahierbarkeit des Lecithins aus 1% Ovalbuminlösung.

pH	cc. Lecithin zugesetzt	Lösung	mg Lecithin in 20 cc. Ätherauszug gefunden	Mittlere Schicht		Wässrige untere Schicht	
				Lecithin	Protein	Lecithin	Protein
				in mg gefunden		in mg gefunden	
3.0	0.5	H <sub>2</sub> O	1	—	—	5.6	96
3.0	2.0	"	5	—	—	2.4	91
3.0	3.0	"	6	—	—	56	108
3.0	0.5	1% KCl	1	5.9	43.8	1.08	11.4
3.0	2.0	"	1	17.0	54.1	1.30	14.4
3.0	3.0	"	18	32.0	65.7	1.70	3.7
3.0	0.5	} Kontrolle	10	—	—	—	—
3.0	2.0		36	—	—	—	—
3.0	3.0		52	—	—	—	—
7.0	0.5	H <sub>2</sub> O	10	Dünne Schicht		1.9	49.9
7.0	2.0	"	33	"	"	7.2	68.4
7.0	3.0	"	41	"	"	7.1	65.1
7.0	0.5	1% KCl	8	"	"	1.2	54
7.0	2.0	"	39	"	"	1.4	61.2
7.0	3.0	"	51	"	"	1.7	64.7
7.0	0.5	} Kontrolle	10	—	—	—	—
7.0	2.0		36	—	—	—	—
7.0	3.0		52	—	—	—	—

Bei demselben pH in Salzanwesenheit (1% KCl) bilden sich drei Phasen. In die Ätherphase geht nur ein kleiner Teil des Lecithins über. Die zweite Phase die eine Emulsion ist, enthält viel Lecithin und Protein. Die dritte wässrige Phase enthält noch viel Lecithin (z. B. 14% des Gesamtlecithins). Das Lipoprotein dieser Phase enthält 34% Lecithin. Viel leichter ist es das Lecithin aus der wässrigen Phase zu extrahieren wenn das Lecithin zu dem Ovalbumin bei pH 7 zugesetzt wurde. Fast die ganze Menge Lecithin wurde in der Ätherphase wiedergefunden. Es bildete sich keine neue Übergangphase.

Ganz andere Resultate wurden erhalten in denjenigen Fällen in welchen das Lecithin zu dem Protein bei pH 3 zugesetzt wurde und nach 4—12 Std. das pH durch 0.1 N. NaOH bis auf 7 erhöht wurde (Tabelle III).

Tabelle III.

Das Ovalbumin wurde mit Lecithin bei pH 3 gemischt. Nach 24 Std. wurde das pH durch NaOH Zugabe bis auf 7 gebracht.  
In 20 cc. Ätherauszug wurden mg Lecithin gefunden

cc. Lösung Lecithin	Systeme ohne KCl	Systeme mit KCl	Kontrolle
0.5	8	6	10
2.0	27	26	38

Es bildete sich zwar keine neue Phase, in der wässrigen Phase blieben aber in salzfreien Lösungen 20—25% des Lecithins. Aus einer 1% KCl Lösung konnten nur 60—70% des Lecithins extrahiert werden. Das Lipoprotein der wässrigen Phase enthält ca. 15—20% Lecithin.

Die erhaltene Resultate beweisen, dass die künstliche durch uns erhaltene Lecithino-Proteine sich sehr ähnlich wie die natürliche Lipoproteine des Serums verhalten, indem sie unter bestimmten Bedingungen nur einen Teil des Lecithins in die Ätherphase abgeben. Die Versuche beweisen gleichzeitig, dass das Protein stark die Eigenschaften des Lecithins beeinflusst.

Ausserdem muss eine besondere Aufmerksamkeit auf den Einfluss der Erhaltung und Bereitung des Lecitho-Proteins und auf seine Eigenschaften gelenkt werden.

Das bei pH 7 bereitete Lipoprotein ist ganz anders als dasjenige das bei pH 3 entsteht und erst dann auf pH 7 übergeführt wird.

#### Literatur.

- M. M a c h e b o e u f et S a n d o r. Bull. Soc. Chim. Biol. 14 (1932). — v. P r z y b e c k i und H o f e r. Bioch. Z. 288 (1936) 303.



[Institut für physiologische Chemie der J. Piłsudski Universität. Warschau].

## Untersuchungen über Polyoso-Proteine.

St. J. von Przyłęcki.

XII Teil.

### Die Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der verschiedenen Tier - Euglobuline mit Amylose<sup>1)</sup>.

von D. Assenhajm

v. Przyłęcki, Andrzejewski und Mystkowski ('35), Bartuszek ('32), Janicki und Kasprzyk ('36) sowie Mystkowski ('37) haben nachgewiesen, dass die Euglobuline mit Polyosen Verbindungen geben.

Nach v. Przyłęcki ('36) sollen es Molekülverbindungen sein die durch OH Gruppen des Tyrosins und C—O—C der Polyosen entstehen. Schon in der Arbeit von Janicki und Kasprzyk wurde beobachtet, dass Euglobuline aus verschiedenen Tierarten Polyosoproteine geben die verschiedene Mengen der Polyose enthalten. Dieser Unterschied, der als charakteristisches Merkmal einzelner Euglobuline angesehen werden konnte, wurde durch uns gänzlich bestätigt. Die erhaltenen Resultate werden hier besprochen.

Bei allen Arbeiten, in denen man die Eigenschaften ziemlich ähnlicher Stoffe vergleicht, muss die Aufmerksamkeit auf das Arbeiten mit einer standarisierten Methode gelegt werden. Sowohl das Bereiten der Stoffe, ihre Reinigung, Behandlung mit Lauge, Säuren, Salzkonzentration als auch die Konzentration der Komponenten und die Zeit und T<sup>o</sup> der Reaktion müssen überall möglichst absolut dieselben sein.

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 9.XII.1937.

### Methodik.

#### Stärke.

15 g Stärke (Merck) wurden in 100 cc. kaltem Wasser suspendiert und zu 400 cc. H<sub>2</sub>O 95° C langsam eingeführt. Nach dem Erkalten auf 40° wurde die Lösung in Pauli Apparat (24 Std.) elektrodialysiert (100 v. 30 M. Amp.).

Die klare obere Lösung wurde abpipetiert. Jede Amyloseportion wurde vor dem Versuche zentrifugiert (3000 Touren 20'). Jede Amyloselösung wurde nur während maximal 2 Tagen gebraucht.

