

ACTA BIOLOGIAE EXPERIMENTALIS

LITTERAE
SOCIETATIS PHYSIOLOGORUM POLONORUM

REDACTORES:

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

VOL. XIII, FASC. 1/2

AUXILIIS FUNDI CULTURAE NATIONALIS
JOSEPHI PIŁSUDSKII

VARSOVIE
RÉDACTION ET ADMINISTRATION:
INSTITUT NENCKI (SOC. SCI. VARS.)
8, RUE ŚNIADECKI
1939

Les **Acta Biologiae Experimentalis** publient uniquement des travaux originaux de caractère expérimental en langues allemande, anglaise, française, italienne et polonaise et paraissent par fascicules d'importance variable. Deux à quatre fascicules constituent un volume d'environ 320—360 pages.

Le prix de chaque volume (affranchissement compris) est fixé à 20 zloty pour les souscripteurs étrangers.

Tarif spécial pour les souscripteurs polonais.

On s'abonne:

à l'**Institut Nencki de Biologie Expérimentale**, 8 rue Sniadeckich, Varsovie,

à la **Caisse de Mianowski**, 72 Nowy Świat (Palais Staszic), Varsovie.

Les auteurs sont priés de n'envoyer que des manuscrits dactylographiés dont la rédaction soit entièrement terminée.

Les auteurs reçoivent gratuitement 60 tirages à part de leurs travaux. Ils peuvent en obtenir un plus grande nombre à leurs frais.

On est prié d'adresser tout ce qui concerne la rédaction des „Acta” au Prof. K. Białaszewicz, Laboratoire de Physiologie de l'Institut Nencki, 15 rue Wawelska, Varsovie.

Sommaire du vol. XII (1938).

Jędrzej Sniadecki als Physiologe, von W. Mozołowski. — R. Truszkowski and R. L. Zwemer: Experimental alterations in blood potassium. — J. Konorski et L. Lubińska: À propos de l'action de la strychnine. — J. Dembowski: Über die Rhythmik der Parameciumteilungen. — G. Hevesy, T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Ostern und J. K. Parnas: Untersuchungen über die Phosphorübertragungen in der Glykolyse und Glykogenolyse. — P. Ostern, T. Baranowski und J. Terszakowec: Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die alkoholische Gärung. — Z. Augustin: Vergleichende Untersuchungen über Anfangsvorgänge der Glykogenolyse im Muskel und im Herzen. — K. Białaszewicz et H. Głogowska: Sur le métabolisme minéral au cours du développement embryonnaire du Poulet et sur les fonctions de l'allantoïde. — W. Zakrzewski: Apparat zum Messen der Augengewölbe bei den Untersuchungstieren und das physiologische Messen bei Kaninchen, Meerschweinchen und weissen Ratten. — J. Miodoński: Über die monaurale akustische Isolation und deren physiologischen Grenzen. — F. Krajewski: Die Einwirkung des niedrigen Atmosphärendruckes und der Einatmung verschiedener Gasmischungen auf die Sekretionstätigkeit der Magendrüsen. — E. Hofer: Über künstliche Lecithino-Proteine. III. Teil: Lecithino-Serumalbumin. IV. Teil:

[Physiologisches Institut der Jagiellonischen Universität in Kraków].

Jerzy Kaulbersz

Blutuntersuchungen an Einheimischen und Einwanderern des südamerikanischen Hochplateau.

Vorgestellt in der Sitzung der Abteilung Kraków der Polnischen Physiologischen
Gesellschaft am 13.V.1938.

Im Dezember 1937 und Januar 1938 habe ich Gelegenheit gehabt in einigen südamerikanischen, hochgelegenen Orten (im bolivischen Potosi — 4100 M und peruvianischen Cuzco—3700 M und Cerro de Pasco — 4500 M) Blutuntersuchungen zu machen, und zwar Bestimmungen der Blutsättigung mit O_2 , des Färbedexes, der Reticulozytenzahl, des weissen Blutbildes, der CO_2 -SSpannung in den Lungenbläschen, sowie seiner Konzentration im Blut. Die Hauptaufmerksamkeit wurde auf den Vergleich der bekannten Blutänderungen im Höhenklima bei den Einheimischen und den Einwanderern gerichtet, mit der Absicht verschiedene Grade der Anpassung an das Höhenklima zu studieren. Als völlig in der Höhe akklimatisierter Organismus kann nur derjenige gelten, der dort ebenso leistungsfähig ist, wie ein in der Ebene sich befindender, und das ist nur bei dem auf bedeutender Höhe geborenem Einheimischen der Fall, ganz besonders dann, wenn schon seine Vorfahren durch mehrere Generationen in grossen Höhen gewohnt haben.

Bereits die letzten Expeditionen Dill's und seiner Mitarbeiter (1)(2) in die chilenischen Anden, sowie der medizinischen Fakultät zu Lima nach Oroya und Morococha (3—6) haben die Blutsättigungsverhältnisse bei den Einheimischen in höherem Grade berücksichtigt, als die früheren Expeditionen, deren Ergebnissen wir eine grosse Zahl von Blutdissoziationskurven im Höhenklima verdanken. So hat Haldane und Mitarbeiter im Jahre 1912 (7) auf Peak Pikes (4312 M) die Disso-

zationskurven unverändert gefunden, während Barcroft und Mtarb. (8) in Cerro de Pasco (ca. 4500 M) 1921—22 dieselben nach links verschoben fanden. Die Dill'sche Expedition (1) hat 1935 an den physiologischen Blutdissoziationskurven bis zu einer Höhe von 4500 Meter ebenfalls eine Verschiebung nach links festgestellt, dagegen ist oberhalb dieser Grenze eine Abweichung nach rechts zu verzeichnen gewesen. Bei konstantem pH gemessen, sind laut den Untersuchungen dieser Expedition die Hämoglobindissoziationswerte gegenüber den normalen nicht geändert, es wird wohl keine neue Hämoglobinform gebildet, wie dies beim foetalen Blut vermutet wird.

Die O₂-Sättigung des Blutes bei ständigen Höhenbewohnern wurde von Barcroft und Mtarb. nur an 3 Einheimischen untersucht und dabei eine geringere Sättigung des Blutes mit O₂ im Vergleich zu den Einwanderern festgestellt. Diese Tatsache fand aber in den Ergebnissen der Expedition keine besondere Berücksichtigung. In den letzten Jahren hat Hurtado (9) auf grossem Material in Morococha einen deutlichen Unterschied in der O₂-Sättigung zwischen Einheimischen und Einwanderern feststellen können.

In den zunächst genannten Orten habe ich im Ganzen 30 Menschen darunter 25 Einheimische und 5 Einwanderer auf ihren Blutgasgehalt untersucht. Es wurde rasch fließendes Kapillarblut aus den Fingerbeeren verwendet das in einem kleinen Gefäss mit einigen Körnchen Natrium citricum unter flüssigem Parafin gesammelt wurde. Nur diejenigen Proben wurden zur Untersuchung verwendet, wo nach einem Einstich Blut reichlich, und ohne Druck aus der Fingerbeere floss. Aus technischen Gründen und auch aus Rücksicht auf die starke Abneigung der einheimischen Kitchua und Aymara Indianer konnten keine Arterienpunktionen durchgeführt werden. Nach Verzar (10) hat die Haut der Fingerspitzen eine so geringe Respiration und ist so stark durchblutet, dass das Blut hier nur sehr wenig ausgenützt wird und deshalb fast dieselbe Zusammensetzung hat, wie das arterielle Blut. Bei 32 normalen Menschen betrug die O₂-Sättigung des Capillarblutes der Fingerbeere 82.4—98.3% während im arteriellen Blute nach Stadie Schwan-

kungen zwischen 85 und 98% vorkommen. Die Menge der Blutgase wurde im Haldane'schen Apparat sowie in einem nach Klisiecki angegebenen Blutgasbestimmer, der sich gut bewährt hat (Fig. 1), ermittelt. In ein kleines ca. 20 cm³ fassen-

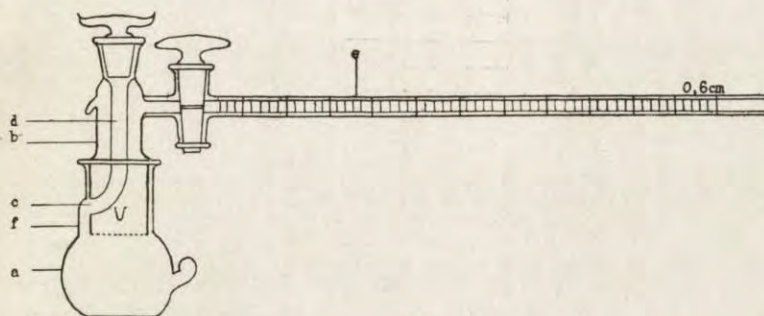


Fig. 1. Blutgasbestimmer nach Klisiecki.

des Gefäß *a* wird etwas 1% NaHCO₃ und etwas Saponin bei der O₂-Bestimmung, H₂O bei der CO₂-Bestimmung gebracht und darunter 1 oder 2 cm³ Blut geschichtet. In die leicht zu reinigende Röhre *e* kommt ein Tropfen H₂O welcher sich bei Neigung der Röhre frei verschieben muss. In das Röhrchen *d* welches mitten in *b* eingebaut ist und welches nur bei Stellung *f* unten in *c* geöffnet, sonst geschlossen ist, wird Kaliumferri-cyanid ev. Weinsäure mit einer Pipette gebracht. Aus der Verschiebung des Tropfens in der Röhre *e* bei konstanter Temperatur des Wasserbades wird die O₂ ev. die CO₂ Menge berechnet.

Der O₂ Gehalt und die O₂ Sättigung waren bei den Einheimischen durchaus geringer als bei den Einwanderern. Fig. 2 stellt die mittlere O₂-Sättigung des Blutes bei den einen sowie bei den anderen in Cuzco, Potosi und Cerro de Pasco dar. Während dieselbe bei den Einheimischen 84—86% beträgt, findet man bei den neu Angekommenen gegen 90%. In Fig 3 sind die Variationen der O₂-Sättigung in Cerro de Pasco bei 17 Einheimischen und 4 Einwanderern aufgezeichnet, die auch auf eine ähnliche Differenz hinweisen. Gutes Selbstfinden steht sicher nicht in direkter Beziehung zum O₂-Sättigungsgrad des Blutes. Dill und Mitarb. haben auf einer Höhe von

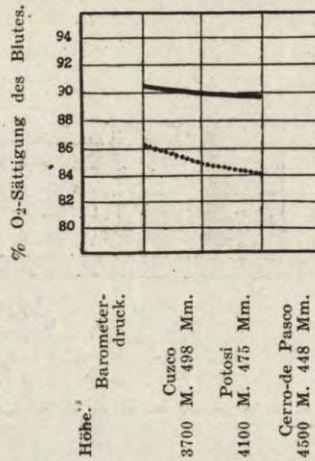


Fig. 2. Mittlere O_2 -Sättigung des Blutes bei Einheimischen und Einwanderern.
 ————— Einwanderer.
 Einheimische.

5300 Meter oft bei sehr geringer Sättigung keine Symptome der Bergkrankheit gefunden und oft bei Bergkranken hohe Sättigungen gesehen. Ich habe bei einigen Einwanderern darunter bei mir selbst in Cerro de Pasco bei ausgesprochener Neigung zur leichten Ermüdung und zu Schleimhautschwellungen höhere Sättigungswerte erhalten, als bei den vollständig leistungsfähigen Eingeborenen. Oft findet man bei Leuten mit geringer O_2 -Sättigung und guter Körperleistung eine ausgesprochene Cyanose. Aus den Untersuchungen von *Lundsgaard* (11) wissen wir dass die Cyanose dann auftritt wenn die Zahl des

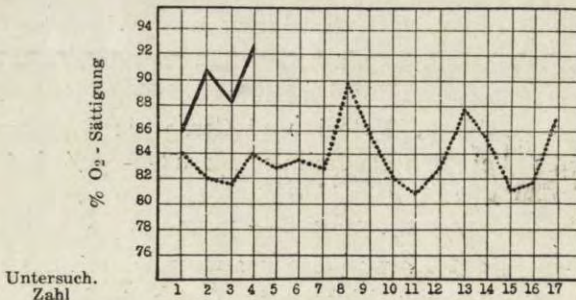


Fig. 3. Variationen der O_2 -Sättigung des Blutes bei Einheimischen und Einwanderern in Cerro de Pasco.
 ————— Einwanderer.
 Einheimische.

reduzierten Hämoglobins, die arteriovenöse Differenz und damit die Ausnützung hoch sind.

Diese bessere Ausnützung des O_2 ist wohl bei den Eingeborenen das wichtigste Anpassungsmerkmal. Wenn man nämlich diese geringere O_2 -Sättigung bei den Einheimischen im Vergleich zu den Einwanderern feststellt und dabei ihre ausgesprochene Leistungsfähigkeit in Betracht zieht, so wird wohl die Annahme berechtigt, dass die entscheidende Bedeutung bei der Anpassung nicht der O_2 -Zahl im Blute zukommt, sondern

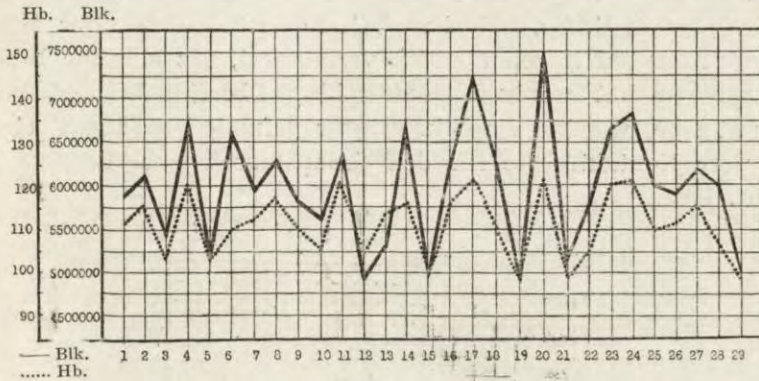


Fig. 4. 1—2 Potosi; 3—8 Cuzco; 9—29 Cerro de Pasco. — Blütkörperchen und Hämoglobinzahlen bei den Einheimischen in Potosi und Cuzco, sowie bei den Einheimischen und 4 Einwanderern in Cerro de Pasco (Nr. 16, 22, 25 und 27).

dass der Hauptort der Anpassung wo anders liegt. Die Untersuchungen von Whipple (12) über das Muskelhämoglobin haben eine Erhöhung desselben nach intensiver oft durchgeführter Muskelarbeit ergeben. Eine ähnliche Erhöhung der Myohämoglobinmenge wurde vor 2 Jahren von Hurtado (13) an Hunden in den peruvianischen Anden gefunden und deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Anpassung an das Höhenklima wohl auf dem Gewebeniveau einsetzt. Es sind aber entschieden weitere Untersuchungen über die Menge des Muskelhämoglobins im Hochgebirge nötig um hier eine sichere Behauptung aufstellen zu können. Eine richtige Anpassung ständiger Bewohner an sehr grosse bis 5000 Meter reichende Höhen ist mit Monge (3—6) entgegen Barcroft (8) zu bejahen. Grosse körperliche Leistungen, die von Einheimischen in Cerro

de Pasco ohne Ermüdung vollbracht werden, sprechen entschieden dafür.

Die Blutkörperchen und Hämoglobinzahlen bei den Einheimischen und Einwanderern in Cerro de Pasco betragen im Durchschnitt: rote Blk. 6 Millionen (Bürker'sche Kammer), Hb 110 (100 = 14% Autenrieth-Königsberg'sches Hämometer „Neoplan“, Hellige'sche Modification). Bemerkenswert war, dass in 20% der Fälle bei den Einheimischen auf 4.500 Meter Höhe keine Erythrozytose vorlag. Fig. 4 stellt die Blutkörperchen und Hämoglobinzahlen bei 29 Individuen in Cuzco, Potosi und Cerro de Pasco dar. Der Färbeindex ist fast in allen Fällen vermindert, das einzelne Blutkörperchen hat weniger Hämoglobin. Übereinstimmend mit Hurtado wurden die Blk. grösser gefunden, wodurch eine grössere Kontaktfläche für den Gasaustausch zur Verfügung steht.

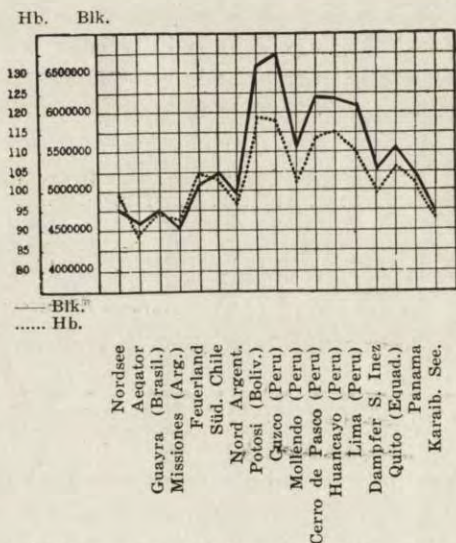


Fig. 5. Eigene Blutkörperchen- und Hämoglobinzahlen während der Reise.

Die eigene Blutkörperchenzahl ist während der viermaligen Hinauf- und Hinunterbeförderung auf grosse Höhen (Fig. 5) bedeutenden Schwankungen unterworfen gewesen. Am höchsten war sie bei dem erstmaligen längeren (der Reihe nach zweitem)

2-wöchentlichen Aufenthalt (8—23 Dezember 1937) auf dem Hochplateau von Bolivien und Südperu (3300—4100 Meter). (Der erste Höhengaufenthalt dauerte nur einen Tag während der Fahrt durch die Anden von Valparaiso nach Buenos Aires). Die Blutkörperchenzahl erreichte in Cuzco — nach 9 Tagen 6.800.000, während die Hämoglobinzunahme nicht über 20% betrug. Bei dem zweiten längeren Höhengaufenthalt (30 Dezember 1937 — 10 Januar 1938) der nach einem einwöchentlichen Verbleiben auf dem Meeresniveau erfolgte war die Zunahme geringer, obwohl grössere Höhen erreicht wurden (4860 Meter in Ticlio, 4500 Meter in Cerro de Pasco, 3700 M. in Oroya). Nachdem später wieder nach einer 3-tägigen Seefahrt und daran anschliessendem 3-tägigen Aufenthalt an der Meeresküste Höhen von 2500 bis 3000 Meter im Equador erreicht wurden, ist bei ausgezeichnetem Wohlbefinden überhaupt keine Erythrozytose mehr zu verzeichnen gewesen. Die Reizbarkeit des blutbildenden Systems scheint nach wiederholter Beanspruchung geringer zu werden, was vielleicht mit dem Beginn der Anpassung auf einem anderen Niveau zusammenhängt.

Die Reticulozyten wurden in keinem Fall über 1.8% gefunden, bei mir während der grössten Blkvermehrung 0.9%. Die meisten Einheimischen hatten 0.5—0.8%.

Das weisse Blutbild stellte keine Besonderheiten dar, eine Lymphozytose konnte in keinem Fall festgestellt werden, die einzige Abweichung von der Norm war eine Vermehrung der Monozyten bis zu 8%.

CO₂-Werte des Blutes und seine Spannung in den Lungenbläschen zeigten bei den Einheimischen höhere Werte als bei den Einwanderern, doch waren die Unterschiede nicht bedeutend, so dass von deren graphischer Darstellung hier Abstand genommen wird. Die Zahlen schwanken zwischen 28 und 38%.

Der charakteristische fassförmige Bau des Brustkorbes der südamerikanischen Höhenbewohner ist so auffallend, dass man sich wundern kann wegen seiner so spät erst erfolgten Beschreibung in der Literatur. Fast jeder Einheimische hat die von Barcroft beschriebene fassförmige Brustform, die um so ausgeprägter ist, je höher die Leute wohnen. Auch Trom-

melfellfinger findet man sehr häufig. Bei den Messungen des Brustumfanges während der Ein- und Ausatmung konnte ich bei den Einheimischen grössere Ein- und Ausatmungsdifferenzen als bei den Einwanderern (darunter mir selbst) in Cuzco und Cerro de Pasco feststellen. Sie betragen 7—10 cm. Bei der Sektion findet man nach Hurtado oft ausgedehnte Lungenbläschen mit normaler Wand. Falls solche Ausdehnungen auch beim Lebenden bestehen sollten, dann wäre ein physiologisches Emphysem vorhanden das einen besseren Kontakt zwischen Luft und dem kreisenden Blute ermöglicht und zusammen mit der Vergrößerung der Oberfläche des einzelnen Blutkörperchen einen nicht unbedeutenden Anpassungsfaktor darstellen würde.

Die verminderte O_2 -Ausnützung der Gewebe bei den Einwanderern im Vergleich zu den Einheimischen ist wohl auch die Ursache der Unfruchtbarkeit der ersteren in grossen Höhen, während die ständigen Bergbewohner sich gut vermehren. Pater Calancha hat in der Mitte des 17 Jahrhunderts in seinem Werke „Cronica Moralizada de la Orden de S. Augustin“ darüber berichtet, dass die spanischen Sieger mehr als $\frac{1}{2}$ Jahrhundert in Potosi keine Nachkommenschaft gehabt haben. Monge (3—6) der dieser Frage in den letzten Jahren nachging, hält diese Unfruchtbarkeit der Einwanderer für bewiesen. Aus eigenen Erkundigungen konnte ich erfahren, dass eingewanderte Männer mit einheimischen Frauen in Potosi und Cerro de Pasco oft Nachkommen haben, ob aber Kinder von beiden eingewanderten Eltern in der Höhe geboren werden, darüber konnte ich keinen sicheren Fall erfahren. Das foetale Blut, welches an sich O_2 -arm ist, kann hier wohl nur bei einer guten O_2 -Ausnützung durch den Foetus die nötige Menge O_2 liefern. Im Zusammenhang damit sollen Aborte bei den Einwanderern häufig vorkommen.

Literatur.

- 1) D. B. Dill, H. T. Edwards, A. Föolling, S. A. Oberg, A. M. Pappenheimer, Jr. and J. H. Talbott. Journ. of Physiol., 1931, 71, 47. — 2) D. B. Dill, E. H. Christensen, H. T. Edwards. Amer. Journ. of Physiol., 115, 530. — 3) Monge, Enci-

nas, Hurtado and Herand. Informe Fac. med. Lima Peru, 1928. — 4) Monge, Encinas, Cervelli, Pesce y Villagarcia. Annales de la Facultad de Ciencias Medicas, Lima, 1935, 17, 7. — 5) Monge. Annales de la Facult. de Ciencias Medicas, Lima, 1935, 17, 175. — 6) Monge. Les erythemies de l'altitude. Masson, Paris, 1929. — 7) Haldane, Douglas, Henderson, Schneider. Philos. Trans. Roy. Soc. Ser. B, 203, 1912, 185. — 8) Barcroft, Binger, Bock, Doggart, Forbes, Harrop and Meakins. Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B, 211, 1923. — 9) Hurtado Alberto. Amer. Journ. of Physiol., 100, 1932, 487. — 10) Verzár. Handb. d. biolog. Arbeitsmeth., IV, 10, 1024. — 11) Lundsgaard zitiert nach Dautreband. Gaz toxiques., Masson, Paris, 1933. — 12) Whipple S. G. Am. Journ. of Physiol., 76, 1926, 693. — Whipple S. H., Groth A. H. and Robscheit-Robbins F. S. Am. Journ. of Physiol. 87, 1928, 185. — 13) Hurtado Alberto. Amer. Journ. of the Medic. Science, 94, 1937, 708.

[From the State Institute of Hygiene in Warsaw].

S. Kołodziejska and J. Duszyńska.

The effect of rancid fats on the sexual organs of rats.

Received for publication: 31.XI.1938.

A. Szczygieł (1) has shown that pathological symptoms and changes develop in rats which had been fed rancid fats for long periods of time.

Vitamin E was not added to the experimental diets. Since among other symptoms, sterility and degenerative changes of the testes were present, it was of interest to establish whether these pathological changes were due to vitamin E deficiency, or whether they were caused exclusively by a toxic agent forming in fats during development of rancidity. The present paper gives the results of a series of complementary researches undertaken with the object of elucidating this problem.

Materials and methods.

In experiment I we used fats artificially rancidified by Whipple's method (2) which consists in aspirating air through molten clarified butter or lard at 60°. Aspiration was continued until the fats gave a positive Kreis reaction for allylic aldehydes and ketones.

The chemical constants of the butter fat and lard, before and after oxidation, are given in the following table.

Kind of fat	Acid value	Saponification value	Iodine value	Reichert-Meißl number	Polensky number	Kreis test
Fresh butter fat	3.0° S-H	228.56	33.4	29.4	3.2	—
Butter fat after oxid.	3.1° S-H	229.60	31.8	27.2	4.2	+
Fresh lard	1.2° S-H	195.00	58.5	0.55	2.0	—
Lard after oxid.	1.4° S-H	197.40	42.3	5.0	2.3	+

In experiment II the diet contained butter fat which had become rancid under the influence of air and light, i. e., of the factors which play

the most important part in the natural process of rancidification of fats. Butter was melted, filtered to remove casein and water, and poured into a shallow dish, so as to expose a large surface to the action of air and light. The dish was exposed to sunlight filtered through ordinary glass, and hence free from ultra-violet rays. In this way there was little likelihood of formation of excessive amounts of vitamin D, which might have exerted a harmful effect on the rats. In order to achieve uniform rancidity the butter fat was mixed and remelted every few days, until the undiluted fat gave a positive *Kreis* reaction. The butter fat was then colourless and looked and smelt like tallow.

In both experiments we used albino rats bred in the Biochemical Department of our Institute. They were four weeks old and weighed 45—55 gr. In the 1st experiment only females, and in the 2nd, only males were used.

The composition of the diet was the same as used by *Szczygieł*, viz. fat 10 or 25, casein 18, agar 2, rice starch 58.9 or 43.9, mineral salts (mixture 51) 6.1, dry brewer's yeast 5. Distilled water was allowed ad libidum.

Salt mixture No 51 consisted of:

CaCO ₃ 1.5	NaHCO ₃ 0.7	MgO 0.2	Fe citrate 0.5 parts
KCl 1.0	NaCl 0.5	K ₂ HPO ₄ 1.7	and Mn traces

Since the chief object of our experiments was to examine the influence of rancid fats on the sexual organs, only the testes, ovaries and uterus were submitted to histological examination. The organs were fixed in *Bouin's* solution and stained with hematoxylin-eosin. In addition to this, in experiment II, testes which had been removed by biopsy or necropsy were fixed and then weighed on an analytical balance, according to *Bülbring* and *Burn* (3). The diameter of the seminiferous tubules was measured with the aid of a *Leitz* micrometer, only those tubules being chosen in each field of vision the cross-section of which was perpendicular to their long axis. Where the cross-sections were not exactly circular the smaller diameter was taken into account. The values given in the tables represent the average of 50—60 measurements made for each testis.

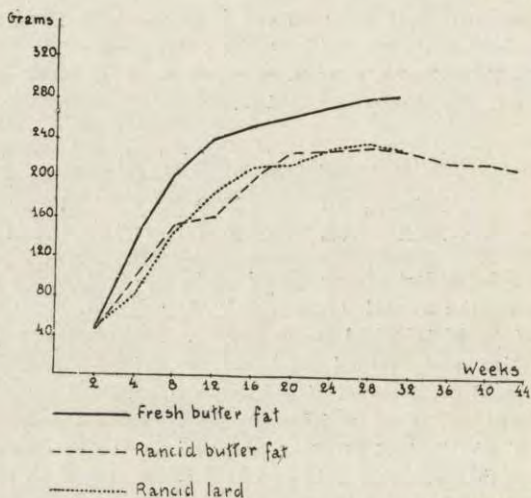
Apart from this, epididymal smears were made immediately after removal of the testes, and were examined for presence and condition of spermatozoa.

Experiment I.

The object of this experiment was to determine whether the degenerative changes in the germinal epithelium of the tubules is attributable to vitamin E deficiency.

The stock diet used in these experiments was supplemented with vitamin E. In addition cod-liver oil (vitamin A, D) and vitamin F were administered twice weekly. Addition of vita-

min F is essential, according to G. O. Burr and M. M. Burr (4), and Murphy, Evans and Lepkovsky (5), who have shown that an unsaturated fatty acid, linoleic or linolenic acid, named vitamin F by American authors, is an indispensable factor of the diet of rats, in absence of which degenerative changes take place in certain organs, and which is essential for normal water metabolism. These unsaturated acids are normal constituents of butter fat and lard; in the conditions of our experiment they might have been destroyed by oxidation, and in order



to replace them each rat was given 0.1 ml linoleic acid once weekly. As a source of vitamin E each rat received 2.5 g of lettuce daily, fed separately in order to ensure that the vitamin E it contains was not destroyed. The necessity of this precaution arises from Olcott's work (6) which showed that whilst vitamin E is fairly resistant to the action of oxygen and heat, it is readily decomposed by rancid fat.

The rats were divided into 3 groups, each group receiving a diet which differed solely in the nature of the fat used. The groups were as follows:

- Group 1 (10 rats) were given a diet containing 25% of rancid butter fat.
 " 2 (5 rats) " " " " " fresh "
 " 3 (10 rats) " " " " " rancid lard.

During the duration of the experiments (31—43 weeks) the rats were weighed twice weekly. The diagram shows the growth curves for the different groups.

We found under our experimental conditions the same histopathological changes, consisting in gradual degeneration of the germinal epithelium of the testes.

The following classification of the process, based on the histological pictures found, has been found convenient:

- Stage 0 — Normal state of the germinal epithelium and seminiferous tubules.
- Stage I — Spermiogenesis still normal. Mature spermatozoa partly degenerated. Desquamated and imperfectly developed spermids with pyknotic nuclei in the lumen of the seminiferous tubules. Lacunae appear in the epithelial layers.
- Stage II — Chromolysis of nuclei in the spermids. In the lumen spherical, polynuclear syncytial masses formed by fusion of dead spermids are evident.
- Stage III — Degeneration of primary and secondary spermiocytes. Only the spermatogonia layer remains below the external membrane. The Sertoli cells are unaltered. The lumen of the tubules is greatly diminished.
- Stage IV — Germinal epithelium absent from tubules. Lumen occupied by connective tissue. The diameter of tubules is reduced to half the normal size or less. Intertubular spaces enlarged and abundantly filled with exsudate. The interstitial cells remain unaltered.

Photomicrographs illustrate the above stages.

Experimental.

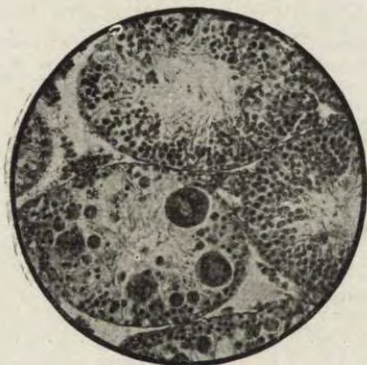
Group 1. The rats grew satisfactorily, but a few weeks after the beginning of the experiment skin eruptions appeared in certain of the animals, which with time affected the entire group. The eruptions began as erythematous rashes, which in-



Stage I.



Stage 0.



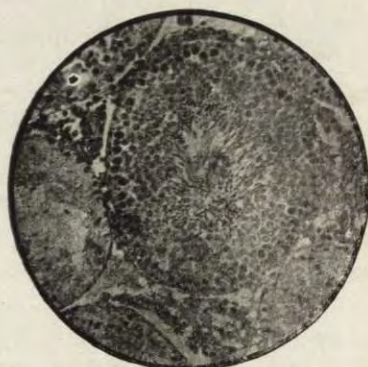
Stage II.



Stage III.



Stage IV.

Rancid replaced by fresh
butter fat.

creased in number and size, and gave rise to dry scales. They were situated over the dorsal surfaces of the skin, occasionally also affecting the head. In some cases the lesions consisted of a confluent mass of scabs, but more often they were separate.

Table II.

Rats		Kind of fat	Fertility	State of spermatozoa in epididymis	Classification of histological changes in the sexual organs
Gr	No				
I	1	rancid butter fat		Spermatozoa absent	Testes: stage 0, III & IV
	2			" "	" " III & IV
	3			" "	" " II & III
	4		Sterile		Ovaries: normal
	5			Very few & dead	Testes: stage III & IV
	6		Sterile		Ovaries: normal
	7			Numerous & dead	Uterus: brown, atrophic
	8			" "	Testes: stage IV
	9		Sterile		Ovaries: normal
	10		" "	" "	Uterus: brown, atrophic
				" " "	
II	11	fresh butter fat	Litter of 14		Ovaries & uterus normal
	12			Numerous & motile	Testes: stage 0
	13		Litter of 11		Ovaries & uterus normal
	14			Numerous & motile	Testes: stage 0
	15		Litter of 8		Ovaries & uterus normal
III	16	lard rancid		In small number & dead	Testes: stage II, III & IV
	17			Single motile	" " 0, I & II
	18			Single & dead	" " II & III
	19			Numerous & dead	" " II
	20			Very few & dead	" " III & IV
	21			Spermatozoa absent	" " III & IV
	22		Sterile		Ovaries: normal
	23			Dead	Uterus: brown, atrophic
	24			Numerous, dead	Testes: stage II, III & IV
	25			Spermatozoa absent	" " IV

The scabs eventually separated, and the lesions healed spontaneously leaving the skin reddened, and, in some cases bald. The period of scab formation was of varying duration, in some cases lasting though out the whole experimental period.

Beginning with the 18-th week of the experiment, the females were mated, but in no case did pregnancy follow, although

they had a normal sexual cycle. Thirty one weeks after the beginning of the experiment half of the rats were sacrificed¹⁾.

The surviving rats were put together in one cage and given a diet in which rancid butter fat was replaced by fresh butter fat.

Group 2. This group served as a control for group 1. The animals received a diet containing 25% of fresh butter fat. The rate of growth of these rats was much higher than with rancid butter fat. The skin lesions found in the previous group also appeared to a greater or lesser extent in this group. No irregularities were observed in the sexual cycle of the females. Rat No 11 cast a litter of 14, No 13 of 11, No 15 of 8 young, all born alive. The females did not however suckle their young. All the rats were killed 31 weeks after the commencement of the experiment.

Group 3. The growth curves and the clinical symptoms of these rats did not differ from those of group 1. After 18 weeks the only female in the group was mated with all the males in turn, but without effect. The rats were killed after 43 weeks.

Discussion.

It follows from experiment I that prolonged feeding with diets containing 25% of rancid fats leads to the development of the following pathological symptoms: arrest of growth, loss of hair, skin inflammation and eruptions, and testicular degeneration. The testicular changes develop in the following order: the spermatozoa in the epididymis lose their motility, undergo agglutination and break down, finally disappearing entirely from the epididymis, which then contains only cell debris. At the same time the testes soften and diminish in size and large amounts of exudate accumulate in the intertubular spaces. The diameter of the tubules diminishes, this being one of the earlier symptoms. Long before the appearance of histopathological changes, spermatogenesis is retarded, spermatozoa being produced in very small quantities, with consequent diminution in the amount

¹⁾ The sex organs of all rats killed were subjected to histological examination. (See Table II). The results will be discussed together with those of the remaining experiments.

of germinal epithelium. Histological changes in the epithelium appear fairly late, but, once initiated, their further progress is rapid.

The control rats on the other hand, except for skin symptoms probably ascribable to a faulty proportion of fat in their diet, bred normally. Their epididymal smears showed viable spermatozoa, and spermatogenesis in the seminiferous tubules was normal.

The possibility, that the effects obtained were due to vitamin E deficiency is not excluded by our experiments, as it might be the case that 1) under the given experimental conditions vitamin E requirements might be higher, 2) this factor might have been inactivated by constituents of rancid fat. In order to exclude these possibilities the experiments were repeated on a group of rats to which a standardized commercial preparation of vitamin E was administered orally and by intramuscular injection.

Experiment II.

In this experiment all the constituents of the diet were the same except for vitamins E and F. A standard wheat germ oil preparation (Evipan B.D.H.) was given as a source of vitamin E. With regard to vitamin F, it has been shown recently by O s m o T u r p e i n e n (7) that maximum growth of rats on fat-free diets was obtained when these were supplemented with about 100 mg of methyl linoleate daily, corresponding with about 95 mg of free acid. Accordingly, the daily ration of linoleic acid was raised for half of the rats of each group, in order to exclude the effect of possible vitamin deficiency on the sex organs of the experimental animals.

Since the histopathological changes appeared only in the males of experiment I, whereas the females had normal sexual cycles, and as vitamin E deficiency does not affect the normal sexual cycle of females, but is essential only for foetal development, only male rats were taken in experiment II. These males were of proved fertility, as had been established by mating them with normal females bred in the laboratory, with subsequent examination of the females for presence of vaginal plug, and of

BIN

spermatozoa. Vaginal smears were also examined for a number of days after mating.

The rats taken for this experiment were divided into the 4 following groups:

Group 1 (10 rats) received a diet containing 10% of rancid butter fat, supplemented by 150 mg of wheat germ oil per os daily, this amounting to two preventive doses of vitamin E.

Group 2 (10 rats) received a diet containing 10% and Group 3 (5 rats) 25% of rancid butter fat, and was given, once weekly, an intramuscular injection of 15 preventive doses of vitamin E.

Group 4 (4 rats) were given a diet containing 10% of fresh butter fat and 2 preventive doses of vitamin E per os daily. These rats served as controls.

Results.

The rats were weighed once every week during the whole period of this experiment, which lasted from 100 to 190 days. Periodic examinations of the rats showed barely perceptible skin lesions in only a few rats from group 1 and 2, and none in the other groups. The rats exhibited neither sex interest nor fecundative ability, irrespective of the rancid butter content of the diet.

After the experiment had lasted 100 days the left testis was removed under ether anaesthesia from about half of the rats of groups 1 or 2, which had been given preventive doses of vitamin E orally or parenterally, from all the rats of group 3 (vitamin E given parenterally), and from one control rat. With the exception of one rat (35) which died under anaesthesia, no untoward effects of the operation were noticed.

On the same day rats No 30, 33, 38 and 45 were removed from group 1 and 2, and placed on a diet in which rancid butter fat was replaced by fresh butter, and in which no vitamin supplements were given other than cod-liver oil. The object of these experiments was to determine whether a change in diet could by itself arrest the progress of the morbid processes in the seminiferous tubules. 90 days later the right testis was removed

and examined histologically (see table III). Two males, No 1 and 2 from experiment I were also included in this group, as they had had rancid butter replaced by fresh on the 31 st day of feeding.

Table III.

Rat		Experiment	After 100 days diet containing rancid butter fat L e f t t e s t i s				After 90 days diet with fresh butter fat R i g h t t e s t i s			
Gr	No		State of spermatozoa in epididymis	Weight gr	Diameter μ	Classification of histological changes	State of spermatozoa in epididymis	Weight gr	Diameter μ	Classification of histological changes
I	30	II	Many dead	1.5047	296	0 & I	Spermat. absent	—	175	IV
,,	33		Spermat. absent	0.8298	206	I & III	—	180	III & IV
II	38		Numerous dead	1.3273	289	I	—	172	IV
,,	45		Majority dead	1.2600	277	0	—	233	0, III & IV
I	1	I	Both testes examined at the end of the experimental period				—	—	0, III & IV
,,	2						—	—	III & IV

The left testis was removed from the rats of groups 1 and 2 in which the diet had remained unchanged throughout the whole course of the experiment. The right testis was removed from all the rats of group 3 as well as from the controls. After 190 days the right testis was removed from all rats of groups 1 and 2 as well as from control animals. The results of histological examination are given in table IV.

D i s c u s s i o n .

The results of histological examination (Table IV) indicate that wide individual variations in the intensity of the process of testicular atrophy exist. Moreover, in many cases various-degenerative phases are observed in different tubules of the same testis.

On the whole, however, and irrespective of whether vitamin E had been administered orally and parenterally, the anatomopathological changes found in the testes of the rats of both groups fed on a diet containing 10% of rancid butter fat differed but very slightly from one another at the various stages

of the experiment, and may be discussed jointly, with, of course, the exception of these animals given special treatment (Table III).

After 100 days of the diet the epididymes of half of the rats belonging to groups 1 and 2 still contained live, motile spermatozoa, and 60% of the testes still exhibited apparently normal spermatogenesis. The changes in the testes of the other animals were, in most cases, just beginning to appear, and in only one case (No 40) was the germinal epithelium entirely altered. Neither did the weight of the testes deviate significantly from the normal (an average of 1.276 g as compared with the normal average of 1.350 g). On the other hand, the diameter of the seminiferous tubules was distinctly smaller; the average value fell from 344.2 μ for normal rats to 268 μ for groups 1 and 2, after 100 days of the diet.

In no case were normal testes found in groups 1 and 2 after 165 days. The histological picture corresponding with stage II (syncytial masses) was found only sporadically. The weight of the testes was distinctly smaller (0.7474 g on the average) and the lumen of the tubules was reduced to half the normal size (170.5 μ).

The 3rd group receiving 25% of rancid butter fat differed from the preceding groups by somewhat more rapid evolution of pathological changes. After 100 days only one animal in five had histologically normal testes, with motile spermatozoa in the epididymis. Moreover, the mean diameter of the tubules was much inferior to the normal (218.6 μ), and the weight of the testes had markedly diminished (1.055).

After 165 days, the testes were completely sterile, weighing on the average 0.7718 g, and the diameter of the tubules was reduced to 155 μ .

As was the case in experiment I the animals of group 4 receiving fresh butter fat, did not exhibit degenerative changes of the testes.

It may, on the basis of the results of the curative experiments (Table III), be supposed that the changes occurring in all the layers of the germinal epithelium commence much earlier than may be detected microscopically. The degenerative process

Table IV.

Rat		% Butter	Vit. E	L E F T T E S T I S								R I G H T T E S T I S									
Gr.	No			100 day period				165 day period				165 day period				195 day period					
				State of spermatozoa in epididymis	Weight gm.	Diameter of tubules	Classific. of hist. changes	State of spermatozoa in epididymis	Weight gm.	Diameter of tubules	Classific. of hist. changes	State of spermatozoa in epididymis	Weight gm.	Diameter of tubules	Classific. of hist. changes	Classific. of hist. changes	Weight gm.	Diameter of tubules	State of spermatozoa in epididymis		
I	26	10 rancid	per os	Numerous & motile	1.2365	252	0											Spermatozoa absent	0.6087	191	III a IV
	27	" "	"					Spermatozoa absent	0.8367	154	IV							"	1.0042	118	IV
	28	" "	"	Numerous & motile	1.4769	296	0											"	0.9433	176	IV
	29	" "	"					Spermatozoa absent	0.6619	167	IV							"	0.8287	117	IV
	31	" "	"	Numerous & motile	1.3178	310	0											"	0.6783	166	IV
	32	" "	"					Spermatozoa absent	0.7889	159	IV							"	0.8339	129	IV
	35	" "	"		Motile	1.3157	296	0											Removed after 100 days; histological picture normal		
				Mean	1.3367	281			0.7625	160									0.8161	149.5	
II	36	10 rancid	parenteral	Numerous & motile	1.5220	302	0											Spermatozoa absent	0.9715	157	III a IV
	37	" "	"					Dead Spermatozoa absent	0.7756	168	IV							"	0.7926	140	IV
	39	" "	"						0.6311	183	III i IV							"	0.4759	150	III a IV
	40	" "	"	Spermatozoa absent	0.6738	199	IV											"	0.8314	157	IV
	41	" "	"	Numerous & motile	1.5638	274	0											"	0.6669	148	III a IV
	42	" "	"					Spermatozoa absent	0.7718	202	II, III i IV							"	0.5450	159	IV
	43	" "	"	Numerous & motile	1.2726	251	0 i I											"	0.5779	136	III a IV
	44	" "	"					Spermatozoa absent	0.7516	171	III i IV							"			
				Mean	1.2580	256.5			0.7324	181									0.6944	149.7	
III	46	25 rancid	parenteral	Dead	1.3161	237	I											Spermatozoa absent	0.7000	181	IV
	47	" "	"	"	1.4067	261	I i II											"	0.8651	131	IV
	48	" "	"	Spermatozoa absent	0.6682	150	III i IV											"	0.5692	145	IV
	49	" "	"	Motile	1.3963	289	0											"	0.9293	153	IV
	50	" "	"	Dead	0.7424	156	II i III											"	0.7894	165	IV
					Mean	1.1059	256.5													0.7718	155
IV	51	10 fresh	per os	Motile	1.3276	353												Motile	1.4067	352	0
	52	25 "	"					Motile	1.4996	326	0							Motile	1.4996	326	0
	54	" "	"	Motile	1.4115	346	0											"	1.3955	339	0
					Mean	1.3695	349.5			1.4996	326									1.4067	352

proceeds unchecked not only in animals with testicular atrophy corresponding with phases III, II and I, but also in those with normal spermatogenesis.

J. D. Greaves and C. L. A. Schmidt (8), who investigated the influence of bile on absorption of vitamin E by rats, report a similar phenomenon. These authors found that although large quantities of vitamin E were given the pathological alterations in the epithelium of the seminiferous tubules could be neither reversed nor checked; once the degenerative process had begun, it proceeded inexorably to complete sterility of the testes.

The diminution in diameter of the seminiferous tubules in the very early stages of the process, and the impossibility of arresting the degenerative process by a change of diet, thus eliminating the pathogenic factor, afford evidence of the existence of some imperceptible change in the germinal epithelium.

The histological picture of the testes of rats No 45 and 1 prove that a change of diet can prevent degeneration of only those tubules which were actually, and not merely apparently, normal.

Conclusions.

It may be concluded, on the basis of the results of our experiments (I and II) that, independently of the nature of the vitamin E preparation given (alimentary product or vitamin preparation), of its amount, and of mode of administration (oral or parenteral), inclusion of so little as 10% of rancid butter fat (artificial or natural rancidification) in the diet is detrimental to the organism of the rat, causing pathological changes in the testes which lead to a complete disappearance of the germinal epithelium.

These changes cannot be attributed to vitamin F deficiency as, in both experiments, and especially in experiment II, the rats received large doses of linoleic acid. In experiment II one half of rats in each group were on a much higher vitamin F dosage level, yet the results of the experiment were the same independently of the amount of linoleic acid consumed.

These changes cannot be attributed to a deficiency or to the destruction of vitamin E by rancid fat or by some unknown oxidising agent in the digestive tract, since this vitamin was

administered not only in the form of lettuce (experiment I) but also of standardised concentrates, and this not only orally, but also parenterally. In the latter case, vitamin E did not come into contact with rancid fat or with the contents of the upper parts of the digestive tract which might have had a destructive effect on it. Moreover experiment II proved that the time necessary for development of pathological changes in the testes did not vary according to whether the animals were given vitamin E parenterally or per os. Rancid fat in the diet is the only factor which could have provoked the above-mentioned alterations in the testes, as is borne out by the following data:

In both experiments the control rats receiving a diet containing 10% or 25% of fresh instead of rancid butter fat (other constituents remaining the same) consistently presented a normal histological picture.

The frequency of incidence of the pathological changes and their gravity rose with increasing rancid butter fat content of the diet. After 100 days of feeding on a diet containing 10% of rancid butter fat (experiment II) the testes of 7 animals out of 12 did not present any apparent changes, as compared with only one rat out of 5 when the diet contained 25% of rancid fat.

Our conclusion is also supported by our attempt at curing rats which had been fed diets containing rancid butter fat and vitamin E and F (Table III) during 100 days. During the next 90 days, rancid was replaced by fresh butter fat in the diet, and vitamin E and F administration was discontinued. Histological examination showed perfectly normal spermatogenesis side by side with completely sterile tubules in the testes of two rats of that group; a similar effect was not observed in any of the animals which had not been given fresh butter fat, although their diets had been supplemented with vitamins E and F.

The experimental results show therefore that the harmful effect of rancid fat is due either to the formation of some toxic factor during artificial or natural rancidification, or else to the destruction of some factor indispensable for the vital functions of the rat. This factor is neither vitamin E nor F, the intake of which greatly exceeded the minimum requirements of the animals.

Bibliography.

- 1) S z c z y g i e ł, A., Arch. Higieny, 6, 49, 1938. — 2) W h i p p l e, Proc. Soc. Biol. Med. 30, 319, 1932-33. — 3) B ü l b r i n g and B u r n, J. of Physiol. 85, 320, 1935. — 4) B u r r, G. O. and B u r r, M. M., J. Biol. Chem., 82, 345, 1929, and 86, 587, 1930. — 5) M u r p h y, E v a n s and L e p k o v s k y, J. Biol. Chem., 106, 431, 441, 445, 1934. — 6) M a t t i e l and O l c o t t, J. Biol. Chem., 104, 423, 1934. — 7) O s m o T u r p e i n e n, J. Nutr., 15, 351, 1938. — 8) G r e a v e s, J. D. and S c h m i d t, C. L. A., Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 37, 40, 1937-38.

[Aus dem Staats-Institut für Hygiene, Kraków].

J. Heller und W. Świechowska.

Über die Reaktion des 3-4-Dioxyphenilalanins (Dopa) mit dem Kaliumferricyanid nach Hagedorn-Jensen.

Vorgestellt in der Sitzung der Abteilung Kraków der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 15.II.1939.

Dioxyphenilalanin reduziert quantitativ die Zuckerreagenzien von **Folin-Wu**, **Folin**, **Bertrand** und von **Hagedorn-Jensen**. Das Glukoseäquivalent beträgt nach der Methode von **Bertrand** 100%, nach den übrigen 200 — 230%. Es wird hier über die Bestimmung von Dopa nach der Zuckermethode von **Hagedorn-Jensen** berichtet. Die Versuche wurden mit d: l. 3-4-Dioxyphenilalanin, bezogen von **Dr. Fraenkel** und **Landau**, Berlin, ausgeführt¹⁾. Es wurde eine Stammlösung von 0.1 g Dopa in 100 ml gesättigter wässriger Benzoessäurelösung mit 0.2 ml N/HCl vorbereitet. Zum Gebrauch wurde wöchentlich diese Lösung zehnfach mit destilliertem Wasser verdünnt. Während 7—10 Tagen hielt sich Dopa in dieser Verdünnung gut. Die Haltbarkeit während längerer Zeitperioden wurde nicht untersucht. Die konzentrierte Lösung war während einiger Monaten (bis zum Verbrauch) unverändert.

1) Die Bestimmung der Dopa in reiner, wässriger Lösung. Das abgemessene Volumen der Lösung, 0.01 bis 0.16 mg Dopa enthaltend, wurde mit destilliertem Wasser auf 10 ml ergänzt, 2 ml der Kaliumferricyanidlösung nach **Hagedorn-Jensen** zugegeben, 15 Minuten im kochenden Wasser erhitzt und weiter nach der Originalvorschrift bearbeitet. Die N/200 Thiosulphatlösung wurde täglich auf Bijodat eingestellt.

¹⁾ Nach **Dulière** und **Raper** ('30) benimmt sich d-l-Dopa in Oxydationsversuchen dem natürlich vorkommenden l-Dopa ganz gleich.

