

Über Beeinflussung der Sauerstoffatmung.

Von
Otto Warburg.

Mit einer Abbildung im Text und zwei Tafeln.

(Aus der medizinischen Klinik in Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 13. Dezember 1910.)

In früheren Mitteilungen¹⁾ wurde gezeigt, wie sich die Oxydationen in lebenden Zellen beeinflussen lassen. Zu den Versuchen dienten teils rote Blutkörperchen, teils Echinideneier. Die beiden Zellarten verhalten sich nun gegen eine Klasse von Stoffen ganz ähnlich, gegen eine andere ganz verschieden, und dieser Unterschied bildet den Ausgangspunkt der folgenden Experimente. Sie verhalten sich ähnlich gegen die indifferenten lipoidlöslichen Substanzen und gegen die lipoidlösliche Blausäure, wie aus nachstehender Zusammenstellung hervorgeht.

		Gramm-Molekül pro Liter	Hemmung des O ₂ - Verbrauchs in Prozenten
Äthylurethan	Seeigelei	0,11	33
	Blutzellen	0,33	50
Phenylurethan	Seeigelei	0,002	43
	Blutzellen	0,004	50
Äthylalkohol	Seeigelei	1,0	40
	Blutzellen	1,6	50
Blausäure	Seeigelei	0,00001	70
	Blutzellen	0,00005	50

Nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ, hinsichtlich

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 1; Bd. LIX, S. 112; Bd. LX, S. 443; Bd. LXVI, S. 305; Bd. LXIX, S. 452.

der Größenordnung der wirksamen Dosis, ist die Übereinstimmung bemerkenswert.

Ganz anders die Salze, die bekanntlich zum großen Teil lipoidunlöslich sind. Die Oxydationen im Ei werden durch sie derartig beeinflusst, daß fast jeder erheblichen Abänderung des Salzmilieus eine Änderung der Oxydationsgröße entspricht. Die Salzwirkung ist höchst wahrscheinlich¹⁾ eine Wirkung auf die Grenzschicht: da die Natur der Grenzschicht von den begrenzenden Schichten bestimmt wird, ist nicht zu erwarten, daß verschiedene Zellen in gleichen Salzlösungen die gleiche Reaktion zeigen, sondern gerade für Grenzschichtwirkungen sind spezifische Wirkungen zu erwarten. Aber, die Indifferenz der Erythrocyten, deren Atmung nicht einmal durch eine isotone Baryumchloridlösung beeinflusst werden konnte, ging soweit, daß der Verdacht entstand, die Plasmahaut der Erythrocyten, die ja im wesentlichen an Hämoglobin grenzt, habe nicht mehr die Bedeutung der Grenzschicht anderer Zellen. Diese Vermutung konnte durch das Experiment geprüft werden und hat sich als richtig erwiesen.

Die Blutzellen der Vögel sind elliptische Zellen mit stark färbbarem Kern. Derjenige Teil, der dem Protoplasma anderer Zellen entspricht, besteht größtenteils aus Hämoglobin. Ich habe nun gefunden, daß die Plasmahaut durch vorsichtiges Gefrieren und Auftauen zerstört werden kann, ohne daß dadurch der Stoffwechsel beeinträchtigt wird: ja, die Oxydationsgröße läßt sich durch Gefrieren unter besonderen Bedingungen sogar um mehr als 50 % steigern. Aus derartigen Zellen ist der flüssige Inhalt des Zelleibes ausgetreten, während der Kern noch deutlich färbbar erhalten bleibt. Auf Tafel I sind die unverletzten und die verletzten Elemente nebeneinander abgebildet (der Rest des Protoplasmas, der den Kern noch umhüllt, ist im gefärbten Präparat sehr undeutlich, dagegen im hängenden Tropfen gut zu sehen). Die Frage, ob in diesen Elementen nur der Kern atmet, oder ob auch der Protoplasmaschatten sich an dem Sauerstoffverbrauch beteiligt, lasse ich offen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXVI, S. 305.

Es ist nun interessant, daß nach Zerstörung der Plasmahaut die Atmung salzempfindlich geworden ist: während bei unveränderter Plasmahaut eine isotone Baryumchloridlösung die Oxydationsgröße gar nicht beeinflußt, wirkt nach Verletzung der Plasmahaut schon eine zehnmal so kleine Baryummenge zerstörend auf die Atmung. Auch Calcium und Magnesium, die vorher ganz indifferent waren, erweisen sich als wirksam. Dagegen beeinflussen die lipoidlöslichen Stoffe die Oxydationsgröße in gleicher Weise, ob die Plasmahaut zerstört ist oder nicht. Die Indifferenz der Sauerstoffatmung gegen die lipoidunlöslichen Stoffe scheint mir somit aufgeklärt.

In den cytolysierten Erythrocyten haben wir Formelemente, in denen die Stoffe noch ebenso zersetzlich oder noch zersetzlicher sind als in den intakten Zellen. und sie müssen, soweit chemische Probleme in Betracht kommen, durchaus als lebend bezeichnet werden. Für Kernstudien ist es ein großer Vorteil, daß der Kern von dem Experimentator nicht mehr durch die Plasmahaut getrennt ist, und ich glaube, daß sich an diesem Material manche Fragen, wie die nach der Natur der Kernmembran, gut studieren lassen. — Die Unwirksamkeit eines sonst so stark wirksamen Giftes wie Baryum zeigt ferner, daß die lipoide Grenzschicht als solche nicht empfindlich ist gegen Salze, sondern daß es offenbar darauf ankommt, daß lebendes Protoplasma an sie grenzt. — Schließlich sind die mitgeteilten Tatsachen wohl eine gute Bestätigung der Overton'schen Theorie.

In einer früheren Untersuchung¹⁾ habe ich die Wirkungsstärke von Substanzen homologer Reihen auf die Atmung verglichen mit dem Resultat, daß die hemmenden Grenzkonzentrationen um so kleiner sind, je größer das Teilungsverhältnis

Öl
Wasser ist. Diese Beziehung ist ganz allgemein, wie wir uns durch Prüfung organischer Substanzen der verschiedensten Konstitution überzeugt haben. Die Beeinflussung durch eine Anzahl

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIX. S. 452.

substituierter Harnstoffe ist besonders instruktiv (Abschnitt V), teils, weil es sich wieder um sehr große Unterschiede handelt, teils, weil die Hemmungen vollkommen reversibel sind. Es läßt sich jetzt sagen, daß weniger die Konstitution als die Löslichkeitsverhältnisse bei einer großen Anzahl von Verbindungen das Entscheidende für die Oxydationsbeeinflussungen sind, und daß die Oxydationsprozesse in engstem Zusammenhang mit dem physikalischen Zustand der Lipide stehen.