#### Euglobulin.

Menschen- oder Tierblut bzw. das Transudat aus Bauchhöhle (ca. 50 cc. oder mehr) wurde in einer Flasche mit Glasperlen geschüttelt (5'), defibriniert und zentrifugiert. Das Serum wurde abpipetiert und die Fibrinoglobuline mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 24% Sättigung ausgefällt. Nach 24 Std. wurde die Lösung abzentrifugiert und die Globuline bei 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Sättigung ausgefällt. Die Globuline wurden nach 24 Std. abfiltriert in wenig H<sub>2</sub>O aufgelöst und aufs neue mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Nach 2 oder 4 maligen Ausfällen wurde die Globulinlösung dialysiert und der Niederschlag abgetrennt, gewaschen und bei 30° im Vacuum getrocknet.

#### Bindung von Polyose mit Protein.

In ein Zentrifugalglas von 15 cc. Inhalt wurden 5 cc. frisch bereiteter Amyloselösung und 0.1 g Euglobulin gegeben. Durch Zusatz von 2 cc. 0.1 M. NaOH wurden die Proteine aufgelöst. Die Lösung war klar, schwach opalisierend. Nach 5' wurde 0.1 N. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis pH 5.4—5.5 zugesetzt. Das System wurde 3 Minuten schwach geschüttelt und 12 Std. stehen gelassen. Die Systeme wurden 20' oder 40' zentrifugiert (3000 Touren), gleichzeitig wurde in derselben Weise die Amylose-Kontrolle behandelt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Gläser 4' im Wasserbad gehalten und aufs neue 20' zentrifugiert. Die Lösung wurde abgetrennt, mit HCl auf pH 2.0 gebracht und 3 Std. im Wasserbad bei 100° hydrolysiert. Der entstandene Zucker wurde nach Bertrand bestimmt.

Die Bestimmung des Zuckers in der Kontrolllösung der Amylose erlaubte die Menge der gebundenen Polyose zu bestimmen.

### Erhaltene Resultate.

#### 1. Bindung der Amylose mit Euglobulinen verschiedener Individuen derselben Tierart.

Es wurden Versuche mit Euglobulinen von 6 Pferden die aus dem städtischen Schlachthaus stammten durchgeführt. Überall wurden identische Versuchsbedingungen beibehalten. Das erhaltene Resultat (Tabelle I) beweist, dass die durch die



Tabelle I.

	mg Amylose die mit 60 mg Euglobulin gebunden sind	
	Einzelne Zahlen	Mittelwerth
Pferd I	9.6	
„ II	8.1	
„ III	9.6	9.07
„ IV	9.0	
„ V	9.2	
„ VI	8.94	

selbe Menge von Proteinen (60 mg) verschiedener Tiere gebundene Amylose sehr ähnlich ist. Aus 6 Tieren erhaltene Euglobuline binden im Mittelwerth 9.07 Amylose. Die einzelne Zahlen liegen zwischen 8.1 und 9.6 mg.

Die Abweichungen in % des Mittelwertes sind 11% in Minus und 5.6 in plus. Die Schwankungen bilden 16.5% des Mittelwertes.

## 2. Untersuchungen mit Menschensera und Transsudaten.

Im Gesensatz zu den mit verschiedenen Individuen einer Tierart erhaltenen Resultate wurde bei dem Vergleich der Euglobuline verschiedener Menschen beobachtet, dass sie sehr verschiedene Mengen von Amylose binden. Es wurden Sera und Transsudate der Patienten aus dem Wolski Hospital zu den Untersuchungen angewandt. Die Abweichungen von dem Mittelwert in der Bindungsfähigkeit verschiedener Euglobuline sind sehr gross. Die Zahlen liegen zwischen 16 mg und 42 mg. Die Differenzen überschreiten um 100% den Mittelwert (Tabelle II).

Tabelle II.

Bindungsfähigkeit von Euglobulinen verschiedener Menschen.

	Gebunde Amylose in mg	Amylose mit 0.1 g Euglobulin in % der Ausgangsmenge
Patient I	14,2	25.7
„ II	25.0	45.3
„ III	8.9	16.2
Transsudat	25.0	45.3

Auch Euglobuline verschiedener Transudate binden verschiedene Mengen Amylose. Diese Resultate beweisen, dass beim Mensch um das richtige Mittelwert zu erhalten ein Material aus viel grösserer Anzahl gesunder Individuen nötig ist.

### 3. Abhängigkeit der Bindungsfähigkeit von der Bereitung des Materials.

Das von demselben Tier stammende Euglobulin das mehr oder weniger gereinigt wurde (2 oder 4 maliges Ausfällen) bindet verschiedene Mengen Amylose 6.5% oder 9.6% (Tabelle III). Die Differenz ist 38.8% des Mittelwertes. Sie ist viel grösser als diejenige die mit in derselben Weise gereinigten Euglobulinen verschiedener Tiere erhalten wurde.

Tabelle III.

Bindungsfähigkeit von Euglobulinen die verschieden gereinigt wurden.

	mg Amylose gebunden mit 100 mg Globulin	
	Euglobulin zweimal ausgefällt	viermal ausgefällt
Pferd III.	6.5	13.5
Pferd I	7.1	13.6

### 4. Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration der Komponenten.

Ausser der Reinigung ist die Bindung von der Konzentration des Proteins und der Amylose abhängig. Tabelle IV und V beweisen, dass die absoluten Werte der gebundenen Amylose

Tabelle IV.

In eine Amyloselösung, die 49,4 mg Amylose enthält, wurden verschiedene Mengen von Euglobulin gelöst.

mg von Euglobulin	Gebundene Amylose in mg
30	2.9
60	5.9
100	10.4
150	13.6
200	15.5
250	17.8

Tabelle V.

100 mg Euglobulin (Ochse) wurden in verschieden konzentrierten Amyloselösung aufgelöst.

mg Amylose in 5 cc.	Gebundene Amylose in mg	% gebunden
4.1	1.8	44.0
8.1	3.6	44.4
15.0	4.8	32.0
27.2	5.6	20.7
58.2	10.2	17.5



Tabelle VI.

Einfluss von pH

pH	Serumeuglobulin	Transsudat-euglobulin
	% Amylose gebunden.	
3.3	28.0	45.9
5.5	27.0	44.9
6.6	24.0	46.5

desto grösser sind, je mehr Euglobulin und Amylose in den Systemen sich befindet.

Auch das pH, bei dem die Bindung zustande kommt, beeinflusst das Reagieren (Tabelle VI). Die Differenzen im pH-Bereich sind aber nicht gross.

#### 5. Vergleich der Bindungsfähigkeit von Euglobulinen verschiedener Tierspezies.

Die in der Tabelle VII angegebenen Zahlen für die von verschiedenen Tierspezies stammende Globuline die aber immer streng in derselben Weise bereitet wurden, beweisen, dass diese Euglobuline verschiedene Affinität zur Amylose haben. Die geringste Affinität hat das Pferde-Euglobulin (10.9%) und das Ochs-Euglobulin (15.7%).

Tabelle VII.