Es wurde versucht die Alkalinität der Kaliumferricyanidlösung zu erhöhen und die Kochzeit zu verlängern. Wir gelangten auf diese Weise zu höheren Reduktionswerten, aber das Optimum lag bei wechselndem Dopagehalt bei verschiedener Alkalinität und auch die optimale Kochzeit erwies sich als abhängig von Dopagehalt. Wir blieben also bei der Originalvorschrift und erhielten dabei die Werte, welche in der Tabelle I zusammengestellt sind:

Tabelle I.

1000 während 15 Minuten.

D o p a mg															
0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15	0.16
Verbrauch von N/200 Thiosulphat.															
1.86	1.70	1.59	1.49	1.37	1.23	1.14	0.99	0.88	0.73	0.65	0.55	0.44	0.28	0.24	0.15
1.86	1.76	1.63	1.50	1.37	1.24	1.11	0.98	0.89	0.73	0.68	0.53	0.45	0.35	0.25	0.19
1.87	1.77	1.61	1.50	1.36	1.20	1.11	0.99	0.91	0.77	0.66	0.51	0.41	0.34	0.23	0.18
1.87	1.68	1.61	1.47	1.31	1.20	1.09	0.96	0.87	0.73	0.61	0.53	0.45	0.28	0.25	0.12
1.89	1.81	1.64	1.42	1.41	1.18	1.08	0.98	0.82	0.77	0.63	0.53	0.38	0.29	0.20	0.14
1.87	1.74	1.62	1.48	1.36	1.21	1.11	0.98	0.87	0.75	0.64	0.53	0.43	0.31	0.23	0.16

2) Die Reaktion bei Zimmertemperatur und bei 37°. Die Reduktion verläuft auch in der Kälte, was bei manchen Fragestellungen von Vorteil sein kann, z. B. wenn man Dopa in Gegenwart von Glukose zu bestimmen hat. Bei 37° gelangt man nach 30 Minuten zu gut definierten Endwerten die aber etwas niedriger, als beim Kochen, liegen. In der Tabelle II bringen wir eine Zusammenstellung der Resultate die mit verschiedenen Dopamengen bei 37° nach 30 Minuten erhalten wurden:

Tabelle II.

37° während 30 Minuten

D o p a mg															
0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15	0.16
1.86	1.79	1.62	1.49	1.43	1.30	1.19	1.08	1.01	0.87	0.74	0.65	0.57	0.47	0.44	0.32
1.88	1.78	1.69	1.53	1.46	1.30	1.19	1.08	0.96	0.83	0.78	0.72	0.58	0.51	0.36	0.37
1.86	1.72	1.61	1.49	1.40	1.26	1.18	1.07	0.91	0.89	0.80	0.66	0.62	0.47	0.38	0.27
1.86	1.73	1.63	1.49	1.39	1.28	1.19	1.07	0.98	0.86	0.78	0.64	0.54	0.43	0.44	0.32
1.87	1.74	1.60	1.55	1.39	1.34	1.23	1.08	1.08	0.88	0.78	0.66	0.56	0.49	0.33	0.25
1.87	1.75	1.63	1.51	1.41	1.30	1.19	1.08	0.97	0.86	0.78	0.67	0.57	0.47	0.39	0.33

3) Die E n t e i w e i s s u n g. Die Zinkfällung nach H a g e d o r n - J e n s e n eignet sich bei den Dopa-Bestimmungen nicht, weil dasselbe mit dem Niederschlag zum Teil ausfällt. Wir haben diese Fällung quantitativ untersucht, um zu erfahren, in wieweit Dopa an der Reduktion verschiedener tierischen Flüssigkeiten beteiligt sein könnte in dem Fällen, in welchen die Methode von H a g e d o r n - J e n s e n angewandt wurde. Die Werte wurden als Glukoseäquivalente für 100 ml auf Grund der Tabelle von H a g e d o r n - J e n s e n in der Tabelle III zusammengestellt.

T a b e l l e III.

Die Zinkfällung nach Hagedorn - Jensen.

Dopa mg	Gefunden als mg % Glukose	Sollwert mg	V e r l u s t	
			mg %	%
0.04	47	99	52	51.5
„	55	99	44	44.5
0.06	62	138	76	55.0
„	66	138	72	32.0
0.08	95	173	78	45.0
„	100	173	73	42.0
0.10	174	209	35	16.7
„	171	209	38	18.2
„	170	209	39	18,6
„	174	209	35	16,7
„	109	209	100	48,0
„	131	209	78	37,5
0.12	201	238	37	15,5
„	169	238	69	28,9
0.14	119	282	163	57,8
„	193	282	89	31,5
„	196	282	86	30,4
0.15	218	292	74	25,2
„	272	292	20	6,9
0.16	230	314	84	26,6
„	257	314	57	18,1

Aus den Zahlen der dritten Tabelle sehen wir, dass die Fällung beim gegebenen Dopagehalt nicht immer gleich ist. Im Allgemeinen nähert sich die Fällung eher einem konstanten Wert von 66 mg% Glukose = 0.03 mg Dopa, als einem bestimmten Prozentwert der vorhandenen Menge. In eiweisshaltigen Flüssigkeiten ist die Fällung ein wenig, aber nicht bedeutend, grös-

ser. (Tabelle IIIa). Es kann also im Fall von Insektenhämolymph ein bedeutender Teil der Reduktion nach Hagedorn-Jensen von dem in diesem Blute anwesenden Dopa herrühren. Demgemäss stellten wir auch fest, dass die Reduktion mit den Filtraten aus diesem Blute zum grössten Teil auch in der Kälte verläuft. Die Frage über die Restreduktion des Insektenblutes und über den Anteil von Dopa daran wird von uns besonders untersucht.

Tabelle IIIa.

Fällung der Dopa durch Zinkhydroxyd in Gegenwart von Serum.

	Reduktion nach Hagedorn in mg % Glukose		
		D o p a	
		Gefunden	Gefällt
0.1 Serum	17		
„ „ + 0.10 Dopa	121	104	105
0.1 Serum	103		
„ „ + 0.10 „	216	113	96
0.1 Serum	76		
„ „ + 0.10 „	222	146	63
0.1 Serum	55		
„ „ + 0.10 „	169	114	95

Ohne Verlust an Dopa lässt sich das Blut und Hämolymph nach der etwas modifizierten Vorschrift von Folin ('28) enteissen: 0.1 ml der untersuchten Flüssigkeit tropft man in 10 ml verdünnter Wolframsäurelösung¹⁾ schüttelt gut und filtriert nach einigen Minuten: das Filter wird mit verdünnter Wolframsäure tropfenweise nachgewaschen bis das Filtrat 10 ml beträgt (meist genügt dazu 1 ml). Mit 0.7 ml N/10 NaOH versetzt kann das Filtrat unmittelbar zur Bestimmung nach Hagedorn-Jensen benützt werden.

4) Die obige Methode eignet sich gut zur Verfolgung der von Arnow ('37) beschriebenen Bildung von Dopa aus Tyrosin unter dem Einfluss der ultravioletten Strahlung. Wir haben

¹⁾ 2 ml 10% Natriumwolframat in etwa 60 ml destillierten Wasser werden tropfenweise mit 2 ml $\frac{2}{3}$ N Schwefelsäure unter Schütteln versetzt und mit destillierten Wasser auf 100 ml ergänzt.

je 2 ml einer 0.15% Tyrosinlösung in gesättigter wässriger Benzoessäurelösung in der Entfernung von 5 cm von der Quarzlampe (für analytische Zwecke, Hanau) belichtet, mit 2 ml N/200 Kaliumferricyanidlösung versetzt und folgende Reduktionswerte als Dopa ausgedrückt gefunden:

Tabelle IV.

Nach Minuten der Belichtung	Bestimmung	
	sofort bei 100°	nach 24 St. bei 37°
10 Min.	0.01 mg	0.016 mg
20 "	0.015 "	0.05 "
30 "	0.023 "	0.043 "

Die viel höhere reduzierende Wirkung bei 24-stündigem Einwirken des belichteten Tyrosins auf Kaliumferricyanid beweist, dass die durch die Strahlung induzierte Umwandlung im Dunklen weiter geht.

Diese Ergebnisse bringen eine Erklärung für den Misserfolg einer Untersuchung, die von einem von uns (H) in den Jahren 1933—34 gemeinsam mit Dr. A. Fried ausgeführt wurde. Es wurde damals der Zusammenhang zwischen Restreduktion des Insektenblutes und seinem hohen Gehalt an Aminosäuren untersucht. Neben einem Glukoseäquivalent für Dopa von 200% wurde ein solches für Tyrosin von 50—56% gefunden. Da der letzte Befund an frischen Lösungen von Tyrosin nicht bestätigt werden konnte, wurde die Untersuchung unterbrochen und nicht veröffentlicht. Die erst benutzte Tyrosinlösung wurde seit Jahren auf einem gut besonnten Regal aufbewahrt und musste unter dem Einfluss der Sonnenstrahlen zu etwa 20% in Dopa umgewandelt werden sein.

Es sei hier angeführt, dass nach unseren Versuchen auch eine Glukoselösung unter dem Einfluss der ultravioletten Strahlen die Fähigkeit erlangt, das Hagedorn'sche Reagens in der Kälte zu reduzieren.

5) Der Mechanismus der Reaktion zwischen Dopa und Kaliumferricyanid. Um einen Einblick in den Mechanismus der Reaktion zu gewinnen,

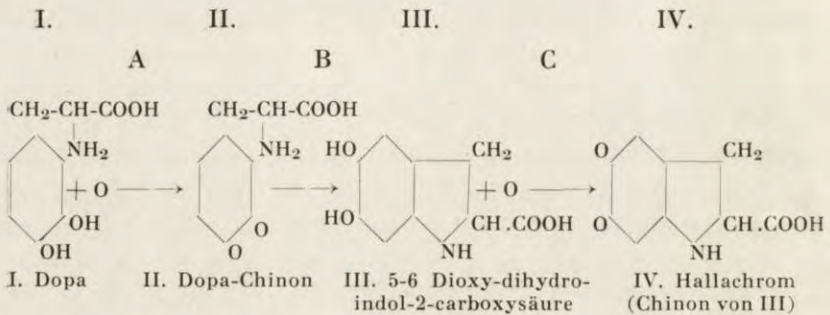
haben wir versucht durch Temperaturerniedrigung ihren Verlauf zu verlangsamen. Die abgemessenen Lösungen wurden in Kühlschränken auf 0°—3° gekühlt, die gekühlte Ferricyanidlösung rasch zugesetzt und nach gewünschtem Zeitintervall die ebenfalls gekühlten Zink-Jodidlösung und Essigsäure zugefügt. So gelangten wir zu den Werten der Tabelle V, die zum Vergleich auch den Reaktionsverlauf bei 37° bringt.

Tabelle V.

Reaktionsverlauf bei 0° C			bei 37° C	
nach Verlauf von	als mg % Glukose	Mikroäquivalente	als mg % Glukose	Mikroäquivalente
Sofort			86	4.8
1 Min.	77	4.3		
2 „	86	4.8		
4 „	90	5.0	149	8.3
8 „	86	4.8	169	9.45
15 „	90	5.0	184	10.2
30 „	95	5.26	197	11.0
60 „	122	6.8	204	11.4
90 „	125	7.9		
2 Stunde	150	8.3	204	11.4
3 „	148	8.2		
4 „	154	8.5		
6 „	175	9.8		
24 „	202	11.2	216	11.8

Nach dem Titrieren der Proben, bei welchen wegen der Kürze der Zeit bei der niedrigen Temperatur die Reaktion nicht zu Ende verlaufen konnte, resultierte eine deutlich rosa gefärbte Flüssigkeit. Am deutlichsten war diese Färbung bei Proben, die sofort nach Kaliumferricyanid mit Jodid und Essigsäure versetzt wurden. Je länger die Reaktionszeit, desto blasser war die Farbe (am Pulfrich-Photometer gemessen). Wir haben an das Hallachrom (5:6 - Chinon der Dihydroindol - 2 Carboxysäure, Farbstoff von *Halla parthenopoea*, einer Polichäte) gedacht, welches nach Raper ('32) als erstes sichtbare Produkt bei der Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin oder Dopa entsteht.

Aus dem angeführten Reaktionsschema sehen wir, dass eine Umsetzung von Dopa in Hallachrom eine Agliederung von 2 Sauerstoffatomen erheischt, also viervalent ist. Ein Blick auf



Schema der Dopa-Umwandlung unter dem Einfluss der Tyrosinase nach
R a p e r.

Umwandlung A: Tyrosinase notwendig, Verlauf ziemlich schnell.
 „ B: „ überflüssig „ schnell
 „ C: „ „ „ ziemlich schnell

die V Tabelle zeigt, dass der bei 0° momentan verlaufende Anteil der Reaktion, welcher zum Maximalgehalt am roten Körper führt, auch vier Äquivalente von Kaliumferricyanid verbraucht. Es konnte aber die Rosafärbung auch von der Vulpian'schen Reaktion herkommen: eine rote Färbung entsteht, wenn Dopa mit einer Jod-Jodkaliumlösung versetzt wird (E v a n s und R a p e r '37), ein Umstand den wir uns in der Endphase unserer Bestimmung realisiert denken können. Um diese Möglichkeit auszuschliessen, haben wir 1 ml einer 0.01% Dopalösung mit 2 ml N/200 Kaliumbijdatlösung versetzt und wie üblich jodometrisch titriert: Keine Spur einer Rosafärbung war zu sehen. Mit einer konzentrierteren Dopalösung (1 mg) gelingt der direkte Nachweis einer Indol-Ringschliessung unter dem Einfluss der Kaliumferricyanids: die erhaltene burgundrote Lösung gibt, mit dem Aldehydreagens nach Ehrlich erwärmt, nach vorübergehenden Verblässen eine prächtige Ametistfärbung. Nach vorsichtigem Zusatz einer sehr verdünnten Nitritlösung schlägt diese in Purpur über.

Wir dürfen also annehmen, dass der erste, momentan eintretende Schritt in der Oxydation von Dopa in seiner Überführung ins Hallachrom besteht. Wir haben hier mit einem Einstellen des Redox-Potentials zu tun und die Abhängigkeit dieser Umwandlung von der Wasserstoffionen-Konzentration

ergibt sich aus den rH-Werten der reagierenden Systeme. Nach Evans und Raper ('37) bestehen hier zwei Systeme: I: Dopa \rightleftharpoons Dopa-Chinon und II: 5-6 Dioxydihydroindol-2-Carboxysäure \rightleftharpoons Hallachrom. Als drittes fungiert Ferricyanid \rightleftharpoons Ferrocyanid. Nun zeichnet sich das letzte System durch die Unabhängigkeit seines Redox-Potentials von pH aus. Sein Potential im Bereich von pH 4 bis pH 10 beträgt $E'_0 = + 0.4$ V. Für das System I bei pH 4.6 — ist $E'_0 = + 0.511$ V, für II bei demselben pH $E'_0 = + 0.170$ V. Bei diesem Säuregrad kann also Dopa durch Ferricyanid nicht oxydiert werden, da sein eigenes Potential gegen Dopa-Chinon positiver ist, als dasjenige des $Fe^{\cdots} Cy'_6 \rightleftharpoons Fe^{\cdots} Cy'_6$ — Systems. Fällt aber die H⁺-Konzentration, so fällt auch gleichzeitig das Potential von (I), bis bei dem pH 7 $E'_0 = + 0.345$ V wird. Dann ist es schon niedriger als dasjenige des Eisencyanids und kann von diesem oxydiert werden. Zwar ist der Unterschied der Potentiale nicht gross, aber der Ferroanteil des Eisensystems wird durch das Zinksulfat (mit Kaliumjodid in der Endphase zugesetzt) gefällt. Zur Wiederherstellung des $Fe^{\cdots} Cy'_6 \rightleftharpoons Fe^{\cdots} Cy'_6$ — Gleichgewichtes wird nun Fe^{\cdots} reduziert und Dopa oxydiert, bis das letzte ganz in sein Chinon übergeht. Dieses oxydiert nun das viel negativere System II.

Tabelle VI.

Reaktionsverlauf mit Brenzkatechin (0.2 mg) bei 0°

Nach Verlauf von Minuten	Glukosewert mg %	Reduziertes Kaliumferricyanid Äquivalente
Sofort	143	2.15
2	188	2.82
5	226	3.40
15	251	3.78
20	257	3.86
30	266	4.0

Zu Vergleichszwecken wurde eine 0.01% Brenzkatechinelösung der Reaktion mit Kaliumferricyanid unterworfen. In der Tabelle VI haben wir die Ergebnisse bei 0° zusammengestellt: in der 1. Kollonne die dem Thiosulfatverbrauch entsprechenden

Glukosewerte aus der Tabelle von Hagedorn, in der zweiten die verbrauchten Äquivalente von Kaliumferricyanid. Die momentan einsetzende Reaktion verbraucht zwei Mikroäquivalente, was einer Oxydierung des Brenzkatechins zum o-Chinon entspricht. Für diese Deutung spricht auch eine schwache dunkle Färbung der Lösung. Dann beginnt ein anderer Prozess, der in 30 Minuten ein zweites Atom Sauerstoff verbraucht, worauf die Oxydation bei 0° aufzuhören scheint. Beim Kochen werden zwei weitere Äquivalente von Kaliumferricyanid reduziert. Beim Dopa werden sofort vier Äquivalente reduziert, zwischen 30 und 60 Minuten die weiteren zwei. Es möge sich hier um denselben Vorgang wie bei Brenzkatechin handeln. Beim Kochen — (und bei 0° in etwa 24 St.) werden weitere sechs Äquivalente verbraucht. Der Mehrverbrauch beim Kochen beträgt also beim Dopa dreimal so viel wie bei Brenzkatechin. Nebenbei wurde auch Hydrochinon untersucht und beim Kochen ein Verbrauch von 6 Äquivalenten an Kaliumferricyanid festgestellt.

Die weitere Oxydation von Dopa scheint also nicht den Weg der Tyrosin-Tyrosinase Reaktion zu folgen, sondern in ähnlicher Weise wie bei den Diphenolen zu verlaufen. Nimmt man aber einen Überschuss von Dopa im Verhältniss zur Kaliumferricyanidlösung, so kommt es zur Bildung dunkler Pigmente wie unter dem Einfluss von Tyrosinase. Die Substitution eines anorganischen Oxydationsmittels für Tyrosinase wurde von Dullière und Raper (30) versucht, welche mit frisch gefälltem Silberoxyd eine Umwandlung von Dopa und Epinin (Dioxyphenil-ethyl-methylamin) in entsprechende Indolderivate erzielt haben. Bei der Oxydation nach Bertrand, — mit Abscheidung des Kupferoxyduls — sind Dopa und Dioxyphenole äquivalent und ihre molare Reduktion entspricht der von Glukose. Es scheint hier also nur der Benzolkern beteiligt zu sein.

6) Von anderen physiologisch vorkommenden Verbindungen reagieren mit Kaliumferricyanid in der Kälte: Cystein, Glutathion, Thionein, Harnsäure, Polyphenole und Ascorbinsäure. Von ersten drei kann Dopa durch Formalinzusatz unterschieden werden, weil dieses die Reduktionskraft jener, nicht aber die Reduktionskraft von Dopa hemmt. Die Harnsäure reagiert mo-

mentan und verbraucht zwei Äquivalente. Es wurde nicht untersucht, ob dabei Allantoin entsteht, oder die Reaktion bei der Bildung von Oxyacetylen-Diureinkarboxysäure stehen bleibt. Der momentane Verlauf der Reaktion lässt auch hier an das Vorkommen einer reversiblen Oxydationsstufe denken. Wir wollen die Frage in der Zukunft näher untersuchen. Bei der Zink-Enteiuweisung nach Hagedorn wird die Harnsäure quantitativ gefällt und kommt für die Restreduktion des Blutes nach Hagedorn nicht in Betracht. Durch Formalin wird ihre Reduktion nicht gehemmt.

Von den Phenolen und Ascorbinsäure kann Dopa unterschieden werden, indem man das Kaliumferricyanid zu knapp bemisst und bei $\text{pH} = 6$ die Reaktion nicht über das Stadium von Hallachrom zu gehen erlaubt. Die Anwesenheit von Dopa verrät sich dann durch die rosa-Färbung.

Zusammenfassung.

Dopa reduziert die Kaliumferricyanid-Lösung nach Hagedorn-Jensen sowohl beim Kochen, wie in der Kälte. Bei 37° verläuft die Reaktion in 30 Minuten zu Ende.

Ein Mol Dopa reduziert 12 Mol Kaliumferricyanid, also zweieinhalbmal so viel wie Glukose.

Die Reduktion von vier Mol erfolgt momentan und führt zu einem rotgefärbten Stoff, welcher eine positive Indolreaktion mit dem Aldehydreagens nach Ehrlich gibt und als Hallachrom angesehen wird. Die Reaktion wird auf Grund der Redox-Potentiale der reagierenden Systeme gedeutet.

O- und p- Dioxybenzene reduzieren Kaliumferricyanid in der Kälte. Sie sind dabei etwa 6-valent. Der momentan verlaufende Anteil der Reduktion verbraucht zwei Mol Ferricyanid (Chinon-Bildung).

Harnsäure reduziert 2 Äquivalente. Die Reaktion verläuft momentan auch in der Kälte. Durch Zinkhydroxyd nach Hagedorn-Jensen wird Harnsäure quantitativ gefällt.

Die genannten Reduktionen werden durch Formalin nicht gehemmt.

Literatur.

Arnow E. D. 1937. The formation of dopa by the exposure of tyrosine solutions to ultraviolet radiation. *J. Biol. Chem.* *120* (151). — Dulière W. L. and Raper H. S. 1930. The tyrosinase-tyrosine reaction. VII. *Biochem. J.* *24* (239). — Evans W. Ch. and Raper H. S. 1937. The accumulation of 1-3:4-dihydroxyphenylalanine in the tyrosinase-tyrosine reaction. *Biochem. J.* *31* (2162). — Raper H. S. 1932. Tyrosinase. *Erg. d. Enzymforschung.* *1* (270).

[Department of Animal Physiology, Faculty of Sciences, Joseph Piłsudski University of Warsaw, and the Marine Biological Station, Roscoff, France].

M. A. Zieliński.

Carbohydrate metabolism and phosphorus compounds in the fertilized eggs of the sea-urchin (*Paracentrotus lividus* Lm.).

Received for publication 15.XII.1938.

Needham and co-workers established ('37) that in the chick embryo, glucose and mannose are the only substrates which are converted into lactic acid if added to the tissue; besides, the phosphorylated compounds known in muscle glycolysis have been excluded as possible intermediates in this process. The cycle of phosphorylating glycolysis, also possible in the embryo, has been found to have very low activity because some of its enzymes are deficient. If it be taken into consideration that the glycogen content in the hen's egg is very small and the carbohydrate reserve consists chiefly of simple sugars (the analytical data are reviewed by Needham, '31), the question arises whether the occurrence of that special type of non-phosphorylating glycolysis is a more general feature of the metabolism of the embryonic tissues or whether perhaps it is connected with the presence of simple sugars, as a carbohydrate reserve. This question cannot, however, be settled before the processes of carbohydrate breakdown in the embryos will be known for different classes of animals.

The present paper is concerned with the glycolysis of the eggs of *Paracentrotus lividus* Lm. Our information on the carbohydrate metabolism and lactic acid formation in the early development of the sea-urchin is very incomplete and rather inconsistent. It has been shown by various authors (Perlzweig and Barron, '28, on *Arbacia*; van Herk, '33, on *Sphaerechinus*; Runnström, '33, on *Paracentrotus*)

that the lactic acid content of the sea-urchin eggs is about 1—2 mg. per 100 mg. nitrogen, provided the eggs are well aerated (this content is higher in anaerobic conditions) and that there is a slow lactic acid production after fertilization. According to Rapkine ('31), the lactic acid content in *Paracentrotus* eggs is considerably higher and it is strongly influenced by the mitotic cycle. According to that investigator (in agreement with other writers on the subject) lactic acid production is connected with glycogen breakdown. But in view of this, it would be rather hard to explain the considerable variations in lactic acid content when compared with the insignificant changes in glycogen previously found by the same author (Ephrussi and Rapkine, '28) in the course of the first 12 hrs. of development of *Paracentrotus*. Ashbel ('29) and van Herk ('33) reported that lactic acid can be produced by sea-urchin eggs from glucose added to their medium. But this result is regarded by Lindahl ('36) as caused by bacterial action, since the penetration of glucose into the eggs is extremely slow (Thörnblom, '32). The role of phosphorus compounds in the glycolysis of developing sea-urchin eggs still remains uncertain. Runnström and his school have presented evidence that hexosephosphoric esters, when added to the cytolysed eggs, take part in their metabolism. But the same author was not able to detect any change in the content of phosphorus compounds after fertilization.

In order to find out which carbohydrate should be regarded as being the source of lactic acid, the present author effected simultaneous determinations of lactic acid, sugars and glycogen in samples of sea-urchin eggs at different stages of the first two mitoses. Secondly, in order to examine the point whether during the development phosphorylating glycolysis takes place, determinations of the phosphorus fractions were made in normal and monoiodoacetate-poisoned, developing eggs.

Methods.

Eggs of *Paracentrotus lividus* Lm., taken from the ovaries and washed in the usual way, were transferred into a round-bottomed flask. After the first sample had been taken, the eggs were fertilized. The suspension

of the developing eggs was stirred and aerated with a water-pump by a stream of air saturated with sea-water vapour. Round-bottomed flasks have been found to be more suitable than the usual Drechsel bottles, in which embryos settle in the corners at the bottom and develop abnormally owing to the insufficient access of oxygen. The concentration of the suspension of eggs was at first about 10%. After the last sample had been taken, more water was added to the eggs and the culture was continued. Both cultures from which samples were taken for analysis gave normal plutei. Sample VIII (July 27th) was taken from a mixture of eggs extracted from nearly empty ovaries of several females, but these eggs were able to develop normally, since from another part of them, after fertilization, normal gastrulae were obtained.

The determination of carbohydrates, lactic acid, and total phosphorus fractions were effected on samples of about 1—2 ml. of eggs. These were fixed with a more than tenfold quantity of boiling ethyl alcohol and were analysed, but after a considerable lapse of time. The eggs were first separated from the alcohol by centrifuging and then ground up thoroughly with quartz-sand, after which they were extracted three times with cold 96% ethyl alcohol in the presence of one drop of 1 n H_2SO_4 . The three extracts, joined to the alcohol in which the sample of eggs was fixed and kept, constituted the first fraction. Three extractions with 60% alcohol were then made (excluding Sample II of July 27th, which was extracted directly with 60% alcohol, without any 96% alcohol extraction): these extracts were accepted as the second fraction. Finally, the material was extracted thrice with hot water in a centrifuge tube, trichloroacetic acid being added before each centrifuging. The water (or rather trichloroacetic acid) extract was the third fraction, and the residue, chiefly containing precipitated proteins, constituted the fourth fraction.

The lactic acid estimations were effected on the 96% alcohol extract by the Lieb and Zacherl method ('32) after alcohol evaporation and the usual copper-lime treatment.

The reducing power of both alcohol extracts was estimated by the method of Fujita and Iwatake ('31) as modified by Niemierko ('38), after the precipitation of most of the reducing bodies (sugars excepted) with cadmium hydroxide. As it is possible that the accuracy of this precipitation depends on the alcohol concentration, the cadmium treatment was always effected in the presence of the same alcohol concentration (about 60%). The reducing power estimations were made in some portions immediately after the cadmium hydroxide had been separated, and in other portions, after 0.6 n HCl hydrolysis for 2 or 3 hrs.

The glycogen and dextrines in the water extract were converted into glucose by means of 3-hr hydrolysis with hydrochloric acid. The glycogen of the fourth fraction (precipitated proteins), after alkali-hydrolysis and precipitation by the method of Pflüger, was washed twice with 60% alcohol and converted into glucose. All glucose estimations were effected

by means of the method of Fujita and Iwatake ('31) after the precipitation of possible impurities with cadmium hydroxide.

In all fractions the nitrogen determinations were effected by the Kjeldahl micro-method with the help of a Parnas-Wagner apparatus, whilst the determinations of the total phosphorus were made by the Kuttner and Cohen microcolorimetric method ('27). The lipid phosphorus was estimated after alcohol was evaporated from a portion of the 96% alcohol extract and the lipids separated by dissolving in chloroform. Only the sum of phosphorus in the 60% alcohol and in the water extract is given in Table II as it was found that both fractions contained the same phosphorus compounds.

For the determinations of the acid soluble phosphorus fractions, fresh material was used. For that purpose, the eggs, separated by centrifuging from 10—20 ml. of egg-suspension, were transferred to an ice-cold mortar and ground up with sand and trichloroacetic acid to a final concentration of about 0.20 or 0.25 normal. The extract obtained in such manner was divided into two parts. One part, after dilution to fivefold volume, was used directly for phosphorus determinations, whilst the other part was separated into two fractions by the barium-precipitation method (Eggleton and Eggleton, '29). The separated insoluble barium salts were dissolved in trichloroacetic and hydrochloric acids and precipitated once again. In such wise, after the double precipitation both liquids contained all the soluble barium salts and traces of the insoluble ones. The solubility of the inorganic barium phosphate was the only one taken into account, while all the figures for inorganic phosphate were corrected for the small amount found in the soluble fraction. All determinations of inorganic phosphate, phosphorus after normal HCl hydrolysis (by the method of Lohmann, '28), or total phosphorus after H_2SO_4 digestion, were effected by the above-mentioned microcolorimetric method. In those cases where the Ba-ion was present in the solution, 0.85 n HCl was used instead of 1 n H_2SO_4 as in the original method.

In cases where figure cited in the table is the mean of two or more determinations, the root-mean-square error of a single determination is given.

Results.

I. Carbohydrates and lactic acid.

Table I summarizes the results of the determinations of reducing sugars, glycogen and of lactic acid in the samples of unfertilized and developing sea-urchin eggs obtained from one female and in one portion of unfertilized eggs from a number of females. It is evident that the alcohol-insoluble fraction, i.e., glycogen and dextrans, form a considerable part (about 90%)

of the total carbohydrate content. About two-thirds of the sugars were found in the 96% alcohol extract. Probably this fraction consists chiefly of simple sugars, since its reducing power ranged from 70 to 100% of the value found after the acid hydrolysis. The remaining sugars passed into the 60% alcohol extract. Their low reducing power, ranging from 40 to

Table I.

Lactic acid and carbohydrates in developing sea-urchin eggs, calculated for 100 mg. total nitrogen.

Date and No of sample	Time after fertilization min.	Stage of development	Lactic acid mg.	Sugar in 96% alc. extract	Sugar in 60% alc. extract	Total reducing sugar	Glycogen and dextrine in terms of glucose mg.
				Reducing power expressed in mg. of glucose (a) without hydrolysis, (b) after HCl hydrolysis			
27.7.1936. I	0	unfertilized eggs	1.3	a) 3.7 ± 0.5 b) 3.8 ± 0.7	0.7 ± 0.1 1.7 ± 0.2	4.4 ± 0.5 5.5 ± 0.7	48.4 ± 0.8
II	0	unfertilized eggs	1.5 ± 0.1	a) — b) —	— —	3.9 ± 0.1 5.8 ± 0.3	48.9 ± 1.4
III	8	fertilization membrane raised	1.5 ± 0.2	a) 3.3 ± 1.1 b) 3.5 ± 0.9	0.7 ± 0.0 1.8 ± 0.0	4.0 ± 1.1 5.3 ± 0.9	47.7 ± 0.6
IV	37	beginning metaphase	1.8 ± 0.2	a) 2.8 ± 0.1 b) 3.2 ± 0.3	1.0 ± 0.1 2.4 ± 0.1	3.8 ± 0.2 5.6 ± 0.3	48.1 ± 1.2
V	81	formation of the first furrow	0.9 ± 0.1	a) 4.0 ± 0.2 b) 4.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1 1.5 ± 0.1	4.7 ± 0.2 5.5 ± 0.2	46.3 ± 0.2
VI	106	metaphase of the second cleavage	1.5 ± 0.2	a) 4.2 ± 1.0 b) 4.0 ± 0.5	0.8 ± 0.2 1.6 ± 0.0	5.0 ± 1.0 5.6 ± 0.5	46.2 ± 1.0
VII	125	formation of the furrow	1.9 ± 0.4	a) 2.2 ± 0.0 b) 3.3 ± 0.3	1.0 ± 0.1 2.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1 5.4 ± 0.3	46.5 ± 0.6
27.7. VIII	0	unfertilized eggs	2.3 ± 0.3	a) 3.6 ± 0.4 b) 5.1 ± 0.5	1.1 ± 0.1 2.1 ± 0.1	4.7 ± 0.4 7.2 ± 0.5	53.2 ± 0.5

50% of the value after hydrolysis, indicates the presence of di- or tri-saccharides, or other compounds which gained reducing properties by the acid hydrolysis.

While the figure for total sugar is fairly constant (in terms of glucose, 5.5 mg. per 100 mg. total nitrogen), there is remarkable decrease in glycogen content, especially after the metaphase of the first cleavage (Fig. 1, full line). But if it be taken into consideration that the differences observed are not very

great when compared with the error in glycogen determination, the application of statistical methods for the calculation of the mean values is more suitable. The method of the least squares gave the glycogen content of 48.4 mg. at the starting point (i.e., in the unfertilized eggs) and the average decrease of 1.14 mg. per hour in terms of glucose per 100 mg. nitrogen; hence the decrease during the first two cleavages is 2.3 mg. (Fig. 1, broken line).

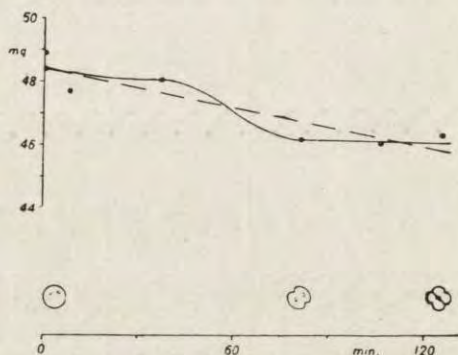


Fig. 1. Changes in glycogen content during the first two cleavages of the sea-urchin eggs.

The figures yielded for the lactic acid are of the same order of magnitude as those of most of the above-mentioned authors. Its content after fertilization is higher (the difference ranges to 0.5 mg) or almost the same as in the unfertilized eggs. An exceedingly low value was obtained only for the formation of the first furrow, but the above results do not permit to settle whether there is really such a fall in lactic acid content in the eggs, or whether the result is caused by some impurity in the analysed extract.

II. Phosphorus compounds.

Table II contains the results of phosphorus determinations in the eggs fixed with alcohol. As no change in phosphorus fractions was observed during the first two mitoses, the means of phosphorus determinations in the unfertilized and in the developing eggs from the same female are given in that table,

which also gives the results of the analysis of sample VIII of unfertilized eggs separately. It follows from these data that 30.5% of the total phosphorus is contained in the phosphoproteins and in nucleic acids, and 22.5% in the lipids. The remaining part, i.e. 47%, forms the so-called acid-soluble phosphorus.

Table II.

Fractions of total phosphorus in sea-urchin eggs calculated for 100 mg. total nitrogen.

Date and No of sample	P in 96% alc. extract		P in 60% alc. and in the CCl ₃ COOH extracts	P precipi- tated with CCl ₃ COOH	Total P	Inorg. and pyro-P
	lipid	non-lipid				
mg. of total phosphorus						mg.
27.7.1936. I-VII	2.86±0.12	0.18±0.02	5.79±0.18	3.97±0.12	12.80±0.24	4.74±0.20
27.7. VIII	3.06	0.29	6.08	4.04	13.47	5.08

The determinations of inorganic phosphorus and pyrophosphate were made separately on fresh material. The results expressed as percentages of the total acid-soluble phosphorus, are shown in Table III. As no change in the content of both inorganic phosphorus and pyrophosphate could be found in the course of development, the mean values were calculated. In the case of inorganic phosphorus, estimated with greater accuracy than the pyrophosphate, the average change was calculated by the method of the least squares, and a decrease of 0.26 ± 0.47 per hour (in % of the acid-soluble P), lying within the limits of experimental error, was found.

If there is any phosphagen in sea-urchin eggs, its phosphorus was included in the inorganic fraction. Attempts were made to estimate the phosphagens separately, but no trace of phosphocreatine could be detected, while about 1.5% of the total acid-soluble P was estimated as phosphoarginine. But this result is considered very uncertain since it could be caused by the partial hydrolysis of some other phosphorus compound.

If the glycolysis in the sea-urchin eggs is connected with phosphorylation, more pronounced differences in the phosphorus compounds might be expected in the development of the

Table III.

Phosphorus fractions in developing sea-urchin eggs, expressed as percentages of acid-sol. P.

Date and No of sample	Time after fertilization min.	Stage of development	Inorganic orthophosphate %	Inorg. P after 7 min. hydrolysis %
29.6.1936. I	0	unfertilized eggs	57.1	81.7 (?)
			55.6	
II	8	fertilization membrane raised . .	56.6	74.8
			54.8	74.8
III	38	metaphase	54.6	73.2
			57.4	74.3
IV	71	formation of the first furrow . .	55.4	76.0
			55.3	76.6
V	90	metaphase of the second cleavage .	55.7	74.4
			56.2	79.6
Average			55.9±0.9	76.2±2.8
Pyrophosphate (P hydrolysed in 7 min.)			20.3±2.9	

monoiodoacetate-poisoned eggs. Being a specific inhibitor of the phosphorylating glycolysis, the monoiodoacetate brings about the accumulation of the phosphorylated intermediates in the case of vertebrate muscle (Lundsgaard, '30a). In order to find an adequate monoiodoacetate concentration, the fertilized eggs were kept in Petri dishes in sea water to which different

Table IV.

Effect of monoiodoacetate on the development of fertilized sea-urchin eggs.

Conc. of $\text{CH}_2\text{I-COONa}$ mol.	Retardation of the 1st cleavage	Retardation of the 2nd cleavage	Observations after 6 hours	Further development
0	—	—	young blastulae	normal
0.025	—	5 min.	about 10 to 20 cells	stopped
0.05	—	about 10 min.	less than 10 cells	stopped
0.10	—	about 10 min.	4 to 8 cells	stopped
0.15	7 min.	more than 10 min.	mostly 3 to 6 cells	stopped

quantities of fresh, half-molar monoiodoacetate were added. A summary of the observations of their development is given in Table IV. The development of the eggs used for phosphorus determinations took place in bottles, as described above, in 0.025 molar monoiodoacetate. It was supposed that in this concentration the first two mitoses would take place normally and in all cells simultaneously, while in the 0.05 molar concentration the lag in the second mitosis was not the same in all the cells. And in actual fact, as the aeration in the bottle culture was much better than in the Petri dish, the development was normal and very regular for about 4 hrs., after which it stopped suddenly at the stage of about 30 cells.

Table V.

Phosphorus fractions in sea-urchin eggs developing in monoiodoacetate solution, expressed as percentages of acid-sol. P.

Date and No of sample	Time after fertilization min.	Stage of development	P estimated without precipitation		Ba-precipitable P*			Organic Ba-non-prec. P	
			inorg. P	org. P after 3 hrs. hydrol.	inorg. P	inorg. P after 7 min. hydrol.	total prec. P	total non-prec. P	org. P after 3 hrs. hydrol.
7.7.1936. I	0	unfertilized eggs	58.5	15.9	59.7	74.7	83.8	16.2	13
II	2	fertilization membrane raised	58.2	13.9	57.4	72.3	82.7	17.3	14
III	38	metaphase of the first cleavage	58.6	14.2	57.3	73.7	80.1	19.9	16
IV	67	formation of the first furrow	56.5	15.1	55.7	71.0	81.0	19.0	15
V	90	metaphase of the second cleavage	56.4	14.8	56.9	73.4	78.5	21.5	—
VI	105	formation of the furrow	56.3	15.1	56.1	—	80.7	19.3	15

* Figures corrected for the solubility of inorganic Ba-phosphate.

The average changes in the phosphorus compounds were calculated from the analysis of the trichloroacetic acid extracts of the poisoned developing eggs (Table V). The decrease in the content of inorganic phosphate amounted to $1.39 \pm 0.30\%$ per hour (in % of acid-soluble P) and could be calculated with the greatest accuracy. As the change in the sum of inorganic phosphorus and pyrophosphate ($0.73 \pm 0.90\%$ per hour) and of

the total Ba-precipitable phosphorus ($1.99 \pm 0.66\%$ per hour) was the same within the limits of experimental error, the content of the Ba-precipitable, other than inorganic, phosphorus is considered to be constant (Fig. 2). On that assumption, the average pyrophosphate content was found to be 15.5%, and that of the more difficultly hydrolysable precipitable phosphorus 8.4% of the total acid-soluble P. The ratio of these two percentages being 1.85, i.e. nearly 2, indicates that in sea-urchin eggs,

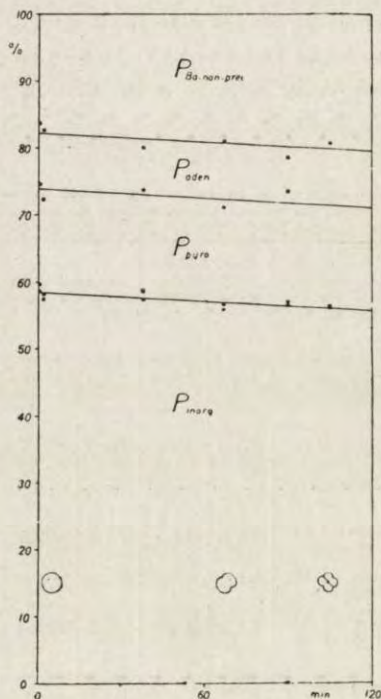


Fig. 2. Phosphorus fractions in monoiodoacetate-poisoned eggs of the sea-urchin, expressed as percentages of the total acid-soluble phosphorus.

as in most other animal tissues, the pyrophosphate is bound in the form of adenosinetriphosphate. The content in the Ba-non-precipitable organic phosphorus was about 17% at the beginning and rose during the course of the experiment. A great part of this fraction consists of very difficultly hydrolysable esters; after 3 hours of hydrolysis with normal hydrochloric acid, only one-fifth of the phosphorus was split from the whole fraction.

Discussion.

According to the above-cited authors, glycogen is supposed to be the source of lactic acid in sea-urchin eggs. The present results (Table I) are in agreement with this view, the decrease in glycogen content being larger than lactic acid production. The difference in lactic acid at the beginning and after 2 hrs. of development is 0.5 mg. (per 100 mg. total nitrogen). The lactic acid production during this time was undoubtedly higher; taking the low value for the formation of the first furrow as correct, the total production for 2 hrs. can be evaluated as $0.4 + 1.0 = 1.4$ mg. This value is far from surpassing the maximal possible quantity, i.e. 2.3 mg., which could be produced from glycogen, whilst there was no discernible change in the content of sugars.

Another question studied herein was the possible role of phosphorus in glycolysis in the fertilized sea-urchin egg. The phosphorus compounds concerned in the best-known cycle of muscle glycolysis pass, when analysed, into the acid-soluble fraction. The average amount of phosphorus in the eggs passing to the trichloroacetic acid extract can be evaluated as being 6.3 mg. per 100 mg. total nitrogen. While under normal development no changes could be detected in the phosphorus compounds of this fraction, the influence of monoiodoacetate on phosphorus distribution was noticeable.

If monoiodoacetate poisoning in sea-urchin eggs has the effect of accumulating phosphorylated intermediates of glycolysis, their possible maximal production can be easily calculated. The glycogen decrease in 2 hrs. being equivalent to 2.3 mg. glucose per 100 mg. of nitrogen, the production of the ester would be equivalent to 0.40 mg. P if each glucose molecule were combined with one molecule of phosphoric acid. If the hexosediphosphate or phosphorylated tri-carbon-compounds were accumulated, their maximal production would be 0.79 mg. P. These quantities, expressed as percentages of total acid-soluble phosphorus are 6.3% and 12.5% respectively.

The only change in phosphorus actually observed after the first two mitoses of the monoiodoacetate-poisoned eggs was the

decrease of $2.4 \pm 0.5\%$ inorganic phosphate (as percentages of the acid-soluble P) and the increase in the Ba-non-precipitable esters. No change, quantitative or qualitative, was found in the organic Ba-precipitable phosphorus. Two interpretations of these results are possible. The absolute content of the inorganic phosphate being constant, the total acid-soluble phosphorus might have been raised by some products of hydrolysis of the acid-insoluble compounds. But here the other alternative is accepted as more probable, viz., that the inorganic phosphate was bound into a Ba-non-precipitable ester.

It is of interest to compare the above results with the best-known process of muscle glycolysis. In the case of this glycolysis, the monoiodoacetate which inhibits the reactions of oxydo-reduction between the tri-carbon compounds, brings about the accumulation of hexosediphosphate and a decrease in phosphagen and pyrophosphate (Lundsgaard, '30b; Oster, '35). In sea-urchin eggs, if the hexosediphosphate is an intermediate product, inhibition by monoiodoacetate probably takes place at some earlier stage of glycolysis, since no change in hexosediphosphate or pyrophosphate was ascertained. The effect of monoiodoacetate was here noticeable in the formation of some non-precipitable ester. If this takes place at the expense of inorganic phosphate, it is probable that we have to do with the phosphorolysis of glycogen, this process being known in muscle glycolysis (Parnas and Baranowski, '35; Oster, Guthke and Terszakowicz, '36). In such case, hexosediphosphate formation during the first two mitoses would be equal to 2.4% of the total acid-soluble phosphorus, i.e. a little more than one-third of the calculated maximal value. Taking this into consideration, that the addition of hexosemonophosphate to the cytolysed sea-urchin eggs increases the production of some acid (Runnström, '33), the above-mentioned effect of monoiodoacetate seems to indicate that the normal course of the glycogen breakdown in the developing eggs is connected with phosphorylation and that the hexosemonophosphate is here an intermediate product.

Summing up, it may be concluded that the carbohydrate metabolism in developing sea-urchin eggs is quite different from

that of the avian embryo. First of all, glycogen (but not the sugars) is metabolized here, and secondly, although the glycogenolysis of sea-urchin eggs is not identical with that of the muscle tissue, there is a body of facts which indicates that phosphorus plays some part in that process.

Summary.

1°. During the first two cleavages of the *Paracentrotus lividus* Lm. eggs, the average decrease in glycogen content is 1.14 mg. (in terms of glucose) per hour per 100 mg. nitrogen, while no change in sugar content is detectable.

2°. The lactic acid production after fertilization is lower than the metabolized quantity of glycogen.

3°. The ratio of pyrophosphate to the total organic Ba-precipitable phosphorus indicates that in sea-urchin eggs the pyrophosphate is bound as adenosinetriphosphate.

4°. The content in the inorganic phosphate is constant throughout the first cleavages. The changes in pyrophosphate likewise do not surpass the limits of experimental error.

5°. In the developing monoiodoacetate-poisoned eggs, the formation of Ba-non-precipitable phosphorus esters was detectable. Two interpretations are proposed: the esters can be produced by the breakdown of the acid-insoluble compounds, or, what is more probable, inorganic phosphate is bound into hexosemonophosphate.

6°. No changes in pyrophosphate and hexosediphosphate were detectable in the monoiodoacetate-poisoned eggs.

References.

- Ashbel, R. (1929). Boll. Soc. Ital. di Biol. Sper. 4. — Eggleton, G. P. and Eggleton, P. (1929). J. Physiol. 68, 193. — Ephrussi, B. et Rapkine, L. (1928). Ann. Physiol. 4, 386. — Fujita, A. and Iwatake, D. (1931). Biochem. Z. 242, 43. — van Herk, A. W. H. (1933). Arch. Néerl. Physiol. 18, 578. — Kuttner, T. and Cohen, H. R. (1927). J. biol. Chem. 75, 517. — Lieb, H. und Zacherl, M. K. (1932). Hoppe-Seyl. Z. 211, 211. — Lindahl, P. E. (1936). Acta zool., Stockholm, 17, 179. — Lohmann, K. (1928). Biochem. Z. 202, 466. — Lundsgaard, E. (1930-a). Biochem. Z. 217, 162. — Lundsgaard,

E. (1930-b). *Biochem. Z.* 227, 51. — Needham, J. (1931). *Chemical Embryology*, Cambridge. — Needham, J. and Lehmann, H. (1937). *Biochem. J.* 31, 1210. — Needham, J. and Nowiński, W. W. (1937). *Biochem. J.* 31, 1165. — Niemierko, W. (1938). *Acta biol. exp.* 12, 178. — Ostern, P. (1935). *Biochem. Z.* 275, 87. — Ostern, P., Guthke, J. A. und Terszakowicz, J. (1936). *Hoppe-Seyl. Z.* 243, 9. — Parnas, J. K. et Baranowski, T. (1935). *C. R. Soc. Biol.* 120, 307. — Perlzweig, W. A. and Barron, E. S. G. (1928). *J. biol. Chem.* 79, 19. — Rapkine, L. (1931). *Ann. Physiol.* 7, 382. — Runnström, J. (1933). *Biochem. Z.* 258, 257. — Thörnblom, D. (1932). *Ark. för Zool.*, cited from Lindahl (1936).

[Institut für physiologische Chemie der Stefan Batory Universität in Wilno].

L. Wejtulewski.

Über den Einfluss der Benzoesäure auf die Harnsäureausscheidung beim Menschen.

Vorgelegt in der Sitzung der Abteilung Wilno der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 24.II.1938.

Lewis und Karr ('16) beobachteten, dass in den ersten vier Stunden nach Verabreichung von benzoesaurem Natrium eine Verminderung der Harnsäureausscheidung eintritt; nach diesem Zeitraum steigt die Harnsäureausscheidung wieder an und erreicht nach 24 Stunden dieselbe Intensität, wie vor der Einführung der Benzoesäure. Diese Ergebnisse wurden von Quick ('32, '34; daselbst ist auch die Literatur angegeben) bestätigt, der die Hypothese aufstellte, dass die Harnsäureausscheidung von der Bildung einer Verbindung der Harnsäure mit einem Kohlenhydratkörper abhängig sei; Substanzen, die aus dem Körper als Kohlenhydratverbindungen ausgeschieden werden, hemmen die Ausscheidung der Harnsäure. Eine derartige Verbindung ist auch die Benzoesäure, die aus dem Harn nicht nur in Form von Hippursäure, sondern auch als Benzoylglukuronsäure ausgeschieden wird. Die experimentelle Begründung dieser Hypothese wurde freilich nicht durchgeführt. Als erster Schritt zu einer solchen Begründung muss die Feststellung der quantitativen, gegenseitigen Abhängigkeit der Harnsäure- und Benzoesäureausscheidung betrachtet werden, was den Gegenstand der vorliegenden Arbeit bildet.