Die oxydationshemmenden Konzentrationen für Blutzellen liegen über den narkotischen Grenzkonzentrationen für Ganglienzellen,¹⁾ wie aus einem Vergleich der Zahlen von Hans Meyer²⁾ oder Overton³⁾ mit den meinigen hervorgeht; und zwar scheinen die relativen Unterschiede innerhalb einer homologen Reihe für die einzelnen Glieder verschieden zu sein. — Daraus ergibt sich u. a., daß ein Stoff nicht oxydationsbeeinflussend auf die Blutzellen wirken wird, wenn erst seine gesättigte Lösung Gehirnnarkose verursacht. Dies fanden wir an verschiedenen Beispielen bestätigt.

Durch den Parallelismus von narkotischer und oxydationsbeeinflussender Wirkungsstärke gewinnt die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Narkose und Sauerstoffatmung besonderes Interesse. Warum ein ursächlicher Zusammenhang allgemein nicht besteht, habe ich schon ausgeführt.⁴⁾ Die Mikrophotogramme am Schlusse dieser Abhandlung sollen dokumentieren, daß bei meinen Messungen die Zellen wirklich narkotisiert waren.

Alle Beeinflussungen der Sauerstoffatmung, die ich bisher mitgeteilt habe, kommen für die spezielle Physiologie der Wirbel-

¹⁾ Eine Ausnahme ist Chloralhydrat, wie in einer späteren Mitteilung gezeigt werden wird, und vielleicht Amylalkohol.

²⁾ Hans Meyer, Schiedebergs Archiv, Bd. XLII, S. 109, 119; Bd. XLVI, S. 338.

³⁾ Overton, Studien über die Narkose, Jena 1901.

⁴⁾ Diese Zeitschrift. Bd. LXIX, S. 452.

tiere kaum in Betracht, da ein lebendes Tier so erhebliche Abänderungen der die Zellen umgebenden Flüssigkeit nicht erträgt: und was die indifferenten eindringenden Substanzen anbetrifft, so wirken sie größtenteils¹⁾ auf die Ganglienzellen, bevor die Grenzkonzentration für die Blutzellen erreicht ist. Ich habe jetzt eine Beeinflussung gefunden, der möglicherweise eine speziell physiologische Bedeutung zukommt. Wenn man nämlich der Salzlösung, in der die Blutzellen suspendiert sind, minimale Mengen Ammoniak zufügt, so steigt der Sauerstoffverbrauch sehr erheblich. Es handelt sich hier um 1,7 mg auf 100 ccm, also Ammoniakmengen, wie sie im Blut angetroffen werden. Auch wenn man zu Serum NH_3 -Mengen zusetzt, die die Reaktion gegen Indikatoren noch nicht verändern, werden deutliche Beeinflussungen beobachtet.

Methode.

Alle Versuche sollten mit jungen Erythrocyten angestellt werden, teils weil sie stärker atmen, teils weil sie interessantere Eigenschaften zeigen; man kann Gänsen erhebliche Mengen Blut entnehmen, ohne sie zu töten; beispielsweise erhielten wir von einer Gans in 24 Tagen 660 ccm Blut bei 10 Entnahmen. Besonders wenn man mit einem starken Aderlaß beginnt (100 ccm), treten sehr bald junge Zellen in die Blutbahn über, und man hat in wenigen Tagen brauchbares Material.

Die Methode der Sauerstoffbestimmung ist die in der vorigen Mitteilung²⁾ beschriebene. Die Messungen sind wiederum nicht umgerechnet, sondern die beobachteten Druckverminderungen in Millimeter Wasser angegeben, abzüglich 3 mm Wasser (der Barcroftschens³⁾ Korrektur für CO_2 -Absorption aus der Schüttelflasche, die bei meiner Versuchsanordnung aber nicht addiert, sondern subtrahiert werden muß). Die Druckverminderungen sind direkt vergleichbar, weil immer die gleiche Menge Blut, 1,8 ccm, verwendet wurde und das Volumen der

¹⁾ Siehe Anmerkung 1 der vorigen Seite.

²⁾ loc. cit., Bd. LXIX, S. 452.

³⁾ Ergebnisse der Physiologie, 1908, S. 785.

Schüttelflasche, abzüglich der eingefüllten Flüssigkeiten, ca. 32 cem betrug.

Die Atmungsgläschen, in die das Blut eingeschlossen wird, haben die aus der Zeichnung ersichtliche Form erhalten. Sie haben den Vorteil, daß bei Abkühlung, z. B. beim Herausnehmen aus dem Thermostaten, kein luftverdünnter Raum über dem Blut entsteht, sondern der Faden in der Kapillare bewegt sich nach Maßgabe der Kontraktion. Trotzdem ist das Blut für die Sauerstoffbestimmung so gut wie abgeschlossen von der Luft.



I.

Zerstörung der Plasmahaut durch Gefrieren und Auftauen.

Die Blutkörperchensuspension wird bei -15 bis -20° gefroren und schnell bei 38° aufgetaut. Die nunmehr tiefdunkle Flüssigkeit füllt man sofort in das Atmungsgläschen: in ein zweites Gläschen die nicht gefrorene Kontrolle. Die Unterschiede im Sauerstoffverbrauch waren anfangs unregelmäßig, bis sich herausstellte, daß die Konzentration der Zellen von Bedeutung ist. Denken wir uns den Grenzfall, daß eine Zelle so dicht neben der anderen liegt, daß gar kein Serum dazwischen ist. Dann wird durch das Auftauen die Plasmahaut zwar zerstört; das Milieu, in dem sich die Formelemente befinden, ändert sich aber nicht, es sei denn, daß der flüssige Inhalt des Protoplasmaleibes verschiedener Zellen sich vermischt. Diesen Grenzfall kann man schwer erreichen; aber man kommt ihm nahe durch starkes Zentrifugieren und Abheben der überstehenden Flüssigkeit. Solche konzentriert gefrorene Zellen sind auf Tafel I, Fig. I abgebildet und man sieht, daß die Kerne wenig verändert sind, durch Vergleich mit den Kernen intakter Zellen auf Fig. II. — Wenn man das Blut, ohne die Elemente zu konzentrieren, gefriert, so wird das Milieu sehr erheblich abgeändert, weil der flüssige Inhalt

