

# ÜBER GLYKOGENSYNTHESE IM ÜBERLEBENDEN RATTENZWERCHFELL UND IHRE BEEINFLÜSSUNG IN VITRO DURCH HORMONE UND VITAMINE

von

OTTO RIESSER

*Laboratorium Dr P. A. Meerburg, Naarden (Netherlands).*

Vor kurzem konnte GEMMILL mit seinen Mitarbeitern<sup>1</sup> zeigen, dass das einer soeben getöteten Ratte entnommene Zwerchfell in Glukose-haltiger Ringerlösung und bei Gegenwart von Sauerstoff aus Glukose Glykogen aufzubauen vermag, und dass Insulin diese Synthese erheblich begünstigt.

Diese Befunde sind in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Das Praeparat selbst, das Zwerchfell junger Ratten, ermöglicht infolge seiner Dünne eine optimale Sauerstoff-Versorgung aller seiner Schichten. Dank diesem Umstand und der Intaktheit seiner Fasern erweist es sich durch die Fähigkeit, Synthesen auszuführen, als überlebend im eigentlichen und wahren Sinne. Es unterscheidet sich dadurch grundsätzlich von anderen viel gebrauchten und zu Unrecht als „überlebend“ bezeichneten Praeparaten, die, wie besonders der Gewebsbrei, aber auch sonstige Herrichtungen, bei denen die relative Dicke des Gewebes keine optimale Sauerstoffversorgung gestattet oder deren Struktur geschädigt ist, die Hauptbedingung des Ueberlebens, die Synthesefähigkeit, nicht besitzen. Die an derartigen Praeparaten beobachteten und gemessenen Vorgänge, stellen ausschliesslich Abbaureaktionen dar und müssen als Absterbe-Erscheinungen bewertet werden.

Der Vorgang des Glykogenaufbaues aus Glukose vollzieht sich, wie wir vor allem durch die Arbeiten der beiden CORI<sup>2</sup> wissen, in zwei Phasen. Die erste und physiologisch bedeutsamste besteht in der Veresterung der Glukose mit Phosphat unter Bildung des Glukose-1-phosphats, des sogen. CORI-Esters. Dieser Vorgang ist an die Intaktheit der Struktur und an optimale Sauerstoffversorgung gebunden und daher ein eigentlich vitaler. Die zweite Phase hängt nicht von jenen Bedingungen ab. Denn die Umlagerung des Coriesters zu Glykogen unter Phosphatabspaltung vollzieht sich auch im strukturlosen Milieu des Muskelbreis unter dem Einfluss des Phosphorylaseferments und bedarf keiner Sauerstoffzufuhr.

Beobachten wir also unter geeigneten Bedingungen einen Aufbau von Glykogen aus Glukose in Abhängigkeit von Strukturerhaltung und optimaler Sauerstoff-Versorgung, so haben wir es mit jener ersten Phase, der Glukosephosphatbildung, zu tun als eines für die lebende intakte Zelle kennzeichnenden Vorgangs.

Ein derartiges, relativ einfaches Praeparat, wie das isolierte Zwerchfell der Ratte es darstellt und das einen Grundvorgang des Lebens zu messen gestattet, muss besonders

geeignet erscheinen, um den Einfluss von Hormonen und Vitaminen auf den Kohlenhydratstoffwechsel zu studieren.

Von solchen Gesichtspunkten ausgehend habe ich eine grössere Zahl von Versuchen durchgeführt. Die sehr beschränkten Arbeitsmöglichkeiten während des Krieges liessen nur einfachste Versuchsanordnungen zu. So konnte ich z. B. nicht, wie es GEMMILL getan hat, die Zwerchfellpräparate im Schüttelapparat mit Sauerstoff behandeln, sondern musste eine primitivere Anordnung wählen. Folgendes Vorgehen erwies sich als brauchbar.

Zu jedem Versuch wurden *zwei* Ratten benutzt, junge Tiere von 150-170 g Gewicht und männlichen Geschlechts. Grössere Tiere haben unter Umständen schon ein für die optimale Sauerstoffversorgung ungünstiges zu dickes Zwerchfell, kleinere als 130 g erlauben kaum noch die genaue Analyse der beiden Hälften, da das Gewicht dann unter 0,08 g kommt. Jeder einzelne Versuch bestand also aus der einen Zwerchfellhälfte als Kontrolle, der zweiten als eigentlichem Versuchsobjekt, und die beiden Tiere dienten zu Parallelversuchen bei gleichzeitigem Ansatz.