Die vorliegenden Beobachtungen wurden an Gesunden bzw. an Lungenabszess leidenden Spitalspatienten ausgeführt. Den Gesunden wurde die Benzoesäure in Form einer wässrigen Natriumbenzoatlösung per os verabreicht, worauf deren Harn, in bestimmten Zeitabständen, auf Harnsäure- und Glukuronsäure-

gehalt untersucht wurde. Den an Lungenabszess leidenden Kranken wurde das benzoesaure Natrium in einer 10% Wasserlösung intravenös eingeführt. Der Harn wurde in ein- bzw. zweistündigen Abständen gesammelt. Nach Enteiweissung des Harnes durch Kochen mit essigsauerm Puffer wurde die qualitative Reduktionsprobe nach Benedict und die Naphtoresorcinprobe nach Tollen s für Glukuronsäure durchgeführt. Die Glukuronsäureauscheidung wurde nach der Betrand'schen Methode bestimmt und in Milligrammen des Traubenzuckers ausgedrückt; die Harnsäure wurde nach der Hopkin s'schen Methode in Cole's ('33) Ausführung bestimmt. Die Gesamtmenge der Benzoessäure wurde nach der kolorimetrischen Methode von Waelsch und Klepetar ('35) bzw. nach der Titriermethode von Waelsch und Busztin ('37) bestimmt. Zur Hippursäurebestimmung wurde die Quick'sche ('26) Methode benützt. Die Durchführung der Beobachtungen über den Einfluss der Benzoessäure auf die Harnsäureausscheidung ermöglicht der Umstand, dass unter normalen Verhältnissen die Harnsäure gleichmässig ausgeschieden wird; die Harnsäuremenge, die vormittags (gerade in diesem Zeitraum führte ich die meisten Bestimmungen aus) im Laufe einer Stunde ausgeschieden wird, unterliegt nur unbedeutenden Schwankungen. Kontrolluntersuchungen an Tagen, an denen kein benzoesaures Natrium verabreicht wurde, bestätigten, dass in allen beobachteten Fällen der Verlauf der Harnsäureausscheidung gleichmässig war, bloss gegen 10 Uhr liess sich eine leichte Zunahme mit darauffolgendem Herabsinken bemerken. Der Verlauf der Harnsäureausscheidung ist individuell verschieden und ist keineswegs von der Diurese abhängig. Die ersten Beobachtungen sollten feststellen, ob die Benzoessäure die Harnsäureausscheidung hemmt und welche Mengen von Benzoessäure deutliche Veränderungen im Harnsäuregehalt des Harns hervorrufen.

Tabelle I veranschaulicht die Ergebnisse, die nach Verabreichung von 7 g benzoesauren Natriums per os bei einer gesunden, 27-jährigen Person von einem Gewicht von 62 kg erzielt worden sind. Verabreichung von 7 g Natriumbenzoat rief in diesem Falle eine Hemmung der Harnsäureausscheidung hervor, welche 4 Stunden andauerte und ihren Höhepunkt in

der dritten Stunde nach Verabreichung des benzoesauren Natriums erreichte; die Harnsäuremenge sank bis auf 4.5 mg/Stunde. Die Harnportionen, die in den ersten Stunden nach Verabreichung der Benzoesäure gesammelt wurden, reduzierten das Kupferreagens (Glukuronsäure). Am stärksten ist die Reduktion in der Periode der grössten Hemmung der Harnsäureausscheidung.

Tabelle I.

L. W. C^r 27 Jahre, Gewicht: 62 kg.

Datum	Stunde	Harnmenge in ml	Ur in mg	Reduktion in mg Traubenzucker	Ur mg% im Blute
29.IV.37.	8—9	28	22		
	9—10	189	29		
	10—11	171	29.5		3.69
	11—12	136	29		3.96
	12—13	60	24		4.07
30.IV. 900 Einnahme von 7 g Na- triumbenzoat	8—9	154	26.		
	9—10	134	11.9	71	4.45
	10—11	97	5.2	134.7	4.45
	11—12	102	4.5	122.5	4.62
	12—13	96	10.7	103	4.54
1.V.	8—9	44	26		
	9—10	230	29.6		4.22
	10—11	57	23.3		4.08
	11—12	39	26.6		3.98
	12—13	24,5	20		

In den weiteren Experimenten wurde die Benzoesäure intravenös eingeführt. Tab. II veranschaulicht die Ergebnisse der Harnanalyse bei einer 40-jährigen, 74 kg wiegenden Person, der einmal 3 g und am nächsten Tage je 6 g benzoësaures Natrium eingespritzt wurden. In den Tagen, in denen kein benzoësaures Natrium verabreicht wurde, wurden ebenfalls Analysen ausgeführt, um die Harnsäureausscheidung unter normalen Verhältnissen festzustellen.

Nach Einspritzung von 3 g benzoësauren Natriums liess sich kein deutliches Ergebnis wahrnehmen. Nach Erhöhung der Benzoesäuredosis bis zu 6 g wurde eine Abnahme der ausgeschiedenen Harnsäure beobachtet, die 2 bzw. 3 Stunden an-

dauerte; alle Harnproben, die eine Verminderung der Harnsäuremenge aufweisen, reduzierten das Kupferreagens.

Die Ergebnisse der Harnanalyse bei einem Menschen, der 6 g und 8 g benzoesauren Natriums eingespritzt erhielt, sind in Tab. III dargestellt. Auch in diesem Falle dauerte die Hemmung der Harnsäureausscheidung etwa drei Stunden an. Bei Abnahme des Harnsäuregehalts gewinnt der Harn reduzierende Eigenschaften, die im ersten Falle etwa 700 mg, im zweiten etwa 800 mg Glukose entsprechen. In diesem Versuche wurden auch

Tabelle II.

K. H. C^r 40 Jahre, Gewicht: 74 kg.

Datum	Stunde	Harnmenge in ml	U _r in mg	Datum	Stunde	Harnmenge in ml	U _r in mg
24.II.37.	9—10	33,5	22,5	28.II.	9—10	29	37
	10—11	47	28		10—11	34	40
	11—12	42	21		11—12	29	38
	12—13	18	19		12—13	41	40
25.II. 900 Einspritzung von 3 g Natriumbenzoat	8—9	100	23	1.III. 900 Einspritzung von 6 g Natriumbenzoat	8—9	27	32
	9—10	44,5	26		9—10	56	11
	10—11	65	21		10—11	92	6,8
	11—12	43	15		11—12	106	22
	12—13	28	20		12—13	30	21
26.II.	9—10	25,5	29	2.III.	9—10	30	33
	10—11	28	24		10—11	35	35
	11—12	26	33		11—12	29	31
	12—13	24,5	33		12—13	27	33
27.II. 1000 Einspritzung von 6 g Natriumbenzoat	9—10	51	34	3.III. 900 Einspritzung von 6 g Natriumbenzoat	8—9	40	34
	10—11	100	4,6		9—10	162	15
	11—12	95	9,8		10—11	108	6,8
	12—13	85	34		11—12	64	11,8
				12—13	54	38	

der Harnstoff, die Chloride und das Kreatinin bestimmt; in der Periode der gehemmten Harnsäureausscheidung ist die Harnstoff und Kreatininmenge etwas vermindert; die Chloride dagegen zeigen ausser einer Zunahme infolge der verstärkten Diurese keine charakteristischen Veränderungen.

In der Tab. IV sind die Ergebnisse angegeben, die nach Einspritzung von 9.5 g benzoesauren Natriums bei einem 42-jährigen, 74 kg wiegenden Manne erzielt wurden. In diesem Falle wurde eine vier Stunden lang andauernde Hemmung der Harnsäureausscheidung beobachtet. Ein Vergleich der Harnsäure- und Benzoessäureausscheidung ergibt, dass die Periode der stärksten Benzoessäureausscheidung mit der Periode der Herab-

Tabelle III.

K. J. ♂ 70 Jahre, Gewicht: 68 kg.

Datum	Stunde	Harnmenge in ml	Ur mg	Harnstoff in g	Cl mg	Reduktion in mg Traubenzucker	Kreatinin in mg
1.IX.37.	8.30—10	80	62	1.2	320	Qualitative Traubenzuckerreduktionsprobe negativ	80
	10—11.30	92	60	1.9	317		65
	11.30—13	72	69	0.97	248		72
	13—14.30	60	56	0.90	207		49
2.IX. 9.30 Einspritzung von 6 g Natriumbenzoat	8— 9.30	46	25	0.85	176		76
	9.30—11	226	9.2	0.77	463	180	41
	11—12.30	108	4	0.56	242	320	30
	12.30—14	62	21	0.45	200	200	48
3.IX.	8— 9.30	85	55	1.45	211	Qualitative Traubenzuckerreduktionsprobe negativ	78
	9.30—11	74	40	1.09	184		60
	11—12.30	142	50	1.64	352		74
	12.30—14	90	33	0.75	300		45
4.IX. 9.30 Einspritzung von 8 g Natriumbenzoat	8— 9.30	60	41	0.99	123	20	78
	9.30—11	158	2.3	0.88	229	204	40
	11—12.30	115	2.9	0.65	166	310	28
	12.30—14	114	39	0.78	154	280	43

setzung des Harnsäuregehaltes zusammenfällt. Sobald der Gehalt der ausgeschiedenen Harnsäure seinen Normalwert wieder erreicht, nimmt die Menge der Benzoessäure im Harn ab. Die Benzoessäure wurde im Harn hauptsächlich in Form von Hippursäure und etwa in 10% als Glukuronsäureverbindung ausgeschieden. Tab. V stellt die Ergebnisse dar, die nach intravenöser Einführung von 6.4 g Benzoessäure bei einer 26-jährigen Frau von einem Gewicht von 51 kg beobachtet wurden. In den ersten

50 Minuten wurden keine Abnahme der Harnsäureausscheidung beobachtet, in diesem Zeitraum wurden nur 33 mg Benzoesäure ausgeschieden. In der zweiten Periode, die bei dieser Person etwa 7 Stunden dauerte, tritt eine Hemmung der Harnsäureausscheidung ein. Während dieser Zeit scheidet die Niere eine bedeutende Menge Benzoesäure aus. Die Zunahme der Harnsäuremenge im Harn bis zum Normalwert fällt in den Zeitraum, in dem der grösste Teil der Benzoesäure bereits ausgeschieden worden ist; nach der im Harn auftretenden Reduktion ist anzunehmen, dass etwa 20% der Benzoesäure sich mit Glukuronsäure, der Rest mit Glykokoll, verbindet.

Tabelle IV.

K. H. C* 42 Jahre, Gewicht: 74 kg.

Datum	Stunde	Harnmenge in ml	\bar{U}_r in mg	\bar{U}_r mg/Stunde	Reduktion in mg Traubenzucker	Hippursäure		Benzoesäure	
						mg	mg/Stunde	mg	mg/Stunde
20.X.37.	9—11	56	63	31,5	20				
	11—13	101	59	29,5	63				
	13—18	150	110	22	47				
	18—6	370	235	19,5	65				
21.X. 11 ⁰⁰ Einspri- tzung von 9,5 g Natriumbenzoat.	9—11	160	60	30	18	27	13,5	20	10
	11—13.50	316	18,5	6,5	305	5753	2030	4076	1438
	13.50-14.50	50	10	10	310	1470	1470	1200	1200
	14.50-18.30	140	120	32,7	190	980	267	789	215
	18.30—7	295	270	21,6	95	1041	83	690	55,2
	7—9	28	54	27	10	76	38	51	25,5

Tab. VI stellt die Ergebnisse einer Harnanalyse bei einem 54-jährigen Manne von einem Gewicht von 76 kg vor. Wir konstatierten hier ebenfalls, dass im Zeitraum der grössten, vier Stunden andauernden Benzoesäureausscheidung die Menge der ausgeschiedenen Harnsäure deutlich sich verminderte. Aus der Reduktionsfähigkeit des Harns ist anzunehmen, dass etwa 10% der Benzoesäure als Glukuronsäureverbindung ausgeschieden wurde. Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen sind in Tab. VII dargestellt. Ihr Wert liegt von allem darin, dass sie sichtlich die Abhängigkeit der Harnsäureausscheidung von der

Tabelle V.

W. P. ♀ 26 Jahre, Gewicht: 52 kg.

Datum	Stunde	Harmenge in ml	Ur in		Reduktion in mg in mg Traubenzucker	Hippursäure		Benzoessäure	
			mg	mg/Stunde		mg	mg/Stunde	mg	mg/Stunde
3.X.37.	8—10	50	42	21	25				
	10—12	58	54	27	18				
	12—14	62	41	20.5	35				
	14—18	120	85	21.2	70				
	18— 6	320	235	19.5	105				
4.X. 10 ²⁵ Einspri- tzung von 6,4 g Benzoessäure	8.25—10.25	65	40	20	40				
	10.25—11.15	73	25	30	54	93	111	73	87
	15.15—13.30	180	9	4	400	2100	933	1728	769
	13.30—15.30	78	17.3	8.6	330	1980	990	1684	842
	15.30—18	82	28	11	310	2175	861	1710	684
	18— 6	135	270	22.5	227	340	28.3	232	19

Ausscheidung der Benzoessäure bestätigt. Trotz intravenöser Einführung von 6 g benzoesauren Natriums trat bei einer 52-jährigen, 58 kg wiegenden Person in den ersten 2 Stunden eine Abnahme der Harnsäureausscheidung, die in diesem Zeitraum meist sehr deutlich ist, nicht ein. Die Hemmung tritt erst in der dritten und vierten Stunde ein, nach Ablauf derer das Harn-

Tabelle VI.

S. T. ♂ 54 Jahre, Gewicht: 76 kg.

Datum	Stunde	Harnmenge in ml	Ur in		Reduktion in mg in mg Traubenzucker	Hippursäure		Benzoessäure	
			mg	mg/Stunde		mg	mg/Stunde	mg	mg/Stunde
24.I.	8—10	60	70	35	40				
	10—12	114	75	37.5	39				
	12—14	65	65	32.5	65				
25.I. 1000 Einspri- tzung von 10 g Natriumbenzoat	8—10	101	60	30	70				
	10—12	255	14	7	250	3600	1800	2544	1272
	12—14	150	24	12	420	5250	2625	3700	1850
	14—16	65	80	40	350	1330	665	1027	513.5
	16—20	125	120	60	210	765	191	670	167

säureniveau zu seiner Norm zurückkehrt. Die in Tab. VII angeführten Angaben beweisen, dass ein inniger Zusammenhang zwischen der Benzoesäure- und der Harnsäureausscheidung besteht. Die beobachtete Person schied 500—600 mg Benzoesäure während einer Stunde aus, ohne dass die Harnsäureausschei-

Tabelle VII.

P. B. C^r 52 Jahre, Gewicht: 58 kg.

Datum	Stunde	Harnmenge in ml	\bar{U}_r mg	\bar{U}_r mg% im Blut	Benzoesäure mg
7.IV.38. 900 Einspri- tzung von 6,9 g Natriumbenzoat	8—9	56	26	2.04	
	9—10	53	38	2.06	625
	10—11	62	23	2.28	855
	11—12	80	8.6	2.30	1568
	12—13	61	13	2.15	1482
	13—14	41	31.2		524

dung dadurch beeinflusst wird; eine Hemmung der Harnsäureausscheidung wurde erst dann beobachtet, als diese Quantität überschritten wurde.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die durch Benzoesäureeinführung hervorgerufene Hemmung der Harnsäureausscheidung von der Menge der ausgeschiedenen Benzoesäure abhängig ist.

Literatur.

Cole S. W. 1933. Practical physiological chemistry (348). Heffer. Cambridge. — Lewis H. B. a. Karr W. G. 1916. The excretion of uric acid in man after ingestion of sodium benzoate. J. biol. Chem. 13 (225). — Quick A. 1932. Factors influencing the excretion of uric acid. J. biol. Chem. 98 (157). — Quick A. 1934. The relationship of uric acid excretion to ketosis, lactic acid metabolism, and aromatic acids. J. biol. Chem. 105 (LXIX). — Quick A. 1926. The study of benzoic acid conjugation in the dog with a direct quantitative method for hippuric acid. J. biol. Chem. 67 (477). — Waelisch H. und Busztin A. 1937. Über die fermentative Bildung von Benzamid und Hippursäure. Ztschr. physiol. Chem. 246 (135). — Waelisch H. und Klepetar G. 1935. Über eine Methode zur Bestimmung der freien und gebundenen Benzoesäure im biologischen Material und über den enzymatischen Umbau der Benzoesäure in der Pferdeniere. Ztschr. physiol. Chem. 236 (92).

[Institut für Zoophysiologie der J. Piłsudski Universität, Warszawa].

K. Białaszewicz und J. Wajsberg.

Über die Resorption der Azofarbstoffe im Dünndarm.

Vorgestellt in der Sitzung der Abteilung Warszawa der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 9.III.1939.

Zweck der vorliegenden Untersuchungen war die Auffindung einer Farbstoffverbindung, die im Dünndarm keiner Resorption unterliegt und demzufolge gestatten würde, den Verlauf der Wasseraufnahme und der Resorption anderer mit der Farbstofflösung in den Darm eingeführten Verbindungen durch die Schleimhaut genau zu verfolgen.

Im Laufe unserer diesbezüglichen Versuche gelang es uns einige derartige Verbindungen unter den Azofarbstoffen aufzufinden. Analoge Versuche mit Farbstoffen von verwandter chemischen Struktur führten zur unzweifelhaften Feststellung, dass zwischen der Konstitution der Farbstoffe und ihrer Resorptionsfähigkeit ein inniger Zusammenhang besteht.

Methodisches.

Unsere Versuche gründen sich in Prinzip auf dem kolorimetrischen bzw. photometrischen Vergleich der Menge des im Darm nach der teilweisen Resorption des Wassers übriggebliebenen Farbstoffes mit der eingeführten Farbstoffmenge.

Alle Versuche wurden an Katzen, die durch 24—28 Stunden nüchtern gehalten wurden, in Dialnarkose ausgeführt. Nach Öffnung der Bauchhöhle und Herausnahme des Darmes wurden an demselben vermittels sechs Ligaturen drei Darmschlingen von je 30 cm. Länge abgesondert. Dann wurde der Darm in die Bauchhöhle zurückgelegt und in jede Darmschlinge mittels einer Spritze eine bestimmte Menge wässriger, bis 37—39° aufgewärmten Farbstofflösung eingeführt. Die dazu benutzte Spritze besass eine metallene, mit einem Dreiweghahn versehene Ansatzvorrichtung, die mittels eines dünnen, dickwändigen Gummirohres mit einer Nadel verbun-

den war. Eine gleiche Menge Farbstofflösung wurde für den kolorimetrischen Vergleich in einen Messkolben abgemessen.

Nach Schliessung der Bauchhöhle wurde das Tier in Ruhe gelassen und mittels eines elektrischen Kissens bis zur normalen Körpertemperatur erwärmt.

Sobald der grössere Teil des anfänglich eingeführten Wassers in den Darmschlingen resorbiert wurde, wurde der Versuch unterbrochen.

Der nicht resorbierte Farbstoff wurde aus dem Darm auf folgende Weise entfernt. Nach Herausnahme des Darmes und Durchschneidung des ganzen Mesenteriums, wurde der Darm mit dest. Wasser abgespült, worauf die durch die Ligaturen abgeschlossenen Darmschlingen herauspräpariert wurden. Die Schlingen wurden dann einzeln an einer Stelle geöffnet und der nicht resorbierte Inhalt ausgepresst, worauf dessen Volumen bestimmt wurde. Dann wurden die Schlingen längs geöffnet und die der Schleimhaut oft sehr innig anhaftenden Farbstoffüberreste mittels eines feinen Pinsels und eines Stromes dest. Wassers entfernt. Schliesslich wurde die nicht resorbierte, bereits früher abgemessene Lösung mitsamt den abgespülten Farbstoffüberresten in einen Messkolben überführt, dessen Volumen dem des Vergleichskolbens gleich war, worauf eine entsprechende Menge einer klärenden und enteiweissenden Flüssigkeit zugesetzt wurde.

Eine beträchtliche Schwierigkeit bot in den ersten Versuchen die Befreiung der nicht resorbierten Reste von der Trübung, die sich mechanisch nicht entfernen liess und die Farbstoffbestimmung auf optischem Wege stark störte. Nach längeren Bemühungen gelang es uns eine optisch vollkommen leere Flüssigkeit dadurch zu erlangen, dass wir zu der Flüssigkeit in beiden Messkolben *Ethylalkohol* oder *Aceton* bis zu $\frac{2}{3}$ des Volumens zusetzten und den Rest mit dest. Wasser ergänzten. Jedes der erwähnten Reagentien, in einer Konzentration benutzt, die eine vollkommene Auflösung des Farbstoffes ermöglicht, besitzt den Vorzug, dass es den Darmschleim entwässert und dadurch seine Aufnahmefähigkeit gegenüber Farbstoffen vermindert; ausserdem vermindern sie auch den Dissoziationsgrad der Salze und Farbstoffe und gleichen dadurch den Unterschied zwischen den Farbnuancen beider verglichenen Flüssigkeiten aus.

Nach Abzentrifugierung des Niederschlages wurden beide Flüssigkeiten im *Bürker'schen* Kolorimeter bzw. *Pulfrich'schen* Stufenphotometer verglichen.

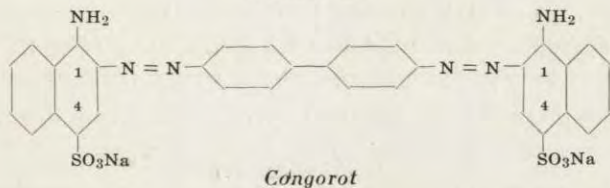
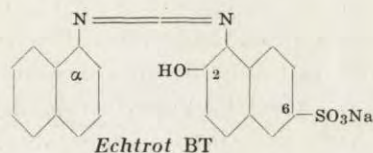
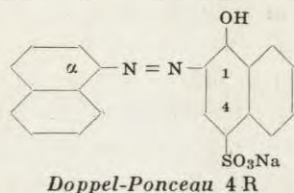
Experimenteller Teil.

1. Schwer resorbierbare Farbstoffe.

In einer Reihe von Voruntersuchungen über das Verhalten allerlei, zu verschiedenen Farbstoffklassen gehörenden Farbstoffe (*Stilben-*, *Azo*, *Carbonium-*, *Anthracenfarbstoffe*, *indigoide Verbindungen*) wurde festgestellt, dass am mindesten die

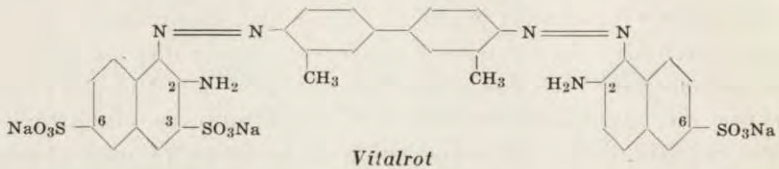
Azofarbstoffe resorbiert werden²⁾. Von den Azofarbstoffen erwiesen sich als sehr schwach resorbierbar vier saure Farbstoffe, von denen zwei (*Doppel-Ponceau 4 R* und *Echtrot BT*) die Gruppe der Monoazofarbstoffe der Naphthalin-azo-naphthalinreihe repräsentieren, während die zwei anderen (*Congorot* und *Vitalrot*) ein Produkt der Kupplung des tetraazotierten Benzidins bzw. o-Tolidins mit zwei entsprechend substituierten Naphthalinmolekülen sind.

Die chemischen Formeln dieser vier schwer resorbierbaren Farbstoffe stellen sich folgendermassen vor:



2) Unsere Versuche umfassten folgende Farbstoffe:

Stilbenfarbstoffe: Curcumin; **Benzol-azo-naphthalinreihe:** Ponceau PR, Brillantcrocein, Palatinscharlach; **Naphthalin-azo-naphthalinreihe:** Chromotrop 10 B, Azorbordeaux, Brillantbordeaux S, Kristallponceau 6 R, Doppel-Ponceau 4 R, Doppel-Ponceau 6 R, Bordeaux B, Echtrot BT, Palatinrot A, Lanacylblau; **Diazofarbstoffe der Benzidinreihe:** Vitalrot, Congorot, Benzopurpurin 4 B, Brillantcongloblau 2 R, Azoblau, Chicagoblau B, Chicagoblau 6 R, Diaminreinblau FF, Benzopurpurin 10 B, Diaminblau AZ, Trypanblau; **Carboniumfarbstoffe:** Fuchsin E, Malachitgrün Ia, Krystallviolett, Erioglaucin, Patentblau, Wasserblau, Phenolrot, Kresolrot, Eosin, Rhodamin B; **Anthracenfarbstoffe:** Antrachinonviolett, Aminoantrachinon, alizarinsulfosaures Natron.



Die erwähnten Farbstoffe kennzeichnen sich somit durch die Anwesenheit zweier Naphthalinkerne, die meistens eine verhältnissmässig kleine Anzahl eingeführter Auxochromgruppen enthalten.

Diese ersten Voruntersuchungen wurden weiter ausgebaut. Vor allem handelte es sich um die Erforschung des Einflusses gewisser, vom Gesichtspunkte der Versuchstechnik wichtigen Faktoren u. zw. um die Feststellung, inwieferne die Resorption der Farbstoffe von der Konzentration derselben und von dem Darmabschnitt, in dem die Resorption stattfindet, abhängig ist.

In der ersten Versuchsserie (Tab. I), die das Verhalten der einzelnen Darmabschnitte gegenüber den benutzten Farbstoffen aufklären sollte, wurden in die einzelnen, ca 30 cm langen Darmschlingen (I, II, III) Farbstofflösungen von identischer Konzentration (0.05 oder 0.1%) eingeführt. In der zweiten Serie dagegen (Tab. II) wurden in die drei Darmschlingen Farbstofflösungen von verschiedener Konzentration (0.025 — 0.1%, bzw. 0.05 — 0.2%) eingeführt. Diese Versuche sollten die Frage der Abhängigkeit der Farbstoffresorption von der Konzentration der Farbstofflösung aufhellen.

Die Versuche der ersten Serie, in denen — wie bereits früher erwähnt — als veränderliche Grösse die Entfernung des resorbierenden Abschnittes vom Duodenum auftritt, ergaben übereinstimmend, dass ein sichtbarer und unzweifelhafter Zusammenhang zwischen dem Ort der Resorption und der Menge des resorbierten Farbstoffes sich nicht feststellen lässt. Das Resorptionsepithel verhält sich gegenüber den aufgezählten, von uns als schwer resorbierbar befundenen Farbstoffen auf der ganzen Länge des Dünndarmes auf die gleiche Art und Weise.

Der Einfluss der Farbstoffkonzentration auf die Aufnahmefähigkeit bildete den Gegenstand der zweiten Versuchsserie, in welcher in die einzelnen gleich langen Darmschlingen Farb-

Tabelle I.

Resorption der Azofarbstoffe in den einzelnen Dünndarmabschnitten, Länge der Darmschlingen — ca 30 cm.

Farbstoff	Nr. des Versuches und Geschlecht des Tieres	Farbstoffkonzentration in der eingeführten Lösung %	Nr. der Darmschlingen	Dauer des Versuches St.	Volumen		Farbstoffmenge in der		Resorptionsgrad		
					der eingeführten Lösung ccm	der zurückgebliebenen Lösung ccm	eingeführten Lösung mg	zurückgebliebenen Lösung mg	des Wassers %	des Farbstoffes %	
<i>Doppel-Ponceau</i> 4R	40 (♀)	0.1	I	1.21	17.58	1.0	17.58	16.91	94	3.8	
		0.1	II	1.55	17.58	5.6	17.58	17.37	98	1.2	
		0.1	III	1.85	17.58	2.0	17.58	17.32	89	1.5	
	41 (♀)	0.1	I	1.25	11.72	3.0	11.72	11.15	74	4.9	
		0.1	II	1.60	11.72	1.0	11.72	11.29	91	3.7	
		0.1	III	1.80	11.72	1.0	11.72	11.26	91	3.9	
	<i>Echtrot</i> BT	53 (♀)	0.1	I	0.91	17.58	7.6	17.58	17.09	57	2.8
			0.1	II	0.98	17.58	2.0	17.58	16.95	89	3.6
			0.1	III	0.96	17.58	3.0	17.58	17.32	84	1.5
54 (♂)		0.1	I	0.96	11.72	5.2	11.72	11.35	56	3.2	
		0.1	II	0.93	11.72	2.0	11.72	11.38	83	2.9	
		0.1	III	0.91	11.72	5.8	11.72	11.39	50	2.8	
<i>Congorot</i>	50 (♂)	0.1	I	1.00	17.58	9.2	17.58	17.49	48	0.5	
		0.1	II	1.23	17.58	11.0	17.58	16.38	38	6.8	
		0.1	III	1.38	17.58	11.0	17.58	16.63	38	5.4	
	27 (♂)	0.05	I	1.25	13.12	(1.0)*	6.56	5.83	92	(11.1)*	
		0.05	II	1.55	13.12	2.5	6.56	6.40	81	2.4	
		0.05	III	1.83	13.12	4.5	6.56	6.49	66	1.0	
<i>Vitalrot</i>	12 (♂)	0.1	I	1.16	13.12	6.7	13.12	13.18	49	-0.5	
		0.1	II	1.25	13.12	3.1	13.12	13.05	77	0.5	
		0.1	III	1.50	13.12	ca 1.0	13.12	12.28	92	6.4	
	30 (♂)	0.1	I	1.16	13.12	8.4	13.12	13.05	36	0.5	
		0.1	II	1.50	13.12	5.6	13.12	12.79	57	2.5	
		0.1	III	1.83	13.12	4.8	13.12	12.77	63	2.7	

*) Infolge der stärkeren Wasseraufnahme bot die Beseitigung des der Schleimhaut anhaftenden Farbstoffes gewisse Schwierigkeiten.

stoffe von wachsender Konzentration der Reihe nach eingeführt wurden. Diese Versuche (Tab. II) ergaben, dass die Permeabilität des Dünndarmepithels gegenüber Farbstoffen, deren Resorptionsgrad nicht einmal 2% der eingeführten Menge beträgt, im grossen und ganzen von der Konzentration der eingeführten Lösung vollständig unabhängig ist. Die Übereinstimmung der in Tab. II angeführten Resultate ist überdies ein Beweis der Genauigkeit der angewendeten Versuchstechnik und der Methoden der optischen Farbstoffbestimmung und dürfte zu weiteren Versuchen in der Richtung der Herabsetzung der unteren Konzentrationsgrenze der zu Resorptionsversuchen benutzten Farbstoffe anspornen.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass das Dünndarmepithel gegenüber den erwähnten Azofarbstoffen der Naphthalinreihe (*Doppel-Ponceau 4 R*, *Echtröt BT*, *Congorot* und *Vitalrot*), unabhängig von ihrer Konzentration, sich auf seiner ganzen Fläche als fast ganz undurchlässig erwies.

2. Die Farbstoffresorption und die chemische Konstitution der Farbstoffe.

Nach Feststellung der Tatsache, dass manche Farbstoffe praktisch genommen überhaupt nicht resorbiert werden, schien es uns interessant zu untersuchen, wie sich diesbezüglich andere, zu denselben chemischen Klassen hingehörende Farbstoffe verhalten. Auf diesem Wege könnte möglicherweise ein Licht auf die Frage geworfen werden, ob zwischen der chemischen Konstitution der Farbstoffe und ihrer Aufnahmefähigkeit durch die Darmschleimhaut irgendein Zusammenhang besteht.

Unsere diesbezüglichen Untersuchungen schreiten einstweilen über den Rahmen allgemeiner Orientierungsversuche nicht hinaus. Wir beschränkten uns nur auf eine Farbstoffgruppe u. zw. auf die Naphthalin-azo-naphthalinreihe, zu der auch *Doppel-Ponceau 4 R* und *Echtröt BT* gehören. Alle zu dieser Gruppe gehörenden Farbstoffe sind ein Kupplungsprodukt einer und derselben Base u. zw. α -Naphthylamins mit den Derivaten von α -u. β -Naphthol, die an verschiedenen Stellen des Ringes Hydroxyl- und Sulfogruppen besitzen. Ausser den bereits früher erwähnten nicht resorbierbaren zwei Farbstoffen benutzten wir

Tabelle II.

Resorption der Farbstoffe bei variierender Konzentration. Länge der Darmschlingen — ca 30 cm.

Farbstoff	Nr. der Versuchs- und Geschlecht des Tieres	Farbstoffkonzentration in der eingeführten Lösung %	Nr. der Darmschlinge	Dauer des Versuches St.	Volumen		Farbstoffmenge in der		Resorptionsgrad		
					der eingeführten Lösung ccm	der zurückgebliebenen Lösung ccm	eingeführten Lösung mg	zurückgebliebenen Lösung mg	des Wässers %	des Farbstoffes in den einzelnen Versuchen %	im Mittel %
<i>Doppel-Ponceau</i> 4R	42 (♂)	0.05	III	1.33	17.58	7.0	8.79	8.72	60	0.8	-0.1
		0.1	II	1.25	17.58	9.8	17.58	17.77	44	-1.1	
		0.2	I	1.25	17.58	8.4	35.16	35.16	53	0	
	43 (♂)	0.05	III	1.30	17.58	2.0	8.79	8.70	89	1.0	1.3
		0.1	II	1.21	17.58	7.4	17.58	17.84	58	-1.5	
		0.2	I	1.00	17.58	5.2	35.16	33.58	70	4.5	
<i>Echtrot</i> BT	46 (♀)	0.025	III	1.16	11.72	5.2	2.93	2.90	56	1.0	1.5
		0.05	II	1.16	11.72	6.4	5.86	5.81	45	1.0	
		0.1	I	1.03	11.72	3.2	11.72	11.44	73	2.4	
	57 (♂)	0.025	III	1.16	11.72	5.2	2.93	2.87	56	2.2	1.7
		0.05	II	1.09	11.72	5.6	5.86	5.80	52	1.0	
		0.1	I	1.00	11.72	7.8	17.58	17.26	56	1.8	
<i>Congorot</i>	28 (♂)	0.025	III	1.85	13.12	6.6	3.28	3.33	50	1.5	0.7
		0.05	II	1.76	13.12	4.2	6.56	6.43	68	2.0	
		0.1	I	1.43	13.12	4.8	13.12	12.92	63	1.5	
	29 (♂)	0.025	III	1.33	19.68	13.0	4.92	4.89	34	0.7	0.6
		0.05	II	1.13	19.68	6.8	9.84	9.69	66	1.5	
		0.1	I	1.00	19.68	4.4	19.68	19.78	78	-0.5	
<i>Vitalrot</i>	14 (♂)	0.025	III	1.83	19.68	4.6	4.92	4.92	77	0	-3.3
		0.05	II	1.58	19.68	13.0	9.84	10.33	34	-5.0	
		0.1	I	1.28	19.68	4.6	19.68	20.66	77	-5.0	
	31 (♂)	0.025	III	1.30	19.68	4.0	4.92	4.90	80	0.5	1.2
		0.05	II	1.16	19.68	5.0	9.84	9.94	75	2.0	
		0.1	I	0.80	19.68	5.6	19.68	14.96	72	(24.0)	

zu diesen Untersuchungen die folgenden Farbstoffe: *Doppel-Ponceau 6R*, *Palatinrot A*, *Brillantbordeaux S*, *Azobordeaux* und *Chromotrop 10B* (α -Naphtholderivate) sowie *Bordeaux B* und *Kristallponceau 6 R*, die eine Hydroxylgruppe in der Stellung β enthalten. Alle erwähnten Farbstoffe wurden in der gleichen Konzentration (0.1%) in die 30 cm langen Darmschlingen eingeführt. Sobald mehr als die Hälfte des anfangs eingeführten Wassers resorbiert wurde, wurden die Versuche unterbrochen. Die Untersuchungen ergaben, dass — wie aus Tab. III ersichtlich — zwischen der chemischen Konstitution der Monoazofarbstoffe und ihrer Durchdringungsfähigkeit durch das Darmepithel ein ganz deutlicher Zusammenhang besteht. Verbindungen die sich nur durch eine andere gegenseitige Stellung zweier Substituenten im Naphthalinkerne unterscheiden, können sich gegenüber der Adsorptionsfläche ganz abweichend verhalten.

Wie aus unseren Versuchen zu entnehmen, hängt die Resorptionsintensität der untersuchten Monoazofarbstoffe mindestens von drei Faktoren ab: 1° — von der allgemeinen Zahl der in die Kupplungskomponente eingeführten Gruppen: 2° — von der gegenseitigen Stellung dieser Gruppen im Molekül und 3° — von der Anzahl der eingeführten Sulfogruppen.

Vergleicht man die einen α -Naphtholkern enthaltenden Farbstoffe, so kann man vor allem feststellen, dass sie desto leichter durch die Darmwand durchdringen, je mehr Hydroxyl- und Sulfogruppen sie enthalten. Umgekehrt — alle schwer resorbierbaren Farbstoffe kennzeichnen sich durch eine geringe Anzahl der in die Kupplungskomponenten eingeführten Atomgruppen. Diese Verhältnisse illustriert einerseits das schwer resorbierbare *Doppel-Ponceau 4 R*, dessen Molekül 1-Naphthol-4-sulfosäure enthält und andererseits das intensiv resorbierbare *Chromotrop 10 B*, das als Kupplungskomponent 1.8-Dioxy-naphthalin-3.6-disulfosäure enthält.

Der Einfluss der Stellung der Substituenten im Naphthalinkerne auf die Resorptionsintensität drückt sich darin aus, dass bei sonst identischen Konstitutionseigenschaften diejenigen Farbstoffe rascher aus dem Darmlumen verschwinden, in denen die Sulfogruppe in grösserer Entfernung von der Hydroxyl-

gruppe liegt. Von den disulfonierten α - u. β -Naphtholderivaten kann man einerseits auf *Palatinrot A*, das zu 39% resorbiert wird und im Molekül 1-Naphthol-3.6-disulfosäure enthält, sowie auf *Azobordeaux*, das zu 52% resorbiert wird und 1-Naphthol-4.8-disulfosäure enthält und andererseits auf *Bordeaux B* bzw. *Kristallponceau 6 R* hinweisen, die 2-Naphthol-3.6-disulfosäure bzw. 2-Naphthol-6.8-disulfosäure enthalten und dementsprechend zu 22% bzw. 32% resorbiert werden. Besonders bemerkenswert in dieser Hinsicht ist das Verhalten zweier isomeren Farbstoffe wie *Doppel-Ponceau 4 R* und *Doppel-Ponceau 6 R*, von denen der erste zu 3%, der zweite zu 27% resorbiert werden und die sich voneinander bloss durch die Lage der Sulfogruppe im Naphthalinring (Verschiebung um eine Stelle) unterscheiden.

Nicht minder deutlich ist der Zusammenhang zwischen der Durchlässigkeit der Darmschleimhaut gegenüber Farbstoffen und der Anzahl der Sulfogruppen im Molekül. Je mehr Sulfogruppen der Farbstoff enthält, desto rascher dringt er durch die Darmwand durch. Den Einfluss der Sulfogruppenzahl auf die Aufnahme der untersuchten Farbstoffe illustriert am besten ein Vergleich der Resorbierungsintensität derjenigen Farbstoffe, die 1-Naphthol-4-sulfosäure (*Doppel-Ponceau 4 R*) bzw. 1-Naphthol-4.8-disulfosäure (*Azobordeaux*) oder 2-Naphthol-6-sulfosäure (*Echtrot BT*) oder schliesslich 2-Naphthol-3.6-disulfosäure (*Bordeaux B*) als Kupplungskomponenten enthalten. Aus dem zitierten Beispiel sieht man, wie stark die Ersetzung der Naphthalinkerne durch Sulforadikale auf die Diffundierbarkeit der Farbstoffe durch das Darmepithel einzuwirken vermag.

Im Zusammenhang damit wäre es vielleicht angezeigt, hier einige Angaben über den Einfluss des Sulfonierungsprozesses auf manche physikalisch-chemische Eigenschaften der Farbstoffe anzuführen. Vor allem seien hier die Untersuchungen über die Diffundierungsfähigkeit der Farbstoffe durch Kollodiummembranen, insbesondere die Arbeiten von *Biltz u. Pfennig*¹⁾ sowie *Zsigmondy*²⁾ erwähnt. Die zitierten Auto-


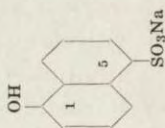
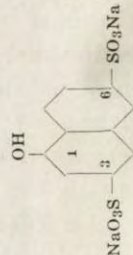
1) *Biltz W.* und *F. Pfennig*. 1911, Zeitschr. f. physik. Chem. A. 77 (91).

2) *Zsigmondy R.* 1924, Zeitschr. f. physik. Chem. A. 111 (211).

Tabelle III.

Resorption der Naphthalin-azo-naphthalinfarbstoffe.

In allen Farbstoffen α -Naphthylamin als Diazotierungskomponente. — Farbstoffkonzentration — 0.1%. Länge der Darmschlingen — ca 30 cm.

Farbstoff	Kupplungskomponente	Versuchsnummer	Darmschlinge	Volumen der eingeführten Farbstofflösung ccm	Resorptionsgrad										
					des Wassers %	in den einzelnen Versuchen %	des Farbstoffes im Mittel %								
<i>Doppel-Ponceau 4R</i>		40, 41	I II III	17.58	85	—	3.1								
								56	I II III	17.58 17.58 17.58	66 71 78	24.3 28.6 29.7	27.5		
														44, 45	II III
<i>Doppel-Ponceau 6R</i>		44, 45	II III	11.72 11.72	88 92	33.1 45.9	39.5								
								<i>Palatinrot A</i>		44, 45	II III	11.72 11.72	88 92		

<i>Brillantbordeaux S</i>		47	III	17.58	89	42.2	42.2
		47	II	17.58	86	52.5	52.5
		38 39	II III	11.72 11.72	92 71	54.0 50.3	52.1
<i>Azobordeaux</i>		53, 54	I II III	17.58	70	—	2.6
		47	I	17.58	88	22.2	22.2
		38, 39	I II	11.72 11.72	83 86	37.1 27.5	32.3
β - Naphtholderivate als Kupplungskomponente							
<i>Echtrot BT</i>		53, 54	I II III	17.58	70	—	2.6
		47	I	17.58	88	22.2	22.2
		38, 39	I II	11.72 11.72	83 86	37.1 27.5	32.3
<i>Bordeaux B</i>		53, 54	I II III	17.58	70	—	2.6
		47	I	17.58	88	22.2	22.2
		38, 39	I II	11.72 11.72	83 86	37.1 27.5	32.3
<i>Kristallponceau 6R</i>		53, 54	I II III	17.58	70	—	2.6
		47	I	17.58	88	22.2	22.2
		38, 39	I II	11.72 11.72	83 86	37.1 27.5	32.3

ren stellten auf Grund zahlreicher Untersuchungen fest, dass die Einführung neuer Sulfogruppen auf die Dialyse beschleunigend wirkt. Nicht minder bemerkenswert sind andererseits die Ergebnisse der Untersuchungen über den Mechanismus der Substantivitätsfärbung der Textilfasern im Zusammenhang mit der räumlichen Konfiguration der in den Farbstoff eingeführten Sulfogruppen; aus der Arbeit von Griffiths und Neale³⁾ über die Aufnahme gewisser Derivate o-Dionisins, das mit verschiedenartig substituierten Naphthalinkernen gekuppelt ist, durch Baumwolle und Celophan scheint unzweifelhaft hervorzugehen, dass parallel zur Vermehrung der Sulfogruppen die Substantivität der Farbstoffe sich verringert und dass dieselbe in starkem Grade von der Stellung der Sulfogruppen im Naphthalinring abhängt.

Diese bemerkenswerte Analogie könnte ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen über den Diffusionsmechanismus der Farbstoffe durch lebende Tiermembranen sein.

Zusammenfassung.

1°. Von der ziemlich grossen Anzahl der von uns untersuchten Farbstoffe erwiesen sich als ganz unresorbierbar vom Dünndarm der Katze die folgenden Verbindungen der Naphthalin-azo-naphthalinreihe und der Benzidinreihe: *Doppel-Ponceau* 4R, *Echtrot* BT, *Congorot* und *Vitalrot*. Von der Gesamtmenge der in verschiedene Darmabschnitte eingeführten wässrigen, 0.025—0.2% konz. Farbstofflösung bleiben am Ende des Versuches ca 98% noch im Darmlumen zurück.

2°. Die Resorptionsfähigkeit der Farbstoffe der Naphthalin-azo-naphthalinreihe, die ein Kupplungsprodukt α -Naphthylamins mit verschiedenen Sulfosäuren α - und β -Naphthols repräsentieren, erwies sich von der Molekülkonstitution abhängig und zwar steigt dieselbe parallel zu der Anzahl der Substituenten, insbesondere der Sulfogruppen und ist ferner von ihrer Stellung im Naphthalinringe abhängig.

³⁾ Griffiths L. H. and S. M. Neale. Trans. Faraday Soc. 1934. 30 (395). Zitiert nach Valkó: Kolloidchemische Grundlagen der Textilveredlung. Berlin 1937.

[Institut de Pathologie Générale et Expérimentale de l'Université
des Jagellons à Cracovie].

J. Fegler et Z. Lelusz-Lachowicz.

Nouvelles recherches sur les variations de la teneur en acétylcholine du système nerveux central des lapins dans les états de forte excitation, provoqués par la strychnine et la toxine tétanique ¹⁾.

Fegler, Kowarzyk et Lelusz - Lachowicz ('38) ont montré que, administrée à doses qui déclenchent de violentes contractions tétaniques, la strychnine fait diminuer chez les lapins la teneur du système nerveux central en acétylcholine (tronc cérébral et moelle épinière).

Au cours de leurs expériences sur l'action exercée par la toxine tétanique sur la teneur du système nerveux central des lapins en acétylcholine, Fegler et ses collaborateurs ont établi que, à l'inverse de la strychnine, cette toxine y fait augmenter la quantité d'acétylcholine. Bien que les effets pharmacodynamiques de la strychnine et de la toxine tétanique offrent beaucoup d'analogie, ce phénomène, suggère l'idée que les variations de la quantité d'acétylcholine dépendent du degré d'augmentation de l'excitabilité et de la vitesse, avec laquelle ce phénomène se produit. Nous savons que l'accroissement de l'excitabilité augmente plutôt graduellement sous l'action de la toxine tétanique, tandis qu'après l'injection intraveineuse d'une dose appropriée de strychnine, les crampes témoignant d'une généralisation de l'excitation réflexe apparaissent en très peu de temps.

Les recherches de Gautrel et ses collaborateurs ('36—'37), de Loewi ('37), de Mann, Tennenbaum

¹⁾ Travail présenté à l'Académie Polon. d. Sc. et d. Lett., Cl. d. Méd. dans la séance du 18.XI.1938.

et Quastel ('38), puis les investigations de Fegler, Kowarzyk et Rymar ('38a) ont fourni la preuve que le système nerveux central renferme de l'acétylcholine sous deux formes différentes, une libre, l'autre liée („complexe” ou „precursur” de Quastel). L'acétylcholine est libérée de ce „complexe” sous l'influence de divers agents, tels que le chauffage, les acides et le chloroforme. La cholinestérase ne décomposerait pas l'acétylcholine liée (O. Loewi).

Ce complexe est évidemment d'une grande importance, surtout si l'on admet avec Quastel et ses collaborateurs que c'est par son intermédiaire que s'opère la synthèse de l'acétylcholine dans le système nerveux central. S'il en est réellement ainsi, la diminution de la quantité totale d'acétylcholine dans ce système pendant l'excitation aiguë, provoquée par la strychnine et, inversement l'augmentation de la quantité d'acétylcholine sous l'influence de la toxine tétanique pourraient s'expliquer par les variations que subissent l'utilisation et la synthèse du „complexe” acétylcholinique.

Dans les recherches dont nous donnons la description ci-dessous, on se propose de trouver des données expérimentales susceptibles d'étayer l'hypothèse suivante: les variations de la teneur du système nerveux central en acétylcholine dépendent de facteurs agissant sur la décomposition et la reconstitution du complexe, auquel état l'acétylcholine est emmagasinée dans ce système. Considérés de ce point de vue, les troubles de l'équilibre entre la décomposition et la reconstitution de ce complexe, peuvent entraîner soit une diminution, soit une augmentation de la quantité totale d'acétylcholine qu'il est possible d'extraire du système nerveux central. La diminution de cette quantité provoquée par la strychnine, témoigne, à notre avis, des conditions qui se produisent dans cet empoisonnement, par suite desquelles la décomposition l'emporte sur la reconstitution; par contre, la reconstitution est plus forte dans l'empoisonnement par la toxine tétanique, de sorte que la teneur du système nerveux central en acétylcholine accuse une augmentation.

La technique des expériences.

Nous avons fait nos expériences sur les lapins de 2 à 2.5 kg. La strychnine était injectée dans une des veines auriculaires à doses de 0.1 à 0.2 mg/kg, tandis que s'il s'agissait de la toxine tétanique, on en introduisait dans la veine 1 cm³/kg, soit une quantité équivalant à 20.000 doses mortelles pour souris. Les lapins, empoisonnés par la strychnine, étaient décapités, ou bien on leur ouvrait l'aorte avec un scalpel, planté dans le 2-e espace intercostal gauche. Les animaux étaient tués après de contractions tétaniques ou après quelques attaques suivantes, pendant le court intervalle entre les convulsions. Après avoir administré les doses mentionnées, la première attaque de contractions apparaissait dans l'espace de 30" à 1'30" après l'injection de strychnine. Les convulsions ne se produisaient que 48 à 56 heures après l'introduction de la toxine tétanique.

L'animal ayant été tué, nous enlevions immédiatement la moelle épinière, le bulbe et le tronc du cerveau, en laissant de côté les hémisphères.

Nous appliquons la méthode des *Stedman* ('37) ou celle de *O. Loewi* et ses collaborateurs (alcool acidifié) pour préparer les extraits. Pour doser l'acétylcholine dans les extraits, nous nous servions du muscle dorsal de la sangsue, sensibilisé par l'ésérine.

En hydrolysant les extraits à chaud avec de la soude caustique, nous avons constaté dans une série de dosages, qu'ils perdaient leurs propriétés actives. Lorsqu'on prépare l'extrait d'après la méthode de *Stedman*, sans toutefois ajouter de l'ésérine, on s'aperçoit qu'il perd également ces propriétés. Ces épreuves indiquent par conséquent que les extraits contenaient réellement de l'acétylcholine.

Aussi bien dans les expériences dont nous avons précédemment publié les résultats, que dans celles dont nous nous entretenons à présent, la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central des lapins accusait d'assez fortes fluctuations. La teneur en acétylcholine des extraits, préparés d'après *Stedman*, varie de 4 γ /g à 8 γ /g (21 expériences), tandis que dans les extraits de tissu nerveux, traité par de l'alcool acidifié, elle entre 2.5 γ /g et 5 γ /g (26 épreuves).

Tableau I.

L'acétylcholine en γ /g dans les extraits du système nerveux central (s. n. c.) de 4 lots de lapins. Dans chaque lot l'acétylcholine était dosée sur le même muscle dorsal de la sangsue.