waren anfangs unregelmäßig, bis sich herausstellte, daß die Konzentration der Zellen von Bedeutung ist. Denken wir uns den Grenzfall, daß eine Zelle so dicht neben der anderen liegt, daß gar kein Serum dazwischen ist. Dann wird durch das Auftauen die Plasmahaut zwar zerstört; das Milieu, in dem sich die Formelemente befinden, ändert sich aber nicht, es sei denn, daß der flüssige Inhalt des Protoplasmaleibes verschiedener Zellen sich vermischt. Diesen Grenzfall kann man schwer erreichen; aber man kommt ihm nahe durch starkes Zentrifugieren und Abheben der überstehenden Flüssigkeit. Solche konzentriert gefrorene Zellen sind auf Tafel I, Fig. I abgebildet und man sieht, daß die Kerne wenig verändert sind, durch Vergleich mit den Kernen intakter Zellen auf Fig. II. — Wenn man das Blut, ohne die Elemente zu konzentrieren, gefriert, so wird das Milieu sehr erheblich abgeändert, weil der flüssige Inhalt

des Protoplasmaleibes mit dem Serum verdünnt wird. Derartig gefrorene Zellen sind auf Tafel I, Fig. III abgebildet.

Es hat sich nun gezeigt, daß konzentrierte Suspensionen (junger) Erythrocyten nach Zerstörung der Plasmahaut bedeutend mehr Sauerstoff verbrauchen, als dieselbe Suspension intakter Zellen.

Atmung bei 38° (anäm. Blut).

		O ₂ -Verbrauch	Versuchszeit in Minuten	Steigerung durch Gefrieren in Prozenten
1	Gefroren	127 (t = 15)	60	65
	Kontrolle	77 (t = 15)		
2	Gefroren	147 (t = 17)	80	51
	Kontrolle	97 (t = 17)		
3	Gefroren	127 (t = 16)	80	51
	Kontrolle	84 (t = 16)		

Der Einfluß der Konzentration der Zellen geht aus folgenden Zahlen hervor («verdünnt» ist etwa die Konzentration des Blutes).

Atmung bei 38° (anäm. Blut).

		O ₂ -Verbrauch	Steigerung %	Versuchszeit Min.
1	Konzentr. gefroren	187 (t = 15)	80	60
	Kontrolle konzentr.	104 (t = 15)		
	Verdünnt gefroren	70 (t = 15)	40	
	Kontrolle verdünnt	50 (t = 15)		
2	Konzentr. gefroren	175 (t = 15)	70	70
	Kontrolle konzentr.	104 (t = 15)		
	Verdünnt gefroren	57 (t = 15)	— 11	
	Kontrolle verdünnt	64 (t = 15)		

Es ergibt sich somit, daß Serum die Atmung nach Zerstörung der Plasmahaut schädigt. Normale (alte) Blutzellen zeigen beim Gefrieren in konzentrierter Suspension keine oder eine sehr viel kleinere Steigerung, als junge Blutzellen, und deshalb sieht man beim Gefrieren normaler Erythrocyten in verdünnter Suspension starke Abnahme des Sauerstoffverbrauchs.

Atmung bei 38° (normales Blut).

	O ₂ -Verbrauch	Steigerung %	Versuchszeit Min.
1	Konzentr. gefroren	71 (t = 15)	60
	Kontrolle konzent.	57 (t = 15)	
	Verdünnt gefroren	17 (t = 15)	
	Kontrolle verdünnt	39 (t = 15)	
2	Konzentr. gefroren	50 (t = 14)	65
	Kontrolle konzent.	52 (t = 14)	
	Verdünnt gefroren	23 (t = 14)	
	Kontrolle verdünnt	37 (t = 14)	

Keine Änderung des Sauerstoffverbrauchs durch Zerstören der Plasmahaut findet man demgemäß manchmal bei alten Zellen in konzentrierter Suspension oder bei jungen in verdünnter Suspension, ohne daß solchen Übereinstimmungen Bedeutung zukäme. Denn sie sind das mehr zufällige Resultat von zwei in verschiedener Richtung wirkenden Einflüssen.

Durch häufiges Gefrieren in verdünnter Suspension kann die Atmung fast völlig aufgehoben werden.

Es entstand jetzt die Frage, ob die ausgetretene Flüssigkeit des Protoplasmaleibes oder die zurückbleibenden Formelemente den Sauerstoff verbrauchen. Es wurde deshalb nach dem Auftauen zentrifugiert, und der Sauerstoffverbrauch der überstehenden klaren und der tieferen, die Formelemente enthaltenden Schicht, verglichen. Da die zähe Flüssigkeit sich

schwer zentrifugieren läßt (man zentrifugiert am besten warm, wobei die geringere Reibung viel ausmacht), muß man eine relativ große Menge Blut in Arbeit nehmen, um wenige Kubikzentimeter Flüssigkeit zu erhalten. Aus den folgenden 3 Versuchen scheint hervorzugehen, daß der Sauerstoff nicht in der zellfreien Flüssigkeit verbraucht wird. In Nr. 2 ist allerdings ein geringer O_2 -Verbrauch zu konstatieren, aber man muß bedenken, daß eine vollständige zellfreie Flüssigkeit schwer zu erhalten ist; immerhin ist auch in 2 der Unterschied zwischen den beiden Schichten sehr groß (14 : 101).

Atmung bei 38° .

		O_2 -Verbrauch	Versuchszeit Min.
1	Überstehende Flüssigkeit	3 (t = 16)	60
	Formelemente	102 (t = 16)	
2	Überstehende Flüssigkeit	14 (t = 16)	75
	Formelemente	101 (t = 16)	
3	Überstehende Flüssigkeit	— (t = 15)	60
	Formelemente	21 (t = 15)	

Daß in der zellfreien Flüssigkeit gar kein Sauerstoff verbraucht wird, können wir aus den angeführten Messungen nicht schließen; der Verbrauch könnte von einer anderen Größenordnung sein.

Es fragte sich weiter, ob wir es nach Zerstörung der Plasma-haut noch mit einer wirklichen Sauerstoffatmung zu tun haben, d. h., ob die Oxydationen noch bis zur CO_2 -Bildung führen. Diese Frage muß auf Grund folgender Versuche bejaht werden:

a) CO_2 vor dem Versuch in 1 cem kältecytolysierten Blutes	0,35 cem
CO_2 nach dem Versuch in 1 cem kältecytolysierten Blutes	0,52
Pro Stunde bei 38° in 1 cem entstanden CO_2 .	0,17 cem (0° , 760 mm).

b) CO ₂ vor dem Versuch in 1 ccm kältecytolysierten Blutes	0,15 ccm
CO ₂ nach dem Versuch in 1 ccm kältecytolysierten Blutes	0,24 »
Pro Stunde bei 38° in 1 ccm entstanden CO ₂ .	0,09 ccm (0°, 760 mm).