Bindungsfähigkeit von Euglobulinen verschiedener Tierspezies

Tierspezies	mg Amylose gebunden mit 100 mg Euglobulinen (Mittelwerte)
Mensch-Serum	30.1
Mensch Transsudat	45.3
Pferd	10.9
Ochs	15.7
Gans	22.2

Viel mehr Amylose bildet das Euglobulin der Gänse und die grösste Bindungsfähigkeit wurde mit Euglobulin der Menschensera (30%) sowie der Transsudate erhalten (41.8%).

Die Differenzen sind sehr gross und liegen ausser der Fehlergrenzen.

Eine interessante Erscheinung wurde in vielen Versuchen beobachtet. Das Zentrifugat des Amyloso-euglobulins besteht aus zwei Schichten. Die obere Schicht ist viel schwerer ausfällbar und enthält mehr Amylose als der schwere untere Niederschlag.

### B e s p r e c h u n g e n .

Es unterliegt keinem Zweifel, dass die Euglobuline verschiedener Tiere sich verschieden verhalten was die Bindung mit Amylose anbetrifft.

Die Differenzen der Mittelwerte sind sehr gross. Wenn wir die geringen Abweichungen der Einzelwerte bei derselben Tierpezies in Betracht nehmen, liegen oft die Minima - werte der einen Tierpezies weit oberhalb der Maxima-werte einer anderer Tierpezies. Das ist z. B. beim Vergleich von Pferde- und Ochsen-globulinen der Fall. Maximum für Pferd 9.6%, Minimum für Ochs — 13.1%. Die einzelnen Werte beim Pferd differieren um 11% des Mittelwertes. Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Bindung von Pferde und Ochs-Euglobulin ist 47%. Dieselbe Menge Euglobulin der Gans bindet 2 mal so viel Amylose als die des Pferdes.

Diese Unterschiede sind nicht durch die verschiedene globale Zusammensetzung oder Verunreinigungen der Euglobuline hervorgerufen. Tabelle VIII beweist wie ähnlich der N Gehalt

#### T a b e l l e V I I I .

100 mg verschiedener Euglobuline wurden zur Analyse angewandt.

	N in mg
Mensch Serum	14.7
„ Transsudat.	14.8
Pferd	14.7
Ochs.	14.8
Gans.	14.75

der verschiedener Euglobuline ist. Auch der verschiedene Gehalt vor Lipoiden kann somit nicht als Ursache der Unterschiede in Betracht genommen werden.

Die erhaltenen Resultate zeigen, dass die Annahme der Serologen, dass die Euglobuline sowie andere Serumproteine verschiedener Tierarten verschieden sind, auch auf rein chemischem Wege bestätigt werden kann. Auf rein chemischem Wege, bei Anwendung der standarisirten Methode kann man die Zugehörigkeit der Euglobuline zu gewissen Tierpezies bestimmen. Bei Vergrößerung der Anzahl der untersuchten Tierpezies wird es vielleicht möglich die charakterische Bindungs-



fähigkeit näher zu bestimmen. Es wird dann interessant die Intensität der Unterschiede mit der Grösse der serologischen Differenzen zu vergleichen. Wir glauben, dass ein grösseres Material dieses Problem zu erklären erlauben wird.

Die Differenzen, die in der Bindungsfähigkeit verschiedener Euglobuline beschrieben wurden, können jetzt noch nicht aufgeklärt werden. Es könnte sich entweder um ein verschiedenes Mengenverhältniss der Euglobulinfractionen, von denen nur eine eine grosse Affinität zur Amylose hat, handeln oder um einen anderen Feinbau.

Der Unterschied könnte entweder in der verschiedener Zusammensetzung der Fraktion (verschiedene Mengen der einzelner Aminosäuren) oder verschiedener Aneinanderlagerung besonders der Tyrosine, bei Erhaltung derselben Zusammensetzung liegen. Diese Untersuchungen sind jetzt im Institut verfolgt.

#### Literatur.

v. Przyłęcki, Andrzejewski u. Mystkowski. Koll. Z. 71 (1935). — v. Bartuszek. Bioch. Z. 248 (1932). — Janicki u. Kasprzyk. Biochem. II. 30 (1936). — E. Mystkowski. Biochem. II. 31 (1937). — v. Przyłęcki. Monatsheft. f. Chem. 69 (1936). — Bull. Soc. Chim. biol. Rapport du Congrès Lyon (1937).

[Institut für physiologische Chemie der Universität J. Piłsudski, Warschau].

**St. J. von Przyłęcki.**

**Über die Art der Bindung von Polyosen mit Proteinen in den sogenannten Glyko-Proteinen aus Serum <sup>1)</sup>.**

Durch viele Autoren(1—6) wurde die Existenz von Polyosoproteinen im Serum nachgewiesen, die aus einer noch nicht vollständig definierten Polyose (Triose oder Multiples) und dem Serumalbumin oder Globulin zusammengesetzt sind. Zum ersten Male wurde durch *Levene* (7) beobachtet, dass auch in den Ovoproteinen solche Verbindungen existieren. Interessanterweise sind diese Symplexe sehr stabil und unterscheiden sich von denen die durch uns (8) und *Willstätter* (9) untersucht waren. Es ist viel leichter das Protein in freie Aminosäuren zu spalten, als die Polyose von den Resten der Peptide bzw. Aminosäuren zu befreien.

*Levene* (7) und nach ihm *Rimington* (5a) konnte durch langes Hydrolysieren die freie Polyose bekommen. *Rimington* lenkte aber gleichzeitig die Aufmerksamkeit auf die stark mit der Polyose gebundene Aminosäure und schreibt (5a): „Since histidin is the most tenaciously adhering impurity“ (Seite 1067). „This aminoacid appeared to be united chemically to the complex“ (S. 1070). „As to how the carbohydrate complex is united to the protein no suggestion is at present ventured it is however certain that whatever the linkage, it is of a type that is markedly resistant to prolonged alkaline hydrolysis“ (S. 1064).

Indem wir seit 10 Jahren mit Untersuchungen über die Polyoso-Proteine beschäftigt sind, haben wir eine besondere Auf-

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 27.I.1938.



merksamkeit auf diese starke, kovalenzartige Verbindung gelenkt und haben gleichzeitig von vielen Seiten die Bindungsart der Polyosen mit den Serumproteinen die im natürlichen Glykoprotein existieren untersucht.

In dieser ersten Mitteilung soll untersucht werden, welche Aminosäure bei der Bindung der Komponenten beteiligt ist. Das Serumalbumin und Serumglobulin wurden durch Trypsin (Lao-koon), Polypeptidasen und Dipeptidase vollständig verdaut. Nach 2 Wochen wurde die Lösung filtriert und mit Blei-Acetat und etwas  $\text{NH}_3$  wie die Vorschrift angibt die Polyose-Aminosäure ausgefällt. Der Niederschlag war abzentrifugiert in etwas Essigsäure aufgelöst und die Procedur noch einmal wiederholt. Der letzte Niederschlag wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert mit  $\text{CO}_2$  bei  $60^\circ$  aufgelöst, filtriert und mit  $\text{HgSO}_4$  10 Tage stehen gelassen. Der flüssige Teil wurde nach dem Filtrieren mit  $\text{H}_2\text{S}$  behandelt und der Überschuss von  $\text{H}_2\text{S}$  mit Luftstrom bei  $80^\circ$  entfernt. Die klare Lösung gab starke positive Molischreaktion und eine positive Ninhydrinreaktion; die Biuretprobe war negativ.