No. du lot	No. du lapin dans chaque lot				Méthode d'extraction
	1.	2.	3.	4.	
I	4.0	4.3	4.0	4.3	Alcool acidifié <i>Stedman</i>
II	5.75	5.7	—	—	
III	5.3	5.5	5.3	—	" "
IV	7.3	7.5	—	—	
V	5.2	5.2	—	—	

Ainsi que l'indique le tableau I, les extraits, préparés avec du tissu nerveux des lapins, et dont la quantité d'acétylcholine était déterminée à l'aide de la même préparation de sangsue, donnent des résultats concordants.

Nous appuyant sur ces données, nous sommes en droit de supposer que les fluctuations de la quantité d'acétylcholine, déterminée à l'aide de différentes préparations de sangsue, dépendent surtout des différences que présentent ces préparations, et que ces fluctuations ne reflètent pas les différences réelles de la concentration de l'acétylcholine dans le système nerveux central des lapins. Cette constatation nous permet d'évaluer d'autre part les variations de la teneur en acétylcholine dans les états de forte excitation centrale, à condition de disposer en même temps d'un moyen de contrôle, constitué par un extrait du système nerveux central, provenant d'un lapin normal, cet extrait ayant été contrôlé sur le même muscle dorsal de la sangsue. Il nous faut donc insister sur la circonstance que nos données se prêtent surtout à une comparaison, sans donner la possibilité d'établir la quantité absolue d'acétylcholine dans le système nerveux central des lapins.

Partie expérimentale.

1. La quantité d'acétylcholine libre et d'acétylcholine totale dans le système nerveux central des lapins empoisonnés par la strychnine.

Le grand nombre d'expériences, effectuées jusqu'à présent, nous apprend que, malgré la diminution de la teneur en acétylcholine du système nerveux central, observée chez la plupart des lapins, le degré de cette diminution oscille notablement dans différentes expériences, il varie de 20 à 60%. Différents facteurs influencent donc probablement le phénomène que nous avons établi, qui est peut être l'expression d'une mobilisation de l'acétylcholine dans le système nerveux central, dans les états d'excitation suraiguë, qui apparaissent au cours de l'empoisonnement par la strychnine. Si nous considérons comme très probable l'existence du „complexe-precursor" d'acétylcholine dont nous avons parlé ci-dessus, nous pouvons supposer que le degré des variations que présente la concentration de l'acétylcholine à la suite d'une excitation aiguë, dépend de différents facteurs qui décident du degré d'utilisation de ce complexe et déclenchent des troubles de l'équilibre entre l'utilisation et la reconstitution.

Les expériences de B r o w n et de F e l d b e r g ('37), nous permettent de supposer que cet équilibre entre ici réellement en jeu; en effet, ces auteurs qui irritaient pendant un espace de temps assez prolongé le ganglion cervical supérieur, purent établir qu'il libère de l'acétylcholine, qui passe dans le liquide de perfusion. Ils établirent en outre que la quantité totale d'acétylcholine qu'il est possible d'extraire de ce ganglion après la période d'excitation, correspondait à la quantité de cette substance qu'on pouvait obtenir d'un ganglion témoin qui n'avait pas été irrité.

Les expériences si intéressantes que Q u a s t e l et ses collaborateurs ('36) ont été effectuées pour se rendre compte de la quantité d'acétylcholine produite *in vitro* par le tissu nerveux vivant; elles permettent de supposer que la synthèse de cette substance dans le système nerveux central, a lieu par l'intermédiaire de la production du „complexe-precursor" dont la décomposition donne naissance à de l'acétylcholine libre. D'après les expériences de Q u a s t e l et ses collaborateurs, les résultats des expériences de B r o w n et F e l d b e r g pourraient s'expliquer peut être par des conditions optimales dans le ganglion cervical supérieur, à la suite desquelles la décomposition du „precursor", était en équilibre avec sa reconstitution.

Dans une série d'expériences, nous avons irrité électriquement les nerfs sciatiques des lapins, pour doser ensuite l'acétylcholine de la moelle épinière. Même après une forte excitation qui durait jusqu'à 1-heure, interrompue par de courts intervalles, excitation qui produisait des contractions réflexes dans les extrémités postérieures et antérieures, nous n'avons observé aucune différence dans la quantité d'acétylcholine, comparé avec la quantité de ce corps chez un lapin témoin. Il nous faut donc admettre que l'empoisonnement par la strychnine crée des conditions particulières, dans lesquelles une excitation, peut-être même forte, s'accompagne d'une diminution manifeste de la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central.

Nous avons observé jusqu'alors une diminution de la quantité d'acétylcholine après l'administration de strychnine chez les lapins, tués immédiatement après une ou plusieurs attaques de convulsions. Il était donc intéressant de savoir combien de

temps après l'accès cette diminution se maintient. Nous avons dû surmonter de nombreuses difficultés en abordant cette série d'expériences surtout parce qu'il fallait administrer une dose de strychnine qui déclenchait une attaque typique de convulsions, sans cependant tuer l'animal. Nous réussîmes toutefois à trouver la dose appropriée (0.1 mg/kg.) après avoir fait une série d'épreuves. Les lapins étaient tués à différents intervalles après des accès de convulsions, puis nous préparions des extraits du tronc cérébral et de la moelle épinière, après quoi nous comparions leur teneur en acétylcholine avec celle que nous avions trouvée dans le système nerveux d'un lapin témoin.

Tableau II.

L'acétylcholine en γ/g du s. n. c. des lapins tués à différents intervalles après les convulsions provoquées par la strychnine.

Lapins témoins	Lapins tués immédiatement après les convulsions	Lapins tués 20—30' après les convulsions	Lapins tués 1—2 h. après les convulsions
4,5	3,0 ; 1,8 ¹⁾	3,7	3,7
3,4	1,3	2,8	—
4,1	2,6	—	4,0
4,8	3,3	3,8	4,8

1) Lapin mort après la première attaque de contraction.

Il résulte des données du tableau II que la diminution de la teneur en acétylcholine, conséquence de l'influence de la strychnine, disparaît relativement vite, dès que cessent les symptômes aigus de l'empoisonnement, ou du moins qu'elle tend à disparaître. Les données obtenues dans cette série d'expériences parlent donc en faveur de la supposition que ce n'est que dans la phase des convulsions et peu de temps après, qu'il existe des conditions où la compensation de l'utilisation de l'acétylcholine est troublée. Lorsque ces phénomènes sont liés à la décomposition et à la reconstitution du complexe dont se dégage l'acétylcholine libre, le premier processus l'emporte de beaucoup sur le second dans cette phase.

Désirant appuyer cette hypothèse sur d'autres bases encore, nous avons fait des expériences en vue d'élucider la question, si les variations de la quantité totale d'acétylcholine que pro-

duit la strychnine, s'étendent également à l'acétylcholine libre. Cette supposition serait fondée, s'il était possible d'établir que la quantité d'acétylcholine libre augmente parallèlement à la diminution de la quantité totale de cette substance. Il ne faut cependant pas perdre de vue l'activité de la cholinestérase dont l'influence pourrait se traduire par un accroissement relativement peu sensible de la quantité d'acétylcholine libre.

Les expériences en question étaient précédées d'une série d'autres épreuves qui devaient nous renseigner sur les conditions indispensables pour pouvoir doser l'acétylcholine libre, et l'acétylcholine liée.

D'accord avec O. L o e w i, F e g l e r et ses collaborateurs ('38a) ont montré qu'après avoir agité quelque temps une suspension de tissu nerveux avec de l'eau ou avec une solution saline, il se dépose dans le sédiment une certaine quantité d'acétylcholine qu'il est possible d'en extraire avec de l'alcool acidifié. Cette quantité correspond suivant O. L o e w i et G a u t r e l e t à la quantité d'acétylcholine, qui est libérée d'un complexe sous l'influence de l'alcool acidifié et d'une série d'autres agents, tels qu'une température élevée, le chloroforme etc.

Notons que l'eau dont se servaient F e g l e r et ses collaborateurs dans les expériences mentionnées ci-dessus, était portée à une température de 18° à 20°.

Désirant établir dans quelles conditions il fallait procéder au dosage de l'acétylcholine, tant libre que combinée, nous avons fait l'expérience suivante: après avoir broyé le tissu du tronc cérébral et de la moelle épinière d'un lapin normal, on l'a traité par de l'ésérine (0.5 mg par g de tissu) et exposé pendant 2 à 3 h. à l'action de différentes températures (environ 2° à la glacière, 20° dans une chambre, 37° à l'étuve et 70° dans certaines épreuves). Le tissu était soumis ensuite à l'extraction par de la solution physiologique de sel refroidie à 2° et la suspension fut centrifugée. L'acétylcholine était dosée dans le liquide ainsi obtenu. L'autre portion de tissu nerveux broyé était traitée selon la méthode des S t e d m a n, pour y doser l'acétylcholine totale.

Tableau III.

L'acétylcholine dans les extraits aqueux du tissu nerveux éseriné après une période de 3 heures d'exposition à différentes températures.

L'acétylcholine libre (extraits aqueux) en γ/g après exposition du tissu nerveux à une température de:				Quantité totale d'acétylcholine en γ/g
20	200	370	700	
1.2	1.5	2.2	3.0	4.5
1.5	2.1	2.6	—	6.3

L'examen des données réunies dans le tableau III suggère l'idée que le tissu nerveux, additionné d'éserine, laisse diffuser des plus fortes quantités d'acétylcholine libre, non seulement à une température plus élevée, comme c'était le cas dans les expériences de G a u t r e l e t et ses collaborateurs, car à la température de chambre et à 37°C, il en fournit déjà des quantités supérieures à celles qui sont libérées à 20°C environ. En nous référant aux résultats des expériences de O. L o e w i et à ceux des épreuves de Q u a s t e l et ses collaborateurs, nous supposons que l'augmentation de la quantité d'acétylcholine libre dans les conditions données, est une conséquence de la décomposition du „precuteur” acétylcholinique, qui se produit sous l'influence d'une température plus élevée, sans que la cholinestérase dont l'action est inhibée par l'éserine, prenne part à ce processus.

Les données que nous avons obtenues s'accordant avec les résultats des dosages analogues de Q u a s t e l et ses collaborateurs, il s'ensuit qu'on doit procéder au dosage de l'acétylcholine libre dans le tissu nerveux broyé à la température voisine de 0°C.

Il importe cependant d'établir que, bien que la désagrégation du „precuteur” soit très sensiblement réduite dans ces conditions, celles-ci ne sauraient la supprimer complètement. La décomposition se produit probablement déjà à la suite du broyage du tissu et pendant qu'on l'agite à l'occasion de l'extraction par de l'eau. C'est pourquoi le dosage de l'acétylcholine libre dans les extraits ne peut donner que des valeurs relatives et non des valeurs absolues.

Nous donnons dans le tableau IV les résultats de la série d'expériences où nous avons dosé l'acétylcholine libre et l'acétylcholine totale chez des lapins tués après l'apparition des convulsions provoquées par la strychnine. L'acétylcholine totale a été dosée dans un extrait préparé d'après la méthode de Stedman, tandis que pour procéder au dosage de l'acétylcholine libre, nous nous sommes servis d'un extrait préparé avec de la solution physiologique refroidie (5 cm³ par g de tissu), par laquelle nous traitions le tissu nerveux préalablement broyé et additionné d'ésérine.

Tableau IV.

La teneur en acétylcholine libre et totale en γ /g du s. n. c. des lapins témoins (t) et des lapins tués après les convulsions provoquées par la strychnine (s).

	Acétylcholine libre	Quantité totale d'acétylcholine	Valeur du rapport: acétyl. total acétyl. libre
t.	1.2	6.0	5.0
s.	1.7	4.0	2.4
t.	1.0	6.3	6.3
s.	1.2	5.1	4.3
t.	1.3	6.3	4.7
s.	1.6	2.5	1.5

La concentration de l'acétylcholine libre démontre certaines différences dans ces épreuves. Ainsi, dans les expériences 1 et 3 où la réduction de la quantité totale d'acétylcholine était plus prononcée, la teneur en acétylcholine libre était plus forte. Les différences sautent aux yeux lorsqu'on considère la colonne 3, acétylcholine totale où nous donnons la valeur du rapport: $\frac{\text{acétylcholine totale}}{\text{acétylcholine libre}}$.

Dans les expériences 1 et 3, la quantité d'acétylcholine libre correspondait, respectivement à 43% et à 64% d'acétylcholine totale; par contre, dans l'épreuve 2 où la diminution de la teneur en acétylcholine totale n'était pas aussi manifeste, la quantité d'acétylcholine libre n'équivalait qu'à 24% de la quantité d'acétylcholine totale, de sorte qu'elle ne dépassait qu'insensiblement la quantité de cette substance dans le tissu nerveux des lapins témoins.

Les expériences que nous venons de décrire, militent, à notre avis, en faveur de l'hypothèse que dans l'empoisonnement par la strychnine, il se produit une décomposition du complexe acétylcholinique, accompagnée d'une diminution de sa reconstitution.

Dans une autre série d'expériences où notre attention s'est également portée sur la manière dont se comporte l'acétylcholine libre dans le système nerveux central des lapins empoisonnés par la strychnine, nous avons dosé l'acétylcholine totale et l'acétylcholine libre chez des animaux, auxquels nous avons injecté de l'ésérine (salicylate de physostigmine 0.3 mg par kg) avant d'administrer de la strychnine.

Tableau V.

Acétylcholine libre et totale dans le s. n. c. des lapins témoins (t) et des lapins intoxiqués par de la strychnine (s).			Acétylcholine libre et totale dans le s. n. c. des lapins traités par la physostigmine (0.3 mg/kg), intoxiqués ensuite par la strychnine.	
	Acétylch. libre	Acétylch. totale	Acétylch. libre	Acétylch. totale
t.	—	4.2	—	4.1
s.	—	2.8	—	5.7
t.	—	—	1.1	6.5
s.	1.2	4.4	1.2	5.4
t.	1.0	7.2	1.1	7.0
s.	1.2	5.0	1.2	7.9
t.	1.1	6.0	1.3	6.7
s.	1.4	4.0	1.5	6.0
t.	—	5.0	—	5.3
s.	—	3.5	—	4.5
t.	—	—	—	4.7
s.	—	—	—	4.5

Il résulte des chiffres ci-dessus que la physostigmine modifie le tableau que présente ordinairement l'empoisonnement par la strychnine. Dans une partie des expériences, la teneur en acétylcholine non seulement ne diminuait pas dans le système nerveux central des lapins auxquels nous avons administré de la physostigmine avant d'injecter la strychnine, mais elle accusait même une augmentation par rapport à la quantité d'acétylcholine chez les lapins témoins. Dans certaines expériences, la diminution était bien moins prononcée que chez les lapins qui n'avaient pas été intoxiqués par la physostigmine avant l'in-

jection de la strychnine. Il s'agit donc en quelque sorte d'une suppression ou du moins d'une réduction de l'action qu'exerce la strychnine sur le métabolisme de l'acétylcholine dans le système nerveux central. La physostigmine n'a pas fait augmenter la quantité d'acétylcholine libre, augmentation à laquelle on pouvait s'attendre. Les différentes données que nous avons obtenues dans ces expériences offrent pour ainsi dire un tableau paradoxal; en effet, quoique l'action pharmacodynamique de la strychnine persiste, une diminution de la quantité totale d'acétylcholine fait défaut ou n'est que légèrement marquée, et une augmentation de la quantité d'acétylcholine libre ne se produit pas non plus.

Ces résultats réclament de nouvelles recherches. Il semble toutefois que l'action de la physostigmine sur le système nerveux central *in vivo* n'est pas limitée à enrayer la décomposition de l'acétylcholine, et il s'agit peut-être d'un processus plus compliqué. On ne saurait également exclure la possibilité qu'en inhibant la décomposition de l'acétylcholine libre, la physostigmine agit indirectement dans le sens d'une inhibition de la décomposition du „precuteur”. Au cours des recherches sur le complexe acétylcholinique, F e g l e r et ses collaborateurs essayèrent d'établir si l'addition d'acétylcholine au tissu nerveux broyé n'exerce pas *in vitro* d'action inhibitrice sur la désagrégation de ce complexe. Les résultats de ces épreuves n'étaient cependant pas concluants. Dans les expériences de Q u a s t e l et collaborateurs, le fait d'ajouter de la choline, avec ou sans addition d'ésérine, fait sensiblement augmenter *in vitro* la synthèse du „precuteur” dans le tissu nerveux isolé et survivant. Quoique ajoutée après addition préalable d'ésérine, l'acétylcholine fasse également augmenter la synthèse, cette augmentation est cependant bien plus faible. Ce serait donc la choline et non l'acétylcholine qui jouerait le rôle principal dans la synthèse. Si l'on tient compte des résultats obtenus par Q u a s t e l au cours des expériences effectuées *in vitro*, l'action de la physostigmine que nous venons de décrire dans nos expériences *in vivo*, est incompréhensible, de sorte qu'elle nécessiterait des investigations ultérieures.

2. L'action de la ventilation des poumons avec de l'oxygène sur la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central des lapins empoisonnés par la strychnine.

Ainsi que nous l'avons dit précédemment, il résulte du grand nombre de nos expériences que le degré, de la diminution de la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central de divers lapins empoisonnés par la strychnine subit de grandes variations. Une diminution pareille fait cependant parfois défaut. En cherchant à expliquer ces différences, notre attention s'est portée sur certains phénomènes qui ont lieu secondairement dans l'empoisonnement par la strychnine, et qui peuvent avoir une répercussion sur le métabolisme de l'acétylcholine dans le système nerveux central.

Depuis longtemps nous avons observé la différence qu'offrait l'action pharmacodynamique de la strychnine chez des lapins normaux, comparée avec celle observée sur d'autres lapins chez lesquels, avant d'injecter de la strychnine, nous avons ventilé les poumons avec de l'oxygène. Il arrivait que les doses de strychnine, administrées d'ordinaire (0.15 à 0.20 mg/kg) ne déclenchaient pas des convulsions typiques chez ces animaux, de sorte que maintes fois il fallait doubler les doses. Les convulsions observées alors, différaient de celles qui apparaissaient chez les lapins dont les poumons n'avaient pas été ventilés; en effet, les attaques, surtout la première, provoquées par une dose plus élevée de strychnine, duraient plus longtemps. D'accord avec les données de la littérature (Osterwald '00), nous avons remarqué que les lapins qui avait respiré de l'oxygène, supportent plus facilement l'intoxication.

Pendant l'empoisonnement par la strychnine, l'animal se trouve à l'état d'asphyxie prononcée. Nous nous sommes demandés si cette asphyxie n'est pas en rapport avec la diminution de la concentration d'acétylcholine dans le système nerveux central.

Nous avons donc comparé dans une série d'expériences, l'action qu'exerçait la strychnine sur la teneur en acétylcholine du système nerveux central chez les lapins normaux et chez

d'autres où, avant et pendant l'attaque de convulsions, nous avons ventilé les poumons par une canule introduite dans la trachée. Le tableau VI nous renseigne sur les résultats de cette série d'expériences.

Tableau VI.

L'action de la ventilation des poumons avec de l'oxygène sur la quantité d'acétylcholine dans le s. n. c. des lapins empoisonnés par de la strychnine.

Lapins témoins	Lapins empoisonnés par de la strychn. sans ventilation des poumons avec de l'oxygène	Lapins empoisonnés par de la strychn. avec ventilation des poumons avec de l'oxygène	Méthode d'extraction
5.0	2.1	3.8	Alcool acid.
5.6	2.0	4.1	"
6.0	2.6	4.3	"
3.0	2.0	3.2	"
4.4	2.8	4.9	Stedman
6.2	3.6 ; 3.2 ¹	4.4 ; 4.5 ¹	"
6.6 ; 6.8 ¹	4.2 ; 4.0 ¹	5.5 ; 5.1 ¹	"
7.1	3.9	5.0	"

1) Dans cette expérience on a utilisé 2 lapins.

Ces épreuves permettent d'établir que la strychnine fait diminuer moins fortement la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central des lapins dont les poumons ont été ventilés avec de l'oxygène. Cette diminution fait même complètement défaut dans certains cas. Par contre, l'action pharmacodynamique de la strychnine administrée à doses appropriées se maintient comme d'ordinaire, ainsi que nous l'avons déjà dit; elle est même plus intense et les convulsions durent plus longtemps. Les résultats de ces épreuves nous autorisent à admettre par conséquent que, lorsque l'organisme est suffisamment pourvu d'oxygène, il peut contrebalancer la réduction de la quantité d'acétylcholine que la strychnine fait subir au système nerveux central. Nous en concluons que l'asphyxie, dont l'attaque de convulsion s'accompagne régulièrement, est un facteur important dans le mécanisme de cette diminution.

Dans plusieurs épreuves exécutées dans les mêmes conditions, nous avons étudié la façon dont se comporte la quantité d'acétylcholine libre, comparée avec la teneur en acétylcholine totale. Dans l'expérience dont nous donnons les résultats ci-des-

sous (tableau VII), l'acétylcholine libre et l'acétylcholine totale furent dosées chez deux lapins témoins, puis chez deux autres pendant les convulsions, enfin chez deux lapins tués pendant l'accès, mais dont nous ne cessons de ventiler les poumons avec de l'oxygène.

T a b l e a u VII.

L'acétylcholine libre et l'acétylcholine totale dans le s. n. c. des lapins empoisonnés par de la strychnine, sans ou avec ventilation des poumons avec de l'oxygène.

	Acétylcholine libre	Acétylcholine totale	Valeur du rapport: acétylcholine totale / acétylcholine libre
Lapins témoins	1.2; 1.3	6.2; 6.2	5.2; 4.7
Lapins empois. par la strych.	1.5; 1.6	2.7; 2.5	1.8; 1.5
Lapins empois. par la strychn. avec ventilation des poumons	1.2; 1.2	4.2; 5.0	3.5; 4.2

Il résulte des données réunies dans le tableau VII, que la teneur en acétylcholine libre du système nerveux central correspond chez les lapins témoins à 19 et 21% de la quantité d'acétylcholine totale, qu'elle équivaut à 55 et 64% chez les lapins empoisonnés par la strychnine et tombe à 30 et 24% chez les animaux intoxiqués dont les poumons étaient ventilés avec de l'oxygène. Ces résultats paraissent confirmer la supposition qu'en empêchant l'asphyxie pendant les convulsions, on compense en quelque sorte la décomposition du „complexe” acétylcholinique en intensifiant peut-être sa réconstitution. Inversement, l'augmentation de la concentration relative d'acétylcholine libre, accompagnée d'une diminution de la quantité d'acétylcholine totale, comme c'est le cas chez les lapins dont les poumons n'ont pas été ventilés, permet, de conclure à une plus forte décomposition du complexe, qui l'emporte sur la reconstitution.

Les expériences que nous venons de décrire et les recherches de Q u a s t e l et ses collaborateurs, paraissent avoir donné des résultats concordants. Au cours des investigations sur le tissu nerveux survivant *in vitro*, ces chercheurs établirent qu'il produit, dans une atmosphère d'oxygène, une quantité d'acétylcholine bien supérieure à celle qui s'en dégage dans une atmosphère d'azote.

La supposition que nous avons énoncée auparavant paraît fondée à la lumière des données de *Quastel* et des faits que nous avons établis nous-mêmes; le métabolisme de l'acétylcholine paraît en effet comprendre deux phases dont une correspond à la décomposition du „complexe” avec dégagement d'acétylcholine libre, l'autre à la reconstitution parallèle de ce „complexe”. Comme dans les épreuves *in vitro* de *Quastel*, de même dans nos expériences *in vivo*, les processus liés au métabolisme normal de l'acétylcholine dans le système nerveux central demandent que le tissu nerveux soit suffisamment pourvu d'oxygène.

Quastel et ses collaborateurs constatèrent également que la production d'acétylcholine augmente dans de fortes proportions, lorsque le milieu où se trouve le tissu nerveux, est additionné du glucose ou de certains produits de sa désagrégation, tels que l'acide pyruvique ou l'acide lactique. Ils en concluent que la production d'acétylcholine dépend du métabolisme des glucides.

Nous publierons prochainement les résultats de nos recherches sur les relations entre le métabolisme des glucides et de l'acétylcholine dans le système nerveux central.

Nos expériences, exécutées jusqu'à présent ont démontré que chez les lapins privés de nourriture pendant 5 à 7 jours, la strychnine fait bien plus fortement diminuer la teneur du système nerveux central en acétylcholine que chez des lapins nourris abondamment.

Chez ces deux catégories d'animaux nous n'avons pas constaté de différences nettes dans la concentration du glucose sanguin.

Les expériences peu nombreuses encore que nous avons exécutées sur des lapins intoxiqués par l'insuline démontrent qu'après les convulsions hypoglycémiques, il se produit également une diminution de la teneur du système nerveux central en acétylcholine.

Takahashi ('24), *Winterstein* et *Hirschberg* ('25) ont constaté que la strychnine provoque dans le système nerveux central des lapins une diminution très nette de la teneur en glycogène. D'autre part, *Kerr* et ses collabo-

rateurs ('36, '37) ont constaté une diminution de la teneur en glycogène du système nerveux central des lapins à la suite des convulsions insuliniques.

Les données de ces auteurs, ainsi que nos recherches encore peu nombreuses suggèrent l'idée, que chez les animaux avec excitation centrale aiguë on pourra trouver peut être dans le système nerveux central une relation entre le métabolisme de l'acétylcholine d'une part, et les processus de la glycogénèse et la glycogénolyse de l'autre.

3. Les variations de la teneur du système nerveux central des lapins empoisonnés par la toxine tétanique en acétylcholine libre.

Il résulte de nos expériences antérieures et des épreuves dont nous parlons à présent que, à l'inverse de la strychnine, la toxine du tétanos fait augmenter la teneur en acétylcholine du système nerveux des lapins.

La marche de l'intoxication par la strychnine et l'évolution de l'empoisonnement par la toxine du tétanos sont très différentes. Tandis que l'action de la strychnine est violente et brusque, celle du tétanos commence à se manifester après une longue période latente. Cette différence de l'augmentation progressive du degré d'empoisonnement constitue probablement la cause de l'action différente de ces poisons sur la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central des lapins. L'empoisonnement par de la toxine du tétanos crée probablement des conditions favorables à une accumulation d'acétylcholine dans ce système.

Nous avons étudié dans une série d'expériences la question de savoir, si cette accumulation n'a lieu qu'au moment où l'intensité de l'empoisonnement a atteint le maximum, ou si elle se produit progressivement et parallèlement à la marche de l'intoxication. Le tétanos apparaissait dans nos expériences 48 à 56 heures après l'injection intraveineuse de la toxine. Nous administrions la toxine du tétanos à différents intervalles aux lapins que l'on sacrifiait, dès qu'apparaissaient les convulsions chez le premier animal. Nous voulions étudier ainsi les différen-

tes phases de l'empoisonnement et connaître les variations de la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central, qui les caractérisaient. On trouvera dans le tableau VIII les résultats de deux de ces expériences.

Tableau VIII.

Acétylcholine en γ/g dans le s. n. c. des lapins tués à différents intervalles après l'empoisonnement par la toxine du tétanos.

Lapins témoins	24 h. après l'empoisonnement	36 h. après l'empoisonnement	48 h. après l'empoisonnement	52—56 h. après l'empoisonnement
3.1	3.1	3.5	4.4	5.1
4.9	4.5	—	6.4	6.9

Nous voyons par conséquent que la teneur en acétylcholine du système nerveux central augmente progressivement à mesure que se suivent les phases de l'empoisonnement. La manière dont se comportaient les animaux ne présentait généralement rien de particulier 24 heures après l'introduction de la toxine dans l'organisme, et la quantité d'acétylcholine dans le système nerveux central correspondait à celle qu'on trouvait chez les lapins témoins. Dans la phase suivante, les lapins manifestaient une certaine inquiétude motrice, tandis qu'après 36 heures l'excitabilité aux stimulus externes paraissait déjà augmentée. La teneur en acétylcholine du système nerveux central était déjà légèrement accrue dans cette phase, accroissement qui devenait de plus en plus marqué à mesure qu'augmentait l'intensité des symptômes d'empoisonnement. L'augmentation de la quantité d'acétylcholine atteignait le maximum dans la phase des convulsions tétaniques.

L'intensité des convulsions, déclanchée par de la toxine du tétanos, différait sensiblement dans nos expériences, de celle des contractions que produit la strychnine. Les convulsions apparaissaient plutôt sous l'action d'excitations externes plus fortes, tandis que chez les lapins intoxiqués avec de la strychnine, de très faibles stimuli suffisaient à les déclancher, de sorte qu'elles faisaient l'impression d'être spontanées. Quoique différents muscles eussent régulièrement présenté des contractures

chez les lapins empoisonnés par la toxine tétanique (opisthotonos, extension des extrémités), ils n'étaient pas aussi rigides que dans l'empoisonnement par la strychnine. On s'aperçut en outre que l'animal ne cessait de respirer, même pendant l'accès de convulsions, et que la cyanose était moins prononcée que durant les attaques consécutives à l'emploi de strychnine.

Il fallait encore répondre à la question, laquelle des deux formes d'acétylcholine, libre où liée, avait subi une augmentation dans le système nerveux central des lapins empoisonnés par de la toxine du tétanos. Pour trancher cette question, nous avons procédé comme dans nos expériences où les lapins avaient été empoisonnés par de la strychnine. Nous avons donc préparé des extraits en nous servant d'une solution physiologique refroidie, additionnée d'ésérine, pour déterminer la concentration de l'acétylcholine libre, tandis que nous appliquions la méthode de *Stedman* pour doser l'acétylcholine totale.

Tableau IX.

Acétylcholine libre et l'acétylcholine globale en γ/g dans le s. n. c. de 2 lapins empoisonnés par de la toxine du tétanos (T₁, T₂), en comparaison avec un lapin témoin (t).

	Acétylcholine libre	Acétylcholine totale	Valeur du rapport: acétylcholine totale / acétylcholine libre
t.	1.0	4.5	4.5
T ₁	1.2	6.4	5.3
T ₂	1.4	7.5	5.3

Cette expérience prouve que c'est plutôt l'acétylcholine combinée qui augmente dans le système nerveux central des lapins empoisonnés par de la toxine tétanique. Nous pouvons en conclure que cet empoisonnement crée des conditions, dans lesquelles la reconstitution l'emporte sur la décomposition du complexe d'acétylcholinique.

Résumé et conclusions.

1°. La teneur du système nerveux central en acétylcholine totale diminue sous l'action de la strychnine; par contre, la

quantité d'acétylcholine libre accuse une augmentation relative. Inversement, la toxine du tétanos fait augmenter la teneur en acétylcholine totale et entraîne une diminution relative de la quantité d'acétylcholine libre. Dans le premier cas nous avons affaire par conséquent à une diminution, dans le second, à une augmentation de la quantité d'acétylcholine liée dans le système nerveux central („complexe” ou „precuteur” acétylcholinique).

2°. La diminution de la teneur en acétylcholine du système nerveux central des lapins, empoisonnés par la strychnine, est bientôt compensée après la phase d'excitation aiguë, ou du moins elle a une tendance à l'être.

3°. L'accumulation d'acétylcholine dans le système nerveux central des lapins, empoisonnés par de la toxine tétanique, augmente peu à peu, parallèlement au degré d'empoisonnement.

4°. L'ésérine, introduite chez des lapins avant l'administration de la strychnine, empêche la diminution de la teneur en acétylcholine du système nerveux central.

5°. La ventilation des poumons avec de l'oxygène pendant l'empoisonnement par la strychnine, empêche également la quantité d'acétylcholine de diminuer.

6°. Dans les conditions normales, le métabolisme de l'acétylcholine dans le système nerveux central est caractérisé par l'équilibre entre la décomposition et la reconstitution du „complexe” acétylcholinique. Une de ses conditions consiste à assurer un apport suffisant d'oxygène au tissu nerveux. A l'inverse de l'action de la toxine tétanique, l'empoisonnement par la strychnine crée des conditions qui troublent cet équilibre, de sorte que la décomposition l'emporte sur la reconstitution.

Bibliographie.

- G. Brown et W. Feldberg. (1937). *J. Physiol.*, 88, 265. — E. Corteggiani, Gautrelet, Kaswin et Mentzer. (1936). *C. R. S. Biol., Paris*, 123, 667; Corteggiani. (1937), *ibid.* 124, 1197; 125, 944, 949; Corteggiani, Carayon-Gentil, Gautrelet et Kaswin. (1937), *ibid.*, 125, 945. — J. Fegler, H. Kowarzyk et Z. Lelusz-Lachowicz. (1938). *Klin. Wschr.*

17, 240, 667; *Acta Biol. Exper.*, 12, 139. — J. Fegler, H. Kowarzyk et J. Rymar. (1938a). *Bullet. Acad. Polon. Sc. Cl. Med.* — S. E. Kerr et M. Ghantus. (1936). *J. biol. Chem.*, 116, 9. — S. E. Kerr, C. W. Hampel et M. Ghantus. (1937). *J. biol. Chem.*, 119, 405. — O. Loewi. (1937). *Pflügers Arch.*, 239, 430. — C. Osterwald. (1900). *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.*, 44, 451. — P. J. G. Mann, M. Tennenbaum et I. H. Quastel (1938). *Bioch. J.*, 32, 243. — I. H. Quastel, M. Tennenbaum et A. H. M. Wheatley (1936). *Bioch. J.*, 30, 1668. — E. Stedman et E. Stedman. (1937). *Bioch. J.*, 31, 817. — K. Takahashi. (1924). *Bioch. Z.*, 154, 444. — H. Winterstein et E. Hirschberg. (1925). *Bioch. Z.*, 159, 351.

[Institut für medizinische Chemie der Universität Lwów].

P. Ostern und St. Hubl.

Darstellung von Glykogen.

Vorgestellt in der Sitzung der Abteilung Lwów der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 8.II.1939.

Für die präparative Darstellung von Glykogen wird gewöhnlich die Methode von Pflüger benützt. Diese Methode ist in Bezug auf die Ausbeute einwandfrei, aber sonst ziemlich umständlich und auch kostspielig, da grosse Mengen von Kaliumjodid verbraucht werden. Infolge der zahlreichen Operationen zieht sich die Gewinnung von einem reinen Produkt über mehrere Tage hin. Für die Darstellung von kleinen Glykogenmengen (für Standardlösungen zur Nephelometrie) hat Rona eine Extraktion von kleingeschnittenen und festgefrorenen Leberstücken zunächst mit 3% Trichloressigsäure und dann mit Wasser vorgeschlagen. Das Glykogen wird dann mit Alkohol gefällt und durch 5-6 fache Umlösung in Wasser und Wiederfällung mit Alkohol gereinigt.

Nun haben wir bei der Aufarbeitung der Phosphatfraktionen in der Leber gefunden, dass ohne irgendwelche besonderen Vorsichtsmassregeln das gesamte Glykogen dem Leberbrei durch entsprechend konzentrierte Trichloressigsäure entzogen werden kann. Da keine Wasserextraktion erfolgt, so erhält man eiweissfreie, stark saure Lösungen, aus denen das Glykogen ohne Verunreinigungen durch Zusatz desselben Volumens Alkohol gefällt wird. In dem sauren Extrakt sind nämlich die üblichen Begleitstoffe des Glykogens (Phosphor- und Stickstoffverbindungen) gut löslich und zeigen keine Tendenz zur Adsorption. Das mit Alkohol gefällte Produkt wird mit 50% und dann absolutem Alkohol gewaschen und scharf abgenutscht. Man erhält in der Weise binnen weniger Stunden ein schneeweisses, feines,

in Wasser leicht lösliches Pulver, welches bei der quantitativen Untersuchung fast theoretische Werte für Glykogen gibt. Die Aufarbeitung gestaltet sich, wie folgt:

10 oder 20 Lebern von gut mit Möhren und Rüben genährten Kaninchen werden unmittelbar nach der Tötung der Tiere präpariert, gewogen und mit demselben Volumen 10% Trichloressigsäure in einem Mörser unter Zusatz von etwas Quarzsand zerrieben. Nach Zusatz von weiteren 2 Volumina 5% Trichloressigsäure wird abgenutscht, der Niederschlag mit noch einem Volumen 5% Trichloressigsäure abermals zerrieben und abgenutscht. Die gelblichen, fluoreszierenden Filtrate werden mit Alkohol bis zu 50% Konzentration versetzt, worauf sich das Glykogen schnell als weisser Niederschlag absetzt. Der Niederschlag wird zentrifugiert, zweimal mit 50% Alkohol gewaschen, in 50% Alkohol aufgeschwemmt, auf ein Büchner-Filter übertragen, scharf abgenutscht, mit absolutem Alkohol entwässert und im Exsiccator getrocknet. Ausbeute an Glykogen: je nach dem Ernährungszustand der Kaninchen 5—10% des Lebergewichtes. Die Methode eignet sich auch für quantitative Glykogenbestimmungen.

Das in dieser Weise dargestellte Glykogen ist aschefrei, enthält unter $0.10/_{00}$ N und keinen anorganischen Phosphor. Die optische Drehung und Reduktion nach Hydrolyse ist theoretisch. Der Gehalt an organischem Phosphor schwankt in verschiedenen Präparaten zwischen $0.1—0.90/_{00}$. Vieles spricht dafür, dass dieser Phosphor ein Bestandteil des Leberglykogens ist, und es erscheint durchaus möglich, dass die Schwankungen in seinem Gehalt mit verschiedenen Abbau- oder Aufbauphasen des Glykogens zusammenhängen. Wenn man auf Grund des Phosphorgehaltes das Molekulargewicht von Glykogen berechnet, so kommt man zu Minimal-Werten von 35.000—300.000, welche weit besser zur Formel von Staudinger, als zu der von Haworth passen.

[Physiological Laboratory J. Piłsudski Academy of Physical Education, and Department of Physiology, J. Piłsudski University, Warszawa].

W. Missiuro, S. Niemierko, A. Perlberg and B. Pawlak.

Compensatory processes at rest and during work under conditions of lowered oxygen tension.

Presented before the Polish Physiological Society, Warsaw, 15.XII.1938.

Numerous observations suggest the possibility of augmenting the individual resistance of the organism to hypoxaemic influences after repeated attainment of high altitudes in mountains, by aeroplane, or after "high altitude training" in low pressure chambers. The object of the present research was to find out what are the residual functional effects of previously acquired acclimatization to high altitudes. For this purpose, comparative studies were made of 8 experienced mountain climbers, who had taken part in expeditions in the Tatra Mountains, the Alps, the Caucasian Mountains, the Atlas, in Norway, Spitzbergen, and the Andes, and of 8 healthy individuals, accustomed to systematic physical training.

The functional characterisation of these groups was accomplished at rest, under normal respiratory conditions, and their reaction to breathing air of lowered O_2 content (10%) at ordinary (sea-level) barometric pressure was determined. In addition, the effect of standardised physical effort, followed by recovery, were determined under the same conditions. Pulmonary ventilation was determined by the method of continuous registration, as well as respiratory exchange, pulse rate, blood pressure, and electrocardiograms were taken. The O_2 and CO_2 contents of venous blood (v. brachialis), its O_2 combining capacity, alkali reserve (at a tension of 40 mm Hg of CO_2 in the tonometer), and lactic acid content were determined, and the

pH_s of the blood was calculated from the H e n d e r s o n - H a s s e l b a l c h equation.

The results of the examination of the physical state of the members of both groups, at rest, and under normal atmospheric pressure, revealed certain analogies between the functional characteristics of the mountain climbers and the state achieved following systematic training in prolonged physical effort. We find more economic and efficient pulmonary ventilation, as expressed by a more efficient utilisation of the oxygen of the inspiratory air. We found a tendency to systolic and diastolic hypotension, with slight enlargement of the left ventricle of the heart, and with a slightly slower respiratory rate, and a rather more slow basal pulse rate. To these changes should be added increased alkalinity of the blood, and a lowering of the basal metabolic rate; together, they give a picture similar to that characteristic of functional adaptation of the trained organism to efforts of long duration.

It appears, from these observations, to be certain that the increase in fitness after training favours readier acclimatization and greater efficiency of muscular activity at high altitudes. The question remains whether this mechanism of adaptation to lowered atmospheric pressure is identical with the changes, of greater or smaller duration, produced by physical training. It should rather be thought that, apart from those properties which are the natural consequences of systematic physical effort, associated with mountaineering, other specific mechanisms increasing tolerance to low oxygen pressure may be created or perfected.

A study of the reaction of the organism to lowering of the oxygen content of inspired air gave more reliable data for the appraisal of individual adaptability. Abrupt transition to an atmosphere containing 10% of O_2 , answering to a barometric pressure of 370 — 385 mm Hg, corresponding with an altitude of 5500—5600 m., caused a typical increase in pulmonary ventilation, compensating for the fall in the O_2 tension of alveolar air. The rapidity with which hyperpnoea develops, and its persistence in conditions of CO_2 loss and raised blood alkalinity, are suggestive of the centrogenic nature of this response. Ac-

ording to Winterstein, Haldane, Gollwitzer-Meier, and Gesell even an inconsiderable oxygen deficit in the respiratory centre leads within it to augmented production of acidic substances, with consequent hyperpnoea. On the other hand, the observation reported by Lutz and Schneider, that the augmented pulmonary ventilation following breathing of air of low oxygen content may be initiated in less time than is required for one complete circulation of the blood, as also the relevant researches of Hasselbalch and Lindhard, Rein and Nielsen, afford evidence that hypoxemic hyperpnoea is connected with increased irritability of the respiratory centre. It is therefore possible that an important part in the phenomena of the initial hyperpnoea under discussion is also played by reflex impulses from nerve-endings in the chemo-sensory regions of the carotid sinus and aorta (Cordier and Heymans, and Comroe).

The increased lung ventilation, which is exceptionally great at the beginning of breathing air of low O_2 content (amounting in one case to 245% of the initial value), as well as the succeeding fall in ventilation to a constant value for the greater part of the duration of the hypoxaemia, did not reveal any features peculiar to the group of mountain-climbers, and the same applied to the mechanism of increase in minute volume of respiration, being in all cases due to greater depth of respiration. A larger respiratory amplitude, with less effective changes in both directions of the respiratory rate, not playing any great part in increasing pulmonary ventilation, appears to be the typical reaction to exposure of individuals to conditions of hypoxaemia.

The absence of any correlation between increase in respiratory amplitude and better fitness for exposure to very low partial O_2 pressures, emphasised by Schneider, and described by Graybiel et al. in their comparison of healthy individuals and cardiac patients, should be ascribed to the greater efficiency of the function of external respiration due to training of the control subjects. Larger respiratory amplitude as a response to increased oxygen need is also the rule in such conditions. Cases of diminished tidal air values observed during the exper-

periments apply to individuals having a low resistance to O₂ deficiency.

The more efficient intake of O₂ per unit vol. of inspired air found in the group of mountain-climbers ensures the possibility of better utilization of O₂ in the tissues, with at the same time, a smaller reduction in the HbO₂ content of the efferent blood. The fall in the degree of saturation of venous blood with O₂ in hypoxaemia is about the same in both groups, but the percentage saturation of Hb with oxygen, i. e., the HbO₂ content is higher in the group of mountain climbers (22.2 — 41.9%, as compared with the control of 20.8—35.4%). These changes, which point indirectly to a smaller drop in the oxygen tension within the tissues, are in this case at the same time indicative of a higher HbO₂ content of arterial blood, and of better conditions for transport of oxygen from the lungs to the tissues; mobilisation of available reserves of blood, and increased functional activity of the heart participate in effecting this change.

Table I.

Certain properties of venous blood during breathing normal air (20.9% O₂) and 10% oxygen mixture at rest and work.

Group	Subject	HbO ₂ Content %			O ₂ Content %			O ₂ Capacity %		
		Rest		Work	Rest		Work	Rest		Work
		20.9% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	20.9% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	20.9% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂
Mountain climbers	Kar.	71.28	41.91	39.42	15.89	9.53	9.61	22.29	22.74	24.38
	Buj.	65.73	32.94	25.37	15.83	7.38	6.32	24.08	22.40	24.91
	Nar.	41.79	42.27	21.63	9.06	8.92	4.95	21.68	21.10	22.88
	Os.	52.56	—	—	11.48	—	7.24	21.84	24.08	—
	Zul.	37.98	22.23	16.94	8.19	4.93	3.66	21.56	22.18	21.60
	Ber.	45.61	32.28	12.71	9.98	6.38	3.03	21.88	19.76	23.83
	Kaw.	56.77	27.68	15.21	12.61	6.18	3.52	22.21	22.32	23.14
	Grofi.	45.50	—	28.29	9.82	—	6.76	21.58	—	24.04
Control	Maj.	44.91	26.84	16.33	9.66	6.12	3.86	21.51	22.80	23.64
	Gab.	46.86	35.45	26.31	10.76	8.26	6.56	22.96	23.30	24.93
	Mus.	52.03	26.96	12.28	11.36	6.12	2.87	21.83	22.70	23.36
	Now.	47.51	20.80	12.42	10.78	4.72	2.97	20.73	22.69	23.91
	Tuř.	52.18	28.77	—	11.46	6.60	—	21.96	22.94	—

In accordance with the results of Grollman, Talenti, Ewig and Hinsberg, and of Christensen, it should be accepted that the cardiac output per minute is a decisive factor in increasing the blood flow during the period of adaptation to sudden reduction in the oxygen content of the inspired air. The adjustment of the circulation is achieved chiefly by augmentation of the cardiac output, and to a lesser extent by acceleration of the cardiac rate. As appears from the results of the present research greater capacity for adaptation to high altitudes lies in mobilisation of an appropriately increased cardiac output, since the increase of pulse rate, which is a consequence of the lowered tonus of the vagus centres (Gollwitzer-Meier, Opitz and Tillmann, Borgard), with governing influences of the sympathetic nerve system, is less marked in the group of mountain climbers (up to 130% of the initial value).

The tendency towards some decrease of the resting pulse rate, which appeared after the initial phase of acceleration consequent on respiration in an atmosphere containing 10% of O₂, took an extreme form in two members of the control group; this is evidence of augmented vagal tonus. Falling of the pulse rate below the initial value, together with arrhythmia, drop in blood pressure, and marked paleness of the skin, following cyanosis (a puce coloration), were signs of impending collapse, in such cases. This reaction, which hastens the onset of the critical phase of severe oxygen want and asphyxia, is the most characteristic symptom of intolerance to more extreme degrees of hypoxaemia, and has also been noted by Gollwitzer-Meier, Schneider and Truesdell, Missiuro, and Graybiel et al. The more or less uniform fall in pulse rate found by us in certain of the subjects studied, and also reported by Schneider, MatEFF and Schwarz, is probably a result of stimulation of the vagus centres associated with more extreme anoxia. The electrocardiogram is in some cases symptomatic of auriculo-ventricular heart block (Borgard). In some cases decrease of the pulse rate to sub-initial values may be a transient phenomenon (Herbst, Opitz and Tillmann and Besserer).

The symptoms noted during hypoxaemia under resting conditions, together with the circumstance that experiments on physical effort during anoxaemia had in certain cases to be abandoned solely owing to appearance of symptoms of acute heart failure, point to the particular importance of the circulatory function for adaptative processes. Whilst we by no means attach to the circulatory function such importance as to consider this alone to be the decisive factor in the mechanism of resistance to hypoxaemia, we are of the opinion, confirming that of Dill, that, together with the allied mechanisms of external respiration, internal respiration, and transport of oxygen, the activity of the circulatory system appears to be the first to suffer deterioration in acute O_2 deprivation, in cases in which the efficiency of the heart is constitutionally or as a result of pathologic changes sub-normal.

The gradual return to normal of the initially increased cardiac output per beat and per minute, at rest and during physical effort, which takes place parallel to development of polycythaemia during acclimatization to high altitudes, does not, however, appear to be, as Christensen supposes, irrefutable proof that the chief factor in compensation of oxygen deficit of the blood is that of pulmonary ventilation. Even after acclimatization the minute volume of the heart may be 40% greater than during performance of the same effort at sea level, as was shown by Ewig and Hinsberg.

The significance of the greater possibility of accomodation of circulatory activities is obvious, in view of the necessity of compensating the fairly abrupt fall in O_2 consumption which ensues during the initial phases of breathing O_2 -impoverished air. The gradual rise in O_2 consumption, which in most cases attains, towards the close of the period of hypoxaemia, values not differing from the initial by more than the ordinary physiological variation ($\pm 15\%$), is the resultant of coordination of the increased ventilation of the lungs with increased respiratory surface of the blood (mobilisation of blood reserves), and its more rapid circulation. In certain exceptional cases, in individuals suffering from low O_2 -tension (e. g., Ver. and Tut.) the rise in O_2 consumption is particularly marked towards the

end of the hypoxaemic test. This effect may also be ascribed to increased work of the respiratory muscles (Liliensstrand, and Schadow) during hyperpnoea. The slight rise in resting metabolism observed in our experiments corresponds with the analogous effect found during adaptation to high altitudes. It was found that as acclimatization became more complete, the basal O_2 consumption tended to fall to the sea-level value (Hasselbalch and Linhard, Herxheimer et al.).

Cases of pronounced lowering of O_2 consumption towards the close of the period of breathing O_2 -impoverished air are indicative of decompensation of the functions of transport and transference of O_2 to the tissues. Such symptoms were observed in a few individuals hyperesthetic to low oxygen tension.

A lower level of saturation of Hb with O_2 , with an unchanged degree of reduction of venous HbO_2 , following breathing of air of low O_2 content, is, in the control group, associated with the occurrence of certain differences in the typical changes of the ability of the blood to bind and transfer oxygen. Increase in the O_2 combining capacity of the blood under conditions of hypoxaemia at high altitudes, reported by Talbot, Dill, and McFarland, takes place chiefly as a result of increase in the number of erythrocytes in circulation, and in the Hb content. The phenomena of erythrocythaemia and increase in Hb concentration, connected with mobilisation of considerable amounts of blood from the natural reservoirs (Barcroft), as a direct reaction to the action of diminished atmospheric pressure, also take place following abrupt transition to hypoxaemia caused by sudden lowering of the O_2 tension of the inspired air (Dallwig, Kells, Loewenhardt, Herbst).

According to the recently published results of Hall, Keys, and Barron, confirming those of Dill et al., Barcroft's hypothesis of the possibility of increase in the affinity of Hb for O_2 , independently of change in pH of the blood, is definitely excluded. The results of these authors showed that the affinity of Hb for O_2 , as determined at constant pH, is actually lowered at altitudes of over 4500 m. This effect, together with the observation of Ewig and Hinsberg that the

rise in alkalinity of venous blood is on the whole less than in arterial blood, provides more favourable conditions for dissociations of HbO_2 .

The rise in O_2 combining capacity, found during hypoxaemia in all control subjects without exception (Table I), is probably one of the emergency compensational mechanisms, being in this case of greater importance than in individuals possessing better adaptative possibilities. To this may be ascribed the fact that the O_2 -combining capacity of blood rose in only half of the group of mountain climbers. A similar incidence of such changes in the blood was found by Graybiel, Missiuro, Dill, and Edwards, who compared the reactions of cardiac patients and of healthy individuals to breathing air containing 12% of O_2 .