In a) wurde Blut in Serum gefroren: in b) in 0,9%iger NaCl, beide in konzentrierter Suspension. Es ist methodisch günstiger, die CO₂-Versuche in NaCl zu machen als in Serum, damit die CO₂-Menge vor dem Versuch möglichst klein ist. Das Blut wurde zuerst mit O₂ gesättigt und dann die CO₂ nach Haldane-Barcroft entwickelt. Auch die CO₂-Bestimmung wird schöner, wenn man, wie ich es in der letzten Mitteilung beschrieb, das Ferricyanidverfahren vermeidet.

II.

Zerstörung der Plasmahaut durch destilliertes Wasser.

Die Plasmahaut der Erythrocyten läßt sich noch durch ein anderes physikalisches Verfahren zerstören, durch Verminderung des osmotischen Druckes der umspülenden Flüssigkeit. Zentrifugiert man das Serum ab und fügt viel destilliertes Wasser zu, so tritt nicht nur das Hämoglobin aus, sondern auch die Kerne werden zu einer fadenziehenden gequollenen Masse und sind offenbar zerstört. Wenn man aber den Wasserzusatz vorsichtig bemißt, so läßt sich die Plasmahaut zerstören, ohne daß die Kerne gleichzeitig vernichtet werden. In Ausstrichpräparaten sieht man dann den stark vergrößerten und schwach färbbaren Kern, den der Protoplasmaschatten als enge Zone umgibt. Die Bilder erklären sich wohl so, daß die osmotischen Eigenschaften der Kernmembran noch erhalten sind: fügt man zu solchen Suspensionen Salz, so wird der Kern wieder kleiner. Es stellte sich nun heraus, daß auch derartige Elemente noch eine sehr erhebliche und gegen die Kontrolle nur wenig verminderte Sauerstoffatmung zeigen. In den folgenden Versuchen, zu denen wieder nur Blutzellen anämischer Gänse verwendet wurden, war die Hämolyse «kom-

plett», d. h. Proben, die nach dem Atmungsversuch zentrifugiert wurden, gaben ein rein weißes Sediment beim Waschen mit physiologischer NaCl_2 -Lösung.

Atmung bei 38° .

		O_2 -Verbrauch	Abnahme in %	Versuchszeit Min.
1	Hämolyse 1,5 : 3	58 (t = 14)	12	60
	Kontrolle in Serum	66 (t = 14)		
2	Hämolyse 1 : 3	60 (t = 14)	25	75
	Kontrolle in Serum	80 (t = 14)		
3	Hämolyse	60 (t = 15)	17	60
	Kontrolle in NaCl	72 (t = 15)		

Die Zahlen neben «Hämolyse» bedeuten, daß z. B. 1,5 ccm konzentriert in Serum zentrifugierter Blutkörperchen auf 5 ccm mit destilliertem Wasser gebracht wurden. Die Kontrollen sind Versuche mit unverletzten Zellen. Nach den Resultaten des Abschnitts I erklärt sich die Abnahme des O_2 -Verbrauchs nicht durch Zerstörung der Plasmahaut, sondern durch die Verdünnung, die sich bei der Wasserhämolyse nicht vermeiden läßt.

Ich lasse noch einige Bestimmungen folgen, die in derselben Weise wie in Abschnitt I entscheiden sollten, ob die Atmung in der Flüssigkeit oder in den Formbestandteilen vor sich geht. Die Versuche zeigen, daß nur die Formbestandteile atmen.

Atmung bei 38° .

		O_2 -Verbrauch	Versuchszeit Min.
1	Überstehende Flüssigkeit	2 (t = 13)	60
	Formelemente	73 (t = 13)	
2	Überstehende Flüssigkeit	1 (t = 16)	60
	Formelemente	59 (t = 16)	

III.

Eine große Zahl von Stoffen hemmen die Atmung schon in sublösender Dosis.¹⁾ Steigert man die Konzentrationen derartiger Substanzen bis zur lösenden Dosis, so findet man, wie nicht anders zu erwarten, auch nach der Lösung keinen O₂-Verbrauch. Es gibt aber auch Stoffe, die in sublösender Dosis den O₂-Verbrauch nicht beeinflussen; zu diesen gehören nach einigen Vorversuchen z. B. Saponin und die spezifischen Lysine.

IV.

Wie anfangs erwähnt, verbrauchen die intakten Erythrocyten in den verschiedensten Salzlösungen die gleiche Menge Sauerstoff und selbst Ionen, wie Baryumionen, die sonst in kleinen Mengen zerstörend wirken, beeinflussen in ca. 2,5%iger Lösung den Stoffwechsel nicht.

2 Stunden bei 38°. — Sauerstoffverbrauch.

In isoton. NaCl	75	t = 18
„ „ KCl	83	t = 18
„ „ BaCl ₂	78	t = 18

Die folgenden Versuche sind wieder mit Zellen anämischer Gänse angestellt; von ein und derselben Suspension (konzentrierte Suspension in Serum) wurde eine Probe, etwa 1,5 ccm. gefroren und aufgetaut und mit der zu prüfenden Salzlösung auf 5 ccm aufgefüllt; eine zweite nicht gefrorene Probe wurde immer zur Kontrolle in gleichem Verhältnis mit der Salzlösung vermischt.

1 Stunde bei 38°.

Plasmahaut intakt	in Serum	43 (t = 14),
	in isot. BaCl ₂	42 (t = 14).
Plasmahaut verletzt	in Serum	52 (t = 14),
	in BaCl ₂	4 (t = 14).

Isotonische Baryumchloridlösung wirkt also bei verletzter Plasmahaut ungemein giftig. Selbst wenn man eine isotonische NaCl-Lösung mit $\frac{1}{10}$ einer isotonischen BaCl₂-Lösung vermischt,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIX. S. 452. und diese Arbeit. Abschnitt V.

Tafel I.