Ein Teil der Substanz wurde mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  10 oder 20 Std. hydrolysiert, das Ba mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ausgefällt. Die Substanz wurde dann im Vacuum getrocknet und mit Eisessig extrahiert. Ein grosser Teil des Stoffes blieb ungelöst als Pulver zurück. Er gab keine Ninhydrin-Reaktion (Tab. I). Die Essigsäure wurde abgedampft und der Rückstand in Buttersäure gelöst. Die Lösung war ganz klar.

Tabelle I.

Hydrolysat des Polyoso - Histidins getrocknet		
In $\text{CH}_3\text{COOH}$	löslicher Teil	Unlöslicher Teil
Molich	+	+ + +
Nylander	+	+ + +
Biuret	—	—
Ninhydrin	+ + +	—
Fehling	+	+ + +

Kein Rückstand blieb am Boden. Die ganze Menge der mit der Polyose gebundenen Aminosäure ist somit in Buttersäure löslich. Diese Aminosäure wurde in den Bi- oder Mono-chlorid übergeführt. Die mit der Substanz ausgeführten Reaktionen sind in der Tabelle II angegeben. Sowohl die quantitative Analyse wie auch die qualitativen Reaktionen beweisen, dass in den Aus-

gangspräparaten nur eine Aminosäure und zwar das Histidin anwesend war.

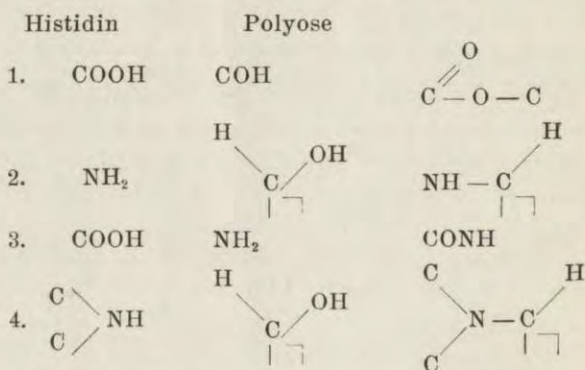
Tabelle II.

In Essigsäure lösliche Fraktion.

In Buttersäure löslicher Teil	Unlöslicher Teil (Spuren)
Ninhydrin + + +	—
Molisch —	+ +
Biuret —	—
N in der freien Base in % 26.9 — 27.2	(Reste des Glukosamins und der
Cl im Dichlorid in % 31.2	Kohlehydrate die in Spuren in
Knoop +	Essigsäure löslich sind)
Phosphorwolframsäure — ausfällbar	
Diazoreaktion +	
In Sublimat + NH <sub>3</sub> ausfällbar	

Nach den erhaltenen Resultaten unterliegt es keinem Zweifel, dass in den sogenannten Glykoproteinen aus Serum die Polyose mit den Proteinen durch Histidin verbunden ist.

Diese Aminosäure konnte auf verschiedene Weise mit den Polyosen (von Typus Mannose + Galaktose + Glukosamin) in Bindung treten; es bestehen 4 Möglichkeiten:



Der Vergleich der Stabilität und der Eigenschaften des natürlichen Glykoproteins mit den 4 Verbindungsarten beweist, dass die Verbindung nicht zu der ersten oder zweiten Art gehören kann. Die Spaltung der Verbindungen 1. und 2. erfolgt leicht in alkalischer und saurer Lösung. Schon bei Zimmertemperatur werden die beiden Verbindungen 1. und 2. durch 0.1 N NaOH oder HCl angegriffen.

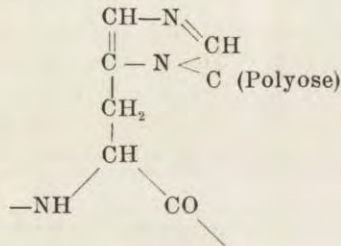
Das Entstehen der Verbindung 3. verlangt die Anwesenheit einer freien COOH Gruppe im Histidin. Es könnte somit nur



das Endhistidin in Betracht genommen werden. Im Serumalbumin könnte somit nur 1 Histidin eines Protein-Teilchens (von Molekulargewicht 70.000) reagieren. Wenn die Polyose, die gebunden ist, ein Molekulargewicht von 2.000 (Levene) hätte, könnte das Serumprotein nur 3% Polyose enthalten. Hewitt konnte aber eine Serumalbumin-fraktion erhalten, die mehr als 10% Polyose enthält.

Die Verbindung Histidin-Polyose, die nach dem Verdauen erhalten wurde, müsste alkalisch reagieren, wenn die COOH-Gruppe des Histidins verbunden wäre. Sie reagiert aber fast neutral, was nur bei Anwesenheit von freier COOH-Gruppe möglich ist. Die Spaltung der Verbindung CO-NH erfolgt ausserdem viel leichter, als es bei der Verbindung Histidin-Polyose beobachtet wurde. Das Simplex Histidin-Polyose wird weiter viel leichter nach dem Abtrennen von dem Protein durch Ba(OH)<sub>2</sub> angegriffen.

Alle diese Gründe zwingen uns zu der Annahme, dass die Bindung der Polyose mit dem Serumalbumin und dem Serumglobulin durch das Histidin und zwar durch die NH-Gruppe nach dem Schema:



erfolgt.

Welche Hexose direkt mit dem Histidin verbunden ist und durch welche Gruppen, ist unbekannt. Es ist wahrscheinlich nicht die C<sub>1</sub> Gruppe. Die Polyose hat nach der Hydrolyse mit Ba(OH)<sub>2</sub> keine reduzierende Eigenschaften, obwohl sie durch die Hydrolyse einer Zersetzung unterliegt.

Wenn die Analysen von R i m i n g t o n richtig sind, entspricht jedem gebundenen Histidin ein Dreihexosen-Komplex. Die Polyose müsste somit eine Triose sein und nicht 12 Hexosen wie im Ovalbumin enthalten.

Die Verbindung zwischen Histidin und Polyose ist sehr schwer angreifbar. Im Organismus wird sie sicher durch ein Enzym gespalten. Alle diese Probleme sind im Institut weiter verfolgt.