The typical changes in the CO_2 transporting function, and the shifting of the acid-base equilibrium of the blood caused by breathing air containing 10% of O_2 , also exhibit a certain dependence on the degree of individual tolerance to lowered O_2 tension. The rate of elimination of CO_2 from the blood due to hyperpnoea is approximately equal in both groups (mean fall in CO_2 content 2%). The same applies to the fall in CO_2 tension (pCO_2), and the corresponding fall in H_2CO_3 content of venous blood. The total amount of alkalis released simultaneously, further augmented by greater reduction of Hb, is in spite of this, distinctly lowered, and this is more pronounced in the control group. The fall in alkali reserve is in these conditions a factor compensating for the effects of lowering of the bound CO_2 content, and preventing the development of more pronounced alkalosis. The rise in alkalinity of venous blood, which was in spite of this a typical effect of our experiments, indicates that the rate of elimination of CO_2 exceeds that of fall in alkali reserve.

The rise in the pH_s of venous blood, by 0.03—0.07 in both groups, is of the same order as noted by most observers during mountain expeditions or in low pressure chambers, with a fall in the O_2 tension of the air to about 8%. The parallelism between the rise in pH_s of venous blood and the degree of reduction of Hb was especially well marked in the group of mountain

Table II.

Certain properties of venous blood during breathing normal air (20.9% O₂) and 10% oxygen mixture at rest and work.

Group	Subject	CO ₂ Content (Alkali reserve) (T ₄₀) %				CO ₂ Capacity %				pCO ₂ mm Hg				pH _s				
		Rest		Work		Rest		Work		Rest		Work		Rest		Work		
		20.9% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	20.9% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	20.9% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	20.9% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	10.0% O ₂	
Mountain climbers	Karp.	45.33	45.01	35.30	49.94	39.86	54.7	44.3	39.7	7.32	7.39	7.34	7.32	7.39	7.39	7.34	7.34	
	Buj.	47.18	46.40	41.58	53.46	51.05	55.1	46.8	46.8	7.35	7.40	7.38	7.35	7.40	7.38	7.38	7.38	
	Nark.	45.96	43.03	35.60	54.04	51.48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Os.	44.59	43.87	—	56.64	45.91	64.3	—	—	—	7.28	—	—	7.28	—	—	—	—
	Zut.	45.47	38.24	39.27	57.78	52.18	64.0	87.6	65.0	7.29	7.13	7.22	7.29	7.13	7.22	7.22	7.22	
	Bern.	45.22	40.45	36.55	61.62	53.32	71.1	72.7	—	7.28	7.21	—	7.28	7.21	—	—	—	—
	Kaw.	45.65	45.01	43.16	56.98	55.60	61.1	55.6	54.0	7.31	7.36	7.36	7.31	7.36	7.36	7.36	7.36	7.36
	Gron.	44.31	—	38.68	55.62	48.98	—	—	—	57.7	7.27	—	7.29	7.27	—	7.29	7.29	7.29
	May.	42.73	41.92	38.45	54.02	47.70	65.0	52.0	50.0	7.25	7.33	7.32	7.25	7.33	7.32	7.32	7.32	7.32
	Gaw.	45.72	44.55	39.69	57.78	48.96	66.7	62.0	50.0	7.28	7.31	7.34	7.28	7.31	7.34	7.34	7.34	7.34
Control	Mus.	45.19	39.27	38.25	56.66	50.54	65.1	57.5	63.7	7.27	7.32	7.23	7.27	7.32	7.23	7.23	7.23	7.23
	Now.	45.17	43.27	36.80	53.87	49.98	48.5	64.0	57.0	7.31	7.25	7.28	7.31	7.25	7.28	7.28	7.28	7.28
	Tut.	49.70	43.92	—	60.23	56.54	60.8	60.6	—	7.34	7.31	—	7.34	7.31	—	—	—	—

climbers, in which increased alkalinity of the blood corresponded with a fall in HbO_2 content of 29.1—32.8%, with, in some cases, an increased lactic acid content. The few cases in which lowering of the pH_g of the blood was, in both groups, associated with a considerable simultaneous fall in alkali reserve, with an inconsiderable rise, or even a fall, in pulmonary ventilation (with subsequent rise in the CO_2 tension of the blood), should be ascribed to accumulation in the blood of acid metabolites, chiefly lactic acid. The above effects, developing parallel with progressive anoxia and circulatory and respiratory decompensation are, in accordance with the researches of *H e n d e r s o n* and *R a d l o f f*, indicative of marked intolerance to exposure to low O_2 tension.

The rise in blood lactic acid, which was found when breathing air of low O_2 content, at rest, in most of the members of the control group (average rise 4.8 mg.%, maximum rise 7.6 mg.%), and in two of the mountain climbers, having a low tolerance to hypoxaemic influences is partly the cause of the fall in alkali reserve. Increase in blood lactic acid, noted also by *B a r c r o f t*, *H a r t m a n n* and *M u r a l t*, and by *E d w a r d s* in the initial period of acclimatisation, may be considered as an auxiliary buffering mechanism protecting against excessive alkalosis under conditions of hypocapnia. The possibility of development of this "third line of buffering defence" (*A n r e p* and *C a n n o n*, *P e t e r s* and *V a n S l y k e*) is supported by experiments showing that blood lactic acid rises during alkalosis due to hyperpnoea, or to injection of sodium bicarbonate (*M a c L e o d*, *E g g l e t o n* and *E v a n s*, *A n r e p* and *C a n n o n*, *L o n g*). It appears that, apart from intensification of glycolytic process in the blood cells, as a source of the extra lactic acid (*H a r t m a n n* and *M u r a l t*), part of this rise is due to increased work of the respiratory muscles during hyperpnoea; indeed, *B o c k*, *D i l l* and *E d w a r d s* consider that this latter factor alone may account for increased blood lactic acid. Other mechanisms contributing to compensation of hypoxaemic alkalosis are renal excretion of part of the alkalis (*B a r c r o f t*, *H a l d a n e*, *S i n g e r*, *H a r t m a n n*, and *M u r a l t*), and passage of the bases liberated from com-

bination with CO_2 into the tissues (H e n d e r s o n and H a g g a r d). The insignificant changes in blood lactic acid in the group of mountain climbers, with a fall in alkali reserve little smaller than in the control group (0.32—4.77 vols. %), are evidence of the greater efficiency of these compensatory mechanisms in the group in question.

Table III.

Comparison of gaseous metabolism during work breathing normal air and 10% oxygen mixture.

Subject	Date	O ₂ Content of inspir. air %	Ventilation l/min	O ₂ Intake ml/min	Oxygen debt		O ₂ Intake ml/kgm	RQ
					ml	% total excess		
						O ₂		
Kar.	16.VI	20.9	26.2	1627	3119	34.3	3.03	0.79
	23.III	10.0	38.8	1332	2982	40.8	2.43	1.12
Buj.	22.VI	20.9	22.7	1335	2870	33.3	3.19	0.82
	27.III	10.0	33.7	1357	3621	38.9	3.45	0.98
Mus.	8.VI	20.9	26.3	1480	2884	34.0	3.14	0.90
	6.V	10.0	37.2	1109	2086	34.2	2.27	1.07
Now.	14.V	20.9	21.5	1240	1111	18.5	2.23	0.74
	9.V	10.0	26.9	909	2265	42.3	1.98	1.64

A physical effort equivalent to 540 kgm. per min., which under normal conditions raises pulmonary ventilation to 21.5—26.3 litres per min., and O₂ consumption to 1.2—1.6 litres per min., makes far more pronounced demands on the compensatory-regulatory arrangements when it takes place in a low O₂-containing atmosphere. The increased O₂ requirements due to physical effort raise pulmonary ventilation to 26.9—41.4 litres per min. in both groups. The highest value for pulmonary ventilation, as well as for O₂ intake, were found for those individuals who were least subject to hypoxaemia. In spite of the compensatory dilatation of the alveoli, observed by S c h u b e r t and C a m p b e l l, of the increased capillary surface of the lungs (K r o g h), and of the marked circulatory acceleration, together with increased supply of blood to the muscles, the minute O₂ intake is yet consistently lower than when the same effort is performed under normal conditions. A direct result of the

lowering of the oxygen content of arterial blood during physical effort performed in an O_2 -impoverished atmosphere was also the sub-normal total excess O_2 intake (the sum of that during muscular effort and that of oxygen debt), found in every case but one. The amount of the oxygen debt as determined at recovery under the same conditions of lowered O_2 tension, was not appreciably greater; Ewig and Hinsberg's view that a rise in the absolute O_2 debt takes place at high altitudes (above 3500 m.), as a result of inadequacy of the compensatory increase in minute volume of the heart, is thus not confirmed. The state of oxygen debt found by us, and corresponding with the analogous observations of Rühl, does not represent the actual magnitude of the O_2 debt, which could be determined only during rest in an ordinary atmosphere, or with O_2 administration. Only then, as has been shown by Rühl, does the additional excess O_2 intake appear, raising the total O_2 consumption due to work. The smaller actual O_2 intake during physical activity in hypoxaemic conditions, with the higher values obtained according to Rühl for the real O_2 debt, are indirect evidence that in muscular effort under hypoxaemic conditions an important part should be ascribed to exothermic anaerobic processes, similar to those associated with energetic processes in muscles working in anaerobic conditions.

A greater disproportion between O_2 requirements and actual supply, characteristic of muscular effort in an O_2 -impoverished atmosphere, is particularly clearly shown by the increase in the amount of the relative O_2 debt, expressed as a percentage of the total excess O_2 intake during work and rest (Table III). The lowering of the excess O_2 intake during work, in relation to the amount of the O_2 debt, is clear evidence of the inadequacy of the function of oxygen supply, aggravated in hypoxaemic conditions by the additional stress of muscular effort.

The fall in the rate of oxidation of the lactic acid formed, leading to an increase in its concentration in the blood, is a direct consequence of the greater O_2 deficit during muscular effort in hypoxaemia. The lactic acid content of the blood during work performed in a low O_2 atmosphere was 5.9—14.5 mg% higher

Table IV.

Changes in lactic acid content in venous blood during work when breathing normal air (20.9% O₂) and 10% oxygen mixture.

Subject	Date 1938	O ₂ content of inspir. air %	Lactic acid content of blood mg %	
			Rest	Work
Kar.	16.VI	20.9	16.34	24.44
	23.III	10.0	15.18	34.20
Buj.	22.VI	20.9	14.18	17.42
	27.III	10.0	10.13	28.76
Mus.	8.VI	20.9	11.87	21.81
	6.V	10.0	20.45	36.31
Now.	14.V	20.0	18.23	22.34
	9.V	10.0	27.81	28.28

than when the same effort was performed under normal conditions. The rise in the respiratory quotient, typical for hypoxaemia, and in most cases exceeding the value of 1.0, occurs not at the beginning of the period of recovery, as under normal conditions, but during the performance of the work. The high RQ is due both to the subnormal oxygen intake and to augmented CO₂ loss, resulting from elimination of CO₂ from bicarbonates by lactic acid diffusing into the blood stream from the muscles. During physical effort under normal conditions the supply of O₂ is greater, so that oxidation of the lactic acid produced takes place partly in the muscles, for which reason less enters the blood stream (Bang); the RQ either does not vary in these conditions, or even exhibits a tendency to fall, in those cases in which it was initially high. In normal conditions it is only after cessation of muscular effort that diffusion of lactic acid to the blood stream takes place to any considerable extent, leading to the expelling of CO₂ from bicarbonates, and to a corresponding rise in RQ. The inconsiderable fall in the high value of the respiratory quotient after cessation of muscular effort in hypoxaemic conditions would indicate that, in spite of previously greater diffusion of lactic acid to the blood stream, the process still continues at the beginning of the period of rest.

The fall in blood CO₂ content caused by muscular effort is, similarly to the above described changes, more marked in hy-

poxaemia, attaining values of 3.2—12.3% lower than the resting level in a normal atmosphere. An additional factor, increasing loss of CO₂ from the blood, and complementary to the process of expulsion of CO₂ from carbonates by lactic acid, is the hypoxaemic increase in pulmonary ventilation. The influence of this factor is particularly well marked in the group of mountain climbers, in whom the higher values of pulmonary ventilation for a given amount of work correspond with a parallel increase in saturation of venous blood with O₂, and lowering of its CO₂ content. The phenomenon of hypocapnia caused by increased pulmonary elimination of CO₂ is here manifested by the lowering of the CO₂ tension of the blood (by 1.4—16.7 mm. Hg). The lower blood CO₂ tension during effort in the group of mountain climbers (average 49.1 mm. Hg), as compared with the control group (average 55.0 mm.), is due to more efficient pulmonary ventilation (Table II).

The smaller degree of hyperpnoea, and the slower diffusion of lactic acid to the blood, together with the more rapid production of CO₂ from oxidation of lactic acid in the muscles, are probably the reasons why, in contrast to work during hypoxaemia, the CO₂ tension of the blood during performance of the same amount of work effort under normal atmospheric conditions actually increases (by 1.4—7.1 mm. Hg). The lower concentration of blood lactic acid also explains the smaller fall in alkali reserve in this case, varying in both groups by 1.2—3.73%. As to the acid-base equilibrium, the above changes find their expression in the lowering of blood pH (with one exception) to 7.26—7.29, as compared with 7.28—7.32 in resting conditions.

Under conditions of hypoxaemia, the changes caused by performance of the same work as in normal conditions lead to a greater fall in alkali reserve, amounting in the group of mountain climbers to 3.9—9.7% less than under resting conditions when breathing air containing 10% of O₂, and to 5.6—10% less than under resting conditions in a normal atmosphere (Table II).

The greater fall in alkali reserve during work in the group of mountain climbers (a fall of 4.28—8.37% of the resting

values in normal air, and of 3.47—6.87% of those in O₂ impoverished air) should be ascribed to more efficient compensation of hypoxaemic alkalosis, by renal excretion of the liberated bases. This mechanism, which supplements the effect of lactic acid produced during work, and acts in the same direction, only partly compensates the symptoms of hyperpnoeic hypocapnia. The pH_s of the blood, although lowered, exhibits in the group of mountain climbers (with one exception) a state of mild alkalosis, varying within the limits 7.28—7.38, as compared with the resting value of 7.27—7.35 in normal air (Table II).

The less uniform changes in acid-base equilibrium of the blood of individuals of the control group breathing air containing 10% of O₂ may be ascribed to greater individual differences in the degree of accumulation of lactic acid in the blood, and in the rate of elimination of CO₂. A comparison of the effects of performance of the same amount of work in ordinary and O₂ impoverished air allows of the establishment of definite differences as compared with the group of mountain climbers. In both individuals of the control group examined a more considerable rise in blood lactic acid during work in hypoxaemic conditions caused lowering of the pH_s of the blood, as compared with the initial normal value in ordinary air.

Not less characteristic differences are observed during work in adaptational changes in the function of O₂ transport and transference. The degree of saturation of blood with O₂ varies within very wide limits, being more considerably lowered by work in hypoxaemic than under normal conditions, yet the saturation of venous blood is higher in mountain climbers (17.0—39.4%, as compared with 12.4—26.3% in control individuals). The more efficient utilisation of the O₂ charge of the blood, together with the higher O₂ content of venous blood (average O₂ content 4.9—9.5%) are indirect evidence of the higher saturation with O₂ of the arterial blood of these individuals, and of its more efficient passage of O₂ into the tissues; due to the greater efficiency of the heart, and to the better capillarisation of the working muscles. The greater demands made on the available compensatory mechanism by muscular effort are evidenced by the increased O₂ combining capacity of the blood.

Table V.

Changes caused in certain properties of venous blood by work during breathing normal air and 10% oxygen mixture.

Group	Subject	O ₂ content of inspir. air %	O ₂ Capacity		CO ₂ Capacity (Alkali reserve) (T ₄₀) %		CO ₂ Content		pCO ₂ mmHg		pH _s	
			Rest	Work	Rest	Work	Rest	Work	Rest	Work	Rest	Work
Mountain climbers	Karp.	20.9	21.46	22.44	44.57	40.84	51.45	50.48	53.1	59.6	7.32	7.26
		10.0	22.74	24.38	45.01	35.30	49.94	39.86	44.3	39.7	7.39	7.34
	Buj.	20.9	21.16	22.82	47.53	43.87	54.20	55.76	56.1	63.2	7.32	7.29
		10.0	22.40	24.91	46.40	41.58	53.46	51.05	46.8	47.8	7.40	7.38
Control	Now.	20.9	21.46	22.53	44.84	43.64	52.16	50.36	54.7	56.1	7.31	7.29
		10.0	22.69	23.91	43.27	36.80	54.28	50.54	57.5	63.7	7.24	7.28
	Mus.	20.9	21.98	24.14	47.06	45.66	60.84	59.40	68.9	52.0	7.27	7.34
		10.0	22.70	23.36	39.27	38.25	52.17	49.98	64.0	57.0	7.32	7.23

This effect, which appears even at rest in cases of limited tolerance to hypoxaemia, becomes a typical response for all the members of both groups during muscular activity. (Table I).

The greater rise in O₂ combining capacity of the blood in the group of mountain climbers (amounting to 0.7—4.0%), confirming the analogous observations of Dill and McFarland, complete the characteristic set of signs of better adaptation to hypoxaemia. The increase in the O₂ combining capacity of the blood, which also occurs to a somewhat lesser degree during normal work, is a result of the increased amount of Hb in circulation, and, to some extent only, of the lowering of the CO₂ tension of the blood (Bohr's effect). The more intense degrees of hypocapnia are of far more definite importance during work in hypoxaemic conditions, still further raising the O₂-combining capacity of the blood.

The additional burdening of the circulatory function in hypoxaemia, connected with muscular effort, was manifested

during the recovery period (25 min.) by acceleration of the pulse rate, amounting in the group of mountain climbers to 125% of the resting value in low oxygen tension, and to 107% in the control group. Arrhythmia was noted in a few cases. Complete return to the initial pulse rate was not attained during the period of observation of recovery after work in conditions of hypoxaemia. The rise in arterial blood pressure, and the time required for the return to normal of the latter, following physical effort showed wide variations, probably due to increased lability of the vasomotor centre in hypoxaemia (Barcroft, Ewig and Hinsberg). In most cases systolic pressure fell during the last minute of the period of recovery (25 min.), to values lower than those found towards the close of experiments on resting subjects in hypoxaemic conditions. Less uniform results were obtained for return to initial diastolic pressure (hypoxaemic).

No more considerable changes due to work under conditions of O_2 deficit were found in the electrocardiogram, probably owing to this being taken rather late (9—20 min.) after return to normal air. Apart from the prolongation of accelerated pulse rate, prolonged evolution of the heart was observed in only four cases. The most typical changes are shortening of the S—T interval (prolongation in two cases). In most cases the T wave is prolonged. In two cases inversion of all the waves of the electrocardiogram took place. These changes allow us to draw the conclusion that any changes in the functioning of the auricular-ventricular system which might have been caused by the degree of hypoxaemia applied in our experiments must have undergone rapid regression in the individuals observed.

A discussion of the physiological changes noted by us, from the point of view of individual tolerance to lowering of the O_2 tension in the air breathed, would not be complete without taking into consideration changes in the appearance and behaviour of the subjects, as well as their subjective experiences. In this respect we are entirely in agreement with Keys and his co-workers, who, in a paper we received after the conclusion of the present research, expressed the opinion that

close observation of individuals exposed to low oxygen pressures affords very valuable complementary material as to the course of the process of adaptation, being on the whole in good agreement with objective data. Such data on the subjective symptoms of hypoxaemia might be summarized as follows. Certain of the control group reported that, with rapid transition to an atmosphere containing 10% of O₂, they experienced vertigo, a feeling of pressure in the frontal regions of the head, frequent visual disturbances in the form of motes appearing before the eyes, and darkening of the field of vision, feeling of cold, and somnolence. To these were added during muscular effort speedier or tardier muscular weakness, shortness of breath, palpitation, and copious perspiration. Objectively, cyanosis is observed, passing through various degrees of intensity from a pink to a puce coloration, and changing to paleness in more acute anoxia. In some cases the subjects were agitated, or exhibited tonic and clonic contractions, not being able, for instance owing to contraction of the digital muscles, properly to hold or manipulate a pencil. After return to ordinary air a few cases were noted in which the subjects were unable to walk straight. The severity and frequency of incidence of these symptoms were distinctly greater in the control group. Readier adaptation to acute hypoxaemia of the group of mountain climbers was also evidenced by their higher output of standardised muscular work. In spite of their superior physical training, 3 individuals of the control group breathing 10% O₂ at rest, and one after working for 68 sec., were obliged to interrupt the experiment, owing to loss of consciousness and to development of symptoms of acute decompensation. Only one such case (Kaw.) was noted in the group of mountain climbers, to whom ordinary air had to be given after he had been working for 1 min.

Conclusions.

1°. The physiological characteristic of individuals who had frequently been exposed to low atmospheric pressures whilst mountaineering resembles that typical of the condition of training for physical efforts of the endurance type.

A greater or smaller degree of similarity between the functional characteristics (at rest, under ordinary atmospheric pressure) was manifested: (a) in the more economical, and the same time more efficient ventilation of the lungs, with a somewhat lower respiratory rate, (b) in the tendency to bradycardia and to systolic hypotension, with slight enlargement of the left ventricle of the heart, (c) higher alkalinity of venous blood, (d) lower blood lactic acid content, (e) lower basal metabolic level.

2°. Having ascertained the typical reaction of the organism to hypoxaemia, we found that the functional changes appearing in the group of mountain climbers when transferred to air containing 10% of O_2 differed from those observed in the control group of healthy, well trained individuals in the following respects: (a) better utilisation of O_2 from inspired air, with a smaller rise in RQ, (b) a higher O_2 content of the venous blood, at a higher degree of saturation with O_2 , and a smaller rise in O_2 -combining capacity, (c) a smaller fall in alkali reserve, (d) absence of significant changes in blood lactic acid content, (e) a greater rise in venous blood pH, (f) a smaller acceleration of the pulse rate, and less frequent cases of arrhythmia.

3°. The functional changes caused by standardised physical effort performed in 10% O_2 differed from those found in the control group in the following particulars: (a) a higher O_2 content of venous blood, with a higher degree of saturation with O_2 , (b) a greater increase in blood O_2 -combining capacity, (c) a more considerable lowering of the CO_2 tension of the blood, and a greater fall in alkali reserve.

4°. The members of the group of mountain climbers showed higher ability to perform muscular work in hypoxaemic conditions, and had less marked signs of fatigue, cyanosis, dyspnoea, and hyperidrosis; a number of subjective signs of somatic and sensory disorders were also less evident. None of the members of this group exhibited signs of impending loss of consciousness, or of acute breakdown of the circulatory and respiratory functions, when exposed to low oxygen tension.

References.

- Anrep G. V. and R. K. Cannan. 1923. *J. Physiol.* 58 (244). — Bang O. 1934. *Arb. physiol.* 7 (544). — Barcroft J. 1928. Respiratory function of the blood. — Benzinger T. H. 1938. *Erg. der Physiol.* 40 (1). — Besserer G. 1937. *Luftfahrtmed.* 1 (301). — Bock A. V., D. B. Dill and H. T. Edwards. 1932. *J. clin. Invest.* 11 (775). — Borgard W. 1936. *Arb. physiol.* 9 (308). — Christensen E. H. und E. Nielsen. 1936. *Skand. Arch.* 75 (149). — Comroe J. 1938. XVI Intern. Physiol. Kongress. Zürich. — Cordier D. et C. Heymans. 1935. *Ann. de Physiol.* 11 (535). — Dallwig H., A. Kells and A. Loevenhart. 1916. *Am. J. Physiol.* 39 (77). — Dill D. B. 1938. Life, heat, and altitude. Cambridge. — Dill D. B., E. H. Christensen and H. T. Edwards. 1936. *Am. J. Physiol.* 115 (530). — Dill D. B., H. T. Edwards and S. A. Foelling. 1931. *J. Physiol.* 71 (47). — Dill D. B., H. T. Edwards, S. A. Foelling, A. Oberg, J. Pappenheimer and J. Talbott. 1931. *J. Physiol.* 71 (47). — Edwards H. T. 1936. *Am. J. Physiol.* 116 (367). — Eggleton M. G. and C. L. Evans. 1930. *J. Physiol.* 70. — Ewig W. und K. Hinsberg. 1931. *Ztschr. für klin. Med.* 115 (732). — Gesell R. 1929. *Erg. Physiol.* 28 (340). — Gollwitzer-Meier K. 1928. *Pflüg. Arch.* 220 (434). — Graybiel A., Missiuro W., D. B. Dill and H. T. Edwards. 1937. *J. Aviat. Med.* 8 Nr. 4. — Grollman A. 1930. *Am. J. Physiol.* 93 (19). — Haldane J. S., A. M. Kellas and E. L. Kennaway. 1919—1920. *J. Physiol.* 53 (181). — Hartmann H. 1936. *Luftfahrtmed.* 1 (2). — Hartmann H. und A. von Muralt. 1934. *Bioch. Ztschr.* 271 (74). — Hasselbalch K. und J. Lindhard. 1915. *Bioch. Ztschr.* 68 (265). — Henderson Y. and H. W. Haggard. 1918. *J. biol. Chem.* 33 (333, 345, 355). — Herbst R. 1936. *Luftfahrtmed.* 1 (220). — Herbst R. 1936. *Arb. physiol.* 9 (166). — Herxheimer H., R. Kost and K. Ryjczek. 1933. *Arb. physiol.* 7 (308). — Kestner O. und H. Schadow. 1927. *Pflüg. Arch.* 217 (492). — Keys A. 1938. *Am. J. Physiol.* 124 (13). — Keys A., F. G. Hall and E. S. Guzman Barron. 1936. *Am. J. Physiol.* 115 (292). — Lilienstrand. 1925. *Hndb. norm. pathol. Physiol.* 2 (190). — Long L. 1924. *J. Physiol.* 58 (455). — Lutz B. and E. Schneider. 1919. *Am. J. Physiol.* 50 (227). — Missiuro W. 1932. *Przegl. Fizjol. Ruchu.* 4 (143). — MacFarland and D. B. Dill. 1938. *J. Aviat. Med.* 1. — Nielsen E. 1936. *Skand. Arch.* 74 (83). — Opitz E. und O. Tillman. 1936. *Luftfahrtmed.* 1 (153). — Opitz E. und O. Tillman. 1938. *Luftfahrtmed.* 2 (94). — Peters J. and Van Slyke. 1932. *Quant. Clin. Chemistry.* 1932. — Rein H. 1938. *Luftfahrtmed.* 2 (158). — Rühl A. 1937. *Luftfahrtmed.* 1 (241). — Schneider E. C. and Truesdell. 1921. *Am. J. Physiol.* 55 (223). — Singer W. 1929. *Ztschr. exp. Med.* 66 (45). — Talbott J. and D. B. Dill. 1936. *Am. J. Med. Sciences.* 192 (626). — Talenti C. 1927. *Arch. Sc. Biol.* 10. — Winterstein H. 1928. *Pflüg. Arch.* 219.

[Institut de Physiologie de l'Université de Cracovie].

Kornel Gibiński.

**L'influence du changement de milieu, spécialement de la
pression atmosphérique et de la température, sur le sang de
*Rana esculenta.***

Présenté dans séance du 2.XII.1938 de la Société Polonaise de Physiologie,
Section de Cracovie.

I.

Les expériences, que nous décrivons ci — après ont pour objet l'action, qu'exerce le changement de milieu sur le sang de grenouille. Les animaux furent répartis en trois lots. Le premier lot était exposé à l'air, mais privé d'eau, le second — à une température élevée dans l'eau et hors de l'eau, le troisième enfin subissait l'action d'une pression atmosphérique diminuée, soit dans l'eau, soit hors de l'eau.

Vu le caractère cyclique des changements qui se produisent dans le sang des grenouilles, il importe de comparer les résultats de toutes les expériences avec les épreuves exécutées à la même époque de l'année dans les conditions normales. Désirant nous renseigner, si les grenouilles qui séjournent au laboratoire en hiver, ne présentent pas de différences avec celles qui passent la saison froide dans des conditions naturelles, nous avons également étudié un lot de grenouilles, vivant en hiver dans leur milieu habituel.

Toutes les recherches concernant *R. esculenta* ont été exécutées en été sur des grenouilles fraîchement capturées, tandis qu'en hiver on opérait sur des échantillons gardés au laboratoire. Le sang était prélevé de la *V. cutanea magna*, et on évitait de le mélanger avec les liquides tissulaires. Dans les recherches cytologiques, je me servais de frottis colorés d'après

M a y - G r ü n w a l d. Les prises quotidiennes de sang font diminuer le nombre des globules rouges; or, en allongeant successivement les intervalles entre les prises, j'ai constaté qu'après 3—4 jours environ, le nombre d'hématies revient au niveau constant. Pour déceler les différences et les erreurs possibles des expériences j'ai compté les hématies en employant divers mélangeurs et différents appareils à compter de B ü r k e r, et surtout en prélevant le sang à deux reprises chaque fois. La différence n'était jamais supérieure à 15%. Les résultats obtenus dans la suite sont probablement plus exacts, car je me servais toujours du même mélangeur et du même appareil.

Des nombreux hématologues ont étudié la morphologie du sang de grenouille. Ils distinguent trois genres d'éléments morphotiques: les hématies, les globules blancs et les cellules fuselées. Les fonctions maximales de la moelle osseuse coïncident avec les dernières semaines du printemps et avec le commencement de l'été. L'activité de la moelle diminue ensuite et cesse complètement en hiver d'après M a r q u i s (1); selon N e u m a n n (1), les cellules fuselées peuvent être formées en hiver également. Tous les auteurs admettent enfin que les hématies peuvent se multiplier par division indirecte dans le sang périphérique. Au cours de mes expériences, j'ai observé dans le sang des globules rouges sans noyaux, dont parlent certains travaux consacrés aux Batraciens. Selon les auteurs, on ne les rencontre chez *R. esculenta*, qu'avant, jamais après la métamorphose. En décrivant le sang de *R. esc.*, K l i e n e b e r g e r et C a r l (2) n'en font en général pas mention dans leur „Blutmorphologie”.

Le nombre d'hématies varie très sensiblement chez la grenouille, suivant les auteurs qui les ont comptées. Z e p p (3) souligne l'influence de la saison sur les variations qui se produisent dans le sang, mais c'est en définitive H e e s e n (4) qui réunit les résultats de ses longues recherches et traça une courbe des variations du nombre d'érythrocytes dans le sang durant toute l'année (v. fig. 1).

Après avoir examiné pendant deux ans plus de deux cents grenouilles, j'ai obtenu une courbe qui se rapproche beaucoup de celle de H e e s e n (v. fig. 2). Nous y voyons deux élévations

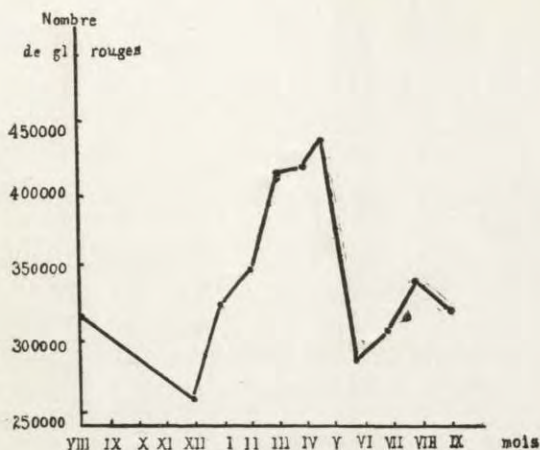


Fig. 1. Variations du nombre de globules rouges chez *Rana esculenta* d'après Heesen.

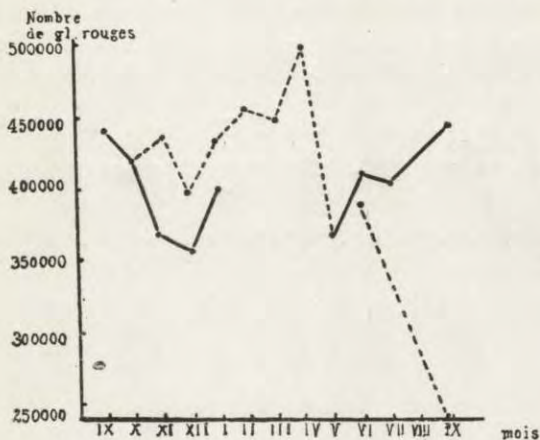


Fig. 2. Variations du nombre de globules rouges chez *Rana esculenta* dans les conditions naturelles et au laboratoire. Trait continu — grenouilles en liberté; trait interrompu — grenouilles gardées au laboratoire.

distinctes. La plus grande augmentation du nombre d'hématies a lieu en mars et en avril, une autre, plus faible, se produit en août et en septembre. En comparant ces deux courbes avec celles que Heesen a tracées pour *R. fusca* et *Bufo vulg.*, puis avec la courbe de Holzappel (5) pour *R. pipiens*, nous aboutissons à la conclusion qu'un tracé onduleux semblable est caractéristique pour toutes les grenouilles. Il résulte de ces ta-

bleaux qu'il faut toujours tenir compte de la saison, lorsqu'il s'agit de déterminer le nombre de globules rouges. Il faut dire enfin, d'accord avec *Holzappel*, que chez les grenouilles qui ont passé l'hiver au laboratoire le rythme saisonnier est assez fidèlement conservé.

Si l'on veut comprendre pourquoi le maximum de la première onde coïncide avec les mois d'août et septembre, il suffit de ne pas perdre de vue la périodicité de l'activité de la moelle osseuse. La seconde augmentation ne peut s'expliquer par l'hématopoïèse augmentée. La prompté élévation et, plus encore, la baisse rapide de cette courbe, semblent indiquer qu'il s'agit d'un décalage de l'eau en deux sens.

J'ai remarqué la première fois les hématies dépourvues de noyaux dans le sang de grenouilles exposées à une pression atmosphérique réduite. Dans les expériences de contrôle, j'en ai trouvé également chez les individus qu'on n'avait pas soumis aux épreuves. On les décèle plus souvent en hiver qu'en été, quoique pas régulièrement et en petite quantité. La quantité de



Fig. 3. Différentes formes de globules rouges, trouvés dans le sang de *R. esculenta*.



Fig. 4. Globules rouges sans noyaux.

ces globules augmente dans certains conditions physiologiques (v. plus bas). Il faut donc les considérer comme des éléments morphotiques constants du sang de grenouille, comme le sont p. ex. les basophiles. On en distingue deux espèces: les uns correspondent par leur forme et leurs dimensions aux globules rouges nucléés, tandis que les autres, plus petits, affectent des formes plus variées.

Nous avons étudié l'influence de la perte d'eau dans des conditions diverses; les voici: 1) les grenouilles privées d'eau

vivaient à l'air, à une température de laboratoire, 2) elles séjournèrent dans une température de 30°C, 3) elles étaient exposées à une pression atmosphérique réduite. Dans tous ces cas, où l'évaporation était plus ou moins forte, on put constater une augmentation considérable du nombre d'hématies. Comme, outre la perte d'eau, d'autres facteurs pouvaient intervenir dans ces conditions artificielles, j'ai fait en même temps les expériences de contrôle sur des grenouilles vivant dans l'eau. Ces dernières recherches, élargies dans la suite, ont également servi à étudier l'influence de la température seule, ou de la pression réduite. Étant donné que ce n'est qu'en privant les grenouilles de nourriture en été, que l'on parvient, à ce qu'il semble, à diminuer le nombre d'hématies, il fallait répartir les résultats en deux catégories dont une comprenait les résultats obtenus en été, l'autre en hiver. La température élevée en été ne fait pas varier le nombre d'érythrocytes; ce nombre subit néanmoins à cette saison une diminution parfois très sensible. Il faut attribuer ces variations au manque de nourriture et en partie, à l'hydrémie, conséquence du métabolisme plus intense à une température relativement élevée.

Pour étudier l'action d'une pression atmosphérique réduite, j'ai gardé les grenouilles dans l'eau dans une caisse hermétiquement close communiquant avec une pompe aspirante, munie d'un mécanisme automatique, réglant la pression de l'air qui traversait la caisse. La baisse de la pression était de 300 mm de mercure dans le plus grand nombre d'expériences. Quant à la durée du séjour des animaux dans ces conditions, elle variait de deux heures à 14 jours. En outre, plusieurs grenouilles furent exposées pendant les mois d'été à une pression réduite de 200 et de 400 mm Hg. Je n'ai pu déceler au cours de ces expériences l'érythrocytose (15—18%), constatée par Bonnet et Cardot (6). Pendant les mois d'hiver, tout comme durant les mois d'été, il se manifeste plutôt une tendance à une dilution du sang, parfois assez considérable. Il n'y a pas de rapport exact entre la durée du séjour dans la caisse et les variations du sang. En contrôlant en même temps les poids des grenouilles on note une augmentation nette du poids chez les animaux gardés sous la pompe, tandis que d'ordinaire on observe une

diminution du poids par suite de l'absence de nourriture. L'absorption et la rétention d'eau par la grenouille pourrait expliquer cette augmentation de poids. Au cours de ces troubles du métabolisme hydrique, nous pouvons évidemment observer de l'hydrémie et s'il y avait une augmentation de l'hématopoïèse, elle pourrait ne pas se traduire par le nombre de globules rouges dans le sang circulant.

À une pression diminuée seulement de 200 mm Hg, je n'ai pas trouvé des variations plus considérables. Nous n'observons ici ni rétention d'eau, ni augmentation de poids, à l'exception d'un cas où cette augmentation est apparue à peine après une semaine, en même temps qu'une forte dilution du sang.

Dès que la pression fut réduite de 400mm Hg, la plus grande dilution du sang et l'augmentation de poids s'opéraient déjà après le premier jour et diminuaient de plus en plus pendant la prolongation de la durée des expériences.

Les globules rouges anuclées, dont j'ai parlé déjà, peuvent être observés plus souvent sur les frottis de sang des grenouilles gardées à une pression réduite, que chez les animaux vivant dans les conditions ordinaires. Sur chaque frottis (j'en ai fait 10). on voit un certain nombre de ces globules à côté de différentes formes qui peuvent expliquer leur origine (v. fig. 5).



Fig. 5. Reconstitution de la division d'une hématie en deux parties, l'une avec noyau, l'autre sans noyau. D'après les différentes phases de la division fixées sur les frottis.

On a observé également des globules pareils chez trois grenouilles après une forte saignée.

Après avoir coupé unè des branchies d'*Amblymostoma mexicanum*, S ł o n i m s k i (7) a trouvé un plus grand nombre des ces „érythroplastides”.

Dans tous ces cas — là nous avons affaire à de l'anoxémie qui semble augmenter ou favoriser la production des hématies privées de noyau.

Tenant compte de cette circonstance, on prévoyait que chez les grenouilles qui passent l'hiver dans leur milieu naturel dont l'action produit de l'anoxémie, on découvrirait une plus grande quantité d'érythroplastides, croissante avec le temps. Ces prévisions se montrèrent justes; on trouva en effet, vers la fin de l'hiver une quantité assez fortement augmentée de ces hématies.

Bibliographie.

- 1) Gaupp. Anatomie des Frosches 1904. I. 2. — 2) Klieneberger und Carl. Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. Leipzig 1912 et 1927. — 3) Zepf. Beiträge zur vergleichenden Untersuchungen der heimischen Froscharten. Zeitschr. ges. Anatomie. Abt. Anat und Entwicklung. 69. 1923. — 4) Heesen. Zahlverhältnis der roten und weissen Blutkörperchen der heimischen Amphibien im Wechsel der Jahreszeiten. Zeitschr. f. vergl. Physiol. 1. 1924. — 5) Holzappel. The cyclic character of hibernation in frogs. The Quarterly Rev. of Biol. 12. 1937. — 6) Bonnet et Cardot. Variations du nombre de globules rouges dans le sang circulant des Batraciens et des Poissons. Annales de Physiol. 5. 1929. — 7) Słonimski. Zur Kenntnis der kernlosen, roten Blutkörperchen bei Amphibien. Arch. exper. Zellforsch. 19. 1937.

[Physiologisches Institut der Universität Kraków].

Jerzy Kaulbersz.

Blut unter dem Einfluss klimatischer Änderungen.

Vorgestellt in der Sitzung der Abteilung Kraków der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 24.VI.1938.

Auf der Fahrt nach Südamerika sowie während der Rückreise und eines fast 5-monatlichen Aufenthaltes in verschiedenen klimatischen Zonen Südamerikas wurden Blutkörperchen und Hämoglobinbestimmungen an einer und derselben Person (mir selbst) vorgenommen (Bürker'sche Kammer, jede Berechnung — Mittelzahl aus 3 aufeinanderfolgenden Zählungen, Hämoglobinometer nach Autenrieth-Königsberger, Hellige's Ausführung). Rasch aufeinanderfolgende klimatische Änderungen auf See und Land, wie auch der Übergang von der Nordsee in die Tropen- und Aequatorgegend, von den Tropen in das kühle Feuerland, die darauffolgende Rückkehr in die Tropengegend des nördlichen Argentiniens bei Tucuman, wurden als Wärme- und Kältereize mit event. Berücksichtigung des Einflusses des Meeresklima betrachtet und ihre Wirkung auf die Blutzusammensetzung studiert. Da die Rückreise nach längerem mehrmaligen Aufenthalt auf dem südamerikanischen Hochplateau erfolgte, wurde diesem Umstand bei Deutung der Zählungen in der Aequator- und Tropengegend Rechnung getragen.

Aus den Arbeiten Barbour's und seiner Schüler (1 und 2) sind wir über den Einfluss den die Wärme auf den Wasserhaushalt ausübt, unterrichtet. Hunde, die im Warmbad von 37—40° oder bei Lufttemperatur zwischen 27 und 39° gehalten wurden, wiesen bei konstanter Körpertemperatur Blutverdünnung, in einem Bad dagegen über 42° und auch oberhalb derselben trockenen Lufttemperatur Blutverdichtung mit gleich-

zeitiger Erhöhung der Eigentemperatur auf. Bei feuchter Luft erfolgte Konzentration des Blutes und Steigerung der Körpertemperatur schon oberhalb 33°C. In einem kühlen Bad, in dem es nicht zum Abfall der Eigentemperatur kam, fand auch Blutverdichtung statt. Tiere, denen Wärmeregulationszentren zerstört worden sind, wiesen diese Blutänderungen nicht auf und wurden bald bei Änderungen der äusseren Temperatur poikilothermisch.

Auch bei Menschen ist eine Verdünnung des Blutes unter Wärmeeinfluss beobachtet worden, sowohl im Warmbad (B a z e t t) wie in warmer Luft (B a r b o u r 3, 4). Diese Verdünnung bezieht sich nicht nur auf das ganze Blut, sondern auch auf das Serum, wie aus gleichzeitigen Bestimmungen des Eiweiss-, Salz- und ganzen Trockengehaltes des Serums sowie seines spezifischen Gewichtes hervorgeht, kann somit nicht auf einem Verlust der Blk. vom Kreislauf, sondern auf einer Vergrösserung der Gesamtmenge der Flüssigkeit in den Blutgefässen beruhen. B a r c r o f t und M i t a r b. (5) haben solche Vergrösserung der Gesamtmenge des Blutes in der Tropengegend mit Hilfe der Inhalationsmethode bei den Teilnehmern der Andenexpedition festgestellt. Unmittelbar nach grossen körperlichen Anstrengungen konnte ich (6) beim Menschen sowohl in der Ebene, wie im Höhenklima, Blutverdünnung bei konstanter Körpertemperatur und Blutverdickung bei Erhöhung derselben finden.

Da während meiner Reise verschiedene klimatische Zonen auch auf dem Meere passiert wurden, muss der Einfluss des Meeresklimas auf das Blut mitberücksichtigt werden. Dieses ist vor allem durch eine intensivere Strahlung ausgezeichnet, indem die von der Wasserfläche reflektierten Strahlen sich zu der direkten Bestrahlung hinzuaddieren. Es kommt unter dem Einfluss des so verstärkten Ultraviolettlichtes zu einer Vermehrung der roten Blk. und des Hb., die aber bei Gesunden nicht bedeutend ist, dagegen bei anämischen Kindern recht gross sein kann (7). Diese, die blutbildenden Organe erregende Wirkung tritt aber nur an den nördlichen Meeren zu Tage, an den südlichen Seen stört der Wärmefaktor diese Wirkung und es kann im Gegenteil zur Erniedrigung des Stoffwechsels und zur Verdünnung des

Blutes kommen, wodurch eine Senkung der Blkzahl und des Hb. eintritt.

Auf der Fahrt von Gdynia nach Rio de Janeiro habe ich nach normalen an der Ost- und Nordsee erhaltenen Werten zunächst eine deutliche Blk.- und Hämoglobinsenkung schon von der Gibraltarbreite beginnend gefunden. Während an der Nordsee 4.900.000 Blk. und 100% Hb. gemessen wurden (s. Figur 1), fielen die Zahlen vor Dakar auf 4.400.000 Blk. und 88% Hb., stiegen dann wieder am Aequator auf 4.600.000 Blk. und 90% Hb. Wenn man bedenkt dass im August zur Zeit meiner Reise diejenige stelle, in der die Mittagssonne am Zenit steht, zwischen Aequator und dem Wendekreis des Krebses liegt und die Temperatur bei Dakar am höchsten war (28° in der Cabine), während es in der Aequatorgegend schon etwas kühler geworden ist (25°C.), wird man geneigt sein zu schliessen, dass hier dem Wärmefactor der entscheidende Einfluss zukommt.

Weiter im Innern Brasiliens nahe der Paraguay — Brasilianischen Grenze an den Parana — Wasserfällen Sete Quedas, die etwas südlich vom Wendekreis des Stiers liegen, habe ich während eines wöchentlichen Aufenthaltes Ende September 1937

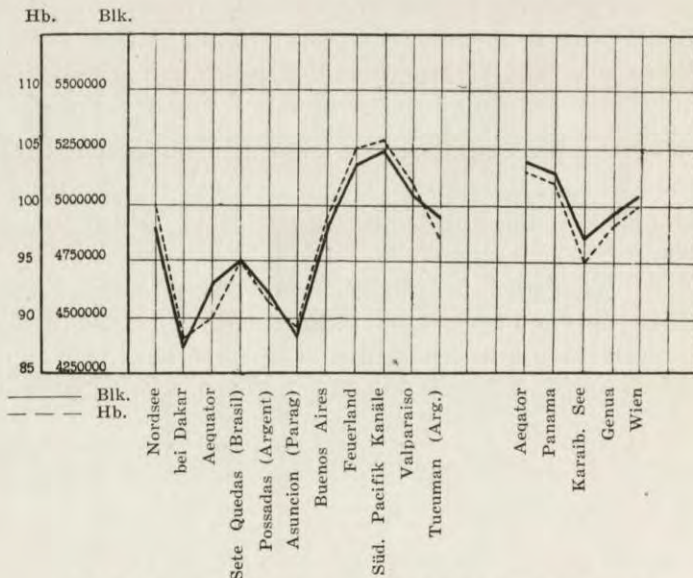


Fig. 1. Blk. und Hb.-Änderungen auf der Reise durch die Tropen.

bei einer äusseren Temperatur von 20°C. mehrere Untersuchungen an mir vornehmen können. Als Mittel von 15 Zählungen ergab sich 4.750.000 Blk. und 95% Hb. Bald darauf Anfang Oktober südlich von den Iguassu Wasserfällen in Misiones (Argentinien) und im Paraguay stieg die Tagestemperatur auf 26°C. und ich erhielt in Possadas 4.600.000 Blk. und 92% Hb., in Asuncion (Paraguay) sogar nur 4.450.000 Blk. und 89% Hb.

In Buenos Aires Mitte Oktober bei einer mittleren Temperatur von 16° fand ich 4.950.000 Blk. und 98% Hb., Ende Oktober im Feuerland (Rio Grande) bei einer Temperatur von 8°C. — 5.200.000 Blk. und 105% Hb., was eine bedeutende Vermehrung im Vergleich zu den in den Tropen gewonnenen Werten darstellte. Noch etwas höhere Zahlen konnten Anfang November auf dem Dampfer zwischen Magallanes und Puerto Montt (südl. Chile) während der Fahrt durch die südl. Pacifikkanäle bei einer Temperatur von 5°C. ermittelt werden — 5.250.000 Blk. und 106% Hb. Möglich, dass hier der Einfluss des kühlen südlichen Meeresklima auch mitgewirkt hat. Dagegen ist schon bei der Ankunft in Valparaiso mit der Bahn von Puerto Montt aus — am 22. November bei 20°C. eine Senkung der Blk. auf 5.050.000 und des Hb. auf 102% zu verzeichnen gewesen. Als ich später Anfang Dezember via Mendoza, Buenos Aires, Cordoba, nach Tucuman im nördlichen Argentinien kam, sind die Werte bis auf 4.750.000 Blk. und 97% Hb. weiter gesunken.

Die darauffolgenden Blutuntersuchungen, die im grösseren Umfange ausgeführt wurden und hauptsächlich die Blutgase bei den Einheimischen und Einwanderern betrafen, beziehen sich auf die Bewohner des südamerikanischen Hochplateau Bolivien's und Peru's, worüber in einer anderen Arbeit berichtet wurde (8).

Auf der Rückreise ist der Aequator auf dem Stillen Ocean am 3 Tag nach letztem Höhengaufenthalt (in der Republik Ecuador) bei einer Temperatur von 24° durchquert worden und es wurden 5.200.000 Blk. und 103% Hb. gezählt. Die verhältnissmässig hohen Zahlen sind wohl noch auf den unmittelbar vorausgegangenen Höhengaufenthalt zu beziehen. Fast dieselben Werte hielten noch nach 2 weiteren Tagen während der Durchfahrt durch den Panama-Kanal (5.150.000 Blk. und 102% Hb.)

an, doch ist schon 2 Tage später am Karaibischen See Anfang Februar bei einer Temperatur von 26°C. eine Senkung auf 4.850.000 Blk. und 95% Hb. eingetreten, die bis zur Überquerung des Wendekreises des Krebses am Atlantischen Ozean anhielt. Später auf der weiteren Fahrt nach Europa Mitte Februar 1938 folgte bei gleichzeitig bedeutendem Temperatursturz eine Erhöhung: in Genua bei 13° — 4.950.000 Blk. und 98% Hb. In Wien zählte ich einige Tage später bei + 4° 5.050.000 Blk. und 100% Hb.

Der Färbeindex blieb bei allen diesen unter dem Temperatureinfluss stattfindenden Abweichungen unverändert im Gegensatz zu seiner deutlichen Erniedrigung im Höhenklima.

Meine Ernährung während der Reise ist keinen grösseren Schwankungen unterworfen gewesen.