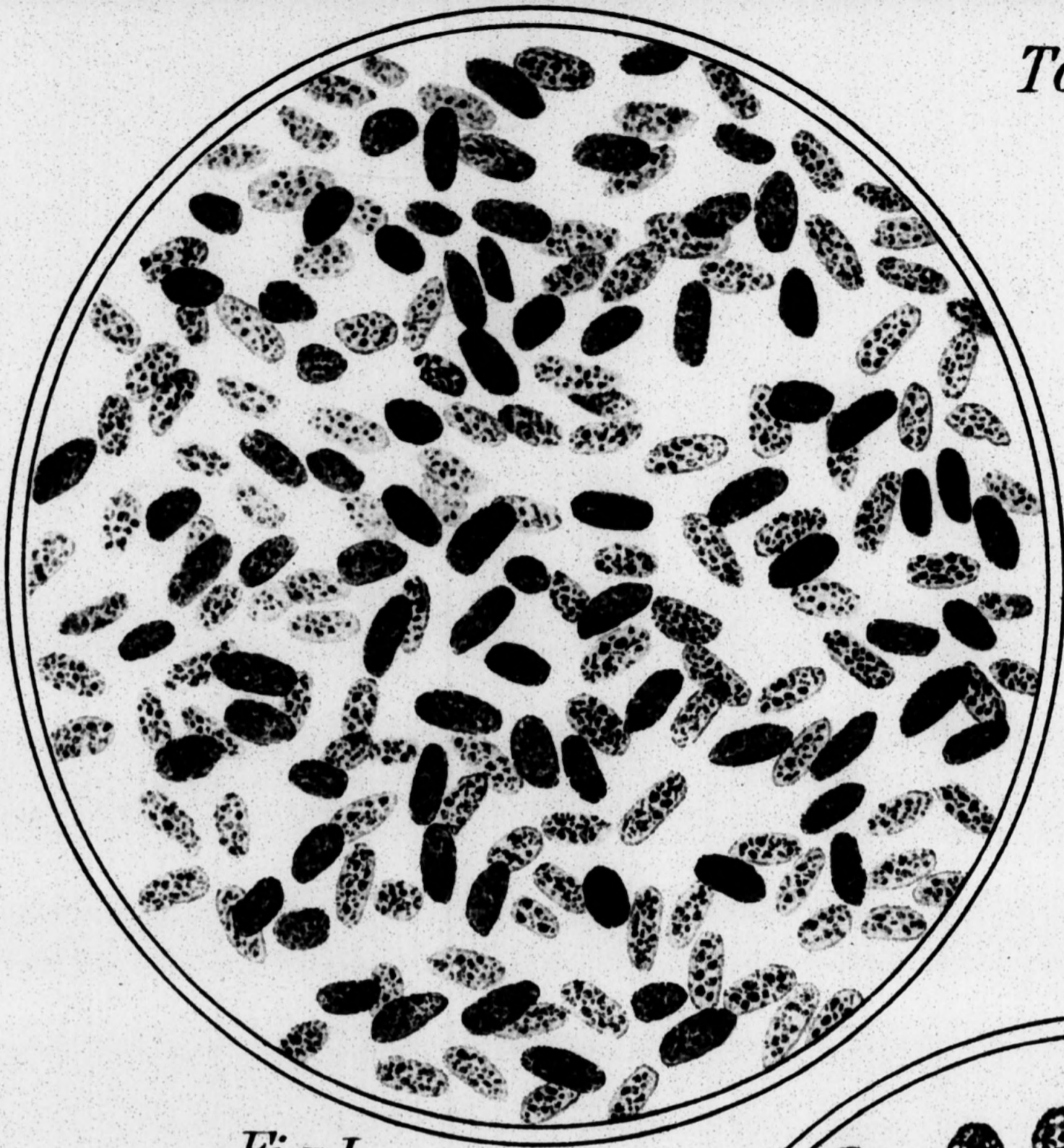


Fig. I.



Fig. II.