Wir wollen noch auf eine biologisch wichtige Tatsache die Aufmerksamkeit lenken. Die Verbindung Histidin-Polyose ist, was die Verankerung zwischen Aminosäure und der Polyose anbetrifft, sehr ähnlich den Purin, Pyrimidin oder Pyridin-Flavin-Nukleosiden. Überall wird die sekundäre Aminogruppe im Ring mit der Zucker Komponente sehr stark verankert. Diese Bindungsart wurde bis jetzt nur bei den wichtigen Stoffen oder katalytisch wirksamen Koenzymen beobachtet.

Heute sehen wir, dass eine ähnliche Bindungsart auch bei den Symplexen von Polyoso-Proteinen existiert. Charakteristischerweise ist auch in diesem Fall der verankerte Zucker nicht die allgemein verbreitete Glukose aber eine ganz charakteristische neue Verbindung, welche eine Mannose, die vor einigen Jahren im Tierreich unbekannt war, neben Galaktose und Glukosamin enthält.

Diese starke, schwer angreifbare Verbindungsart ist ziemlich verbreitet. Wir begegnen sie im Serumalbumin und Globulin im Leberproteinen, Ovoprotein, Muskeleiweiss. Ob überall die Bindung durch Histidin zustande kommt ist heute unbekannt.

#### Literatur

- 1) Bierry et Rothery. Introduction à la physiologie des sucres. Paris, Baillière 1935.
- 2) Diescheu. Popper. Bioch. Z. 175 (1926) 371.
- 3) Fränkel u. Jellinek. Bioch. Z. 185 (1927) 392.
- 4) Lustig u. Haas. Bioch. Z. 231 (1931) 487.
- 5) Rimmington. Bioch. Journ. 23 (1929) 430 i 5a) 25 (1931) 1062.
- 6) Hewitt. Bioch. Journ.
- 7) Leyenc. Journ. of biol. Chem. 84 (1929) 49 i 63.
- 8) Przyłęcki. Mitarbeiter. Bioch. Z. 240 und weitere. Sehe Monatsh. f. Chem. 69 (1936) 243.
- 9) Willstätter u. Rohdewald. Hoppe-Seyler, 225 (1934) 103.



[From the Institute of General and Experimental Pathology, Piłsudski University of Warsaw, Director Prof. F. Venulet, and The Physiological-Chemical Laboratory, Centre of Medico-Aviation Research, Director Dr. A. Fiumel].

F. Goebel and S. Marczewski.

**The artificial acclimatisation of the human organism to low atmospheric pressures<sup>1)</sup>.**

It was noticed by one of us during experiments on the behaviour of blood-gases in dogs subjected either to artificial acidification or to artificial alkalisation (F. Goebel and R. Tislowitz), that in acidified animals the oxygen deficiency in the arterial blood is smaller than before acidification whilst alkalisation adversely affects the oxygen content of arterial blood, since the oxygen deficiency in such conditions is greater than before alkalisation. The above observations have led to the suggestion that acidification of the organism may be advantageous for securing adaptation to low atmospheric pressures.

We conducted experiments on large dogs (21—24 kg). The pH of the blood was determined electrometrically with a Marczewski hydrogen electrode. The alkali reserve was determined by the method of Van Slyke, the oxygen content of the arterial blood as also the oxygen capacity of this blood were determined by the method of Van Slyke and Salvén, and the CO<sub>2</sub> content of the venous blood was determined by the same method. The red blood cell and reticulocyte count, the haemoglobin content, and the colour-index were also determined. The dogs were kept on a uniform diet.

First group of experiments: After several determinations of the normal values mentioned in the methods of investigation

---

<sup>1)</sup> Presented before the Polish Physiological Society, Warsaw, 27.I.1938.

the animals were placed in a low pressure chamber for 10 hours at a pressure of 210 mm Hg, which corresponds to an altitude of about 10,000 m. The period of chamber investigations lasted over two months. When the animals had become adapted to such low atmospheric pressures after a transient alkalisation of the organism an uncompensated acidosis appeared; for example the pH of the blood dropped from 7.35 to 7.05, and the alkali reserve fell from 40.4 ml CO<sub>2</sub> in 100 ml of blood to 32.8 ml CO<sub>2</sub>, parallelly, the oxygen deficit in the arterial blood became smaller and the oxygen capacity increased. There was a marked rise in the number of red blood corpuscles during the period of acidification, from 632,000 to 1,165,000 whilst the colour index, in spite of the considerable increase in haemoglobin, was below unity; this, according to S. M a r c z e w s k i, results an expression of satisfactory adaptation to low atmospheric pressures.

In one case, where the acidification did not appear during the 3-week period in the low-pressure chamber, no increase in the number of red blood corpuscles was noted, the colour index was above unity, the oxygen capacity of the arterial blood declined, and the oxygen deficit increased. The animal died after three weeks of experiments in the low-pressure chamber.

These experiments show clearly that the large number of red blood corpuscles, the lower colour index, the higher oxygen capacity of arterial blood and its greater oxygen capacity, as also acidification of the organism appearing at an altitude of 10,000 metres are functions of each other and indicate a satisfactory adaptional reaction.

The second group of experiments referred to the influence of artificial acidification (by means of ammonia in intravenous doses of 50 — 100 mg<sup>2)</sup>, or ammonium chloride administered

---

<sup>2)</sup> F. Venulet first drew attention to the acidifying influence of ammonia. Investigations made afterwards together with F. Goebel and R. Tislowitz on dogs and humans showed that small doses (50—200 mg) of ammonia given orally or intravenously do not alkalise the organism but acidify it, the ammonia decreasing digestive alkalosis. F. Goebel and S. Marczewski have shown that the repeated intravenous administration of ammonia even during several days results an uncompensated acidosis.



orally in doses of 0.5 g per kg live weight) on the morphological picture of the blood. It was found that after artificial acidification there followed a considerable increase in the number of red blood cell count (after ammoniacal acidification during 12 days this rose from 627,000 to 945,000 and the colour index dropped), in another experiment, acidification with ammonium chloride was followed by a corresponding increase from 610,000 to 820,000 after 5 days of acidification. It follows from these experiments that artificial acidification evokes an increase in the number of red blood corpuscles and a fall in the colour index: in other words the same complex of phenomena which appears under conditions of adaptation to low atmospheric pressures, whilst in addition, in such cases we did not find haemoconcentration as a result of the increased red blood corpuscle content. The oxygen capacity of the arterial blood increased after acidification both with ammonia and ammonium chloride, and the oxygen deficit diminished.

In the third group of experiments, the dogs were acidified with ammonium chloride before introduction into the low pressure chamber. This resulted a considerable acceleration of natural adaptation; the dogs showed no disquieting symptoms whilst in the chamber; their motor activities were the same as under conditions of ordinary atmospheric pressure.