Ausser den an mir selbst in verschiedenen klimatischen Zonen vorgenommenen Untersuchungen habe ich in den subtropisch gelegen polnischen Kolonien Nordargentiniens (Misiones) an 8 Kolonisten und seinen Kindern (alle männlichen Geschlechtes) Blk. und Hb. — mengen untersucht und beide niedriger als es der Norm entspricht, gefunden. Blk. werte schwankten zwischen 4.500.000 und 4.750.000 Hb. werte zwischen 82 und 95%. Obwohl E i j k m a n, v a n d e r S c h e e r u. a. (9) bei den Malaien und anderen Tropenbewohnern keine Abweichungen von der Norm in den Blk. und Hb. werten im Vergleich zu den Bewohnern der mässigen Zonen vorfanden, so sind doch diese niedrigen Zahlen bei den polnischen Kolonisten bemerkenswert. Bei vielen unter ihnen, besonders bei den dort geborenen Kindern fällt oft die blass-gelbe Gesichtsfarbe und nicht selten eine mangelhafte Entwicklung auf. Es ist doch möglich, dass die Blutkörperchenarmut hier eine wesentliche Ursache darstellt. Interessant wäre bei allen diesen Untersuchungen gleichzeitige Bestimmung der Gesamtblutmenge.

Das Hauptergebniss dieser Mitteilung ist der Befund einer parallelen Blk- und Hb-senkung in warmen, einer Erhöhung in kühlen Gegenden. Die höheren Zahlen auf der Rückreise sind wohl als Folge einer noch nicht ganz abgeklungenen Höhenwirkung zu deuten.

Literatur.

- 1) Barbour. Amer. Journ. of Physiol. 67. 1923—4. 366. — 2) Barbour and Tolstoi. Amer. Journ. of Physiol. 67. 1923—4. 378. — 3) Barbour, Loomis, Frankmann, Warner. Journ. of Physiol. 59. 1922. 300. — 4) Barbour, Dawson ad Neuwirth. Amer. Journ. of Physiol. 74. 1925. 204. — 5) Barcroft, Binger, Bock, Doggart, Forbes, Harrop Meakins. Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B. 211. 1923. 351. — 6) Kaulbersz J. Journal de Physiol. et de Pathol. génér. 26. 1928. 616. — 7) C. Haberlin, O. Kestner, F. Lehmann, E. Wilbrand und B. Georges. Kl. Wschrft. 1923. 2020. 8) Kaulbersz J. Acta Biol. Exper. 13. 1939. — 9) Nach Loewy: Handbuch der Balneologie und Klimatologie. Lpzg. Bd. 3. 1924.

[Institut für medizinische Chemie der Universität in Lwów.
Direktor: Prof. Dr. J. K. Parnas].

Tadeusz Baranowski.

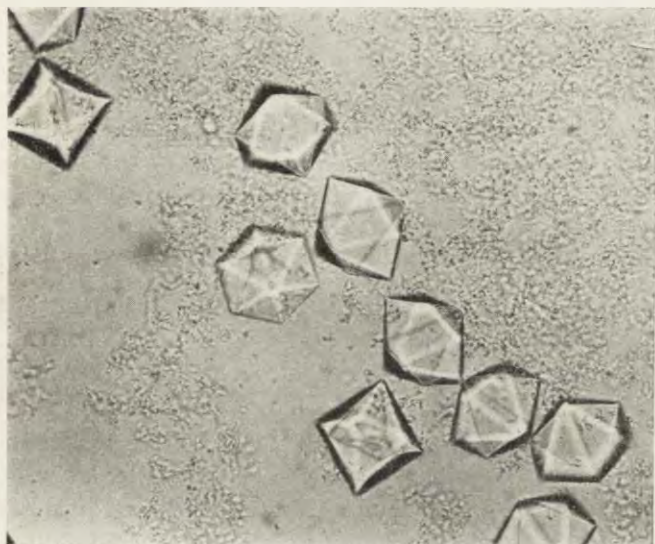
Über die Krystallisation von Myogen.

Vorgestellt in der Sitzung der Abteilung Lwów der Polnischen Physiologischen Gesellschaft
am 4.II.1939.

Die vorliegende Arbeit entstand im Laufe von Versuchen zur Fraktionierung von phosphatübertragenden Muskelenzymen. Wässrige Extrakte aus Kaninchenmuskulatur wurden mit Ammoniumsulphat ausgesalzen und von einem Teil des Eiweiss durch Koagulation bei 52° befreit; der so gereinigte Extrakt wurde mit Ammoniumsulphat gesättigt, das gefällte Eiweiss in einer kleinen Menge Wasser gelöst, so dass die Konzentration 20-fach höher war, als zuvor. Der konzentrierte Extrakt blieb im Eisschrank aufbewahrt; nach drei Wochen hatte sich in ihm ein Niederschlag gebildet, welcher sich bei der mikroskopischen Untersuchung als krystallisiert erwies. Diese Krystalle erinnerten an die Sumner'schen Ureasekrystalle, waren aber bedeutend grösser. Da der Extrakt Nichts ausser Eiweiss und Ammoniumsulphat enthielt, letzteres in einem Sättigungsgrad von nur 0.45, so erschien es wahrscheinlich, dass die Krystalle aus Eiweiss bestehen. Der krystalline Niederschlag wurde abzentrifugiert und fünfmal mit Ammoniumsulphat (Sättigungsgrad 0.5) bei Zimmertemperatur gewaschen. Die gewaschenen Krystalle lösten sich leicht im Wasser; die klare Lösung gab selbst nach grosser Verdünnung starke Eiweissreaktionen.

Ein Teil dieser Lösung wurde 18 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert, das pH der Lösung dann auf 5.9 gebracht und Ammoniumsulphat in Substanz bis zur leichten Trübung zugesetzt; diese entstand in der Regel bei einem Sättigungsgrad der Lösung von 0.45. Nach Impfung mit den ursprünglichen

Krystallen und Kühlung im Eisschrank, fiel bereits nach wenigen Stunden ein krystallinischer Niederschlag aus, dessen Menge im Laufe der nächsten Tage sich bedeutend vermehrte. Die erhaltenen Krystalle waren identisch mit den zuerst dargestellten und liessen sich in der gleichen Weise mehrmals umkrystallisieren. Die Form der Krystalle ist aus der Mikrophotographie, deren Ausführen, ich Herrn Prof. B. J a ł o w y vom Universitätsinstitut für Histologie verdanke, deutlich ersichtlich. Die Vergrösserung ist 265 — fach.



Die Darstellung dieses krystallisierten Eiweisses gelang in jedem Fall von mehreren Versuchen, wobei sich manchmal eine Impfung als notwendig erwies. Die Extrakte wurden stets in derselben Weise bereitet und zwar: Kaninchenmuskelfbrei wurde mit dem gleichen Volumen Wasser bei 0° vermischt, abgepresst, der Extrakt 6 Stunden bei Zimmertemperatur autolysiert und die Globuline mit Ammoniumsulphat bei einem Sättigungsgrad von 0.4 ausgefällt. Aus dem Filtrat wurde das Eiweiss durch vollständige Sättigung mit Ammoniumsulphat gefällt und der Niederschlag in einer geringen Menge Wasser gelöst. Die Lösung wurde 15 Minuten auf 52° erwärmt, filtriert, das Filtrat mit

Ammoniumsulphat gesättigt und der Niederschlag im möglichst wenig Wasser gelöst. Nach Zusatz von Ammoniumsulphat bis zur schwachen Trübung wurde die Lösung mit Krystallen geimpft und einige Tage im Eisschrank aufbewahrt. Nach Abtrennung der krystallisierten Niederschläges konnten weitere Krystallmengen durch weitere Sättigung mit Ammoniumsulphat gewonnen werden. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren erhält man ganz einheitliche, schneeweisse Krystalle. Ihre Grösse schwankt zwischen 5 und 75 Mikronen, aber es lassen sich auch bedeutend grössere Krystalle darstellen. Man erhält kleinere Krystalle, wenn die Eiweisslösung besser gereinigt ist.

Die krystallographische Untersuchung verdanke ich Herrn Prof. Dr. Chrobak vom Universitätsinstitut für Krystallographie. Die Krystalle gehören zum hexagonalen System, haben die Form von Doppelpyramiden (doppelte Rauten) und sind stark lichtbrechend. Im polarisierten Licht zeigen sie eine deutliche, wenn auch schwache Doppelbrechung. Bei Zusatz von Wasser tritt der Auflösung eine Quellung der Krystalle ein.

Diese Erscheinungen sprechen für den Eiweisscharakter der erhaltenen Krystalle, welcher durch die chemische Untersuchung bewiesen wurde. Die umkrystallisierten und mit Ammoniumsulphatlösung (Sättigungsgrad 0.5) gewaschenen Krystalle (150 mg) wurden im Platintigel verascht. Der Ascherückstand betrug 0.08% des Trockengewichtes der Krystalle. Mehrfach umkrystallisierte und gewaschene Krystalle geben Eiweissreaktionen: einen weissen Niederschlag mit Salpeter- und Sulfosalicylsäure, die Xanthoproteinreaktion, die Reaktion von Millon und die Tryptophanreaktion von Adamkiewicz und Hopkins. Die Molisch'sche Reaktion ist negativ. Durch Zusatz von Alkohol und Aceton bis zur Konzentration von 40% wird das krystallisierte Eiweiss denaturiert, bei Zusatz von Alkohol bis zu 60% wird das Eiweiss quantitativ gefällt. Trockene Krystallpräparate enthalten noch ziemlich viel Ammoniumsulphat, da es mir bis jetzt noch nicht gelungen ist, ein Lösungsmittel zu finden, um es ohne Denaturierung des Eiweisses zu entfernen. Das Eiweiss, welches aus der wässerigen Lösung der Krystalle mit Alkohol gefällt und mit 60 prozentigem Alkohol von Ammoniumsulphat freigewaschen und dann getrocknet

wurde, enthält ungefähr 16% Stickstoff und keinen Phosphor. Diese Untersuchungen beweisen also, dass es sich um ein krystallisiertes Muskeleiweiss handelt. Es ist nach dem Myoglobin das erste krystallisierte Muskeleiweiss.

Die Krystalle zeigen einige bemerkenswerte Eigenschaften. Wenn sie in konzentrierten Lösung auf 35° erwärmt und dann langsam abgekühlt werden, so erhält man Krystalle, bis zu 400 Mikronen, welche aber — im Gegensatz zu den kleinen Krystallen-unstabil sind. Geringe Temperaturänderungen oder der Druck des Deckglases ruft einen charakteristischen Zerfall hervor. Zunächst zerspringen die Krystalle in zwei oder mehrere Stücke, welche mit den Brücher aneinander liegen, dann zerfallen sie zu einer Unmenge von krystallinen Bruchstücken, welche manchmal symmetrische Formen bilden. Die krystallinen Bruchstücke können abzentrifugiert und dann wieder zu normalen Krystallen umkrystallisiert werden.

Die Eiweisskrystalle scheinen zu den Albuminen zu gehören. Sie lösen sich ausgezeichnet in destilliertem Wasser und werden durch Ammoniumsulphat erst bei einem Sättigungsgrad von über 0.45 gefällt. Ihre Löslichkeit ist sehr gross: man kann 20-prozentige Lösungen des Eiweisses erhalten. Den isoelektrischen Punkt habe ich noch nicht bestimmt, aber da es am leichtesten zwischen pH 5.9 und 6.3 gefällt wird, so dürfte der isoelektrischer Punkt innerhalb dieser Grenzen liegen. Die Ausbeute an krystallisiertem Eiweiss aus Muskelextrakt ist ziemlich gross und es erscheint wahrscheinlich, dass es gelingen wird, einen grossen Teil der Albuminfraktionen von Muskeleiweiss zu krystallisieren. Alle bisherigen Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich um krystallisiertes Myogen handelt. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Herrn Professor Dr. J. K. P a r n a s, dem ich Anregungen und Ratschläge verdanke, möchte ich an dieser Stelle herzlichst danken.

[Laboratoire de Physiologie Générale, Université Libre de Pologne, Łódź].

J. Rosenberg.

Cultures pures des infusoires sur les souches pures des microbes.

Présenté dans la séance de la Société Polonaise de Physiologie, Section de Varsovie,
le 3.III.1938.

Plusieurs auteurs ont tenté d'obtenir les cultures des protozoaires sur les milieux synthétiques, ne contenant pas des microbes en vue de l'examen des processus biochimiques vitaux des protozoaires. Ces auteurs luttèrent avec maintes difficultés, car lorsqu'on repiquait les protozoaires des milieux ordinaires on ne parvenait pas à éliminer les microbes qui les accompagnaient. Ce n'est que l'amélioration de la technique de stérilisation des animaux monocellulaires obtenue grâce aux travaux de Hargitt et Frey ('17), de Parpart ('28), d'Elliot ('33), et de Hetherington ('34) qui a rendu possible l'obtention des souches stériles de protozoaires.

Peters ('20, '21, '22), fut un des premiers qui s'occupa de l'assimilation par les protozoaires de certaines substances organiques contenues dans les milieux stériles. Ses cultures n'étaient cependant pas complètement libres des microbes (cité d'après Johnson ('35/36a). En même temps que Peters un autre chercheur Oehler ('19, '20, '24), qui appliquait une méthode de stérilisation qu'il a proposé, parvint à cultiver les protozoaires dans les milieux contenant de petites quantités de certaines substances organiques et souvent aussi de la levure.

D'autres auteurs réussirent à cultiver les différents protozoaires dans les milieux libres de microbes (solution de péptone, sérum, extrait de levure etc.).

En ce qui concerne la culture des infusoires, protozoaires employés les plus souvent dans les laboratoires biologiques, on trouve dans la bibliographie des données plutôt contradictoires. Ainsi Glaser ('32), Glaser et Coria ('33) ne parvinrent pas à obtenir des cultures de *Paramecium caudatum* sur les milieux privés des microorganismes vivants; ils en ont obtenu pourtant sur les milieux contenant la levure ou les microbes vivants. Dans les expériences qu'ils ont entrepris plus tard ces auteurs cultivaient les Paramécies dans les milieux contenant différents extraits

et de plus les microbes ou la levure tués. D'autres auteurs comme Elliot ('33) et Loefler ('34 et '36) obtinrent des cultures de *Paramecium* et de *Colpidium* (Elliot '35) sur les milieux dépourvus des microbes. Quoique l'on obtient des cultures de certains protozoaires sur les milieux sans microbes, les bactéries semblent constituer la meilleure et la plus naturelle nourriture de ces animaux. Grâce à l'amélioration de la technique de stérilisation des protozoaires, mentionnée plus haut, on a pu aborder la question des espèces microbiennes qui constituent une nourriture suffisante pour les protozoaires.

La plupart des auteurs cultivaient les protozoaires sur les suspensions d'une souche microbienne pure. Le liquide ambiant était composé de la solution saline additionnée des substances organique (peptone, tryptone, extraits d'organes etc.). Hargitt et Frey ('17), Raffel ('30), Luck, Sheets et Thomas ('31), Phillips ('34), Giese et Taylor ('35) ont démontré qu'une souche microbienne ne constitue pas une nourriture suffisante pour certaines souches des protozoaires, malgré que les suspensions de ces microbes étaient additionnées des substances organiques mentionnées. Giese et Taylor prétendent qu'un mélange des souches microbiennes suffit pour les infusoires, tandis que chacune de ces souches employée séparément ne constitue pas une nourriture suffisante.

Philpott ('28) n'est pas d'accord sur ce point, il croit que le *Paramecium* se développe mieux sur les souches pures du *B. pyocyaneus* que sur les cultures mixtes. Cet auteur indique aussi que les protozoaires peuvent s'accoutumer à l'action toxique des microbes.

Cutler et Crump ('35) publient que l'amibe *Hartmanella hyalina* peut s'accoutumer de se nourrir de *B. prodigiosum*.

Il mérite d'être noté que beaucoup d'auteurs qui s'intéressent à la valeur alimentaire d'une souche microbienne soutiennent que les microbes tués ne constituent pas une nourriture suffisante.

Oehler ('20) rapporte qu'il a réussi de cultiver les infusoires (*Colpoda steini*) sur les suspensions du colibacille tué par le chauffage. E. et M. Chatton ('23 et '29) cultivaient *Glaucoma scintillans* et *piriformis* sur les bactéries tués. Oehler et M. Chatton préparaient les suspensions microbiennes dans les solutions salines additionnées des substances organiques, lesquelles, comme le dit Johnson dans le cas de *Glaucoma ficaria*, constituent déjà par elles mêmes une nourriture suffisante. Johnson ('35/36b) a essayé de cultiver *Glaucoma ficaria* sur les suspensions des microbes vivants ou tués, mais ne contenant pas ces substances organiques. Ces expériences avaient pour but de prouver que beaucoup d'espèces microbiennes qu'il employait peuvent servir comme source de nourriture aux protozoaires. Johnson appliquait la méthode de „migration” pour la stérilisation des protozoaires (d'après Ogata) et faisait les cultures en masse, mettant à la fois quelques centaines d'individus dans un milieu de culture. On ne peut pas comparer dans ces conditions les résultats de cet auteur avec ceux des auteurs cités précédemment car la culture en masse se développe différemment de celle qui part d'un seul individu.

Il nous semblait intéressant de vérifier si la suspension d'une souche microbienne pure constitue pour le *Paramecium*, le *Colpidium* et le *Colpoda* une source suffisante des substances organiques pour les cultures partant d'un seul infusoire. Si les souches vivantes constituent une source suffisante, il nous semblait incompréhensible pourquoi les souches mortes ne le seraient pas. Il fallait supposer que si l'on ne fournissait que les microbes morts aux infusoires ces derniers finiraient par s'accoutumer à cette sorte de nourriture.

Matériel et méthode.

Les expériences étaient faites sur les infusoires *Paramecium caudatum*, *Colpidium colpoda* et *Colpoda cucullus*. Les infusoires ont été obtenus d'une infusion du foin; ils en étaient isolés et cultivés dans une infusion filtrée du foin.

Les suspensions microbiennes étaient préparées du colibacille et de *B. pyocyaneus*; les souches provenaient de l'Institut d'Hygiène de l'Etat à Varsovie. J'ai choisi le colibacille et le *B. pyocyaneus* parce que le premier est assez fréquent dans les eaux stagnantes et le *B. pyocyaneus* fut plusieurs fois isolé des cultures des infusoires dans notre laboratoire.

La stérilisation des infusoires était effectuée selon la méthode de P a r t, compte tenu des remarques des auteurs cités plus haut. Je n'ajoutais les microbes au liquide stérilisant, car je plaçais les infusoires stérilisés dans les suspensions de différentes espèces microbiennes. Pendant la stérilisation les infusoires étaient privés de nourriture ce qui causait souvent chez les Colpodes un enkystement précoce.

Comme solution saline on utilisait la solution de Ringer d'après M-me V i e w e g e r ('30), diluée 1:10 (R_2) et stérilisée à l'autoclave. Les infusoires (Colpodes) vivent très bien dans cette solution.

Je préparais les suspensions microbiennes en émulsionnant avec 10 cm³ de R_2 une culture de 24 h sur gélose inclinée. Une partie de cette suspension était chauffée afin de tuer les microbes. J'ajoutais 0.2 cm³ de suspension vivante ou tuée aux tubes à essai contenant 10 cm³ de R_2 . Les tubes étaient bouchés avec du coton. Pour quelques expériences j'ai employé des petits tubes contenant 1 cm³ de suspension diluée morte ou vivante.

Je plaçais dans chaque tube un ou deux infusoires stérilisés. Les tubes contenant 10 cm³ de suspension étaient gardés pendant 5 jours; au bout de ce temps je mélangeais soigneusement le contenu et je comptais les infusoires dans une cellule avec un quadrillage gradué. Les tubes contenant 1 cm³ étaient contrôlés chaque jour.

J'ensemenciais le contenu de quelques tubes de chaque série sur la gélose pour en vérifier la stérilité. Les cultures étaient en général stériles.

pH du milieu avant l'expérience était égal à 7.1—7.2, après 10 jours de culture — à 7.3—7.4.

Résultats des expériences.

J'ai commencé mes expériences avec les colpodes. Après la stérilisation je les plaçais séparément dans les tubes contenant 10 cm³ de suspension des microbes vivants ou morts. Au bout de 5 jours j'ai constaté que la suspension contenant les microbes vivants était moins trouble; l'opacité de la suspension des microbes morts ne changeait pas. Dans les tubes contenant le colibacille vivant le nombre de protozoaires atteignait 3000. Quelques cultures des colpodes cultivés sur le *b. pyocyanique* vivant atteignaient aussi ce nombre. Par contre dans les milieux contenant les bacilles morts je n'ai trouvé ni des protozoaires vivants, ni des kystes. Après de nombreux essais de culture des colpodes sur les microbes morts, j'ai transporté 0.5 cm³ d'une culture des infusoires (à peu près 100 individus) sur des bacilles vivants dans un milieu contenant les mêmes bacilles morts. Après 5 jours l'opacité des suspensions est devenue moindre; le nombre de microbes diminua et l'on pouvait observer des infusoires en mouvement.

Les colpodes obtenues sur le milieu aux bacilles morts étaient soumises de nouveau au précédé de stérilisation et ensuite placées séparément dans les suspensions de bacilles morts de la même espèce sur laquelle elles étaient cultivées précédemment. Au moins dans 50 p. c. des cultures j'ai obtenu le nombre de colpodes oscillant de 40 jusqu'à 4500 dans un tube. Ce nombre n'était pas très différent de celui des tubes témoins contenant les bacilles vivants. (Le tableau I ne contient que les résultats des premières expériences). Les colpodes qui se développaient bien sur les microbes morts repiqués sur d'autres milieux aux bacilles morts s'y développaient également bien.

Si dans les tubes, dans lesquels on n'a pas constaté des colpodes, on ensemaitait des colpodes provenant des cultures se développant bien on réussissait parfois à obtenir les cultures à une population dense. Dans beaucoup de cas on pouvait constater l'enkystement de tous les infusoires ou d'une partie seulement (tableau I). Parfois l'enkystement avait lieu au cours des dernières étapes de la stérilisation, ce qui rendait impossible la continuation de l'expérience. Ce fait pourrait être expliqué

Tableau I.

La multiplication des Colpodes dans les suspensions microbiennes pendant 5 jours.

Suspension du Colibacille				Suspension du B. pyocyannique			
vivant		mort		vivant		mort	
Nombre d'infusoires							
initial	final	initial	final	initial	final	initial	final
1	2190*)	1	2380	1	1150	1	60*)
1	1680	1	1720	2	3600	1	2380*)
1	2390	1	2890	2	4600	1	720
1	1670	1	1700	2	3240	1	45*)
1	3520	3	4420	1	740	1	430
2	2340	1	2070	2	1100	1	860
1	200	1	180	1	3100*)	1	2450
		2	7960			1	2360
		1	3780			1	1400
		1	990			1	280
		1	720			1	2620
		1	190			1	40*)

*) La majorité ou tous enkystés.

en admettant qu'une partie de protozoaires subit l'enkystement immédiatement après l'ensemencement et ne trouvant pas dans le milieu des conditions favorables ne quitte pas les kystes et ne donne pas naissance à une culture normale. Les produits du métabolisme microbien selon Penn ('35 et '36/37) peuvent causer ou faciliter l'enkystement. En se basant sur les observations de Penn on peut expliquer le fait qu'on trouve un petit nombre d'infusoires, enkystés pour la plupart, dans quelques suspensions des B. pyocyaniques morts. La constatation d'une grande quantité des kystes à côté des colpodes qui subissent des divisions dans une culture très dense fait penser qu'en ces cas l'enkystement est causé par une croissance rapide de la population (Taylor et Strickland '35/36). Pour se rendre compte si vraiment les processus de l'enkystement ont lieu après l'ensemencement, j'ai procédé à une nouvelle série d'expériences.

J'ai fait les cultures dans de petits tubes et je les observais à la loupe. Dans la majorité de cas je n'ai pas remarqué des infusoires mobiles les deux premiers jours. Le troisième jour on pouvait remarquer dans la plupart de tubes quelques infusoires mobiles qui se multipliaient rapidement. Cette ob-

servation plaide en faveur de la supposition, que dans ces conditions les colpodes s'enkystaient au début de l'expérience.

J'ai essayé aussi de cultiver les colpodes provenant des milieux aux colibacilles morts sur les milieux aux bacilles pyocyaniques et vice versa avec des résultats favorables; dans les cultures âgées de 5 jours on trouvait parfois 2000 des protozoaires. Il en ressort que si les protozoaires „s'habituent" à utiliser des microbes morts d'une espèce microbienne déterminée ils peuvent également utiliser d'autres espèces.

Dans les expériences avec les paramécies je plaçais ces dernières dans de grands tubes. Au bout de quelques jours les observations à la loupe ne révélaient pas d'augmentation du nombre de protozoaires et la suspension gardait son aspect trouble. Après 14 jours on pouvait trouver encore dans quelques tubes des infusoires mobiles. Les expériences portaient toujours sur quelques dizaines des tubes de colibacille et des b. pyocyaniques. Je n'ai jamais observé cependant ni l'éclaircissement du liquide, ni l'accroissement du nombre d'infusoires.

Tableau II.

Les Paramécies dans les suspensions du Colibacille (nombre d'infusoires).

Jour	Suspension des bacilles morts										Suspension des bacilles vivants					z : Z	Série	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\frac{x/x_0}{=Z}$	11	12	13	14			15
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	1	1	1	1	1	—	—
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	2	1	1	1	1	1.2	0.83
2	2	1	3	2	2	1	2	1	2	2	1.8	2	2	1	2	2	1.8	1.00
3	2	2	3	1	2	1	2	1	1	2	1.7	2	2	1	2	3	2.0	0.85
4	2	1	4	2	2	1	2	2	1	4	2.1	1	1	2	1	5	2.0	1.05
5	3	2	4	2	3	0	2	2	2	4	2.4	2	1	2	1	5	2.2	1.09
6	0	2	4	4	1	0	2	0	0	0	1.3	2	0	1	2	0	1.0	1.30
7	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	2	0	0.4	1.75
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	1	1	1	1	1	—	—
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	2	1	1	1	1	1.2	0.83
2	2	1	3	2	2	1	2	1	2	2	1.8	2	2	1	2	2	1.8	1.00
3	2	2	3	1	2	1	2	1	1	2	1.7	2	2	1	2	3	2.0	0.85
4	2	1	4	2	2	1	2	2	1	4	2.1	1	1	2	1	5	2.0	1.05
5	3	2	4	2	3	0	2	2	2	4	2.4	2	1	2	1	5	2.2	1.09
6	2	2	4	4	2	0	2	2	2	2	2.2	2	0	1	2	3	1.6	1.38
7	0	2	4	4	1	0	2	0	0	0	1.3	2	0	1	2	0	1.0	1.30
8	0	2	2	2	1	0	2	0	0	0	0.9	1	0	0	2	0	0.6	1.50
9	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	2	0	0.4	1.25
10	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	2	0	0.4	0.75

J'ai fait donc 2 séries d'expériences avec des cultures contenant peu de milieu de culture (1 cm³) (tableau II — 13). Les tableaux démontrent que les infusoires peuvent rester en vie dans ces conditions pendant plusieurs jours, mais leur faculté de multiplication est complètement ou partiellement entravée. J'ai observé parfois (tab. II, tube 2, 4, 14, 2 série et tab. III, tube 5, 14, première série et 2, 11 de la deuxième série) les infusoires en vie pendant 14 jours sans division dans la deuxième semaine.

Tableau III.

Les Paramécies dans les suspensions de *B. pyocyaniques* (nombre d'infusoires).

Jour	Suspension des bacilles morts										Suspension des bacilles vivants					x'/x' ₀ = z'/z'	z : z'	Série	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\frac{x}{x_0}$ = $\frac{z}{z_0}$	11	12	13	14				15
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	1	2	1	1	1	—	—	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.00	1	2	1	1	1	1.00	1.00	
2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0.80	1	3	1	2	1	1.33	0.60	1
3	1	1	2	0	1	2	1	2	1	2	1.30	2	2	2	2	2	1.66	0.78	
4	2	2	2	0	1	2	2	2	1	2	1.60	2	1	4	4	1	2.00	0.80	
5	2	1	2	0	1	0	1	2	1	2	1.20	2	1	2	2	2	1.50	0.80	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	1	1	1	1	1	—	—	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.00	1	1	1	1	1	1.00	1.00	
2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1.30	2	1	1	1	2	1.40	0.93	
3	3	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1.00	1	1	0	0	1	0.60	1.66	2
4	3	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0.80	1	0	0	0	2	0.60	1.33	
5	2	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0.60	1	0	0	0	1	0.40	1.50	

Pour se rendre compte de la fréquence des divisions il faut recourir au rapport $x : x_0 = z$ pour la série d'expériences (x — le nombre d'infusoires constatés le jour donné; x_0 — le nombre d'infusoires pris pour l'expérience). Ce rapport ne dépasse pas 2.4 pour les cultures aux colibacilles morts et 2.2 pour les cultures aux colibacilles vivants; 1.6 pour les cultures aux *b. pyocyaniques* vivants et 1.66 pour les *b. pyocyaniques* morts.

Le rapport $z : z'$ (z correspond au $x : x_0$ dans les cultures aux microbes morts, z' — aux microbes vivants) nous permet d'établir quels microorganismes (vivants ou morts) se prêtent mieux pour garder les infusoires en vie. Pour le colibacille $z : z'$ oscille entre 0.83 et 1.3 les 6 premiers jours de l'expérience, montrant dans les deux séries une égalité surprenante (fig. 1).

En se basant sur ces données on ne peut pas décider laquelle des deux suspensions est meilleure pour les paramécies. Le rapport $z : z'$ dans le cas du *b. pyocyanique* dans les deux séries est complètement différent (fig. 2); on ne peut en conclure non plus laquelle des deux suspensions donne des résultats plus favorables. Si l'on transporte les infusoires qui ont resté 7 jours dans un milieu aux microbes dans un milieu frais, on observe le même tableau que nous avons décrit dans nos expériences.

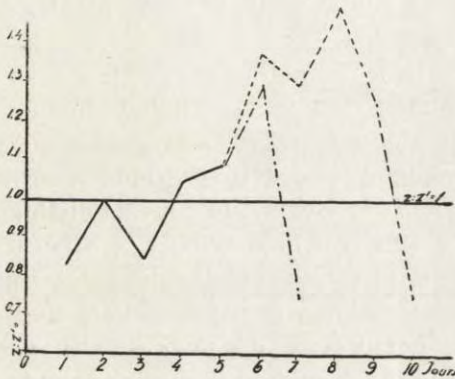


Fig. 1. Le rapport $z:z'$ dans les cultures des paramécies sur les suspensions des colibacilles vivants et morts.

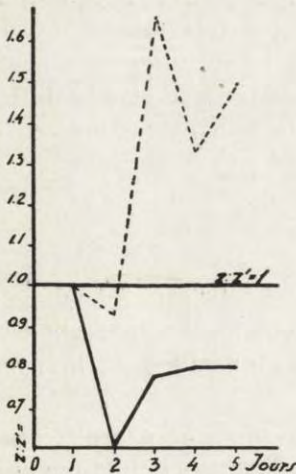


Fig. 2. Le rapport $z:z'$ dans les cultures des paramécies sur les suspensions des bacilles pyocyaniques vivants et morts.

A titre de contrôle j'ai placé des infusoires séparés stérilisés dans un bloc excavé contenant le milieu ordinaire au foin. Dans quelques cas les deux premiers jours je n'ai pas observé des protozoaires mobiles, ce n'est que le troisième jours et parfois même le quatrième que l'on trouvait les infusoires mobiles, qui se divisaient ensuite d'une manière normale. Parfois les protozoaires témoins étaient mobiles mais ne se divisaient pas pendant quelques jours. Il est donc fort probable, que le procédé de stérilisation inhibe la faculté de se diviser, et que cette inhibition disparaît lorsque la paramécie est placée dans des conditions normales.

J'ai placé aussi les colpides dans des tubes contenant 10 cm³ d'un milieu aux microbes. Au bout d'une semaine la suspension ne devenait pas moins trouble. J'ai répété ces expériences plusieurs fois en employant les suspensions du colibacille et du b. pyocyanique mort et vivant. Je pouvais distinguer à la loupe des protozoaires très peu nombreux. Les expériences dans lesquelles je plaçait les colpides isolés dans des petites quantités du milieu présentèrent les mêmes résultats que ceux avec les paramécies. Le nombre des divisions ne dépassait pas 4 pendant une semaine. Au bout de 5 jours les colpides qui n'étaient pas transférés dans un autre milieu commencèrent à périr, quelques uns restaient en vie encore une semaine sans se diviser. Le rapport z : z' ressemblait à celui paramécies dans les suspensions du b. pyocyanique. On peut en conclure que les suspensions du b. pyocyanique et de colibacille morts et vivants peuvent garder en vie les colpides tout en inhibant leur faculté de division.

Resumé.

1°. Les infusoires des espèces *Colpoda cucullus*, *Paramecium caudatum* et *Colpidium colpoda* peuvent être cultivées sur les suspensions des colibacilles ou b. pyocyaniques morts ou vivants.

2°. On n'a pas remarqué des différences dans le comportement des *Paramecium* et des *Colpidium* cultivés sur des suspensions des microbes vivants ou morts. Les Colpodes demeurent

vivants sur les suspensions des microbes morts mais exigent qu'on les cultive préalablement sur la suspension de ces mêmes microbes vivants.

3°. Le choc causé par la stérilisation exerce une inhibition des processus de division chez les infusoires qui n'ont pas subi l'enkystement. La multiplication des Paramécies et des Colpides est inhibée au même degré dans les suspensions des bacilles morts et des bacilles vivants. Par contre les Colpodes se multiplient très intensément après la stérilisation. Il est possible que cet fait est en rapport avec la période du repos (enkystement) qui neutralise l'effet du choc traumatique.

4°. On peut accoutumer les infusoires à utiliser comme nourriture certaines espèces microbiennes, de même que les microbes tués.

5°. L'habitude d'utiliser les colibacilles morts permet également l'utilisation du b. pyocyanique mort et inversement.

Bibliographie.

- Chatton E. et M. L'influence des facteurs bacteriens sur la nutrition, la multiplication et la sexualité des infusoires. C. R. Acad. Sc. 1923 176, 1262. — Chatton E. et M. Les conditions de la conjugation du *Glaucoma scintillans* en culture lethobacteriennes. Action directe et spécifique de certains agents zygotènes. Ibid. 1929, 188, 1315. — Cutler D. W. et L. M. Crump. The effect of bacterial products on amebic growth. J. Exp. Biol., 1935, 12, 52. — Elliot A. M. Isolation of *Colpidium striatum* stokes in bacteria free cultures and the relation of growth to pH of the medium. Biol. Bull. 1933, 44, 45. — Elliot A. B. Effects of carbohydrates on growth of *Colpidium*. Arch. Protistenk. 1935 a, 84, 156. — Elliot A. B. Effects of certain organic acids and protein derivates on the growth of *Colpidium*. Ibid. 1935 b, 84, 473. — Giese A. C. et C. V. Taylor. Paramecia for experimental purposes in controlled mass cultures on a single strain of bacteria. Ibid. 1935, 84, 225. — Glaser R. W. Culture of certain protozoa, bacteria free. J. Parasit. 1932, 19, 23. — Glaser R. W. et N. A. Coria. The culture of *Paramecium caudatum* free from living microorganisms. Ibid. 1933, 20, 33. — Hargitt et Fray. The growth of *Paramecium* in pure cultures of bacteria. J. Exp. Zool. 1917, 22, 121. — Hetherington A. The sterilisation of protozoa. Biol. Bull. 1934, 47, 315. — Johnson D. F. Isolation of *Glaucoma ficaria* Kahl. in bacteria free cultures, and growth in relation to pH of the medium. Arch. Protistenk. 1935/36a, 86, 263. — Johnson D. F. Growth of *Glaucoma ficaria*

Kahl. in cultures with single species of other microorganisms. 1935/36b, 86, 360. — Loefer J. B. Effect of certain „peptone” media and carbohydrates on the growth of *Paramecium bursaria*. 1936. Ibid. 87, 142. — Luck J. M., G. Sheets et J. O. Thomas. The rôle of bacteria in the nutrition of protozoa. Quart. Rev. Biol. 1931, 6, 46. — Oehler R. Flagellaten- und Ciliatenzucht auf reinem Boden. Arch. Protistenk. 1919/20, 40, 16. — Oehler R. Gereinigte Ciliatenzucht. Ibid. 1920, 41, 34. — Oehler R. Weitere Mitteilungen über Amöben und Ciliatenzucht. Ibid. 1924, 49, 112. — Parpart A. K. The bacteriological sterilisation of *Paramecium*. Biol. Bull. 1928, 55, 113. — Penn A. B. K. Ch. Factors which control encystment in *Pleurotricha lanceolata*. Arch. Protistenk. 1935, 84, 101. — Penn A. B. K. Ch. Reproduction in *Colpoda cucullus*. Ibid. 1936/37, 88, 366. — Peters R. A. Nutrition of protozoa. The growth of *Paramecium* in sterile culture medium. J. Physiol. 1920, 53, 108. — Peters R. A. Nutrition of protozoa. The carbon and nitrogen compounds needed for the growth of *Paramecium (Colpidium)*. Ibid. 1921 a, 95, 1. — Peters R. A. The substance needed for the growth of a pure culture of *Colpidium colpoda*. Ibid. 1921 b, 55, 1. — Phillips R. L. *Paramecium* in infusions of known bacterial content. J. Exp. Zool. 1922, 36, 135. — Philpott C. H. Growth of *Paramecia* in pure cultures of pathogenic bacteria and in the presence of soluble products of such bacteria. J. Morphol. and Physiol. 1928, 46, 85. — Raffel D. The effect of conjugation within a clone of *Paramecium aurelia*. Biol. Bull. 1930, 42, 244. — Taylor C. V. et A. G. R. Strickland. Some factors in the encystment of dried cysts of *Colpoda cucullus*. Arch. Protistenk. 1935/36, 86, 181. — Vieveger J. Études sur la multiplication des colpidies dans les différents milieux. Arch. Hydrobiol. i Rybactwa. 1930, 5, 113.

[Institut für physiologische Chemie der Stefan Batory Universität in Wilno].

W. Mozolowski und P. Rogowski.

Über die Anwendung der Naphtoresorcinprobe für die quantitative Bestimmung der Glukuronsäure.

Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 17.II.1939.

Es gibt bisher keine einfache und sichere Methode für die Bestimmung der freien und gebundenen Glukuronsäure. Im Zusammenhang damit ist es verständlich, dass immer wieder Versuche unternommen werden, um die Naphtoresorcinprobe von B. T o l l e n s ('08) zu einer kolorimetrischen, quantitativen Bestimmungsmethode auszubauen. Der erste Versuch in dieser Richtung stammt von C. T o l l e n s ('09), wurde aber von C. N e u b e r g ('10) einer scharfen Kritik unterworfen. Auch spätere Bemühungen endeten immer wieder mit der Feststellung, dass die Reaktion für quantitative Zwecke zu unsicher ist (S a l t '36; F ü r t h und P e s c h e k '36; M o z o ł o w s k i '37), weil sich keine experimentellen Bedingungen finden liessen, um die Farbintensität der Glukuronsäurekonzentration streng proportional zu gestalten. F l o r k i n ('37) versuchte solche Bedingungen zu schaffen, indem er den beim Kochen der Glukuronsäure mit Naphtoresorcin und Salzsäure entstehenden Niederschlag abfiltrierte und nach dem Auswaschen und Trocknen zur kolorimetrischen Bestimmung in Benzol löste; diese Methode soll für reine Glukuronsäurelösungen gute Resultate geben, es fehlen aber die Angaben über ihre Anwendbarkeit für Bestimmungen im Blute und Harn.

In der letzten Zeit berichteten M a u g h a n, E v e l y n und B r o w n e ('38) dass es ihnen gelungen sei die an Pregnandiol gebundene Glukuronsäure mit der Naphtoresorcinprobe quantitativ zu bestimmen und zwar sowohl in reinen Lösungen,

als auch im Harn. Ihre Methode enthält zwei wichtige Modifikationen: an Stelle der üblichen alkoholischen Naphtoresorcinlösung wird eine wässrige Lösung benutzt und der Äther zur Farbstoffextraktion von Peroxyden befreit. Da die Autoren ihre Bestimmungen ausschliesslich mit der an Pregnandiol gepaarter Glukuronsäure ausführten, hielten wir es für zweckmässig, diese Methode auch an anderen Glukuronsäureverbindungen (Borneol-Glukuronsäure, Benzoyl-Glukuronsäure) und an der freien Glukuronsäure und an Glukuron zu prüfen. Unser Verfahren entsprach genau der Vorschrift von *M a u g h a n, E v e l y n* und *B r o w n e* ('38) mit dem Unterschied, dass die Naphtoresorcinlösung stets frisch bereitet wurde (am Vortag der Bestimmung wird Naphtoresorcin im Wasser aufgeschwemmt, die Suspension 24 Stunden bei 37° gehalten und unmittelbar vor der Bestimmung filtriert). Der Extinktionskoeffizient der ätherischen Farbstofflösung wurde im Pulfrich-Photometer gegen die Kontrollprobe ohne Glukuronsäure gemessen (Filter S. 57, Küvetten von 20 mm Dicke). Die Farbintensität ist bei diesem Verfahren der Konzentration der Glukuronsäure — und zwar sowohl der freien als auch gebundenen — *s t r e n g p r o p o r t i o n a l*, vorausgesetzt, dass der Gehalt der Glukuronsäure in der untersuchten Probe nicht mehr als 0.05 mg beträgt. So fanden wir innerhalb dieser Grenze folgende Extinktionswerte für steigende Glukuronsäurekonzentrationen:

mg Glukuronsäure:	0.0125	0.025	0.0375	0.050
Extinktion:	0.11	0.22	0.33	0.44

Die Schwankungen in den Extinktionswerten betragen ca 0.01. Bei höheren Glukuronsäurekonzentrationen (über 0.05 mg) entstehen während des Kochens mit Salzsäure und Naphtoresorcin Niederschläge und die Farbintensität der Ätherlösung ist dem Glukuronsäuregehalt nicht mehr proportional. So erhielten wir z. B. in Proben der untersuchten Substanzen mit je 0.1 mg Glukuronsäuregehalt folgende Extinktionswerte: 0.44; 0.42; 0.31; 0.28. Diese Werte differieren sehr stark untereinander und ausserdem sind sie niedriger als die Extinktionen, welche viel kleineren Glukuronsäurekonzentrationen entspre-

chen. Es ist demnach klar, dass eine Einzelbestimmung für die Ermittlung des Glukuronsäuregehaltes einer unbekanntem Lösung ganz unzureichend ist. Eine genaue Bestimmung der freien und gepaarten Glukuronsäure lässt sich nur in der Weise durchführen, dass man zunächst eine Verdünnungsreihe der untersuchten Lösung bereitet, und nur diejenigen Extinktionswerte als reell betrachtet, welche nach oben und unten dem Verdünnungsgrad der Lösung streng proportional sind. Wir verfahren bei den Bestimmungen folgendermassen.

Die unbekanntem Lösung wurde unverdünnt, in 10- und 100-facher Verdünnung geprüft; aus allen 3 Lösungen wurden je 2, 1 und 0.5 ccm Lösung entnommen, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und die Bestimmung vorgenommen. Massgebend für die Berechnung war nur diejenige Reihe, innerhalb welcher die Extinktionswerte proportional dem Verdünnungsgrad abfielen und Glukuronsäuremengen von 0.01—0.05 mg entsprachen.

In dieser Weise stellten wir fest, dass die Methode von *M a u g h a n*, *E v e l y n* und *B r o w n e* ('38), die von diesen Autoren nur an einer Glukuronsäureverbindung geprüft worden ist, auch für die Bestimmung einer Reihe anderer Glukuronsäureverbindungen und der freien Glukuronsäure anwendbar ist, vorausgesetzt dass gewisse Kautelen dabei beobachtet werden. Als wichtigste Fehlerquelle betrachten wir die Vernachlässigung der Tatsache, dass in Glukuronsäurelösungen eine Proportionalität zwischen Farbe und Konzentration nur innerhalb gewisser Grenzen besteht. Erst wenn diese Proportionalität durch die Wahl entsprechender Verdünnungen erreicht worden ist, lassen sich sichere Werte für den Glukuronsäuregehalt der geprüften Lösungen gewinnen.

Literatur.

- F l o r k i n* M. 1937. Principes d'une methodes de dosage de l'acide glucuronique. *C. R. Soc. Biol.* 126, 916. — *F ü r t h* O. u. *P e s c h e k* K. 1936. Über Mikrobestimmung der Glukuronsäure. *Biochem. Z.* 287, 365. — *M a u g h a n* G. M., *K. A. E v e l y n* a. *J. S. L. B r o w n e*. 1938. A method for the quantitative estimation of glucuronic acid and conjugated

glucuronides. *J. of biol. Chem.* 126. 567. — Mozołowski W. 1937. Sprzężone związki kwasu glukuronowego w ustroju zwierzęcym. *Acta Biologiae Exper.* 11. 348. — Neuberger C. 1910. Erfahrungen über die Naphtoresorcinreaktion. *Biochem. Z.* 24. 436. — Salt H. B. 1935. The application to urine of Tollens's naphtoresorcinol test for conjugated glucuronides. *Biochem. J.* 29, 2705. — Tollens B. 1908. Über einen einfachen Nachweis der Glukuronsäure mittels Naphtoresorcin, Salzsäure u. Äther. *Ber. d. d. chem. Ges.* 41. II. 1788. — Tollens C. 1909. Quantitative Bestimmung der Glukuronsäure im Urin mit der Furfurol-Salzsäuredestillationsmethode. *Zeit. f. physiol. chem.* 61. 95.

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

J. Konorski et L. Lubińska.

Sur un procédé nouveau d'élaboration et reflexes conditionnels du II type et sur les changements d'excitabilité du contre cortical moteur au cours de l'apprentissage.

Reçu le 9.III.1939.

Lorsqu'on oblige un chien d'effectuer, dans certaines circonstances expérimentales, un mouvement déterminé et lorsque l'exécution de ce mouvement est renforcée par la nourriture, l'animal se met à effectuer spontanément le mouvement en question. C'est la formation d'un reflexe conditionnel du II type (Miller et Konorski '28, Konorski et Miller '33).

Pour obliger l'animal d'exécuter le mouvement que l'on voulait renforcer on a eu recours jusqu'à présent à un des procédés suivants: soit on faisait subir à l'animal un mouvement passif, soit on provoquait le mouvement reflexe en portant la stimulation sur un endroit approprié de la surface cutanée, soit, finalement, on attendait que l'animal effectuât accidentellement ce mouvement pour le renforcer.

Nous avons cru intéressant essayer d'obtenir le reflexe conditionnel du II type en utilisant au lieu du mouvement passif ou reflexe une réaction provoquée par la stimulation directe de la zone motrice du cerveau. Ce procédé offrait à côté de certains autres avantages (la réduction du nombre de facteurs intervenant dans l'élaboration du reflexe par suppression de tous les influx centripètes autres que les proprioceptifs provenant du membre en mouvement) la possibilité d'accès direct aux centres du reflexe en voie d'élaboration et d'étude des variations d'excitabilité dont il peut être siège au cours du processus d'apprentissage.

Technique.

Les expériences ont été effectuées sur les chiens auxquels on avait inséré¹⁾ au préalable des électrodes dont les pointes dénudées étaient posées directement à la surface de la pie-mère dans la zone motrice. Les animaux étaient parfaitement rétablis après l'opération et l'expérience avait lieu dans les circonstances habituelles de l'étude des reflexes conditionnels. La stimulation électrique de l'écorce était faite par la méthode monopolaire (l'anode dans le rectum). Le circuit d'excitation comprenait un générateur des décharges rythmiques des condensateurs à travers la lampe au néon (montage d'après *Briscoe* et *Leyshon* '29). On utilisait pour ces expériences la lampe de Philips 4378 alimentée par un courant constant de 125 V et le condensateur de 0.2 μ F, ce qui donnait le rythme de décharges de 20 par seconde environ avec le système des résistances de notre circuit. La fréquence ainsi que la durée de chaque décharge étaient maintenues constantes dans toutes les expériences. On ne faisait varier que le voltage et le nombre de stimuli appliqués.

Partie expérimentale.

Ces recherches ont été effectuées sur deux chiens que nous allons décrire séparément à cause de certaines différences dans la marche des expériences.

I. „Macaire”, ♂, poids 9 Kg; animal tranquille et pas très vorace. Mise en place des électrodes sur la zone motrice de l'hémisphère gauche le 6.XII.1938. Anesthésie au Dial-Ciba (0.6 cm³ par Kg). Comme l'animal était malade après l'opération, les expériences n'ont commencé que le 15.XII. La stimulation au point d'impact de l'électrode provoquait la flexion de la patte postérieure droite. L'expérience se déroulait dans les conditions suivantes: on mettait l'animal debout sur le support et on choisissait le voltage du stimulus de façon à ce qu'il provoque au bout de quelques secondes la flexion de la patte. Une fois ce mouvement exécuté, on donnait

¹⁾ La technique de la mise en place des électrodes sera décrite ailleurs dans ce recueil.

à l'animal un morceau de boudin. On répétait ces stimulations renforcées par la nourriture toutes les 0.5 à 1.5 minutes. La première séance comportait une vingtaine de ces associations. Vers la fin de cette période la latence est tombée à 1—2 secondes des 3 ou 4 initiales. La séance suivante avait lieu le même jour, 6 heures plus tard. C'est à cette séance, au bout de 45 associations (y compris celles du matin) que l'animal leva pour la première fois spontanément la patte postérieure droite. Le mouvement avait exactement la même allure que les réactions déclenchées par la stimulation électrique du cortex et il fut également renforcé par la nourriture. Les jours suivants les expériences avaient la marche semblable, on constatait cependant une diminution de plus en plus rapide des latences et l'apparition bien plus précoce des mouvements spontanés. La fig. 1 illustre l'évolution de ces phénomènes au cours de la III-me, IV-me et V-me séances expérimentales.

II. On procédait de façon un peu différente pour établir le reflexe conditionnel du II type chez l'autre animal.

C'était une chienne „Aza”, de 10.6 Kg, très vive et vorace. La mise en place des électrodes avait lieu le 1.II.1939. Anesthésie au Dial-Ciba, 0.5 cm³ par Kg.

La stimulation au point d'impact d'une des électrodes provoquait la flexion de la patte antérieure droite. C'est cette électrode qui fut utilisée dans la suite. Les expériences ont commencé le 3.II.1939. Elles se passaient ainsi: on faisait voir à l'animal un morceau de boudin (ce qui constituait un stimulus conditionnel „naturel”) et on stimulait l'écorce. Lorsque le mouvement de flexion de la patte antérieure droite fut effectué, on donnait à l'animal un bout de boudin. On a élaboré de la sorte un reflexe conditionnel du II type au stimulus conditionnel qu'était la présentation de la nourriture. De temps en temps on portait une stimulation sur l'écorce entre les présentations successives du boudin, mais on ne renforçait pas les mouvements effectués alors. On avait ainsi des segments de temps pendant lesquels l'animal avait tendance de fléchir la patte et d'autres où il restait parfaitement tranquille.