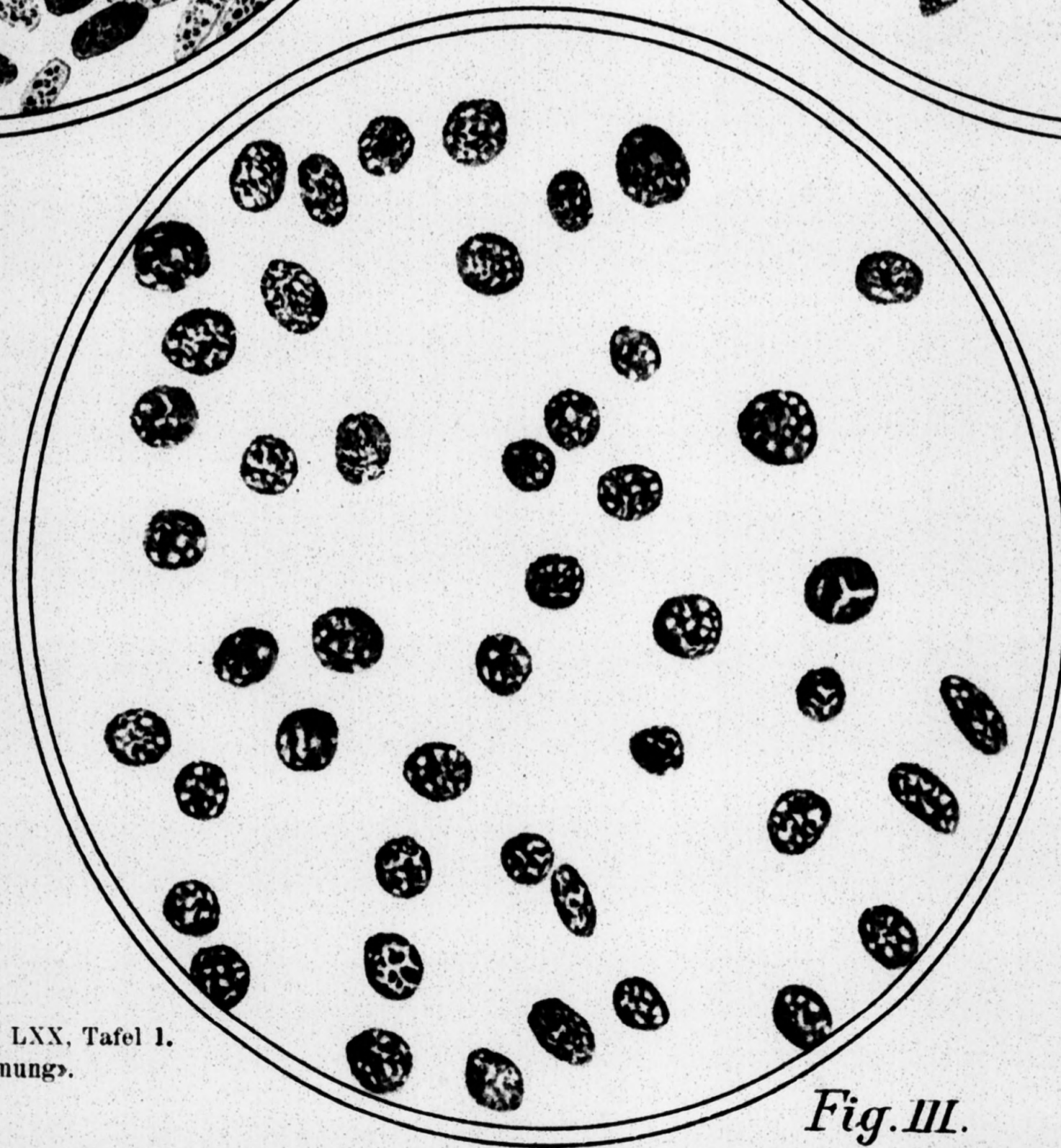


Fig. III.



so wirkt diese Lösung auf die Zellen mit verletzter Plasmahaut noch stark giftig.

1 Stunde bei 38°.

Plasmahaut verletzt in NaCl:	47 (t = 13),
in NaCl + $\frac{1}{10}$ BaCl ₂ :	17 (t = 13).

Auch CaCl₂ wirkt ganz anders nach dem Gefrieren.

1 Stunde bei 38°.

Plasmahaut intakt	in KCl:	62 (t = 14),
	in CaCl ₂ :	67 (t = 14).
Plasmahaut verletzt	in KCl:	57 (t = 14),
	in CaCl ₂ :	9 (t = 14).

MgCl₂. 1 Stunde bei 38°.

Plasmahaut intakt	in NaCl:	47 (t = 13),
	in isot. MgCl ₂ :	47 (t = 13).
Plasmahaut verletzt	in NaCl:	47 (t = 13),
	in isot. MgCl ₂ :	17 (t = 13).

70 Minuten bei 38° (NaCl, CaCl₂, BaCl₂).

Plasmahaut intakt	in isot. NaCl:	61 (t = 17),
	in isot. CaCl ₂ :	57 (t = 17),
	in isot. BaCl ₂ :	57 (t = 17).
Plasmahaut verletzt	in isot. NaCl:	57 (t = 17),
	in isot. CaCl ₂ :	10 (t = 17),
	in isot. BaCl ₂ :	6 (t = 17).

(Ein Einwand gegen alle diese Unterschiede wäre, daß die Salze mit dem Hämoglobin Verbindungen bilden, die den Sauerstoff nicht mehr leicht abgeben. Methämoglobin entstand nicht, sondern die Gläschen blieben ganz hellrot. Ich habe mich aber auch überzeugt, daß der Sauerstoff durch Wasserstoff ganz normal ausgetrieben wird, und damit ist der Einwand widerlegt.)

Von lipoidlöslichen Substanzen wurden geprüft Äthylurethan, Propylurethan und Blausäure.¹⁾

90 Minuten bei 38°.

Plasmahaut intakt	in NaCl:	36 (t = 14),
	in NaCl ^{1/10000} -N-HCN:	19 (t = 14).
Plasmahaut verletzt	in NaCl:	21 (t = 14),
	in NaCl ^{1/10000} -N-HCN:	12 (t = 14).

Die Blausäure bewirkt also Hemmung der Atmung um den gleichen Teil, ob die Plasmahaut verletzt ist oder nicht. Ebenso verhalten sich die Urethane, die in solchen Konzentrationen in isotonischer NaCl-Lösung gelöst waren, daß nach dem Vermischen mit der konzentrierten Blutkörperchensuspension die angegebenen Konzentrationen entstanden.

Atmung bei 38°.

Plasmahaut intakt.	NaCl:	58 (t = 16),
	3,3% Äthylurethan:	17 (t = 16),
	1,5% Propylurethan:	5 (t = 16).
Plasmahaut verletzt.	NaCl:	49 (t = 16),
	3,3% Äthylurethan:	15 (t = 16),
	1,5% Propylurethan:	6 (t = 16).

Auf die Hemmungswirkung der Urethane hat demnach die Verletzung der Plasmahaut nicht den geringsten Einfluß.

Ein bemerkenswertes Resultat gab arsenige Säure, die nach Versuchen des Herrn Onaka die Oxydationen der Blutzellen stark hemmt. Arsenige Säure soll in Lipoiden spurenweise löslich sein; wir versuchten, das Teilungsverhältnis

Öl
Wasser zu bestimmen. fanden aber keine Abnahme des Arsen-

¹⁾ Blausäure ist lipoidlöslich. Das Teilungsverhältnis Olivenöl
Wasser

fand ich zu 0,1—0,13 bei 29°: es wurde eine KCN-Lösung mit H₂SO₄ so neutralisiert wie für biolog. Versuche, d. h. gegen Phenolphth. Spur rosa. 20 ccm dieser Lösung verbrauchten 8,8 ccm ^{n/10}-AgNO₃; davon wurden 40 ccm mit 125 ccm Olivenöl 30 Min. bei 29° gedreht in vollständig gefüllter Flasche. Dann verbrauchten 20 ccm 6,2 ^{n/10}-AgNO₃. Ein weiterer Versuch bei 70 Min. Drehzeit gab für das Teilungsverhältnis 0.1.

titers (jodometrisch), als wir 30 ccm einer wässrigen As_2O_3 -Lösung (10 ccm = 5,9-n/10-Jod) mit 140 ccm Olivenöl 50 Min. bei 29° schüttelten. Arsenige Säure wird also, falls sie überhaupt auf diosmotischem Weg eindringt, sehr langsam eindringen. Es ergab sich nun, daß arsenige Säure in etwa 10facher Verdünnung wirkt,¹⁾ wenn die Plasmahaut verletzt ist. In je 1,8 ccm konzentrierter Blutkörperchensuspension in Serum, gefroren und nichtgefroren, wurden 3,2 ccm arsenige Säurelösung der angegebenen Konzentration gegeben.

1 Stunde bei 38°.

Plasmahaut intakt.	NaCl:	64 (t = 13),
	0,001% As_2O_3 :	58 (t = 13),
	0,01% :	27 (t = 13).
Plasmahaut verletzt.	NaCl:	39 (t = 13),
	0,001% As_2O_3 : ²⁾	20 (t = 23).

V.