Our experiments have shown, that natural acidosis appearing under the influence of low atmospheric pressures, is very useful for the organism, and that it is possible to accelerate adaptation by means of artificial acidification; this is, from the practical point of view, the most important result. The transient alkalosis appearing during the stay of the animals in the low-pressure chamber (during the first chamber period) is disadvantageous, for it is associated with absence of increase in the number of red blood corpuscles, with an increased colour index, a greater oxygen deficit in the arterial blood, and with a lower oxygen capacity of arterial blood.

It is possible, by the aid of artificial acidification, to obtain under normal atmospheric pressure the same reactions which appear usually during good atmospheric adaptation: an increase in the number of red blood corpuscles, a fall in the colour index, and an increase in the oxygen capacity of the arterial blood.

[Physiologisches Institut der Wiener Universität].

Br. Zawadzki (Warszawa).

### Der Einfluss von Allylformiat auf den Froschmuskel <sup>1)</sup>.

Viele Verfasser sind der Meinung, dass die Erregbarkeit in enger Abhängigkeit von der Permeabilität der Membrane steht. Beim Durchfliessen eines konstanten Stromes durch einen Nerv oder Muskel, vergrössert sich im Kathodengebiet die Permeabilität der Membrane (E b b e c k e), dagegen wird die Erregbarkeit bei einer kurzen Strömungsdauer eines schwachen Stromes gesteigert (P f l ü g e r), aber nimmt jedoch nach längerer Zeit oder bei starken Strömen ab (W e r i g o). Es kam also die Vermutung auf, dass die die Permeabilität vergrössernde Körper eine der Kathode ähnliche Wirkung geben, d. h. Steigerung der Erregbarkeit bei kleinen Konzentrationen und kurzer Zeit, dagegen Verminderung der Erregbarkeit nach grösseren Konzentrationen und längerer Einwirkungszeit. Zu den Versuchen wurde Allylformiat benutzt, das bekanntlich die Permeabilität der Membrane steigert. Die Änderungen der Erregbarkeit wurden am Froschmuskel untersucht, indem ich eine Methode anwandte, die die Unterscheidung der Veränderungen der Erregbarkeit von denen der Kontraktilität bzw. der Erregungsleitung ermöglichte.

*Musc. semimembranosus* eines kurarisierten Frosches (*Rana esculenta*) wurde in einer Doppelkammer angebracht, die mit Ringerlösung angefüllt war. Die Kammer war durch eine Gummischeidewand geteilt, in deren Mitte sich eine Öffnung befand. In der Öffnung wurde der Muskel derart angebracht, dass sich eine Hälfte auf einer Seite der Scheidewand und die

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 17.II.1938.



andere Muskelhälfte auf der zweiten befand, die Mitte des Muskels etwas gequetscht war, dass er sich nicht verschieben konnte und gleichzeitig eine Mischung der Flüssigkeiten auf beiden Seiten der Scheidewand verhinderte. Die Muskelenden wurden mit Fäden an zwei silberne Haken gebunden, die gleichzeitig die stromzuleitende Elemente bildeten und die Enden zweier rechtwinklig gebogenen Schreibhebel darstellten. Die entsprechend beschwerten Schreibhebel wurden derart gewählt, dass ihre Enden unabhängig zwei eine über der anderen gelegenen Kurven auf der Trommel verzeichneten. Nach Verzeichnung der Norm für beide Richtungen des Reizstromes wurde eine Kammerhälfte mit Ringerlösung die Allylformiat in 0.005% bis 0.5% Konzentration enthielt, gefüllt. Die zweite Muskelhälfte diente als Kontrolle. Die Reizung wurde entweder nach der Methode von Scheminzky durch Kondensatorentladungen oder durch Rechteckstösse mittels des Apparates von Scheminzky, die durch ein Metronom unterbrochen wurden, ausgeführt. Es wurden maximale oder übermaximale Reize angewandt. Durch Vergleich der Zuckungshöhe beider Muskelhälften untereinander sowie vor und nach der Einwirkung des untersuchten Faktors kann man folgen, ob sich die Erregbarkeit, die Kontraktilität oder die Erregungsleitung des Muskels ändert. In der Voraussetzung, dass nur die Kathode reizt, können wir annehmen, dass diese Muskelhälfte, auf die die Kathode einwirkt, unmittelbar gereizt wird, die zweite Hälfte dagegen mittelbar. Wenn beide Hälften bei unmittelbarer Reizung grössere Zuckungen ergeben als bei mittelbarer, so können wir annehmen, dass die Erregungsleitung zwischen beiden Hälften herabgesetzt ist. Wenn irgendeine Hälfte bei unmittelbarer Reizung kleinere Kontraktionen liefert als bei mittelbarer Reizung, so ist offensichtlich ihre Erregbarkeit vermindert. Wenn schliesslich für beide Stromrichtungen eine Hälfte kleinere Zuckungen gibt als vorher, die zweite Hälfte dagegen unveränderte Kontraktionen aufweist, so geht daraus hervor, dass die Kontraktilität der ersten Hälfte herabgesetzt ist. In Anlehnung auf diese Erörterungen stellte ich fest, dass kleine Allylformiatkonzentrationen bzw. kurze Einwirkung grösserer Konzentrationen eine Steigerung der Erregbarkeit hervorruft, die

in vielen Fällen grösser war, als die die eine gleich lange Pause in der Kontrollhälfte hervorruft. Grössere Konzentrationen über 0.125% ergaben bei einer Einwirkungsdauer von über 10 Minuten meistens eine Verringerung der Erregbarkeit und ausserdem in vielen Fällen eine Verminderung der Kontraktilität. Die auf die Hälfte eines Muskels, der der Wirkung von Allylformiat ausgesetzt war, einwirkende Anode eines konstanten Stromes steigerte bedeutend die Erregbarkeit, die durch das letztere herabgesetzt war. In Anbetracht dessen, dass die Anode die Permeabilität der Membrane verringert, kann man annehmen, dass die durch Allylformiat verursachte Herabsetzung der Erregbarkeit aus ihrer die Permeabilität steigernden Wirkung herrührt.



[Physiologisches Institut der Universität Warschau].

E. J. Bieńka.

**Über Änderungen in der Menge der Chloride und der festen Bestandteile sowie über die Speichelreaktion der Submaxillardrüse in Abhängigkeit von der Art und Stärke des Reizes <sup>1)</sup>.**

In seiner Arbeit (1928) „Änderungen des Chemismus, der Wasserstoffionenkonzentration und der Verdauungskraft des Pankreassaftes“ widerspricht Czubałski der Ansicht Pawłow's über die Spezifität der Verdauungssäfte in Abhängigkeit von der Qualität des angewandten Reizes. Die Untersuchungen von Czubałski erwiesen, dass auf die Menge des in der Zeiteinheit ausgeschiedenen Pankreassaftes nicht so sehr die Qualität als vielmehr die Stärke des Reizes ihren Einfluss ausübt. Ferner geht aus seinen Untersuchungen hervor, dass einige Änderungen des Chemismus sowie der physikalischen Eigenschaften des Pankreassaftes in Abhängigkeit von den Unterschieden in der Sekretionsgeschwindigkeit, die durch die nicht gleichmässige Reizstärke hervorgerufen wird, stehen.