Lorsque le reflexe fut entièrement formé la présentation de la nourriture déclenchait immédiatement le mouvement de la

patte, il était alors très difficile d'étudier l'excitabilité du centre à ce moment. Mais lorsque le reflexe était en voie d'élaboration il était possible de saisir des changements d'excitabilité pendant le processus d'apprentissage, en comparant l'état du centre pendant la présentation de la nourriture et dans les intervalles entre

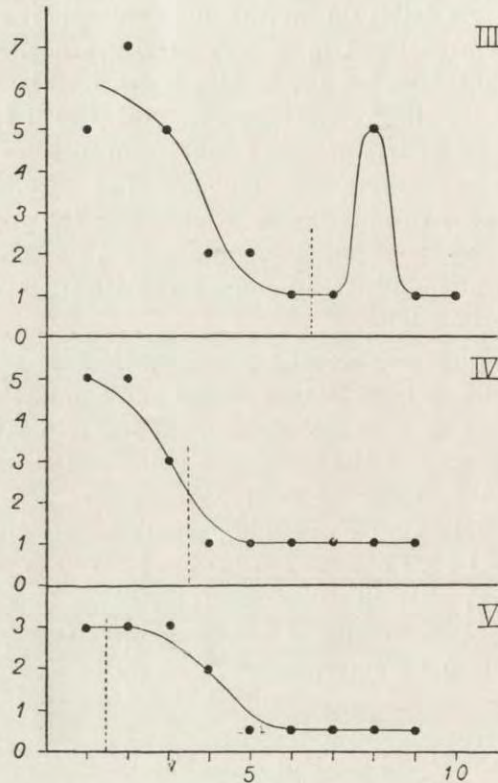


Fig. 1. Évolution des latences de la réaction motrice à la stimulation électrique du cortex au début de trois séances expérimentales III, IV et V, et le moment d'apparition du premier mouvement actif à chaque séance (indiqué en pointillé).

En abscisses: les stimulations successives de l'écorce à 1 minute d'intervalle environ.
En ordonnées: les latences correspondantes en secondes.

les présentations. Le seuil de la stimulation électrique diminuait sensiblement pendant l'application du stimulus conditionnel. Une étude détaillée nécessitait cependant la mesure d'une grandeur dont la détermination ne gênait pas la marche de l'expérience, en particulier il fallait maintenir constant le stimulus

électrique appliqué. Nous avons choisi la durée de la période latente qui satisfait à cette condition. Nous rapportons un extrait de procès-verbal portant sur la période initiale de l'apprentissage.

Extrait du procès-verbal du 3.II.1939.

Minute de l'expérience	Stimulus conditionnel	Voltage du stimulus électrique	Latence en secondes	Réaction	Renforcement
37	—	7	3	Mt de la patte ant. dr.	—
38	—	7	3	Mt de la patte ant. dr.	—
41	Présentation	7	3	Mt de la patte ant. dr.	+
43	—	7	5	Mt de la patte ant. dr.	—
45	—	7	3	Mt de la patte ant. dr.	—
47	Présentation	7	5	Mt de la patte ant. dr.	+
53	Présentation	7	5	Mt de la patte ant. dr.	+
57	Présentation	7	2	Mt de la patte ant. dr.	+
61	Présentation	7	3	Mt de la patte ant. dr.	+
63	Présentation	7	3	Mt de la patte ant. dr.	+
65	Présentation	7	3	Mt de la patte ant. dr.	+
68	Présentation	7	3	Mt de la patte ant. dr.	+
71	Présentation	7	3	Mt de la patte ant. dr.	+
72	—	7	3	Mt de la patte ant. dr.	—
75	Présentation	7	4	Mt de la patte ant. dr.	+
76	—	7	3	Mt de la patte ant. dr.	+
77	Présentation	7	2	Mt de la patte ant. dr.	+
80	Présentation	—	—	—	—
81	Présentation	7	2	Mt de la patte ant. dr.	+
82	Présentation	7	2	Mt de la patte ant. dr.	+
83	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
85	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
86	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
87	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
88	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
88.5	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
89	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
90	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
91	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
92	Présentation	—	—	Mt de la patte ant. dr.	+
93	Présentation	—	—	—	—

On voit que dans cette expérience les stimulations électriques agissant seules donnent lieu à une latence identique à celle que l'on observe lors d'application simultanée du stimulus conditionnel et de la stimulation électrique. Après 12 associations le stimulus conditionnel présenté seul ne provoque pas encore de mouvement de la patte. A cette époque à peu près on voit

cependant la latence à la stimulation simultanée tomber de 3 à 1 seconde. Vers la 25-me association la présentation de la viande a déterminé la flexion caractéristique de la patte antérieure en absence de la stimulation concomitante de l'écorce. C'était la première apparition du reflexe conditionnel du II type qui ne s'est d'ailleurs pas répétée une minute plus tard.

Le lendemain l'expérience continuait de la même façon et a permis de saisir certains côtés plus intimes du processus d'apprentissage.

Extrait du procès-verbal du 4.II.1939.

Minute de l'expérience	Stimulus conditionnel	Voltage du stimulus électrique	Latence en secondes	Réaction	Renforcement
1	—	7	2	Mt de la patte ant. dr.	—
2	—	7	2	Mt de la patte ant. dr.	—
3	Présentation	7	2	Mt de la patte ant. dr.	+
5	Présentation	7	1,5	Mt de la patte ant. dr.	+
6	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
8	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
10	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
11	—	7	3	Mt de la patte ant. dr.	—
12	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
13	—	7	1,5	Mt de la patte ant. dr.	—
14	—	7	1	Mt de la patte ant. dr.	—
15	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
17	Présentation	7	1	Mt de la patte ant. dr.	+
18	—	6	2,5	Mt de la patte ant. dr.	—
19	—	5	7	Mt de la patte ant. dr.	—
22	—	5	7	Mt de la patte ant. dr.	—
23	—	6	4	Mt de la patte ant. dr.	—
24	—	6	3,5	Mt de la patte ant. dr.	—
25	—	6	4	Mt de la patte ant. dr.	—
26	Présentation	6	1	Mt de la patte ant. dr.	+
28	Présentation	6	1	Mt de la patte ant. dr.	+
29	Présentation	6	1,5	Mt de la patte ant. dr.	+
31	—	6	3,5	Mt de la patte ant. dr.	—
32	—	6	3	Mt de la patte ant. dr.	—
34	Présentation	5	2,5	Mt de la patte ant. dr.	+
36	—	5	4,5	Mt de la patte ant. dr.	—
37	—	5	4	Mt de la patte ant. dr.	—
39	Présentation	5	1,5	Mt de la patte ant. dr.	+
41	Présentation	—	4*)	Mt de la patte ant. dr.	+
42	Présentation	—	2*)	Mt de la patte ant. dr.	+

*) C'est la latence à partir du moment de la présentation de la nourriture.

La latence était cette fois un peu plus petite qu'au début du jour précédent et tomba bientôt à une seconde environ pour la présentation du boudin accompagnée de la stimulation électrique. La stimulation électrique appliquée seule à la 11-me, 13-me et 14-me minute de l'expérience a donné 2 fois sur trois une latence plus prolongée que celle que l'on observait lorsque le stimulus conditionnel était appliqué également. Pour avoir sur ce point des résultats plus nets, on a étudié l'influence des stimuli plus faibles qui n'engendrent le mouvement qu'après une latence plus longue. Entre la 18-me et la 25-me minute on déterminait les latences correspondant à ces stimuli plus faibles (sans les accompagner du stimulus conditionnel). On voit qu'elles diminuaient sensiblement pendant la présentation de la nourriture et qu'elles avaient en outre une tendance à diminuer avec le nombre d'associations effectuées. À la 41-re et 42-me minute de l'expérience on a fait agir le stimulus conditionnel seul et on a obtenu les réactions reflexes (après des latences de 4 et 2 secondes).

Dans une des étapes plus avancées de l'apprentissage lorsque les mouvements spontanés sont devenus très fréquents on a pu saisir une période où la stimulation électrique déclenchait des mouvements plus amples qu'elles ne les déterminait auparavant et plus amples que les mouvements spontanés. On avait l'impression d'une sommation d'effets de l'excitation conditionnelle et du stimulus électrique. Plus tard dans la même séance les mouvements spontanés ont atteint eux aussi cette amplitude plus grande qui s'est maintenue dans la suite.

Discussion des résultats.

Il résulte de nos expériences que le chien peut „apprendre” à exécuter spontanément un mouvement que l'on provoquait par la stimulation électrique d'un centre moteur cortical en renforçant par la nourriture la réaction motrice ainsi obtenue²⁾.

²⁾ Les résultats expérimentaux semblables sur ce point ont été obtenus par Loucks ('36). Le point de départ de cet auteur ainsi que son interprétation sont très différents. Malheureusement le mémoire de Loucks nous est parvenu après la correction des épreuves et il nous est impossible de le discuter à présent.

Le reflexe conditionnel du II type que l'on obtient par ce procédé ne diffère à aucun point de vue des reflexes semblables élaborés à l'aide d'autres procédés. Ainsi il subit une extinction (les mouvements spontanés disparaissent), lorsqu'on cesse de le renforcer par la nourriture; un renforcement unique fait régénérer le reflexe éteint etc. Les propriétés des reflexes conditionnels du II type ont été décrites ailleurs (Konorski et Miller '33 et '36), il nous semble donc superflu d'en reparler ici. Nous nous bornerons donc à discuter à présent certains problèmes qui se posent à propos des reflexes obtenus par le procédé que l'on vient de décrire.

1°. Le reflexe conditionnel du II type formé au moyen de la stimulation directe du cortex moteur est-il établi plus rapidement que les reflexes formés par les autres procédés (mouvements passifs ou reflexes)? On pourrait le penser *a priori* car dans les autres circonstances il y a toujours un certain nombre de facteurs supplémentaires (divers stimuli cutanés par exemple) qui sont conditionnés en même temps que les influx proprioceptifs du mouvement exécuté et doivent être différenciés pour que le reflexe moteur puisse être formé. Tandis que dans notre cas c'est probablement le mouvement pour ainsi dire à l'état pur qui est conditionné. Nous ne pouvons cependant pas encore donner à cette question une réponse expérimentale. Les différences individuelles entre les animaux sont très grandes et les conditions expérimentales jouent un rôle important dans la vitesse d'établissement du reflexe, de sorte que nos résultats expérimentaux sont insuffisamment nombreux pour décider ce problème. Nous pouvons affirmer cependant que l'élaboration du reflexe conditionnel du II type au moyen de la stimulation directe du cortex moteur n'est pas plus lente que l'élaboration par les autres moyens.

2°. Le mouvement spontané de l'animal est-il exactement identique au mouvement provoqué par la stimulation de l'écorce?

Sur nos deux animaux (dont un fléchissait la patte antérieure et l'autre postérieure) ces mouvements semblaient absolument identiques de sorte que l'observateur était incapable de discerner s'il s'agit du mouvement spontané ou provoqué par la stimulation. Il faut être moins affirmatif en ce qui concerne

la période tout à fait initiale de l'apprentissage. L'animal manifeste généralement une inquiétude motrice au début d'établissement de tout reflexe conditionnel c'est pourquoi il est difficile de savoir si la réaction reflexe n'est pas constituée alors par le mouvement un peu plus généralisé que la réaction à la stimulation électrique.

3°. Pendant l'élaboration des reflexes on a observé chez les deux animaux une diminution de la latence de réaction qui précédait l'apparition des mouvements spontanés. Il semble que cette diminution s'accroisse davantage après la formation du reflexe, ce fait est cependant assez difficile à établir parce que, comme nous l'avons déjà mentionné, les mouvements spontanés ne diffèrent en rien des mouvements déclenchés par la stimulation électrique de l'écorce, on n'est donc jamais certain d'avoir affaire à la réaction au stimulus électrique et non à un mouvement spontané.

Il faut remarquer que nous avons observé par ailleurs l'augmentation d'excitabilité du centre cortical moteur lorsque l'animal passait de l'état d'indifférence ou de somnolence à l'animation (comp. L u b i n s k a et K o n o r s k i '39). On pourrait donc supposer que la diminution de la latence dans les expériences rapportées plus haut soit due à l'animation progressive du chien à la suite d'offres répétées du boudin. Cette hypothèse nous paraît cependant peu vraisemblable à la lumière des procès verbaux d'„Aza". Dans le stade initial de l'apprentissage (procès-verbal du 3.II.39) les latences ont été identiques pour les stimulations électriques seules et accompagnées de la présentation du boudin, malgré l'excitation de l'animal par la nourriture. Ce n'est qu'à mesure de l'établissement du reflexe conditionnel à la présentation de la nourriture que les différences sont apparues (procès-verbal du 4.II).

Nous sommes ainsi amenés à penser que l'élaboration du reflexe conditionnel du II type (qui est à la base du comportement moteur acquis) est intimement liée à un accroissement d'excitabilité des centres moteurs corticaux correspondants. Les recherches en cours ont pour but d'analyser ce problème de plus près.

Résumé et conclusions.

1°. En renforçant par la nourriture un mouvement déclenché par la stimulation d'une aire motrice du cerveau chez le chien on fait apparaître le reflexe conditionnel du II type, c'est à dire l'animal apprend à effectuer spontanément ce mouvement dans les circonstances expérimentales données.

2°. Lorsqu'on renforce systématiquement par la nourriture la réaction motrice provoquée par la stimulation portée sur un point moteur de l'écorce, on observe une diminution de la latence et un abaissement du seuil de ce mouvement ce qui indique l'accroissement d'excitabilité du centre cortical stimulé. Ce fait est probablement étroitement lié au processus d'apprentissage.

Bibliographie.

Briscoe G. and Leyshon W. 1929. Reciprocal contraction of antagonistic muscles in peripheral preparation, using flashing neon-lamp circuit for excitation of nerve. *Proc. Roy. Soc. B*, 105, 259.

Konorski J. et S. Miller 1933. Les principes fondamentaux de la théorie physiologique des mouvements acquis. Les reflexes conditionnels moteurs. *Med. Dośw. i Społ.* 16. — Konorski J. and S. Miller 1936. Conditioned reflexes of the motor analyser. *Studies from I. P. Pavlov's Physiol. Lab.* 6/1 (127—278). — Loucks R. B. 1936. The experimental delimitation of neural structures essential for learning: the attempt to condition striped muscle responses with faradisation of the sigmoid gyri. *J. of Psychol.* 1 (5—44). — Lubińska L. et J. Konorski. 1939. Sur les propriétés d'un centre moteur de l'écorce cérébrale étudiées sur l'animal normal. XIII Réunion Ass. Physiol. (372). — Miller S. et Konorski J. 1928. Sur une forme particulière des reflexes conditionnels. *C. R. Soc. Biol.* 99 (1155).

[Institut für physiologische Chemie der Stefan Batory Universität in Wilno].

A. Wigura.

Über den Einfluss von Insulin auf den endogenen Alkoholgehalt im Blute des Menschen.

Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 17.II.1939.

Durch die Arbeiten vieler Forscher insbesondere von *Gettler*, *Niederl* und *Benedetti-Pichler* ('32) ist in tierischen Geweben und im Blute Alkohol nachgewiesen worden, welcher aus Stoffwechselfvorgängen stammt. Nach den Angaben der oben zitierten Autoren beträgt der endogene Alkoholgehalt im menschlichen Blute ca 4 mg%, nach *Friedemann* und *Klaas* ('36) 0.4 mg%. Nach meinen Untersuchungen schwankt beim Menschen die Blut-Alkoholkonzentration zwischen 0.9 — 1.2 mg%.

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich den Einfluss von Insulin auf den endogenen Alkoholspiegel im Blute des Menschen. Die Arbeiten früherer Forscher (*Kanitz* '36; *Siegmund* u. *Flohr* '37; *Widmark* '35) bezogen sich hauptsächlich auf den Einfluss von Insulin auf den exogenen Blut-Alkoholgehalt; die Wirkung des Insulins auf den endogenen Blut-Alkohol wurde nur von *Aoki* ('25; '26; '27) studiert, welcher bei Vögeln nach Insulinzufuhr einen Abfall der Blutalkoholkonzentration beobachtete. Seine Werte weichen jedoch nur wenig von denen der Norm ab und da auch die nötigen Kontrollen fehlen, so erscheinen die Resultate seiner Untersuchungen nicht ganz sicher.

In meiner Arbeit bestimmte ich den Alkohol nach *Friedemann* und *Klaas* ('36) d. h. durch doppelte Destillation des untersuchten Materials einmal aus saurer, das andere Mal

aus alkalischer Lösung. In dieser Weise werden nämlich andere flüchtige und reduzierende Substanzen von basischem und saurem Charakter ausgeschaltet. Der abdestillierte Alkohol wird mit Permanganat oxydiert und der Überschuss von Permanganat jodometrisch titriert. Die Fehlergrenze der Methode ist aus folgenden Werten ersichtlich, welche an demselben Rinderblut in 6 Parallelbestimmungen ermittelt wurden:

0.99; 0.92; 0.88; 0.85; 0.80; 0.74mg%.

Meine Untersuchungen wurden an dem Krankenmaterial der Universitätsklinik für Nerven- und Geisteskranken (Wilno)¹⁾ durchgeführt, und zwar an Patienten, welche mit grossen Insulindosen behandelt wurden.

Das Blut (5—8 cm³) gewannen wir aus der Kubitalvene, nach Reinigung und Desinfektion der Haut mit Seifenlösung und 1% Sublimat. Die erste Blutprobe wurde den Kranken unmittelbar vor der intramuskulären Injektion von Insulin entnommen, die zweite auf der Höhe der hypoglykämischen Symptome (diese Symptome bestanden entweder in vollständigem Kollaps oder in Benommenheit je nach der Insulindosis und der individuellen Empfindlichkeit der Kranken), die dritte nach dem Abklingen der Insulinwirkung. Der hypoglykämische Kollaps wurde durch intravenöse Glucoseinjektion und perorale Zufuhr von Kohlehydraten (Obstsafte, Marmelade und Brot) aufgehoben. Zum entnommenen Blut wurde Kaliumoxalat und Natriumfluorid zugesetzt. Die Zeitintervalle zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme betragen durchschnittlich ca 3 Stunden, zwischen der Zufuhr von Kohlenhydraten und der dritten Blutentnahme etwa 1 Stunde.

Die Resultate meiner Versuche sind aus der Tabelle ersichtlich.

Aus den mitgeteilten Versuchen zeigen nur Versuche 3a, 6a und 8 Differenzen im Blut-Alkoholgehalt (vor und nach Insulinzufuhr) welche die Fehlergrenze der Methode übersteigen. Diese Differenzen scheinen aber in keinem Zusammenhang mit

¹⁾ Der Leitung der Klinik danke ich bestens für die freundliche Erlaubnis zu diesen Untersuchungen. Herrn Dr. O I s z e w s k i bin ich für die erwiesene Hilfe sehr verbunden.

Tabelle.

Protokoll- Nummer	mg % Alkohol vor Insulin	Insulin- dosis	Zeit der II. Blut- entnahme nach Insu- lin in Minuten	mg % Alkohol in der II. Blut- portion (nach Insulin)	Zeit der III. Blut- entnahme nach Zu- fuhr von Kohlen- hydraten	mg % Alkohol in der III. Blutprobe
1. Terl.	1.82	150	150	1.74		
2. Ter.	1.14	40	180	1.04		
3. Tem.	1.00	52	180	2.58		
	0.67	88	180	0.50		
4. Kos.	1.27	60	180	1.00	60	1.00
5. Pasz.	0.92	40	120	1.23	60	1.20
6. Lasz.	1.70	40	120	0.86		
	1.20	40	150	1.20		
7. Bier.	1.07	50	180	1.06		
8. Kit.	—	40	180	1.03	60	1.48
9. Sch.	0.97	50	210	0.82	90	1.20
10. Lab.	1.00	50	210	1.24	90	1.13

dem Kohlenhydratstoffwechsel zu stehen, was daraus hervor-
geht, dass bei denselben Kranken schon 4 Tage später (Ver-
suche 3b und 6b) keine nennenswerten Unterschiede im Blut-
alkohol vor und nach Insulinbehandlung auftreten. Übrigens
sind die Unterschiede in 3a und 6a nicht gleich gerichtet: im
Falle 3a ist ein Anstieg, im Falle 6a ein Abfall der Alkoholkon-
zentration zu beobachten. Wir haben es also entweder mit ir-
gendeinem individuellen Faktor, oder aber — was nicht aus-
zuschliessen ist — mit einem Versuchsfehler zu tun.

Die Kranken Nr. 1, 5, 7, 8, 9 und 10 befanden sich nach
Insulinzufuhr im Kollapszustand, wenn ihnen die zweite Blut-
probe entnommen wurde; die übrigen Kranken waren nur be-
nommen. Der Blutzucker solcher Kranken fällt nach den Unter-
suchungen von I. Rose ('35), aus derselben Klinik, unmittel-
bar nach der Insulinzufuhr während der ersten 30—40 Minuten
sehr schroff, später nur langsam ab. Der Kollaps tritt bei einem
Blutzuckerspiegel von 20—40 mg% ein. Nach intravenöser Glu-
coseinfusion und peroraler Kohlenhydratzufuhr steigt der Blut-
zucker schon nach 30 Minuten auf 120—130 mg% an.

Aus den oben mitgeteilten Versuchen geht eindeutig hervor,
dass Insulin keinen Einfluss auf den endogenen Alkoholspiegel
im Blut des Menschen ausübt.

Literatur.

- Aoki M. 1925; 1926; 1927. The production of alcohol in the animal body. *J. of Biochem.* 5 (71), 6 (307), 7 (333). — Friedemann T. a. Klaas R. 1936. The determination of ethyl alcohol. *Journ. of biol. Chem.* 115 (47). — Gettler A. O., Niederl J. B., Benedetti-Pichler A. A. 1932. The isolation, identification a. quantitative determination of ethyl alcohol normally present in human a. animal tissues. *Mikrochemie* 5 (167). — Kanitz R. H. 1936. Über die Wirkung des Insulins auf den Verlauf der alimentärhyperglykämischen u. alimentärhyperalkoholemischen Kurve. *Naunyn Schmied. Arch.* 183 (380). — Rose J. 1935. Zachowanie się cukru gronowego we krwi w przebiegu leczenia schizofrenii wielkimi dawkami insuliny. *Rocznik Psychiatr.* 25 (1). — Siegmund B. u. Flohr W. 1937. Über den Einfluss von Insulin auf den Alkoholumsatz beim Menschen. *Klin. Wochenschr.* (1718). — Widmark E. 1935. Hormonaler Einfluss auf den Alkoholumsatz. *Biochem. Zeitschr.* 282 (79).

[Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Lwów].

T. Korzybski und J. K. Parnas.

Über den Umsatz der Adenosintriphosphorsäure im lebenden Tier.

Vorgestellt in der Sitzung der Abteilung Lwów der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 8.II.1939.

Diese Untersuchung schliesst an eine Frühere an¹⁾ in welcher wir untersucht haben, ob der an Pentose direkt gebundene Phosphor der Adenylsäure in den Muskeln eines lebenden Tieres ausgetauscht wird, und in welchem Zeitmass. Kleine Mengen von Na_2HPO_4 , die durch radioaktives ^{32}P gezeichnet waren, wurden Kaninchen injiziert, nach verschiedenen Zeiten wurden die Kaninchen getötet; aus ihren kurz autolytierten Muskeln, wurde die Inosinsäure als Bariumsalz präpariert, schliesslich im Phosphor der Inosinsäure die Aktivität bestimmt. Die Aktivität dieses Phosphors, der aus dem Phosphor der Adenylsäure hervorgeht, wurde in jener Arbeit mit der Aktivität des Phosphors verglichen, der im autolytierten Muskelbrei als anorganischer Phosphor enthalten ist, und der aus dem wirklich anorganischen Phosphat, aus dem Phosphokreatin und den Zuckerestern abstammt, so wie aus den beiden labilen Phosphoren derselben Adenosintriphosphorsäure, aus welcher der in Form von Inosinsäure isolierte Phosphor stammt. Das Ergebniss jener Arbeit lässt sich kurz dahin zusammenfassen, dass der Phosphor der Adenylsäure im Verhältniss zum Phosphor der anderen Verbindungen sehr langsam ausgetauscht wird.

¹⁾ T. Korzybski und J. K. Parnas. Z. physiolog. Chem. 255. 195. 1938. Vgl. auch: G. Hevesy, T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Ostern, und J. K. Parnas. Acta Biol. Experimentalis. 12. 34. 1938.

In der vorliegenden Arbeit wollten wir den Austausch der Phosphoratomte, die im Molekül der Adenosintri-phosphorsäure enthalten sind, im Muskel des lebenden Tieres genauer verfolgen. Wir haben also die Adenosintri-phosphorsäure unter Vorsichtsmassregeln isoliert, welche postmortale Umsetzungen weitgehend einschränken mussten; wir haben die beiden Phosphore, die gegenüber chemischen Reagenzien und Enzymen des Muskels labil sind, durch alkalische Hydrolyse abgespalten; die dabei entstandene Adenylsäure enzymatisch desaminiert und als Inosinsaures Barium isoliert und gereinigt. Magnesium-Ammoniumphosphat aus Pyrophosphat, das bei alkalischer Hydrolyse das ATP abgespalten war, und das gleiche Phosphat aus der Inosinsäure, beide aus demselben Molekül des ATP stammend, wurden verglichen, und ausserdem wurde als Vergleichssubstanz das anorganische Phosphat, das in den Muskeln enthalten war, verwendet. Wir haben in diesen Versuchen die Kaninchen nur kurz nach der Phosphatinjektion leben lassen. Die Versuche dauerten 30, 60 und 120 Minuten. Diese Versuchsanordnung ging auf Folgendes aus: den Austausch des Phosphors IV (Fig. 1) in den kleinsten Grenzen zu halten; dadurch den Austausch der Phosphore V und Va um so reeller erscheinen zu lassen; ausserdem aber die Zeit kennenzulernen, in welcher der erstaunlich schnelle Austausch der labilen Phosphore zwischen der Adenosinpolyphosphorsäure einerseits, ihren Phosphatdonatoren — dem anorganischen Phosphat und dem Phosphokreatin — andererseits stattfindet.

Die Versuchsanordnung war die folgende: Kaninchen von etwa 2 kg Gewicht erhalten in die Ohrvene eine Injektion von Na_2HPO_4 das ^{32}P enthält. Sie werden dann in einem kleinen Käfig ruhig gehalten. Nach Verlauf der Zeit, die für den Versuch bestimmt war, wurden die Tiere durch Nackenschlag und Entblutung getötet, sehr schnell gehäutet, sofort in Eis gelegt und die Bauchhöhle mit Eiswürfeln ausgefüllt. Nach Abkühlung werden die Muskeln schnell und möglichst ohne Querschnitte präpariert und durch eine grosse Wurstmaschine, die durch hindurchgetriebenes Eis abgekühlt war, durch das feinste Sieb (Frankfurterwürstchen) in kalte 10% Trichloressigsäure getrieben.

Gegen diese Procedur wäre noch ein Bedenken zu erheben. Schon beim Zerreiben der Muskeln konnten jene Reaktionsketten in Gang kommen, durch welche die ATP in die Glykolyse eingreift, und in welchen die Phosphatdonatoren — anorganisches Phosphat und Phosphokreatin — in der Resynthese der Adenosintri-phosphorsäure teilnehmen. Durch diese postmortalen Vorgänge konnte die Rejuvenierung der Adenosintri-phosphorsäure, die wir feststellen, vorgetäuscht werden, sie könnte postmortal und traumatisch sein, und nicht physiologisch. Um diese Fehlerquelle zu verringern, haben wir sofort nach Tödtung und Häutung des Tieres grosse Adduktoren der Oberschenkel möglichst verletzungs-frei präpariert und in flüssige Luft geworfen, um sie später im gefrorenen Zustande in Trichloressigsäure zu fixieren. Diese Muskeln wurden nicht auf Inosinsäure verarbeitet, sondern es wurde anorganisches Phosphat und das labile Phosphat der Adenosintri-phosphorsäure isoliert. Es ist zu bemerken, dass das Verhältniss dieser Fraktionen in diesem Versuch und in ungefrorener Muskelmasse verschieden ist, aber nur auf einen Anteil der postmortal-traumatischen Vorgänge an der Rejuvenierung der Phosphore V und Va hinweist.

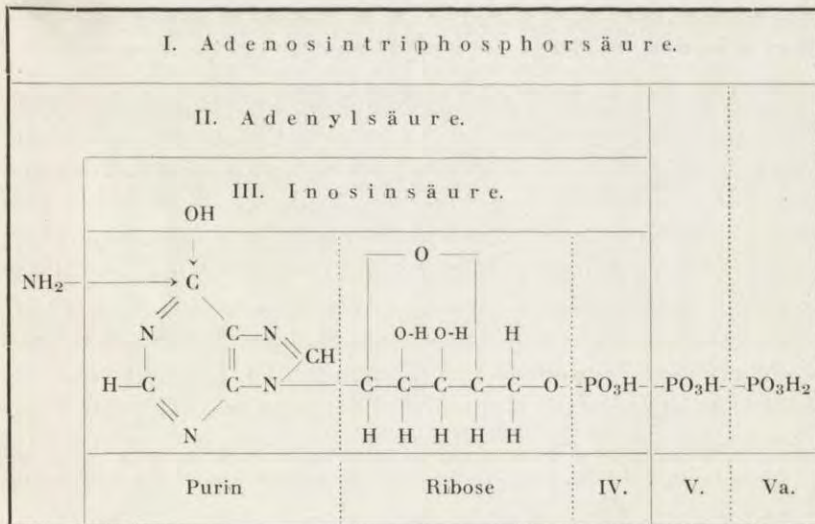


Fig. 1

Über die chemische Beziehungen der Adenosintri-phosphorsäure²⁾, ihrer Derivate und Fraktionen gibt das Schema eine Übersicht (Fig. 1), in welchem wir die Lohmannsche Formel der Adenosintri-phosphorsäure verwenden. Es würde an den Beziehungen der Phosphore nicht viel ändern, wenn eine andere Formulierung der ATP und der Adenosinpolyphosphorsäuren sich richtig erweist. Wir werden in der Folge bei der Darstellung der Methode und der Bezeichnung der Fraktionen uns an dieses Schema halten.

Die chemische Verarbeitung des Trichloressigsäure-extrakts ist im Schema (Fig. 2) dargestellt, das wir aber in seinen einzelnen Phasen erläutern wollen. Der Extrakt wird auf pH = 6 gebracht und mit Essigsauerm Barium gefällt. Der Niederschlag enthält ATP-Bariumsalz und anorganisches Bariumphosphat; im Filtrat ist das anorganische Phosphat als Bariumsalz enthalten. Aus der Lösung wird das Barium niedergeschlagen, abfiltriert und das Phosphat mit Magnesia-Mischung gefällt; man erhält so den grössten Teil des anorganischen Phosphats (VI) der Muskeln. Anorganisches Phosphat ist jedoch auch im Niederschlag des ATP-Ba enthalten: wir lösen den Niederschlag in kalter 0.2 n HNO₃ auf, entfernen das Barium und fällen das anorganische Phosphat als Magnesium- Ammoniumphosphat, welches dann umgefällt wird. In einigen Versuchen wurde diese Fraktion gesondert gemessen (VII), weil darin auch Phosphat enthalten sein kann, das aus der Adenosintri-phosphorsäure hydrolytisch abgespalten ist. Aus dem Filtrat der Phosphatfällung wird jetzt die Adenosintri-phosphorsäure mit Essigsauerm Barium gefällt, der gewaschene Niederschlag wird bei 100° mit Ba(OH)₂ behandelt, wobei die Reaktion so gehalten wird, dass Phenolphthalëin gerade maximal gerötet wird; die alkalische Reaktion verschwindet zunächst, dann wird Bariumhydroxyd zugefügt. Wir haben in besonderen Versuchen ausprobiert, dass unter diesen Bedingungen 90 Minuten lang erhitzt werden muss (es wurde dabei dauernd gerührt), um einen maximalen Gehalt an Adenylsäure in der heissen Lösung zu erreichen, ohne dass eine Spaltung der Adenylsäure zu Adenosin

2) J. K. Parnas. Erg. d. Enzymforschung. 6. 57. 1937.

ihr enthaltene Phosphor fehlt zwar in der Endausbeute an Inosinsäure, geht aber nicht in das Phosphat V und Va ein, denn er wird bei der 10-Minutenhydrolyse in n-HCl bei 100° nicht abgespalten, durch welche das Pyrophosphat (V und Va) in Orthophosphat übergeführt wird. Das Pyrophosphat wird also in HCl aufgelöst, die 10-Minuten-Hydrolyse ausgeführt, das Barium entfernt, dann wird das $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ niedergeschlagen, in dem die Phosphore V und Va enthalten sind. Das Ammonium-Magnesiumphosphat wird 1 bis 2 mal umkrystallisiert, um es von der Verunreinigung mit Inosinsäure zu befreien³⁾.

Bei allen diesen Operationen erwies sich die Schnellmethode für die Bestimmungen der Verunreinigungen mit Pentosederivaten sehr nützlich, die von W a n d a M e j b a u m in diesem Laboratorium ausgearbeitet worden ist (*Z. physiol. Chem.* 258, 117, 1939): man kann sich schnell darüber orientieren, wieviel Adenylsäure oder Inosinsäure in den Fällungen noch steckt. In Anbetracht dessen, dass der Phosphor IV entweder überhaupt nicht, oder aber sehr viel schwächer durchaktiviert ist, als die Phosphore V und Va, sind die an der Pentosebestimmung ermittelten kleinen Verunreinigungen mit dem Phosphor IV unerheblich. Die vom Pyrophosphat V und Va getrennte Lösung wird vom Barium befreit und enzymatisch desaminiert. Wir verwenden für diesen Zweck einen nach L o h m a n n (*Biochem. Z.* 272, 24, 1934) bereiteten Extrakt aus mehrfach gewaschenem Muskelbrei, der in den Versuch keine Phosphate und keine Inosinsäure einführt. Durch Inkubation mit diesem Extrakt wird die Adenylsäure in Inosinsäure übergeführt, wobei die Desaminierung durch die Bestimmungen der NH_3 -Bildung kontrolliert wird. Die Inosinsäure wird als Bleisalz gefällt, der Niederschlag entbleit, mit $BaCO_3$ gesättigt, filtriert und durch Eindampfen eingeengt, schliesslich das Inosinsäure Barium zur Krystallisation gebracht, abfiltriert und umkrystallisiert. Das Inosinsäure Barium wird dann mit Soda und Salpeter verascht, aus der vom Barium befreiten Lösung der Schmelze das Ammonium-Magnesiumphosphat gefällt, welches den Phos-

³⁾ G. Hevesy, T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Osterreich, und J. K. Parnas. *Acta Biol. Exper.* 12, 34, 1938. Punkt V.

phor IV enthält. Es konnte keinen schärferen Nachweis der Sauberkeit dieser Verarbeitung geben, als die Feststellung, dass dieses Ammonium-Magnesiumphosphat im 30-Minuten-Versuch völlig inaktiv war, während die Fraktionen V und Va sowie VI stark aktiv sind.

Vgl. die Bezeichnungen Fig. 1 u. 2	Phosphatfraktionen	A k t i v i t ä t nach						
		30'	30' *)	30' *)	60'	120'		
VI	Anorganisches Phosphat	100	100	100.8	100	149.5	100	100
IV	Phosphat aus Inosinsäure	0	0	—	0	—	4	3
V u. Va.	Leicht abspaltbare Phosphatgruppen aus ATP.	79	70.7	68.2	105	88	82	86
VII	Phosphat mit dem ATP-Ba zusammen gefällt, dann als $MgNH_4PO_4$ abgeschieden	—	70.7	80.0	92.6	129.0	—	—
		A	B	B ₁	C	C ₁	D	E

*) Gefrorene Muskeln. Die Aktivität des anorganischen Phosphats aus dem nicht gefrorenen Muskel ist in den Versuchen gleich 100 gesetzt. Die Versuche B und B₁, sowie C und C₁ gehören zusammen, und die Werte für das anorganische Phosphat, sowie die anderen Fraktionen in diesen Versuchspaaren sind miteinander vergleichbar.

Fig. 3.

Die Ergebnisse dieser Versuche (Fig. 3) können wir folgendermassen zusammenfassen: Es zeigt sich mit aller Schärfe, dass im Kaninchen nach 30 Minuten der Phosphor der Adenylsäure (IV) überhaupt nicht nachweislich ausgetauscht wird. Nach 60 Minuten und nach 2 Stunden sind die Aktivitäten dieser Fraktionen bereits feststellbar, aber die Zahlen haben keine reelle Bedeutung, denn sie entsprechen sehr schwachen Aktivitäten: die Durchaktivierung und ihr Verlauf in so kurzen Zeiten müsste in grösseren Versuchsreihen und aus grösseren Mengen von Material gemessen werden, wenn dies von Bedeutung wäre.

Ganz anders für die Phosphore V und Va. Sie erweisen sich in den Versuchen so durchaktiviert, dass sie zwischen 70 und über 100% der Aktivität des wirklich anorganischen Phosphats des Muskelgewebes aufweisen. Um feststellen zu können, in welcher Zeit nach der Injektion dieser Zustand bereits hergestellt

ist, müsste man Versuchsreihen ausführen, die sich auf viel kürzere Zeiten erstrecken. Die Phosphatfraktionen VII, die in einigen Versuchen bestimmt worden sind, stehen in ihrer Aktivität dem Phosphor V und Va, oder dem anorganischen Phosphor nahe, oder sie liegen zwischen beiden. Wählt man das anorganische Phosphat der in flüssiger Luft gefrorenen Muskeln als gleich 100, so erweist sich die Aktivität des anorganischen Phosphors der nicht gefrorenen Muskeln gleich oder geringer, die Aktivität der Phosphore V und Va etwas grösser als in den durch Gefrieren fixierten Muskeln. Dies beweist, dass die postmortal-traumatischen, mit intensiver Glykogenolyse verbundenen Umsetzungen des Phosphors in der Durchaktivierung der Phosphore V und Va wohl in Gewicht fallen, aber nur einige Prozente dieser Durchaktivierung ausmachen. Die beweglichen Phosphore der Adenosintriphosphorsäure sind im Muskel des Kaninchens in 30-Minuten-Versuch drei Minuten nach Tödtung — zu mindestens 60% mit dem anorganischen Phosphat des Muskels im Gleichgewicht. Dabei kann man — hier wollen wir die Vorstellungen zur Hilfe nehmen, die sich auf enzymchemische Versuche stützen, — annehmen, dass die in der kurzen Zeit zurückgebildete Adenosintriphosphorsäure ihre Phosphore V und Va aus dem Phosphokreatin hat, und nicht aus dem anorganischen Phosphat, und dass in diesem Zustand des Muskels noch wenig Milchsäure gebildet worden ist.

Die hier beschriebenen Versuche erscheinen uns in folgendem Zusammenhang nicht unwichtig. Die Entwicklung der Vorstellungen über die chemischen Vorgänge im Muskel, — ähnlich auch in der alkoholischen Gärung und wahrscheinlich auch in anderen gewebchemischen Vorgängen — hat zu einem sehr komplizierten Bild geführt, auch in Vorgängen, die früher viel einfacher erschienen. Diese Vorstellungen stützen sich aber notwendigerweise auf Versuche an gestörten Systemen: Gewebsextrakten, in verschiedenem Grade gereinigten Enzymen, vergifteten Geweben. Es fehlt an physiologischen Versuchen, welche die Anwendung der gewebchemischen Resultate aus dem lebenden Organismus stützen würden. Die Anwendung der stabilen und der radioaktiven Isotopen zur Bezeichnung von Substanzen in physiologisch-chemischen Versuchen hat eine neue

Ära eröffnet. So konnten in der Physiologie des Eiweißstoffwechsels die fundamentalen Ergebnisse der Arbeiten von K n o o p, von K r e b s, von B r a u n s t e i n durch einige Experimente von R. S c h o e n h e i m e r c. s.⁴⁾ am lebenden Tier b e w i e s e n werden, in welchen der schwere Stickstoff ¹⁵N zur Bezeichnung von Ammoniak und von Aminosäuren verwendet worden ist. Ganz ähnlich ist die Lage auf dem Gebiet der Glykogenolyse und der Glykolyse: die zentrale Rolle der Adenosintri-phosphorsäure ist aus Versuchen an Enzymextrakten in durchaus widerspruchsfreier Weise erschlossen, es fehlte aber bis jetzt vollständig an einem physiologischen Stützpunkt für die Übertragung auf den lebenden Organismus. Es ergibt sich daraus oft eine Erschwerung der Verständigung zwischen den Vertretern der Gewebchemie einerseits, Physiologen anderer Gebiete andererseits.

In der hier mitgeteilten Versuchen ist zumindestens der Nachweis auch an lebenden Tier geführt, dass vom Molekül der Adenosintri-phosphorsäure zwei Phosphatgruppen i m l e b e n d e n Tier im lebhaften Austausch mit dem anorganischen Phosphat stehen, während die dritte, die der Adenylsäure, während längerer Zeiten keinem Austausch unterliegt. Es ist damit ein Versuch gemacht, zumindestens für einen Punkt der Lehre vom intermediären Stoffwechsel der Kohlehydrate und für die Koenzymfunktion der Adenosintri-phosphorsäure und der Adenylsäure einen p h y s i o l o g i s c h e n Nachweis zu erbringen.

4) S c h o e n h e i m e r R. c. s., J. biol. Chem. 127. 285—344. 1939.

[Institut de Physiologie, Université Jean Casimir de Lwów].

M. Wierzuchowski et Z. Bieliński.

**Influence du CO₂ gazeux sur le sinus carotidien
circulatoirement isolé.**

Présenté à la séance de la Société Polonaise de Physiologie, Section de Lwów, le 8.II.1939.

On a isolé circulatoirement chez les chiens anesthésiés à la chloralose un sinus carotidien, laissant intact, ou presque intact, son nerf sino-carotidien. Après la ligature de la carotide commune on a fait communiquer vers le sinus une canule avec la carotide commune et une autre avec la carotide externe. On rinçait le sang et on faisait circuler par le sinus sous pression les gaz O₂, CO₂ et parfois l'acétylène. Le manque de phénomènes d'embolie gazeuse qui apparaît, quand même le plus petit vaisseau communique avec la circulation générale, prouvait l'exactitude de l'isolation vasculaire. On a tracé la pression centrale dans l'artère fémorale, la pression à l'intérieur du sinus carotidien, par lequel on laissait passer les gaz, et on enregistrait aussi les respirations. Le sinus, dépourvu de tout liquide, était soumis pendant des heures aux perfusions gazeuses.

Les gaz étaient employés dans des conditions rigoureusement identiques et sous la même pression. On a observé à cette occasion: a) des réflexes pressosensibles provenant de la pression du gaz exercée sur les terminaisons nerveuses pressoréceptrices, de même que b) des réflexes chémosensibles dont l'apparition doit être attribuée à l'action spécifique du gaz donné sur les terminaisons spécifiques. En outre on pouvait remarquer des différences dans l'action de certains gaz sur les terminaisons pressosensibles, qu'on attribuait à leur influence chimique sur ces terminaisons.

Les réflexes pressorécepteurs. Pendant le passage du CO₂ par le sinus carotidien les réflexes au facteur

„pression” étaient souvent plus faibles que pendant le passage de l'O₂. Pendant une augmentation de pression du CO₂ jusqu'à 200 mm Hg durant 30 secondes non seulement la pression artérielle ne baissait autant que pendant l'action de l'O₂, mais la chute de la pression ne durait souvent que pendant la première dizaine de secondes de la pression, et dans la phase suivante de sa durée la pression artérielle générale retournait au niveau d'avant la pression, ou montait parfois au-dessus de ce niveau. Le cas ne se présentait pas pour l'O₂ ni pour l'acétylène.

Quand on perfuse durant une dizaine de minutes le sinus avec un courant de CO₂, on arrive même à la disparition complète des réflexes pressorécepteurs, tandis que la perfusion du sinus par l'O₂ conserve les réflexes pendant une période allant jusqu'à 10 heures ou plus (Bieliński¹⁾). Si on laisse passer le CO₂ par le sinus sous une pression même relativement assez basse, ou si on en remplit le sinus et on l'y laisse sans exercer aucune pression, une introduction postérieure de l'O₂ sous haute pression semble donner des résultats moins prononcés d'une diminution réflexe de la pression artérielle générale, que celle qu'on obtiendrait sans l'action antérieure du CO₂.

Au fur et à mesure qu'on sectionne successivement les trois nerfs frénateurs restants (les deux dépresseurs de l'aorte et l'autre nerf sinusien), les réflexes pressorécepteurs du nerf sino-carotidien intact augmentent d'intensité, mais leur relation reste semblable, puisque le réflexe amené par la pression du CO₂ est toujours plus faible que celui provoqué par l'O₂ et l'acétylène.

Quand dans le sinus n'étaient conservées que les fibres pressoréceptrices, le CO₂ entraînait une diminution de la respiration, de même que l'O₂ et l'acétylène. Mais l'influence du CO₂ sur la respiration était — ainsi que celle sur la circulation — manifestement plus faible qu'avec les deux autres gaz, ce qui apparaissait avec une évidence particulière après la section des deux nerfs dépresseurs de l'aorte et du second nerf sino-carotidien. L'action du CO₂ diminuant la sensibilité des terminai-

1) Z. Bieliński. 1938. Acta Biologiae Experimentalis, 12, 165.

sons nerveuses pressoréceptrices, apparaît donc également dans les réflexes circulatoires que dans les réflexes respiratoires.

R é f l e x e s c h é m o r é c e p t e u r s. Dans certaines expériences on a réussi à obtenir durant l'introduction du CO_2 sous pression de 200 mm Hg une accélération et un approfondissement considérable de la respiration, qui avaient comme effet une augmentation de ventilation pulmonaire allant jusqu'à quelques cents p. 100. En des conditions identiques l' O_2 ne provoquait dans la même préparation qu'un ralentissement de la respiration. La pression artérielle tombait pendant l'augmentation de la ventilation amenée par le CO_2 .

Quand on exclue les autres zones vasculaires chimico-sensibles par la section des vago-sympathico-dépresseurs et du second nerf sino-carotidien, on obtient pendant la perfusion du sinus isolé par le CO_2 une augmentation de la respiration de caractère semblable qu'avant la section. De basses pression du CO_2 , voisines pourtant de celles qui règnent dans le sang, n'ont déterminé pendant la perfusion du sinus par le CO_2 aucun ou rien qu'un léger changement de respiration. Une augmentation de la respiration sous l'action du CO_2 se déclarait immédiatement, quand on exerçait une pression considérable, et cessait d'un coup, ou ne durait encore qu'un court moment, quand la pression s'interrompait.

D i s s o c i a t i o n d e s a c t i o n s p r e s s o - e t c h é m o r é c e p t r i c e s. L'influence des réflexes déclenchés mécaniquement et de ceux provoqués par voie chimique sur la respiration est antagoniste, car les premiers ralentissent la respiration et les autres l'accélèrent. Si on agit donc au moyen d'un facteur réflexogène qui excite simultanément les deux genres de filets nerveux, ce qui est le cas pour l'action du CO_2 , on déclenche l'interférence des deux actions.

La préparation qu'on obtient fréquemment par la ligature successive des vaisseaux sinusiens est dépourvue de réflexes chémorécepteurs et ne déclenche que les réflexes pressorécepteurs. C'était la cause de l'échec de Mies²⁾, qui n'a pas obtenu d'action chimique à l'aide du CO_2 introduit dans le sinus

²⁾ H. Mies. 1932. Zeitschr. ges. exper. Med., 85, 282.

carotidien, et, se basant sur ces observations, a nié que ce gaz pût exercer une action chimique sur le sinus. Cet auteur a pourtant obtenu d'une façon incontestable une action du CO_2 déprimant les réflexes réagissant à la pression. Même après l'exclusion des autres nerfs frénateurs les réflexes chémosensibles n'apparaissent pas dans une telle préparation.

La manière d'écarter les réflexes pressosensibles en présence de réflexes chémosensibles à l'aide d'une perfusion avec le CO_2 s'est révélée particulièrement commode. Après un séjour d'une dizaine de minutes, ou plus bref, dans le sinus le CO_2 paralyse les fonctions pressosensibles sans entraver les fonctions chémosensibles. Après une insufflation du sinus avec du gaz CO_2 la chute de la pression ne se manifeste plus, par contre l'accélération et l'approfondissement de la respiration se maintiennent avec évidence incontestable. Par une perfusion postérieure du sinus par l' O_2 on réussit parfois à ressusciter les fibres pressosensibles, surtout après la section des autres dépresseurs.

Il en résulte, que les filets chémosensibles du sinus carotidien résistent spécialement à l'action du CO_2 , ce qui est une preuve de leur rapport particulier avec la fonction respiratoire. Elles doivent donc posséder une faculté éminente de vie anaérobie sous forte pression de CO_2 . Quoique ce soient des fibres nerveuses situées dans le glomus carotidien en contact très intime avec le sang, elles sont au cours de nos recherches durant de longues heures peu sensibles à une anémie complète, à une absence totale de sang et autre liquide nourrissant, demeurant dans un milieu gazeux de composition variable.

C o n c l u s i o n s .

1) Pendant la perfusion gazeuse du sinus carotidien isolé de la circulation, le CO_2 gazeux agit comme dépresseur de la sensibilité des fibres pressosensibles. Cette inhibition atteint au même degré les réflexes pressorécepteurs dirigés vers la circulation que ceux concernant la respiration. Elle est réversible par l'action de l' O_2 gazeux perfusant le sinus.

2) Les fibres chémosensibles du glomus carotidien déclenchent sous l'influence de fortes pressions du CO_2 une augmentation intense de la respiration, caractérisée par une accélération et un approfondissement des mouvements respiratoires, même après la section des nerfs vago-sympathico-dépresseurs et de l'autre nerf sino-carotidien. Ce fait abolit l'objection émise contre le rôle du CO_2 dans le sinus carotidien, modifiant d'une façon réflexogène la respiration, rôle découvert par Heymans et ses collaborateurs (Heymans, Bouckaert et Dautrebande³), Heymans et Bouckaert⁴).

3) Les filets nerveux chémosensibles gardent leur sensibilité au CO_2 , même après une action ininterrompue durant environ une dizaine de minutes, tandis que les terminaisons nerveuses pressosensibles ont déjà beaucoup plus tôt arrêté leur activité. On réussit de la sorte à appliquer le critérium de la réaction au CO_2 à la classification et à la différenciation des terminaisons nerveuses de la bifurcation de la carotide commune. Il existe:

a) des récepteurs résistant en une certaine mesure au CO_2 (chémosensibles du glomus carotidien), et

b) des récepteurs nonrésistants au CO_2 (pressosensibles du sinus carotidien *sensu stricto*).

³) C. Heymans, J. J. Bouckaert et L. Dautrebande. 1930. Arch. Internat. de Pharmacodyn. et de Thérap. 39, 400.

⁴) C. Heymans et J. J. Bouckaert. 1938. Kongressbericht II des XVI. Internationalen Physiologenkongresses, 14—19 August 1938, Zürich, p. 305.

[Institut de Physiologie, Université Jean Casimir de Lwów].