Substituierte Harnstoffe.

Die Substanzen wurden in Lockescher Flüssigkeit gelöst und im übrigen so verfahren, wie in der vorigen Mitteilung (Diese Zeitschrift, Bd. LXIX, S. 452) beschrieben ist. Deutliche Hemmung der Atmung wird bewirkt durch folgende Konzentrationen:

Dimethylharnstoff (asymmetrisch)	12%.
Diäthylharnstoff (symmetrisch)	6%.
Phenylharnstoff	0,25%.
Tolylsulfoharnstoff	0,25%.

¹⁾ Wenn die arsenige Säure sehr langsam eindringt, könnte diese Tatsache so erklärt werden, daß bei Versuchen mit unverletzter Plasmahaut nie Gleichgewicht erreicht war.

²⁾ Die Arsenkonzentration ist dann nach dem Vermischen noch etwas kleiner.

Analytische Belege.

1³/₄ Stunden bei 29°.

	O ₂ -Verbrauch	
1. in Locke	51	t = 17
2. Dimethylharnstoff 12 ⁰ / ₀	30	t = 17
8. Diäthylharnstoff 6 ⁰ / ₀	18	t = 17

Nach dem Waschen der 3 Kontrollproben mit Locke:

1. aus Locke	47	t = 17
2. Dimethylharnstoff	48	t = 17
3. Diäthylharnstoff	52	t = 17

1³/₄ Stunden bei 29°.

	O ₂ -Verbrauch	
1. in Locke	62	t = 17
2. 0,25 ⁰ / ₀ Phenylharnstoff	37	t = 17
3. 0,25 ⁰ / ₀ Tolylsulfoharnstoff	35	t = 17

Nach dem Waschen der 3 Kontrollproben mit Locke:

1. aus Locke	59	t = 17
2. Phenylharnstoff	71	t = 17
3. Tolylsulfoharnstoff	68	t = 17

Auch hier sieht man wieder, daß nach der Hemmung eher eine geringe Steigerung des Stoffwechsels zu konstatieren ist.

VI.

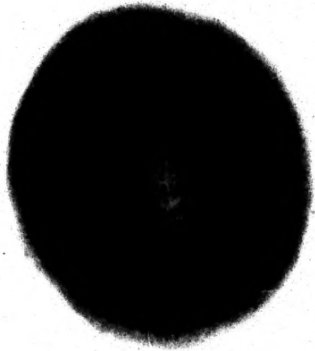
NH₃.

Wenn man die Atmung der (unverletzten) Erythrocyten in Salzlösungen mit der in Serum vergleicht, findet man häufig ziemlich bedeutende Unterschiede, manchmal geringe und manchmal gar keine. Ebenso findet man Unterschiede zwischen Serum und der Lockeschen zuckerhaltigen Flüssigkeit. Alle Angaben dieses Abschnitts beziehen sich wieder nur auf die jungen Erythrocyten.

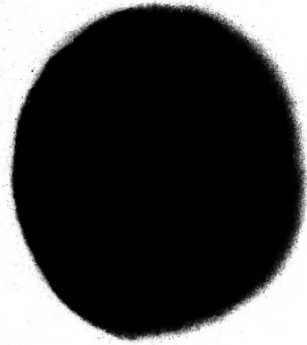
Seewasser.

Phenylurethan:
Grenzkonzentration.

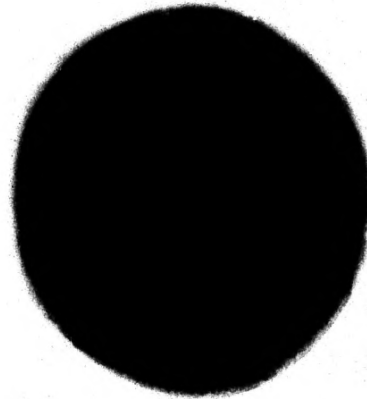
Phenylurethan;
das 4fache der Grenzkonzentration.



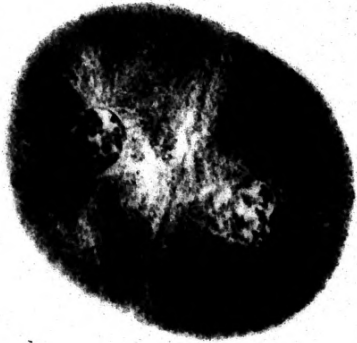
1



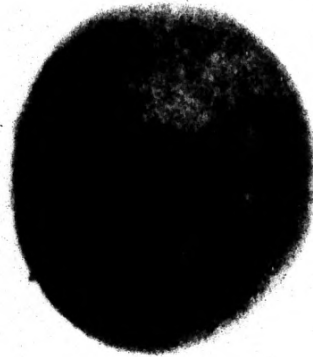
2



3



1a



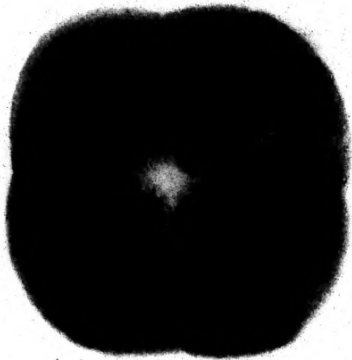
2a



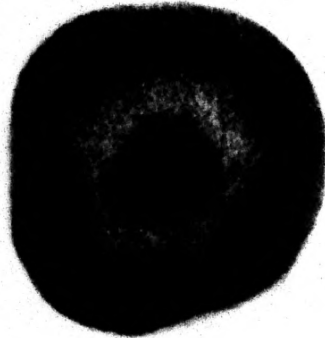
3a



4



1b



2b



3b

Die Bedeutungslosigkeit der Plasmahaut für die Oxydationen, die aus den vorigen Abschnitten hervorgeht, ließ vermuten, daß der steigernde Stoff im Serum eine lipoidlösliche Substanz sei. Von diesem Gesichtspunkt aus untersuchte ich auch den Einfluß von NH_3 -Spuren und fand, daß sich mit Hilfe von NH_3 Salzlösungen herstellen lassen, in denen die Zellen ebensostark oder noch stärker atmen als im Serum. Ob im Serum das NH_3 wirklich dieser Stoff ist, ist damit nicht festgestellt. Es handelt sich hier um $1/1000$ -n- NH_3 -Lösungen (in NaCl), mit denen etwa 2 ccm der Suspension 3mal gewaschen wurden in Zentrifugiergläsern von 20 ccm Inhalt. Es ist aber bei den NH_3 -Versuchen nicht bis zum Gleichgewicht mit den entsprechenden Lösungen gewaschen worden (wie aus der Prüfung der Waschwässer mit Phenolphthalein hervorging), und so haben die angegebenen NH_3 -Zahlen nur den Wert von Maximalzahlen.