Jeweils 4 breite Reagenzgläser wurden mit je 10 cc bikarbonatfreier, 0,05% primäres Phosphat und Glukose (0,2-0,5%) enthaltender Ringerlösung beschickt und in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gestellt, das seinerseits in einem grösseren, als Thermostat dienenden Gefäss stand. Die Temperatur wurde mittels kleiner Gasflamme auf 37-38 Grad gehalten. Durch fein ausgezogene Glasröhren perlte ein Dauerstrom von Sauerstoff in die Lösungen.

Die Herstellung des Zwerchfellpräparats geschah auf folgende Weise.

Die Ratten wurden in schwacher Aethernarkose durch Nackenschlag getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle durch einen quer verlaufenden Schnitt an der unteren Grenze des Brustkorbs wurden die überdeckenden Reste der Bauchmuskeln und die Brustmuskeln abgetragen. Nunmehr wurden die grossen Gefäss und der Oesophagus dicht unterhalb des Zwerchfells durchtrennt, wobei zugleich Entblutung eintrat. Anschliessend wurden die Nebennieren abgetragen, von denen besonders die rechtseitige später bei der Präparation des Zwerchfell-Rippenrings leicht miterfasst werden könnte. Indem man den processus xiphoides mit starker Pinzette fasst und anhebt, durchtrennt man mit einem Scherenschlag das Brustbein dicht darüber und schneidet nun, nach beiden Seiten die Rippen durchtrennend, einen Ring heraus, der das unverletzte Zwerchfell einschliesst. Nunmehr durchtrennt man genau der Mittellinie folgend von vorn nach hinten das Zwerchfell, vom Brustbeinrest ausgehend bis an die Wirbelsäule und löst dann erst den einen, dann den anderen Rippen-Halbring mit der an ihm haftenden Zwerchfellhälfte heraus. Nach Abspülen in kalter Ringerlösung kommt jeder der beiden Halbringe in eins der vorbereiteten Gläser.

Während der in unseren Versuchen durchweg eingehaltenen Versuchszeit von  $2\frac{1}{2}$  Stunden wurden die Röhrchen von Zeit zu Zeit mit der Hand geschüttelt, doch scheint der Sauerstoffstrom die frei flottierenden Zwerchfellsegel schon genügend zu bewegen.

Die geschilderte Art der Präparierung der Zwerchfellhälften in Verbindung mit dem Rippen-Halbring sollte eine möglichst weitgehend Vermeidung von Verletzungen des zarten Muskels gewährleisten. Demgegenüber steht der Nachteil, dass relativ viel Fremdgewebe, also vor allem Knochen bzw. Knorpel und sonstige Muskelreste (Intercostales) mit in das Versuchsgefäss kommen, und dass man nicht weiß, ob und wieweit diese Beimengungen das Ergebnis beeinflussen können. Tatsächlich scheinen die Versuche auch mit völlig frei präparierten Zwerchfellhälften zu gehen, wie mir eigne Beobachtung erwiesen hat. Dennoch bin ich bei der geschilderten Anordnung geblieben.

Nach Schluss der Expositionszeit wurden die Praeparate auf ein Uhrglas gebracht und nun das Zwerchfell sorgfältig abpräpariert. Durch leichtes Andrücken beider Seiten des Muskels auf Filterpapier wurde anhaftende Flüssigkeit tunlichst entfernt. Anschliessend wurde schnell auf einer Torsionswage gewogen (Gewicht einer Zwerchfellhälfte 0,10,13 g, selten etwas weniger oder mehr) und der Muskel in 3 cc heisse 30%ige KOH geworfen, die in einem Zentrifugenglas von ca 12 cc Inhalt im kochenden Wasserbade stand. Nach längstens 20 Minuten dauerndem Erhitzen ist völlige Lösung eingetreten.