Z. Bieliński.

**Influence de quelques facteurs sur les terminaisons
nerveuses du sinus carotidien chez les chiens.**

Présenté à la séance de la Société Polonaise de Physiologie, Section de Lwów, le 8.II.1939.

Pour examiner l'influence exercée par les agents physiques et chimiques sur le sinus carotidien, on a appliqué une méthode permettant la perfusion successive du sinus avec les liquides contenant le facteur examiné et avec des gaz divers. On a constaté que le milieu liquide n'est pas absolument nécessaire à la vie des terminaisons nerveuses du sinus carotidien, car ce sinus, perfusé même exclusivement avec l'O₂ ou de l'air pur, accomplit ses fonctions réflexogènes plus de 10 heures après avoir été vidé de sang (B i e l i ń s k i ¹⁾).

À l'aide d'un simple système de canules et d'un robinet en verre on pouvait facilement chez le chien anesthésié à la chloralose perfuser le sinus carotidien, isolé au point de vue vasculaire, avec les liquides agissants, ou bien immédiatement après avec les gaz au moyen desquels on exerçait dans le sinus la pression nécessaire à provoquer les réflexes. Un manomètre à mercure à transmission aérienne enregistrait la pression intrasinusienne. S'il fallait pour des raisons comparatives appliquer constamment une pression endosino-carotidienne du gaz identique, on employait un automate à mercure approprié. On notait les respirations et la pression artérielle. Pour provoquer les réflexes on n'employait que de l'O₂ et exceptionnellement le CO₂. On enregistrait constamment la température intrasinusienne

¹⁾ Z. Bieliński. 1938. Acta Biologiae Experimentalis, 12, 165.

à l'aide d'un thermomètre à mercure très sensible. On s'efforçait de la maintenir égale, excepté une série d'expériences où on la modifiait exprès.

I. Facteurs physiques.

Viscosité. — On introduisait dans le sinus carotidien une solution de 5 et 10 p. 100 de gélatine à la température du corps et on comparait son action avec l'action de la solution physiologique du chlorure de sodium. On n'obtint aucun changement notable ni dans la pression ni en respiration par le changement de la viscosité du liquide employé à la perfusion. Une solution de 20 p. 100 du glucose ne produisit non plus aucun effet.

Température. — L'influence de violents changements de la température du liquide introduit dans le sinus sans aucune pression, se déclare avec une netteté particulière. Une température de 42° amenait une grande chute de pression artérielle, si la température dans le sinus était inférieure à la température du corps (p. e. 30°). Si on voulait faire disparaître immédiatement la chute de la pression, on injectait dans le sinus du liquide à une température de 10° au-dessus du zéro. Une perfusion alternante avec de la solution physiologique de 50° et avec de l'O₂ gazeux déclenche parallèlement une diminution de la réaction à la température et une diminution de la réaction à la pression au cours d'une expérience de longue durée. On n'a pas pu dissocier les fibres nerveuses en agissant sur elles par la température.

II. Facteurs chimiques et chimico-physiques.

Pipéridométhyl-3-benzodioxane, préparé par Fourneau (F. 933), introduit dans le sinus isolé en concentration de 0.15 p. 100, n'exerce pendant son séjour aucun effet sur la pression artérielle ni sur la respiration. Mais une perfusion postérieure du sinus avec du gaz sous pression ne déclenche plus aucun réflexe dépresseur, car le pipéridométhyl-3-benzodioxane a paralysé les terminaisons pressoréceptrices sino-carotidiennes. Le nerf sino-carotidien lui-même continue

à réagir normalement à l'excitation par courant faradique. Nous constatons donc ici une influence sur les terminaisons sensorielles du nerf sino-carotidien pareille à celle exercée par la cocaïne.

Il était évident que le pipéridométhyl-3-benzodioxane agissait non seulement sur les pressorécepteurs, mais aussi sur les terminaisons chémosensibles. Si le CO_2 déclenchait avant l'action de F. 933 les réflexes indiquant la stimulation de toutes les deux espèces de terminaisons (W i e r z u c h o w s k i et B i e l i ń s k i²), les uns et les autres disparaissaient après l'introduction de la solution de 0.15 à 0.25 p. 100 du F. 933 en solution physiologique dans le sinus isolé. Cette paralysie des fibres nerveuses ne se déclare pas à de plus faibles concentrations du F. 933, même si le séjour de la solution par exemple de 0.1 p. 100 de F. 933, dans le sinus est prolongé jusqu'à 15 minutes.

On connaît de nombreux types de l'action du F. 933 sur les neurones postganglionnaires, les synapses et les neurones préganglionnaires du système autonome sympathique. Les recherches actuelles apportent un type d'action sur les récepteurs du système cholinergique, qui peut être bien placé dans le schéma de l'action du F. 933 publié par W i e r z u c h o w s k i³).

L'alcool éthylique en solution de 0.5, 1 et 50 p. 100 paralyse progressivement les fibres sensible à la pression, l'alcool de 100 p. 100 enfin les détruit après un court séjour dans le sinus.

L'injection de n/10 NaOH, des solutions n/100 HCl, ainsi que des mélanges de phosphates à pH = 5 et pH = 8 n'endommage aucunement les filets réagissant à la pression. De même l'adrénaline en concentration de 1/1000 n'a nullement influencé les réflexes. La perfusion du sinus avec KCN

²) M. W i e r z u c h o w s k i et Z. B i e l i ń s k i. 1939. Acta Biologiae Experimentalis 13, 166.

³) M. W i e r z u c h o w s k i. 1938. Arch. internat. de Pharmacodyn. et de Thérap., 59, 1.

de 2 p. 100, avec l'histamine à 0.15 p. 100 et avec la nicotine même en grandes concentrations ne détermine au moment de son application aucune action directe déclenchant des réflexes. Elle ne provoque non plus dans la susceptibilité des terminaisons nerveuses aucun changement qu'on pourrait constater par l'action du stimulant provoquant la pression intrasinusienne. On peut conclure à une résistance assez prononcée du sinus contre les actions chimiques et pharmacodynamiques.

[Institut de Physiologie, Université Jean Casimir de Lwów].

E. Nikodemowicz et M. Wierzuchowski.

Injections continues du glucose à vitesses croissantes chez la poule.

Présenté à la séance de la Société Polonaise de Physiologie, Section de Lwów, le 8.II.1939.

Les résultats présents forment une suite des recherches sur le problème de la transformation du glucose introduit par voie intraveineuse à vitesse constante chez différentes espèces animales. Jusqu'à présent on a décrit les lois observées en ces circonstances chez le chien (Wierzuchowski¹⁾). Les recherches actuelles apportent des données sur la poule.

On choisissait des femelles mûres, pas trop vieilles, pesant environ 2 kg et on les nourrissait uniformément de grain de froment. 36 heures avant l'injection du glucose on cessait de leur présenter la nourriture. La solution du glucose était introduite dans la veine de l'aile à vitesse constante comportant dans les expériences particulières de 1 à 7 g/kg/heure pendant une période de 6 heures. Avant l'injection et au cours d'elle on prélevait des échantillons de sang de la veine jugulaire et on recueillait l'urine de la cloaque d'une manière continue à l'aide d'une canule à forme appropriée. On déféquait l'urine des corps réducteurs non-sucrés. La méthode de l'injection du glucose ressemblait à celle employée dans les recherches précédentes sur le chien.

S u c r e d u s a n g. — Le niveau de glycémie comportait à jeûne en moyenne 190 mg p. 100. Quand la vitesse de l'apport était moindre et comportait jusqu'à 2 g/kg/heure, la glycémie se stabilisait dès la 3-me heure d'administration

¹⁾ M. Wierzuchowski. 1936. Journ. of Physiol. 87, 311; 1937. 90, 440; 91, 140.

continue à un niveau en proportion à la vitesse de l'apport et se plaçait au-dessus de 600 mg p. 100. Quand l'apport du glucose s'accomplit à une vitesse de 3 g/kg/heure, le sucre du sang commence à augmenter de plus en plus dans la seconde moitié de l'apport de 6 heures et atteint 1200 mg p. 100. A cette vitesse l'équilibre dynamique entre l'apport du glucose et son élimination est rompu, et le sucre commence à s'accumuler dans l'organisme. Quand l'apport s'effectue à de plus grandes vitesses, le glucose commence à s'amasser dans l'organisme de plus en plus rapidement, et s'il atteint enfin dans le sang la teneur moyenne de 4300 mg p. 100, l'animal succombe. À mesure que pendant un apport de 5 à 7 g/kg/heure la vitesse de l'apport augmentait, l'animal atteignait plus rapidement la glycémie létale. Pendant la première heure de l'apport du glucose on peut souvent constater au commencement une plus forte augmentation du sucre du sang, qui baisse dans les quarts-d'heure suivants. C'est la phase initiale qui se présente si distinctement chez le chien.

G l u c o s e d a n s l' u r i n e. — La vitesse de l'apport 1 g/kg/heure, la plus faible qu'on ait appliquée dans cette série de recherches jusqu'à présent, était encore de beaucoup au-dessus de la limite de tolérance intraveineuse. Au fur et à mesure qu'augmente la teneur du sucre du sang et la vitesse de l'apport du glucose, augmente aussi son élimination avec l'urine de 18 p. 100 de la quantité introduite à la vitesse de 1 g/kg/heure jusqu'à 40 p. 100 à des plus grands taux d'introduction. Aux vitesses d'apport les plus basses (1 à 2 g/kg/heure) les courbes de la glycosurie démontrent une baisse vers la fin de la période des 6 heures. Les plus hautes valeurs de l'élimination du glucose comportent 3 g/kg/heure.

Quand on applique les plus grandes vitesses d'injection du glucose, l'élimination du glucose n'atteint pas les vitesses maxima qu'on remarque à de moindres vitesses d'apport, car l'excrétion est limitée dès le début de l'introduction intraveineuse de ce sucre. Dans la courbe de glycosurie apparaît au début une „phase initiale” caractérisée par une plus grande élimination du glucose que la phase suivante.

D é b i t u r i n a i r e. — L'élimination de l'urine est proportionnelle à la quantité du sucre éliminé. Les valeurs de la diurèse se stabilisent à un certain niveau pendant les vitesses minima. Quand l'apport du glucose s'accroît, la glycosurie augmente, mais vers la fin de la période de 6 heures il y a une baisse de diurèse accompagnée d'une baisse de glycosurie, tandis que le taux du sucre du sang commence à augmenter rapidement. C'est donc une rétention rénale du sucre. L'élimination maxima de l'urine comporte environ 70 cm³/kg/heure ou même plus. Pendant l'injection du glucose à vitesse maxima (7 g/kg/heure) la diurèse était limitée dès le début et n'atteignait pas le maximum d'intensité.

A s s i m i l a t i o n d u g l u c o s e i n j e c t é. — Le reste non-éliminé du glucose injecté était assimilé. À une vitesse d'apport de 1 g/kg/heure 82 p. 100 du glucose injecté était assimilé, à l'apport de 4 à 5 g/kg/heure — 60 p. 100. À des vitesses élevées se déclarait la rétention pré-létale du glucose d'origine rénale mentionnée ci-dessus, qui pouvait sembler être une augmentation de l'utilisation. Si on calculait la vitesse d'assimilation d'après la formule publiée antérieurement ¹⁾ au moment où le glucose s'était stabilisé, on obtenait la valeur de 1.6 g/kg/heure à une vitesse d'apport de 3 g/kg/heure. Cette valeur ne subissait aucune augmentation ultérieure, lorsque l'apport du glucose s'accroissait. C'était donc la limite du métabolisme des tissus, qui n'augmentait plus avec l'accroissement de la teneur du glucose à l'intérieur de l'organisme. De cette manière on a atteint et dépassé la limite de l'apparition du diabète „par surabondance”, constatée antérieurement chez le chien. Cette limite apparaît chez la poule comme chez le chien aux environs de 1000 mg p. 100 de teneur du sucre dans le sang.

P h é n o m è n e s t o x i q u e s. — Pendant l'apport du glucose à vitesse minima employée l'animal est tout-à-fait normal. À de plus grandes vitesses il respire profondément, le bec grand ouvert, et reste étendu les paupières closes, dans un état voisin d'un léger degré de narcose. Il frissonne de temps en temps. Si la température du liquide injecté se rapproche de la température du corps de la poule, on réussit à maintenir la température du corps pendant l'injection au niveau normal.

Une salivation et des vomissements légers apparaissent. Immédiatement avant le décès l'animal devient inquiet, s'agite plusieurs fois. S'ensuit la cessation de la respiration et enfin le décès. À des vitesses élevées de l'apport du glucose apparaît la forme transsudative de l'intoxication, caractérisée par une accumulation dans l'abdomen du liquide qui contient à peu près la même concentration du sucre que le sang.

P a r a l l è l e a v e c l e c h i e n . — Dans nos conditions de recherches la vitesse d'assimilation du glucose est chez la poule deux fois plus faible par kg de poids de corps que chez le chien, et par mètre carré de surface du corps — même trois fois plus faible. Il est possible que la composition du régime, diminuant l'assimilation, y jouait un certain rôle, ce qui fera encore l'objet d'une étude. L'élimination du glucose avec l'urine est aussi plus faible. De même les vitesses d'injection tolérées avec survie des animaux sont plus basses que chez le chien. La capacité de rétention assimilative du glucose par l'organisme de la poule dans les conditions décrites est assurément de beaucoup plus faible que celle de l'organisme du chien.

Les phénomènes toxiques chez la poule sont beaucoup moins prononcés que chez le chien. Il n'y a chez la poule presque pas de phénomènes d'excitation motrice, presque pas de convulsions et point de nystagmus, si caractéristique pour le chien²⁾ normal. Chez la poule c'est l'action narcotique du glucose qui est dominante. Le décès chez la poule se présente à une glycémie semblable à celle du chien. La forme transsudative de l'intoxication apparaît chez les deux espèces animales.

²⁾ M. Wierzuchowski. 1936. Journ. of Physiol., 87, 85 P. 1937. Polska Gazeta Lekarska, 16, 1.

[From the Biochemical Laboratory, J. Piłsudski University and the Biochemical Laboratory of the Pediatric Clinic, J. Piłsudski University].

E. M. Mystkowski, Ch. Olszyna, and D. Lasocka.

Binding of polysaccharides by certain serum globulin fractions of immunised and non-immunised animals.

Presented before the Polish Physiological Society, Warsaw, 16.III.1939.

The question whether two basic types of globulin, eu- and pseudo-globulin, exist in serum has been debated almost as long as the existence of serum proteins has been known. These fractions have been separated, and identified on the basis of their solubilities, i. e., their tendency to precipitation during dialysis, or as the concentration of salts, such as ammonium sulphate or sodium sulphate, is increased. However, considerable confusion arose during the very first attempt at application of these solubility functions. The fractions obtained by dialysis were not identical with those obtained by salting out. These discrepancies are well presented by C. S a n d o r ('34) in his paper: „Le problème des protéides”. Today, the most common classification is that based on precipitation by $\frac{1}{3}$ saturation with ammonium sulphate (euglobulin), and $\frac{1}{2}$ saturation (pseudoglobulin). The shortcomings of such a classification are obvious, and its continued survival may be ascribed to didactic reasons.

The difference between eu- and pseudo-globulin fractions depends on the arbitrarily selected concentration of $\frac{1}{3}$ saturation with ammonium sulphate; actually no clear-cut theoretical or practical delimitation between these fractions exists. For this reason we cannot imagine that these fractions are actually present as preformed individual substances in blood-serum. Applying steadily increasing concentrations of various salts, any desired number of protein fractions may be obtained.

A. Schmitz ('31), on this basis, studied the solubility of individual fractions, and was unable to establish any definite demarcation between the fractions precipitating at $\frac{1}{2}$ and at $\frac{1}{3}$ saturation. Similarly to the fractions obtained at higher and lower concentrations, the transition from one fraction to another is quite continuous, no abrupt changes in turbidity being found as the concentration of salt is varied. Schmitz hence drew the conclusion that serum globulin can, by gradual increase in the concentration of the precipitating salt, be separated into any desired number of fractions. Chemical differences between eu- and pseudo-globulin are even less probable.

This is indicated by the work of Lustig ('30), who showed that both eu- and pseudo-globulin may be separated into a series of sub-fractions, differing in solubility; both fractions contained sub-fractions soluble and insoluble in water. Water-soluble euglobulins constitute about 29% of total serum proteins, and soluble pseudoglobulin about 18%. Certain of the insoluble fractions may be dissolved in NaCl solutions, others in Na_2CO_3 or NaOH. These globulin sub-fractions exhibit a number of chemical differences.

A number of other workers, who attempted to demonstrate differences between eu- and pseudo-globulin, other than that they are precipitated at $\frac{1}{3}$ and $\frac{1}{2}$ saturation, have also shown that a number of different sub-fractions are to be found in serum globulin. Following the work of Bierry and RATHERY, and of RIMINGTON, attention was directed chiefly to investigation of the carbohydrate content of the fractions, in the hope that in this way it would be possible to establish clear-cut differences between the individual fractions. Lustig reports that the carbohydrate content of his protein fractions varied according to their solubility, and it is in this connexion of interest that eu- and pseudo-globulin fractions of similar solubility had similar carbohydrate contents. Thus Lustig found a greater difference between euglobulin soluble in water (0.8% of carbohydrates) and in aq. NaOH (8.5%) than between water-soluble eu- and pseudo-globulin (0.98%). The individual sub-fractions of euglobulin (and of pseudoglobulin) thus differ more from each other than do the correspon-

ding sub-fractions of these two proteins. The tryptophan content of Lustig's fractions varied analogously.

Hewitt's researches ('38) showed that more soluble euglobulin fractions have a higher carbohydrate content than the less soluble ones.

The most interesting researches on the fractionation of serum protein are those conducted at the Physical Chemistry Dept. at Upsala. Tiselius ('37) was able, using an electrophoresis method, to demonstrate the existence of four protein fractions, differing in their rate of mobility in an electric field. Of these fractions the albumin fraction (35.6%) moves fastest, then three globulin fractions α , β and γ (12.3, 18.7, and 33.4%). The most mobile globulin fraction is α , the least mobile γ . The fourth, least mobile component, globulin δ , probably originates from others present in undiluted, or little diluted serum. The carbohydrate contents of the fractions were not equal.

These researches were conducted both on isolated proteins and on diluted sera, and it was found that the mobilities of the isolated proteins were not identical with those in native sera. This is of importance, inasmuch as it shows that proteins behave differently according to the nature of the medium in which they are dissolved, and, further, this is evidence that conclusions as to the behaviour and structure of native proteins cannot be drawn without reservation from studies of preparations of proteins isolated from serum.

These studies also give certain indications as to the nature of the heterogeneity of eu- and pseudo-globulins isolated from serum by salting out with ammonium sulphate. The precipitate obtained by adding ammonium sulphate to 30% saturation consisted of globulin with a fairly considerable admixture of albumin, whilst the supernatant liquid obtained by 55% saturation with ammonium sulphate still contained 25% of globulin.

Pseudoglobulin prepared by electrodialysis contained 85% of the most mobile constituent (globulin α). Similarly euglobulin was found not to be homogeneous, in spite of repeated purification.

Of extreme interest are the data presented by Tiselius concerning the effect of immunisation on the protein com-

position of serum. Thus the albumin fraction of rabbit serum protein fell from 66.2 to 51.2% following sensitisation to protein, whilst the fraction of least mobility rose from 17.2 to 33%. This fraction, both from normal and immunised animals, had an isoelectric point of 6.1, as compared with 5.1 for the other fractions. The fractions separated by electrophoresis were subjected to sedimentation analysis in the ultra centrifuge, and exhibited a high degree of homogeneity.

Tiselius' work constitutes an important complementation of ultra-centrifuge studies. These were conducted chiefly by Mutzenbecher ('33) and by McFarlane ('35), and established the existence in serum of two chief fractions — albumin and globulin. These workers did not succeed in demonstrating the existence of fractions corresponding with eu- or pseudo-globulin, either by centrifuge studies of diluted serum or of solutions of proteins isolated from serum. Whilst neither the albumin nor the globulin fractions were ideally homogeneous, each containing a certain amount of components of lower and higher sedimentation constants, yet those differences did not appear to stand in any relation to the classification in question.

The researches conducted in Svedberg's laboratory were performed both on serum and on preparations of isolated proteins. In particular, researches performed on diluted serum involve the least modification, in the present conditions of experimental technique, of so complicated a system as is blood serum. The majority of other researches have been performed on proteins isolated from serum by methods which were in most cases somewhat drastic; these preparations were studied, and the results thus obtained served for the drawing of conclusions as to the existence and behaviour of the corresponding fractions in serum. If, as was pointed out both by Tiselius and by Pedersen, the fractions obtained by their methods are in all probability not chemical units, and since determination of the molecular weight of a given protein can in no case serve for its chemical identification, there is all the less justification for regarding eu- and pseudo-globulin, the separation of which

depends on so arbitrary a procedure, as being chemical individuals.

The question of the classification of serum protein fractions becomes still further complicated when we pass from normal animals to those in pathological conditions. B i e r r y and R a t h e r y give in their monograph a number of morbid changes affecting the amount of carbohydrate combined with protein. Unfortunately these researches were performed on serum protein as a whole, so that they throw no light on the more intimate nature of these changes.

A number of workers engaged in the study of immunochemistry have attempted to find changes in serum proteins related to the immunisation of the animal. It has long been known that both the absolute globulin content, and the globulin/albumin ratio, rise in the blood serum of animals following immunisation. This finding has been confirmed by a number of authors; we shall here cite only the most recent work of H e w i t t ('34). H e w i t t found that the total serum protein content rose in horses from 7.2 — 7.5% to 11.2% following immunisation to diphtheria, and to 9.8% following immunisation to haemolytic streptococcus; the corresponding rise in the globulin fraction was from 4.1 to 9.1 or 7.9%, respectively. Although no satisfactory interpretation of this finding has been advanced, yet it is of importance inasmuch as immune properties are connected in some as yet unexplained way with serum globulins, so that the discovery of differences between the proteins of immunised and non-immunised animals might permit of a closer analysis of the mechanism of immunisation.

A study of eu- and pseudo-globulin fractions, conducted in this direction has not furnished any definite indications. In the same way as no definite chemical differences have been found between eu- and pseudo-globulins, so also have they not been demonstrated between the proteins of normal and immunised animals. Only the analysis of a whole series of sub-fractions allows of the hope that those differences will ultimately be apprehended, and will permit of the elucidation of this problem.

No differences in chemical composition have been found. The differences in digestibility of the serum proteins of immunised and nonimmunised animals are not significant; the results obtained were probably connected with a certain limited resistance of the antitoxin fraction to digestive factors. Certain researches indicating definite differences in the behaviour of the proteins of immunised animals have been performed at Upsala by Heidelberg, Tiselius, and Pedersen ('36 and '37). These workers showed that pneumococcus antibodies in horse serum have a higher sedimentation constant than has the chief globulin fraction of the serum of non-immunised animals. The same fraction is also present in normal sera, but its content is far smaller. However, a study of the sera of other animals did not reveal such differences, except in the shifting of the isoelectric point, from 5.7 for normal globulin to 5.0 for anti-bodies. The mol. wt. of this fraction was three times as high as that of normal globulin.

A quantitative determination of the distribution of globulin fraction, based by Tiselius on differences in rate of transport in an electric field, showed that the content of the least mobile fraction (fraction $\delta + \gamma$) rises from 17.2% in normal serum to 33.0% in immune sera. This change is associated with fall in albumin content, and with insignificant variations in the remaining fractions. The antibody function was associated in its entirety with this least mobile fraction.

The object of the present research was to isolate serum globulin fractions by a procedure depending on differences in solubility. The characterisation of the fractions obtained was based on a somewhat different property than those ordinarily applied, viz., on their capacity for combining with polysaccharides. It was, on the basis of the results reported by Przyłęcki et al. ('38), supposed that this is a natural property of native proteins; it was hoped that differences in the behaviour of the various fractions obtained might thus be revealed, without the necessity of applying the ordinarily used more drastic procedures. That such a possibility might actually exist was shown by the work of Assenhajm (cf. Przyłęcki, '38), who found considerable differences between the capacity for

combination with carbohydrates of the serum globulins of different animals. At the same time we attempted to find an explanation of the changes taking place in the serum of immunised animals, based on the supposition that the changes in binding power found would apply not only to binding of antigens but also of carbohydrates.

The researches described in this communication are connected with those in progress at the Biochemical Laboratory of the J. Piłsudski University, conducted by Prof. St. P r z y ł ę c k i (A s s e n h a j m and K o c i ę c k i, unpublished work); a short review of these researches is to be found in the paper by P r z y ł ę c k i, cited.

Experimental methods.

Serum of normal animals (oxen, swine, horse) was obtained from the municipal abattoir, from blood collected immediately after the animals were slaughtered. Immune sera (of horses only) was generously supplied us by Dr. Józef Celarek, of the State Hygiene Institute.

The sera were without delay subjected to dialysis against distilled water in cellophane sacs, the water being changed 2—3 times daily, and the dialysis lasting 3—4 days. A precipitate appeared during the first day of dialysis, and continued to increase in bulk to the end of the second day, after which it did not appear further to increase. The pH fell from 7.56—7.64 initially to a final value of 5.9—6.0, indicating a quite definite acidification. The dialysed liquid was centrifuged, and the precipitate was taken as being the first protein fraction, and designated b I.

0.1 N-H₂SO₄ was added to the centrifugate (being serum diluted with water entering during dialysis) to formation of a maximum amount of precipitate (pH 4.84—4.87), which was collected in the centrifuge, and designated as b 2. The centrifugate was subjected to electro-dialysis in a Pauly apparatus, during 3—4 days. A bulky precipitate collected at the bottom of the central chamber, whilst the supernatant fluid stratified into a number of layers, of which the upper ones were quite clear, whilst the lower ones were increasingly turbid. The precipitate (b 3) was collected on the centrifuge, after siphoning off the clear upper layers. The centrifugate were strongly opalescent. The proteins thus obtained were dried in vacuum at 37°, and stored in the dry state.

Further protein fractions were obtained by fractional precipitation of the electro-dialysed sera with ammonium sulphate. This was added to $\frac{1}{2}$ saturation, and the precipitate was collected by centrifuging, re-dissolved in water, and dialysed for 3 days against tap-water, and for 1 day

against distilled water. The precipitate was removed by centrifuging, and the proteins in the centrifugate (designated b 4) were precipitated by addition of 0.1N H_2SO_4 . The suspension was centrifuged, and ammonium sulphate was added to the centrifugate to $\frac{1}{2}$ saturation, and the same procedure of successive dialysis, centrifuging, and precipitation by H_2SO_4 was applied. The pseudoglobulin fraction thus obtained was designated b 5. Both fractions b 4 and b 5 contain proteins which were not precipitated during dialysis and by acidification. These fractions were also stored as dry powders.

The protein fractions were dissolved in water, giving concentrations of 100 mg. of protein in 2.5 ml. of water, for the purpose of testing their combining capacity for carbohydrates. Since the solubility of the fractions was not uniform, various amounts of 0.1N NaOH were added to the suspensions of dry protein, so that the final pH was 8—9; this had the object of standardising conditions of precipitation. The suspensions were allowed to stand for 10—20 hours, after which they no longer showed any trace of undissolved protein. Systems consisting of 2.5 ml. of water or of a solution containing 100 mg. of protein and 2 ml. of approximately 2% amylose were then prepared, and allowed to stand for 20 min., after which 0.1N H_2SO_4 was added drop by drop to maximum formation of precipitate, and the systems were centrifuged after 20 min. Further portions of H_2SO_4 were added to certain of the tubes, in order to test completeness of precipitation.

The centrifugates were then poured off, diluted to 10 ml., 1 ml. of conc. HCl was added, and the systems were hydrolysed for 3 hr. at 100°, after which the solutions were made neutral, and reducing sugars were determined by Bertrand's method. The results are given as mg. of combined carbohydrate, i. e., as the differences between the control systems not containing protein (amylose and water) and those containing protein. The differences were taken to represent the amount of carbohydrate bound by protein. Percentage binding of carbohydrate, as given in the tables, represents the ratio of this difference to the sugar content of the control systems, taking this latter to be 100 mg.

Results.

Three protein fractions were isolated, viz.: Globulin I, precipitating during dialysis against distilled water, at pH 5.9.

Globulin II, precipitated by acidification to pH 4.8 of the centrifugate Globulin I.

Globulin III, precipitating at pH 3.5 during electro dialysis of the residual solution after precipitation of fractions I and II.

Characteristics of the fractions obtained.

The dry fractions obtained differed in solubility and appearance. The most readily soluble was globulin III, which gave a perfectly clear solution; globulin II solutions were somewhat turbid, and globulin I solutions were more so. The high solubility of globulin III is somewhat unexpected, inasmuch as this fraction was obtained by electro dialysis, during which no precautions were taken to prevent denaturation due to acidification. This fraction had, further, a definitely green colour, both in the dry state and in solution, whilst fraction II was yellow. These colorations are ascribed to binding of blood pigments by the various fractions. This effect was also reported by P e d e r s e n, who found that bilirubin moves together with albumin during cataphoresis, and by T i s e l i u s, whose globulin B fraction moves together with the yellow pigment of serum (he did not identify this with bilirubin).

The amounts of each fraction so obtained were different, although the relative amounts of the individual fractions obtained in a series of experiments did not deviate greatly. The yields of globulin III were the highest, and of globulin II the least. The sum of the fractions so obtained amounted to a content of 1.32 to 2.19% in serum, corresponding with $\frac{1}{3}$ to $\frac{1}{3}$ of the total serum protein content.

The amounts of proteins obtained by $\frac{1}{3}$ to $\frac{1}{2}$ saturation are greater when the ammonium sulphate solution is added directly to the serum. Applying our experimental technique, the amount of globulins obtained after dialysis of the dissolved precipitate is very small, being 0.02—0.9 for $\frac{1}{3}$, and 0.03—0.17 for $\frac{1}{2}$ saturation.

The fractions described in this paper were isolated on the basis of their solubility, and no attempt is made to define their relation to pseudo- and eu-globulin. Whilst globulin I would appear to correspond most closely with euglobin, fraction II, precipitating at pH 4.8, is quite certainly not euglobulin. That globulin III is not a homogeneous product was shown quite clearly by its behaviour during electro dialysis, when 4—5 layers

differing in coloration and turbidity were obtained after 12 hr. in the Pauly apparatus. No definite opinion can be expressed as to the existence of our fractions in native serum.

The binding of carbohydrates, on which we attempt to base our characterisation of the protein fractions obtained by us, depends quantitatively on the concentration of protein in solution, as is shown by the following experiment, in which the concentration of amylose was maintained constant, and that of protein varied.

Table I.

Dependence of binding on protein concentration.

Amount of protein mg.	Non-immune bound		Immune bound	
	mg.	%	mg.	%
25	—	—	3.4	11.5
50	2.0	4.9	5.1	21.9
100	3.25	7.9	—	—
200	6.0	14.6	10.1	34.5

It appears from Table I that the amount of amylose bound rises with increasing concentration of protein. The maximum saturation of protein with amylose was not attained. It should be noted that protein concentrations both higher and lower than those ordinarily applied in our experiments were taken.

Whether this is evidence that not all of the micelles of protein present in the solution were saturated with amylose, or that not all the groups of individual micelles capable of combining were so saturated (taking into account also the relative affinity of the individual groups present in a single micelle, viz., of certain aminoacids, of which some might have a greater, and others a smaller, affinity to amylose), cannot, on the basis of our experimental material, be stated with any certainty. There can, however, be no doubt that protein present in the solution is capable of combining with greater amounts of amylose than was actually the case.

Binding of different carbohydrates.

The next series of experiments had as their object the comparison of the combining capacity of proteins for different carbohydrates, viz., amylose, starch, and glycogen. Amylose has a greater affinity for protein than starch, whilst glycogen has only a very small affinity. Thus 6.48 mg. of amylose, 5.16 mg. of starch, or 1.22 mg. of glycogen were bound by 100 mg. of globulin I. The amount of amylose bound varies with different preparations, and falls with time elapsing after its preparation; thus, in exp. 10, 21% of amylose prepared on the previous day was bound, whilst a sample which had been stored ad 0° for 22 days was bound to the extent of only 11.2%.

Considerably greater percentage binding of glycogen by serum protein was reported by one of us in a previous paper (M y s t k o w s k i '36). We ascribe this difference to differences in the protein preparations used in the previous and the present experiments. The earlier ultra-centrifuge experiments showed that protein not separated from serum combined most strongly with glycogen, whilst the present experiments were performed with isolated, redissolved proteins.

Binding by different fractions.

These experiments consisted of two groups, of which the first referred to horse serum proteins, and the second to the serum proteins of horses and other animals.

The results obtained with horse serum proteins are presented in Table II. It was not possible to express the results for percentage binding by any particular fraction as mean values for all experiments performed in a given group, since the experiments were not performable under strictly comparable conditions. The reason for this is that the affinity of the proteins for amylose depends on a number of factors which could not be standardised, such as the exact concentration of the amylose solutions, the freshness of its solutions, etc. For this reason only those obtained in a single given experiment should be compared with each other; in such an experiment the protein fractions originated from a single animal, and their carbohy-

drate-binding capacity was tested on the same solution of amylose. The results given in Table II refer to globulins obtained from normal and immune sera.

We see that in both these cases, and for all the samples taken, the binding capacity of the fractions falls in the order globulin II > I > III, globulin II being far superior in this respect to the remaining fractions.

Similar effects were not found in the case of other animals. Thus, in the case of swine serum proteins, the following results were obtained: fraction I, 33.2 and 26.2% binding, fraction II, 8.4 and 107%, and fraction III, 60 and 63% binding. The corresponding values for ox serum proteins were: fraction I 16.6%, II 25.0%, III 21.0%.

Table II.

Binding of amylose by individual protein fractions.

A. serum proteins from non-immunised horse sera,

B. serum proteins from immunised horse sera.

The figures I, II and III in the first column refer to globulin I, II and III.

The numbers at the head of the columns indicate corresponding pairs of experiments.

A.

	1		2		3		4		5		6					
	N		N ₁		N ₂		N ₃		N ₄		N ₅					
	mg.	%	mg.	%	mg.	%	mg.	%	mg.	%	mg.	%				
I	8.0	25.3	2.1	2.8	4.5	14.5	3.0	7.1	5.4	6.0	9.75	15.6	8.1	11.0	12.8	26.5
II	11.1	38.1	13.9	19.0	9.9	32.0	4.0	9.6	22.9	25.3	32.5	53.3	35.6	48.2	24.0	49.8
III	6.5	20.3	0.5	—	1.5	4.9	2.0	4.8	9.6	10.3	5.0	8.2	6.4	8.7	10.5	22.3

B.

	1		2		3		4		5		6	
	U ₁		U ₂		U ₃		U ₄		U ₄		U ₅	
	mg.	%	mg.	%	mg.	%	mg.	%	mg.	%	mg.	%
I	4.6	21.0	11.2	33.3	10.4	11.5	6.0	9.8	6.4	8.7	5.3	10.9
II	19.4	58.8	14.8	44.1	39.6	43.8	24.8	40.6	27.1	36.7	27.3	56.5
III	—	—	4.8	14.3	9.6	10.6	2.3	3.7	7.4	10.0	11.5	23.7

Differences in binding power of serum globulins from normal and immunised animals.

It appears from Table II that the absolute amount of amylose bound, as well as percentage binding, are higher for serum proteins derived from immunised than from ordinary animals. The binding capacity of all fractions is not increased to the same extent. Thus fraction II, which has the greatest binding power normally, shows the greatest increase in binding power in the case of immune sera. The binding power of globulin III, which is normally the lowest, is increased to a relatively greater extent than fraction I in immune sera.

The differences between the binding power of the proteins of ordinary and immune sera are best contrasted by comparing the results obtained for pairs of experiments, performed simultaneously, and referring to one set of normal, and to one set of immune serum proteins, with the same amylose solution; the variability of this latter factor is thus excluded. Such pairs of experiments are designated by the numerals at the head of each column.

In two experiments, performed on one pair of sera (N_4 and U_4), the normal serum proteins had a greater binding power than the immune ones, and greatly exceeded that found for other normal sera. It might here be supposed that the serum of the animal in question possessed immune properties, possibly acquired as a result of some infection which it had undergone. As appears from certain unpublished results of *Assenhajm* and of *Celarek*, certain inoculations, such as, for example, tetanus, increase binding power to a far greater extent than do others, such as diphtheria. The normal sera at our disposal came from the municipal abattoir, no data being available as to the previous history of the animals slaughtered.

Effect of diphtheria toxin on binding.

A number of experiments were carried out, with the object of investigating the specificity of binding by proteins from immune and non-immune sera. In these experiments the protein solutions were incubated with diphtheria toxin before addition of amylose.

It was hoped in these experiments to determine to what extent combination between toxin and anti-toxin, i. e., serum protein of the immunised animals, should this take place, might affect the binding power of the protein for amylose. Positive results might be expected only in the event that the same groups present in serum proteins are responsible for combination with both toxin and amylose. We do not wish here to enter into any profound discussion of the nature of anti-toxins, but shall assume merely that the anti-toxic function of immune sera is in some way connected with their proteins.

Incubation with concentration of 1/100 to 1/1,000,000 of toxin did not in any way affect the binding power for amylose of either immune or non-immune sera proteins.

The antitoxic properties of the immune serum proteins were tested by the Jensen method on rabbits, and by the lethal dose method on guinea pigs. These tests, performed together with Mr. Heller, showed that antitoxic properties were possessed to a marked degree by all fractions, including globulin I, which corresponds most closely to euglobulin. Yet it is generally supposed that the anti-diphtheritic function of horse serum antitoxin is bound up with the pseudoglobulin fraction. This observation affords further evidence against the rigid demarcation of eu- from pseudoglobulins, and indicates the necessity of a more rational classification.

Total carbohydrate content.

Bierry and Rathery have shown that serum protein is combined with a carbohydrate, consisting of mannose, galactose and glucosamine, and these authors report a number of morbid conditions in which they find variations in the content of this serum protein constituent. It appeared to us to be of interest to determine whether the content of this carbohydrate varies according to the protein fraction studied, and to establish whether immunisation has any effect on the carbohydrate content.

Table IV gives the carbohydrate contents of the fractions in question. It appears that the carbohydrate contents of globulins

Table III.

Carbohydrate content of individual globulin fractions (I, II and III), from non-immune (N_3 and N_4) and immune sera (U_6).

	N_3	N_4	N_4	U_6
Globulin fraction I	2.77	2.57	3.07	2.85
" " II	3.35	3.39	3.58	3.75
" " III	3.50	3.32	3.39	3.42

II and III differ only very slightly, and are much higher than of globulin I. This result is in agreement with Hewitt's results, in that solubility and carbohydrate content vary parallelly. Our figures are on the whole higher than those reported by Hewitt, possibly owing to differences in the methods applied for determination of the carbohydrates (Hewitt used a colorimetric method, whilst we applied Bierry and RATHERY's reduction method). No very significant differences between immune and non-immune serum proteins were found.

Binding by the fractions precipitated after removal of the first 3 globulins from serum.

The yields of globulins obtained by $\frac{1}{3}$ and $\frac{1}{2}$ saturation with ammonium sulphate, after removal of globulins I, II, and III from serum, differed very widely, as did also their solubility, as to render it impossible to draw any conclusions as to their amylose binding capacity.

Discussion.

The globulin fractions obtained differed in solubility, in carbohydrate content, and in carbohydrate binding power. These fractions do not probably represent chemical units pre-existent in the sera, and are complex products, the nature of which depends on the mode of securing them.

Fractionation performed in this way does not represent an attempt at the establishment of any particular scheme of

classification of proteins, based on the characteristic property of binding carbohydrates, since such a classification would, similarly to all those previously proposed, be based on one property only, entirely inadequate for the characterisation of serum proteins, as certain type of units of invariable properties. The object of the present research was to demonstrate that one of the properties of serum protein is that of binding carbohydrates, and that this property may in certain circumstances be of importance for physiology and pathology.

The present paper, together with those cited in the introduction, show clearly that the present division of serum globulins into eu- and pseudo-globulin fractions is unsubstantiated, and that each of these fractions consists of a number of sub-fractions, having the most diverse properties.

An ever-increasing number of authors now hold the view that fractions of the type of eu- and pseudo-globulin do not exist at all. The attempted preparation of a „pure protein” is an anachronism, leading methodically to the production of artefacts not encountered within the organism. Taking as an example serum protein, we can envisage on the one hand the possibility of preparing a large number of fractions differing in their properties, and in the readiness with which these properties undergo change, and on the other hand in the readiness with which they enter into combination with non-proteins, leading to the formation of complexes of a mosaic type, and of very diversified properties (Przyłęcki and his school). The modern conception of the nature of serum proteins corresponds most closely with that of Sørensen, who postulated the existence of polypeptide chains bound together in micelles, possessing considerable plasticity and possibility of exchange of individual components. The Upsala school is of similar opinion, Pedersen supposing that the larger protein molecules consist of smaller units interconnected by carbohydrates, phosphatids, nucleic acids, etc. Certain questions are still debatable, such as the size of these smaller units, the way in which they are bound together, the lability of individual combinations both with other proteins and with

non-proteins, and the elucidation of their role. In accordance with this conception the different polypeptide chains may have different properties, and hence carbohydrate binding capacities. Hence the isolation from serum of a protein fraction characterised by its greater or smaller affinity for carbohydrate may depend on the predominance of a peptide chain having a strong carbohydrate binding capacity.

A second problem studied in the present research was that of the possibility of modification of serum globulin not only in the direction of binding of specific antigen (diphtheria toxin). We were able to demonstrate that this is actually the case — immune serum globulin has a greater affinity for carbohydrate than has ordinary serum globulin, this applying particular to the fraction precipitating at low pH. We may on this basis assert that binding of antigen is not the only feature distinguishing these two types of protein; parallel with this is the rise in affinity to carbohydrates. We were not successful in establishing any relationship connecting these two properties: the toxin did not prevent binding of carbohydrate. A certain analogy exists, however, between these processes, inasmuch as ordinary serum proteins possess an affinity not only for carbohydrates, but also for toxin, of which they are able to neutralize small amounts. Both of these functions are enhanced in immune serum proteins, that of binding toxin to an incomparably greater extent.

S u m m a r y.

1°. Globulin fractions differing in their affinity for carbohydrates and in their carbohydrate content may be isolated from serum by dialysis, acidification, and electro-dialysis.

2°. The affinity for carbohydrates is greater in immune than in ordinary serum proteins.

3°. The question of the existence of eu- and pseudo-globulin fractions in serum is discussed.

References.

- C. Sándor. Le problème des protéides, Paris 1934. — A. Schmitz. *Biochem. Zeitschr.* 241, 271, 1931. — B. Lustig. *Biochem. Zeitschr.* 225, 247, 1930. — L. F. Hewitt. *Bioch. Journ.* 32, 26, 1938. — L. F. Hewitt. *Bioch. Journ.* 38, 2080, 1934. — A. Tiselius. *Bioch. Journ.* 31, 1464, 1937. — A. S. McFarlane. *Bioch. Journ.* 29, 416, 407, 660, 1935. — P. v. Mutzenbecher. *Biochem. Zeitschr.* 266, 226, 1933. — M. Heidelberger and K. O. Pederson. *Journ. of exp. Med.* 65, 393, 1937. — M. Heidelberger, K. O. Pedersen, A. Tiselius. *Nature* 138, 165, 1936. — St. J. Przyłęcki. *Kolloid-Zeitschrift*, 85, 251, 1938. — E. M. Mystkowski. *Bioch. Journ.* 31, 716, 1937. — H. Bierry and F. Rathery. *Introduction a la physiologie des sucres*. Paris 1935.



Extrahierbarkeit von Lecithin aus künstlichen Lecithino-Ovalbuminen durch Äther-Äthanol-Mischung. — St. J. von Przyłocki: Untersuchungen über Polyoso-Proteine. XII Teil. D. Assenhajh: Die Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der verschiedenen Tier-Euglobuline mit Amylose. — St. J. von Przyłocki: Über die Art der Bindung von Polyosen mit Proteinen in den sogenannten Glyko-Proteinen aus Serum. — F. Goebel and S. Marczewski: The artificial acclimatisation of the human organism to low atmospheric pressures. — Br. Z a w a d z k i: Der Einfluss von Allylformiat auf den Froschmuskel. — E. J. Bieńka: Über Änderungen in der Menge der Chloride und der festen Bestandteile sowie über die Speichelreaktion der Submaxillärdrüse in Abhängigkeit von der Art und Stärke des Reizes. — Br. Z a w a d z k i: Einige Beobachtungen über Wendungseffekt. — J. Heller: Über den Einfluss der Temperatur auf die Ernährung, Gasaustausch und Wachstum der Raupen von *Deilephila Euphorbiae* (Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten, XII). — N. Berend: Über den Zusammenhang zwischen der Sekretionsgeschwindigkeit und der Zusammensetzung des Darmsaftes. — J. W a l a w s k i und Br. Z a w a d z k i: Vorversuche zur Unterscheidung der Reizung und des Tonus des Vagus im Zusammenhang mit der Theorie der chemischen Übertragung von Nervenimpulsen. — T. Baranowski: Untersuchungen über die phosphatübertragenden Enzyme im Muskelextrakt. — R. Natolski: L'influence de l'acide lactique et de ses sels sur la pression artérielle. — A. S z w a b o w i c z: The influence of the concentration of alcohol upon temperature, pulsrate and respiration at rabbits and dogs. — J. Fegler, H. K o w a r z y k und Z. L e l u s z - L a c h o w i c z: Über den Acetylcholin - Gehalt des zentralen Nervensystems bei den Erregungszuständen nach Strychnin - und Tetanustoxin - Einführung. — J. V. S u p n i e w s k i und M. S e r a f i n - G a j e w s k a: Über die pharmakologischen Eigenschaften des Cysteamins und des Merkaptothiazolins. — J. Szulc: Méthode d'angiostomie appliquée aux recherches sur l'absorption des sels du calcium par voie digestive. — Z. B i e l i Ń s k i: Einfluss der Gase bei ihrer direkten Durchleitung durch den Carotissinus. — M. W i e r z u c h o w s k i und Z. B o r k o w s k i: Differentiation of the forms of glucose intoxication. — H. S t e i n h a u s und M. W i e r z u c h o w s k i: Diabetische Grenze der Glykoseverbrennungsfähigkeit beim normalen Wirbeltierorganismus im Ruhezustand. Versuch einer mathematischen Formulierung. — W. N i e m i e r k o: Über eine Methode zur Bestimmung sehr kleiner Zuckermengen. — L. L u b i Ń s k a et H. R o s e n b e r g: Influence de la concentration des sels magnésiens sur le muscle de Grenouille. — E. A. Sym: Hydrolasenwirkung des Blindsackinhaltes des Pferdes und des Panseninhaltes des Rindes. I Teil. Einleitung, allgemeine Methoden und proteolytische Wirkungen. — B. S z a b u n i e w i c z: Die Polarisationsaufstellung der Muskeln des Wasserfrosches (*Rana esculenta*). — J. D u s z y Ń s k a: Cycle saisonnier de la sensibilité sexuelle à l'absence des gonades. — W. N i e m i e r k o und Ch. Ł o s z y c e r: Über den Fettstoffwechsel bei Sprotten. — M. R u b i n s t e i n: Recherches sur l'action exercée in vivo par l'extrait embryonnaire de Poule. — J. Heller: Über das Exkret des ausschlüpfenden Schmetterlings. — K. B i a ł a s z e w i c z et M. L e w i n: Sur la composition des cendres de la sécrétion du jabot des Pigeons en „lactation“. — A. K l i s i e c k i und M. N i e d b a ł: Die statisch-elastische Kräfte des Brustkorbes und ihre Bedeutung für die Atmungsbewegungen. — B. S z a b u n i e w i c z: Untersuchungen über die Elektronegativität der verletzten Stelle im Muskel. — H. K r z y m i e Ń: Sur les propriétés élastiques des ongles. — K. B i a ł a s z e w i c z et Ch. L a n d a u: Sur la composition minérale de l'hémolymphe des vers à soie et sur les changements qu'elle subit au cours de la croissance et pendant la métamorphose.

Sommaire des fascicules 1 et 2, volume XIII.

Nr.Nr.	pp.
1. J. Kaulbersz. Blutuntersuchungen an Einheimischen und Einwanderern des südamerikanischen Hochplateau	1
2. S. Kolodziejska and J. Duszyńska. The effect of rancid fats on the sexual organs of rats	10
3. J. Heller und W. Świechowska. Über die Reaktion des 3-4-Dioxyphenilalanins (Dopa) mit dem Kaliumferricyanid nach Hagedorn - Jensen	24
4. M. A. Zieliński. Carbohydrate metabolism and phosphorus compounds in the fertilized eggs of the sea-urchin (<i>Paracentrotus lividus</i> Lm.)	35
5. L. Wojtulewski. Über den Einfluss der Benzoesäure auf die Harnsäureausscheidung beim Menschen	49
6. K. Białaszewicz und J. Wajsberg. Über die Resorption der Azofarbstoffe im Dünndarm	57
7. J. Fegler et Z. Lelusz-Lachowicz. Nouvelles recherches sur les variations de la teneur en acétylcholine du système nerveux central des lapins dans les états de forte excitation, provoqués par la strychnine et la toxine tétanique	69
8. P. Ostern und St. Hubl. Darstellung von Glykogen	89
9. W. Missiuro, S. Niemierko, A. Perlberg and B. Pawlak. Compensatory processes at rest and during work under conditions of lowered tension	91
10. K. Gibiński. L'influence du changement de milieu, spécialement de la pression atmosphérique et de la température, sur le sang de <i>Rana esculenta</i>	111
11. J. Kaulbersz. Blut unter dem Einfluss klimatischer Änderungen	118
12. T. Baranowski. Über die Krystallisation von Myogen	124
13. J. Rosenberg. Cultures pures des infusoires sur les souches pures des microbes	128
14. W. Mozołowski und P. Rogowski. Über die Anwendung der Naphtoresorcinprobe für die quantitative Bestimmung der Glukuronsäure	139
15. J. Konorski et L. Lubińska. Sur un procédé nouveau d'élaboration des reflexes conditionnels du II type et sur les changements d'excitabilité du centre cortical moteur au cours d'apprentissage	143
16. A. Wigura. Über den Einfluss von Insulin auf den endogenen Alkoholgehalt im Blute des Menschen	153
17. T. Korzybski und J. K. Parnas. Über den Umsatz der Adenosin-triphosphorsäure im lebenden Tier	157
18. M. Wierzuchowski et Z. Bieliński. Influence du CO ₂ gazeux sur le sinus carotidien circulairement isolé	166
19. Z. Bieliński. Influence de quelques facteurs sur les terminaisons nerveuses du sinus carotidien chez les chiens	171
20. E. Nikodemowicz et M. Wierzuchowski. Injections continues du glucose à vitesses croissantes chez la poule	175
21. E. M. Mystkowski, Ch. Olszyna and D. Lasocka. Binding of polysaccharides by certain serum globulin fractions of immunised and non-immunised animals	179