Wenn man den NH_3 -Gehalt weiter steigert, so wird die Atmung gehemmt, und zwar ist die Hemmung, wenn sie stark ist, irreversibel. Wenn man den NH_3 -Gehalt erheblich steigert, so tritt, wie bekannt, Cytolyse ein.

110 Minuten bei 29°.

in Serum	70	t = 16
$1/1000$ -n- NH_3	77	t = 16
$1/200$ -n- NH_3	62	t = 16
Locke ¹⁾	52	t = 16

135 Minuten bei 29°.

NaCl:	43	t = 16.
$1/1000$ -n- NH_3 :	68	t = 16.
$1/500$ -n- NH_3 :	64	t = 16.
$1/250$ -n- NH_3 :	48	t = 16.

¹⁾ Die Lockesche Lösung für die NH_3 -Versuche ohne Bicarbonat
Hoppe-Seyler's. Zeitschrift f. physiol. Chemie. LXX.

145 Minuten bei 29°.

Serum:	60	t = 16,
15 Serum + 1 ccm $n/10$ -NH ₃ :	81	t = 16.

Durch Zusatz derartiger NH₃-Mengen zu Serum wird die Reaktion gegen Phenolphthalein nicht merklich verändert. Man sieht aus diesem Versuch, daß die NH₃-Mengen, die im Serum steigernd wirken, größer sind als in NaCl, was wahrscheinlich mit Reaktionen des NH₃ im Serum zusammenhängt. Für die Serumversuche wurde immer nur einmal gewaschen und zwar 2 ccm mit 15 ccm NH₃-Serum.

1 Stunde bei 38°.

1. Serum:	84	t = 16,
2. 15 Serum + 0,5 $n/10$ -NH ₃ :	105	t = 16,
3. 15 + 1,0 :	112	t = 16,
4. 15 + 3,0 :	82	t = 16.

1 Stunde bei 38°.

1. Serum:	55	t = 15,
2. 15 Serum + 1 ccm $n/10$ -NH ₃ :	74	t = 15.

1 Stunde bei 38°.

NaCl:	39	t = 15,
$1/2000$ -n-NH ₃ :	57	t = 15,
$1/1000$ -n-NH ₃ :	66	t = 15.

1 Stunde bei 38°.

Serum:	74,
15 Serum + 1 ccm $n/10$ -NH ₃ :	84.

Aus allen diesen Versuchen geht die steigernde Wirkung des NH_3 hervor, über deren Mechanismus wir aber gar nichts aussagen können. Besonders die zuletzt angeführte Messung zeigt, daß die Steigerung im Serum nicht immer um den gleichen Betrag durch gleiche Mengen erzielt werden kann, während die NaCl-Versuche doch recht regelmäßig sind.

Ob NaOH, dem Serum zugesetzt, gleichfalls wirkt, habe ich noch nicht geprüft; es ist aber wahrscheinlich, da die Bindungsverhältnisse des NH_3 im Serum durch NaOH verschoben werden. Man könnte sich so erklären, warum Mengen Alkali, die die Reaktion des Serums noch nicht verschieben, steigernd auf den Stoffwechsel wirken.¹⁾

VII.

Erklärung zu den Tafeln.

Tafel I: Ausstrichpräparate, gefärbt nach May-Grünwald (Eosin—Methylenblau). Mit dem Zeichenapparat gezeichnet.

Tafel II: Alles Eier von *Stongylocentrotus lividus*. Konserviert in Pikrinessigsäure nach Boveri. Gefärbt mit Hämalaun.

Die Mikrophotogramme hat Herr Professor v. Wasielewski, Chefarzt im Samariterhaus, angefertigt, wofür ich ihm auch hier vielen Dank sage.

Die 9 Bilder 1, 1a, 1b; 2, 2a, 2b; 3, 3a, 3b sind Proben desselben Materials. Es wurde, bei 15° , 10^{20} befruchtet. 10^{50} wurden die Eier in 3 Schalen verteilt: 1. Seewasser, 2. $1/2000$ -n-Phenylurethanseewasser, 3. $1/500$ -n-Phenylurethanseewasser und darauf sofort eine Probe aus jeder Schale konserviert: Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3 der Tafel. Nachdem die Eier 1 Stunde 30 Minuten (bei 15°) in den Schalen gewesen waren, wurden wieder 3 Proben konserviert: 1a, 2a, 3a (um 12^{20}), und schließlich um 1^{00} wieder 3 Proben: 1b, 2b, 3b.

Wie man sieht, ist um 1^{00} die Probe in Seewasser im 4-Zellenstadium, in der Probe in $1/2000$ -n-Phenylurethan sind

¹⁾ Zuntz erhielt z. B. Steigerung des Gesamtstoffwechsels eines Tieres durch Soda.

die Astrosphären noch nicht einmal zur 2-Teilung auseinandergegangen und in der dritten Probe ist es überhaupt nicht zur Anlage der Astrosphären gekommen.

Obwohl nun in $1/2000$ -n-Phenylurethan keine Furchung stattgefunden hat (man kann auch sagen, die Entwicklung ist enorm verlangsamt), wurde der Sauerstoffverbrauch gegenüber der Kontrolle in Seewasser nicht oder nur wenig herabgesetzt gefunden.¹⁾ In $1/500$ -n-Phenylurethan war der Sauerstoffverbrauch um etwa 40% gesunken.

Eier, die in der schwachen Phenylurethanlösung längere Zeit gelassen werden, zerfallen, und zwar früher als solche in der stärkeren Phenylurethanlösung. Die Erklärung dieser zunächst paradoxen Erscheinung Phenylurethan wird durch Phenylurethan entgiftet — ist ohne weiteres durch die Sauerstoffbestimmungen gegeben.

Nr. 5 gehört nicht in den Zusammenhang dieser Abhandlung. Es ist ein unbefruchtetes Ei von *Stongylocentrotus*, das eine Stunde in einer hypertonischen Lösung und darauf eine Stunde in Seewasser gewesen ist. Außer den Astrosphären um den Kern sind 7 weitere Strahlungen an der Peripherie entstanden. Derartige interessante Bilder sieht man häufig, wenn das Ei stark atmet, sich aber aus irgend einem Grund nicht furcht.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXVI, S. 305.