In der vorliegenden Arbeit führte ich analoge Versuche am Speichel der Submaxillarspeicheldrüse durch. Die Untersuchungen bezweckten die Bestimmung der pH-Schwankungen und der Änderungen im Chlorgehalt sowie der festen Bestandteile im Speichel der Submaxillardrüse, den ich in Versuchsbedingungen, in denen schnelle oder langsame Ausscheidung hervorgerufen wurde, erhielt. Den Speichel lieferten mir Hunde, die mit einer nach der Methode Pawłow an den Ausführgängen der Submaxillardrüsen angebrachten Fisteln versehen waren.

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 17.II.1938.

Durch Reizung der Mundschleimhaut mittels verschiedenartiger Nahrungsreize, chemischer oder mechanischer Art verursachte ich Speichelausscheidung durch die Fistel, wobei unmittelbar nach Einwirkung des Reizes der Speichel reichlicher und schneller ausgeschieden wird (die sogenannte Schnellfraktion), wonach eine langsamere Ausscheidung des Speichels erfolgte (die sogenannte Fraktion des langsam ausgeschiedenen Speichels). Beide Speichelfraktionen fing ich getrennt für die Untersuchung auf.

Als Ergebnis dieser Versuche erhielt ich ein Resultat, das mit den Vermutungen der erwähnten Arbeit von Czubałski sowie den Ansichten über die Gesamtheit der Ausscheidung der Verdauungssäfte, ferner mit den gegenwärtigen Ergebnissen von Bieńka und Szczepański der Speicheluntersuchung der Ohrspeicheldrüse übereinstimmt.

Auf Grund der Versuchsergebnisse konnte ich folgende Schlüsse ziehen:

1°. Der eine Speichelausscheidung verursachende Reiz gibt im ersten Abschnitt seiner Einwirkung einen schnellen Speichelausfluss, hierauf erfolgt mit abnehmender Reizstärke infolge verschiedener Faktoren, wie Verdünnung des Mundhöhleninhaltes, Weiterverschiebung des Reizes nach weiteren Abschnitten des Verdauungskanales, Gewöhnung oder Entfernung des Reizes nach aussen — eine Herabsetzung der Speichelausflusgeschwindigkeit.

2°. Am reichlichsten wird der Speichel durch chemische Reize wie Säuren und Basen ausgeschieden, ferner durch gepulverte Nahrung, die chemisch und mechanisch sowie geschmacklich reizt, dann durch mechanische Reizung stark pulverisierter Mittel, und anschliessend folgen die Nahrungsreize, von denen wiederum Kohlehydrate, hierauf Eiweiss und Milch, am stärksten wirken. Die Speichelausscheidung wird am wenigstens von Extraktivstoffen beeinflusst.

3°. Die mittels rein mechanischer Reize ausgeschiedene Speichelmenge ist dem Pulverisierungsgrade der Nahrung proportional.

4°. Chemische Reize von saurer Reagens verursachen den Übergang der Reaktion des durch sie ausgeschiedenen Spei-



chels ins Alkalische; umgekehrt bewirken basische Reize einen Speichel von allgemein schwächerem pH.

5°. Ein Reiz, der sich aus einem chemisch und mechanisch Speichelausfluss bewirkenden Faktor zusammensetzt, gibt im allgemeinen einen reichlicheren Speichelausfluss als ein teils rein chemischer teils rein mechanischer Reiz.

6°. Der schnell ausgeschiedene Speichel, ohne Rücksicht auf den Charakter des angewandten Reizes, zeichnet sich im Verhältnis zum langsam ausgeschiedenen Speichel durch eine grössere Anzahl von Chlorsalzen, geringerem pH Wert und einem grösseren Gehalt an festen Bestandteilen aus; umgekehrt in dem langsam ausgeschiedenen Speichel ist die Menge der Chloride geringer, der pH Wert grösser, und der Gehalt an festen Bestandteilen kleiner. Daraus ergibt sich die Folgerung dass: die Reizstärke, unabhängig von ihrem Charakter, und die durch diese Stärke hervorgerufenen Änderungen in der Schnelligkeit der Speichelausscheidung der eigentliche Grund der charakteristischen Schwankungen im Gehalt der Chloride, der pH Änderungen, sowie der quantitativen Unterschiede des Speichels im Gehalt fester Bestandteile ist.

[Physiologisches Institut der Wiener Universität].

Br. Zawadzki (Warszawa).

### Einige Beobachtungen über Wendungseffekt<sup>1)</sup>.

Scheminzky und Mitarbeiter untersuchten in einer Reihe von Arbeiten eine Erscheinung, die von ihnen „Wendungseffekt“ genannt wurde, und die darauf beruht, dass, wenn die Kontraktionen isolierter Kaltblütermuskeln infolge direkter Reizung mit Strömen gleichbleibender Richtung nach einer gewissen Zeit verschwinden, so genügt die Wendung des Reizstromes, um neue Muskelkontraktionen zu erhalten. Um diese Erscheinung zu erklären, nahmen die erwähnten Autoren an, dass die Erregbarkeit an einem Ort, bei erhaltener Erregbarkeit an anderen Stellen sowie bei erhaltener Kontraktilität, aufgehoben werden kann; ferner dass die Reizung nur an der Kathode erfolgt und schliesslich, dass ausser der Ermüdung der Erregbarkeit an der Reizungstelle gleichzeitig bei der Kathode eine Herabsetzung der Erregbarkeit erfolgt, die mit einer Steigerung der Permeabilität der Membrane in Verbindung steht, die wiederum ihrerseits durch die physikalisch-chemische Wirkung des Reizstromes verursacht wurde. Bei Anwendung einer besonderen Methode, bei der die Kontraktionen des direkt gereizten Froschmuskels in der kathodischen und anodischen Hälfte besonders aufgezeichnet wurden, so dass sich eine unmittelbare Beurteilung der polaren Stromwirkung geben lässt, erhielt ich auf einem neuen Wege die Bestätigung der Auffassung von Scheminzky und Mitarbeitern über den Wendungseffekt.

Die Methode beruhte darauf, dass der kurarisierte *Musculus semimembranosus* von *Rana esculenta* in eine mit Ringerlösung

---

<sup>1)</sup> Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 17.II.1938.



gefüllte Doppelkammer aus Glas gebracht wurde, die durch eine Scheidewand aus Mossgummi in zwei Hälften geteilt war. Durch ein Loch in der Gummiwand ragte je eine Muskelhälfte in jede Kammerhälfte. Die Stromzuleitung erfolgte mit silbernen Haken, an die die Muskelenden angebunden waren und die gleichzeitig die Enden der rechtwinklig umgebogenen Schreibhebel darstellten.

Meine Versuche erwiesen, dass sowohl bei Reizung mit Kondensatorentladungen als auch mit Rechteckstößen durch Unterbrechung eines Sättigungsstromes mit Hilfe eines Metronoms, der Erregungszustand nur an der Kathode entsteht. Wenn man nämlich einen konstanten Strom durch den Muskel schickt und ihn dann einmal mit einem Strom in einer Richtung und dann in der entgegengesetzten Richtung reizt, so kann man einen solchen Zustand erreichen, dass sich nur die Muskelhälfte kontrahiert, auf die vorher die Anode des konstanten Stromes einwirkte, und dabei gibt sie nur dann Kontraktionen, wenn die Kathode des Reizstromes auf sie einwirkt, dagegen liefert die Anode des Reizstromes keine Zuckungen. Wenn jetzt ein Strom von entgegengesetzter Richtung durch den Muskel fließt, so gibt jetzt die Hälfte, die sich beim ersten Mal unter der Einwirkung der Kathode befand und keine Kontraktionen lieferte, nach der Anodeneinwirkung Zuckungen, aber auch nur dann, wenn die Kathode des Reizstromes unmittelbar auf sie einwirkte.

Wenn wir die Zuckungshöhe beider Hälften eines lang arbeitenden Muskels nach der und vor der Pause vergleichen, so überzeugen wir uns, dass nach der Pause die Zuckungshöhe beider Hälften unbedeutend anstieg. Wenn wir dagegen eine gleich lange Zeit hindurch Strom hindurchschicken, so zeigt es sich, dass an der Stelle der Anodeneinwirkung des konstanten Stromes die Zuckungshöhe bedeutend steigt, dagegen an der Stelle der Kathodenwirkung sich vermindert oder gänzlich verschwindet. Der ermüdete Muskel hatte offensichtlich eine vergrößerte Permeabilität und dadurch eine verminderte Erregbarkeit. Unter der Einwirkung der Anode wird die Permeabilität herabgesetzt, die Erregbarkeit dagegen gesteigert. Umgekehrt setzt die Kathode des konstanten Stromes die Erregbar-

keit herab. Diese Ergebnisse bestätigen die Ansicht von S c h e m i n z k y und Mitarbeitern über die Herabsetzung der Erregbarkeit an der Kathode während der Reizung mittels eines gleichgerichteten Stromes.

Schliesslich erbrachten meine Untersuchungen einen neuen Beweis für die Unabhängigkeit des Erregungsmechanismus vom Kontraktionsmechanismus. Allein der Wendungseffekt beweist schon, dass die Erregbarkeit bei erhaltener Kontraktibilität an einem Ort aufgehoben werden kann insofern als ein Reiz an einer anderen Stelle genügt, um neue Kontraktionen zu erhalten. In meinen Versuchen hatte ich Fälle, in denen eine Muskelhälfte kleinere Zuckungen bei unmittelbarer Reizung durch die Kathode lieferte, als bei Reizung der anderen Hälfte. Dies beweist, dass die erste Hälfte eine herabgesetzte Erregbarkeit bei unveränderter Kontraktibilität besass. In anderen Fällen gab eine Hälfte nach einer gewissen Zeit bedeutend kleinere Zuckungen als zu Beginn für beide Stromrichtungen, während die zweite Hälfte auch für beide Stromrichtungen eine unveränderte Kontraktionshöhe ergab. Dies beweist, dass die Kontraktibilität der ersten Hälfte sich herabsetzte, die Erregbarkeit dagegen unverändert blieb.







## Sommaire du fascicule 1, volume XII.

Nr.Nr.	pp.
1. <b>R. Truszkowski and R. L. Zwemer.</b> <i>Experimental alterations in blood potassium</i> . . . . .	1
2. <b>J. Konorski et L. Lubińska.</b> <i>À propos de l'action de la strychnine sur la préparation neuro-musculaire</i> . . . . .	13
3. <b>J. Dembowski.</b> <i>Über die Rhytmik der Parameciumteilungen</i> . . . . .	22
4. <b>G. Hevesy, T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Ostern und J. K. Parnas.</b> <i>Untersuchungen über die Phosphorübertragungen in der Glykolyse und Glykogenolyse</i> . . . . .	34
5. <b>P. Ostern, T. Baranowski und J. Terszakowec.</b> <i>Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die alkoholische Gärung</i> . . . . .	40
6. <b>Z. Augustin.</b> <i>Vergleichende Untersuchungen über Anfangsvorgänge der Glykogenolyse im Muskel und im Herzen</i> . . . . .	45
7. <b>K. Białaszewicz et H. Głogowska.</b> <i>Sur le métabolisme minéral au cours du développement embryonnaire du Poulet et sur les fonctions de l'allantoïde</i> . . . . .	50
8. <b>W. Zakrzewski.</b> <i>Apparat zum Messen der Augengewölbe bei den Untersuchungsstieren und das physiologische Messen bei Kaninchen, Meerschweinchen und weissen Ratten</i> . . . . .	57
9. <b>J. Miodoński.</b> <i>Über die monaurale akustische Isolation und deren physiologischen Grenzen</i> . . . . .	64
10. <b>F. Krajewski.</b> <i>Die Einwirkung des niedrigen Atmosphärendruckes und der Einatmung verschiedener Gasmischungen auf die Sekretionstätigkeit der Magendrösen</i> . . . . .	66
11. <b>E. Hofer.</b> <i>Über künstliche Lecithino-Proteine. III. Teil: Lecithino-Serumalbumin. IV. Teil: Extrahierbarkeit von Lecithin aus künstlichen Lecithino-Ovalbuminen durch Äther-Äthanol-Mischung</i> . . . . .	70
12. <b>St. J. von Przyłęcki.</b> <i>Untersuchungen über Polyoso-Proteine. XII Teil. D. Assenhajm: Die Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der verschiedenen Tier-Euglobuline mit Amylose</i> . . . . .	75
13. <b>St. J. von Przyłęcki.</b> <i>Über die Art der Bindung von Polyosen mit Proteinen in den sogenannten Glyko-Proteinen aus Serum</i> . . . . .	82
14. <b>F. Goebel and S. Marczewski.</b> <i>The artificial acclimatisation of the human organism to low atmospheric pressures</i> . . . . .	87
15. <b>Br. Zawadzki.</b> <i>Der Einfluss von Allylformiat auf den Froschmuskel</i> . . . . .	90
16. <b>E. J. Bieńka.</b> <i>Über Änderungen in der Menge der Chloride und der festen Bestandteile sowie über die Speichelreaktion der Submaxillardrüse in Abhängigkeit von der Art und Stärke des Reizes</i> . . . . .	93
17. <b>Br. Zawadzki.</b> <i>Einige Beobachtungen über Wendungseffekt</i> . . . . .	96