Zur Fällung des Glykogens verwendete ich ursprünglich gemäss der üblichen Vorschrift die doppelte Menge (also 6 cc) 96% Aethylalkohol. Als dieser nicht mehr erhältlich war, ging ich zu Methylalkohol über und zwar mit bestem Erfolg, nachdem ich mich nochmals, wie schon früher, davon überzeugt hatte, dass man damit dieselben Werte wie mit Aethylalkohol bekommt. Unser Methylalkoholpräparat enthielt 4% Aether, was aber bestimmt ohne Belang ist und nur Vorsicht beim Zugeben des Alkohols zu der heissen Kalilauge erforderlich macht. Er wurde portionsweise unter leichtem Schütteln zugefügt, worauf nochmals zweimal gründlich umgeschüttelt wurde. Die Abscheidung des Glykogens vollzieht sich in gröberen Flocken und wesentlich schneller als bei Verwendung von Aethylalkohol. Die zuerst auch hier auftretende diffuse Trübung, die eine sehr zuverlässige Abschätzung der relativen Glykogenmenge ermöglicht, geht innerhalb weniger Minuten in Flockung über. Die Röhrchen blieben verschlossen bis zum folgenden Tage stehen. Der Niederschlag wurde 5 Minuten scharf zentrifugiert und die klare alkoholische Lauge abgegossen. Der Rückstand wurde je 3 Minuten zuerst mit 60%igem, dann mit reinem Methylalkohol und zuletzt mit Aether gewaschen und der noch anhaftende Aetherrest durch schwaches Erwärmen verjagt. Nach Einbringen von je 3 cc 2,2% HCl wurde, unter Verwendung von kurzen aufgesetzten Glasröhren als Kühler, 3 Stunden im kochenden Wasserbade hydrolysiert. Nach Abkühlen wurde der Röhrcheninhalt quantitativ in 50 cc-Messkölbchen übergeführt. Nach Zusatz eines kleinen Tropfens alkoholischer Phenol-phthaleinlösung wurde mit 2,5% NaOH neutralisiert und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die gut durchgeschüttelte Lösung wurde durch trockne Filter in trockne Kölbchen filtriert. Vom Filtrat kamen je 5 cc zur Glukosebestimmung nach HAGEDORN-JENSEN. Zu Doppelbestimmungen reichte das Material natürlich nicht aus. Zu jeder Analyse gehörte eine Blanco-Bestimmung.

Die Menge von 0,1 g Muskel pro Glykogenanalyse ist recht gering, und man muss sich darüber klar sein, dass dadurch die Fehlerbreite ziemlich hoch wird. Man kann sich eine Vorstellung davon machen, wenn man die auf Tab. I zusammengestellten Versuche näher betrachtet, bei denen beide Zwerchfellhälften in glukosehaltiger Ringerlösung exponiert waren oder wo die eine einen wirkungslosen Zusatz erhalten hatte. Die beiden Hälften sind in der Tabelle mit a und b bezeichnet. Die a-Hälften der insgesamt 28 Versuche ergeben den Mittelwert 591 mg%, die b-Hälften 555 mg%, der Mittelwert aller Proben ist also 573 mg%. Der Mittelwert aller  $\pm$  Abweichungen zwischen je zwei Hälften desselben Versuchs (Spalte 4) beträgt 85 mg%, was bezogen auf 577 mg% ca 15% entspricht. Die Abweichungen schwanken zwischen 0 und 290 mg%.

TABELLE I.

Zwei Zwerchfellhälften (a und b) in Ringer-Glukose. Verwendet sind auch eine Reihe von Versuchen mit unwirksamen Zusätzen. Glykogen hier wie in allen anderen Tabeilen in mg %

Vers. no.	a	b	Abweichung	Glukose %
11	280	350	70	0,5
14	670	750	80	0,5
18	610	530	80	0,5
26	430	360	70	0,2
26	670	650	20	0,2
32	1100	810	290	0,2
33	1070	1070	0	0,2
34	720	750	30	0,2
61	700	840	140	0,25
63	300	500	200	0,25
64	390	380	10	0,25
65	480	330	150	0,25
66	580	630	50	0,25
69	570	530	40	0,25
70	340	350	10	0,25
73	340	300	40	0,5
74	970	1050	80	0,5
75	520	590	70	0,5
76	360	400	40	0,5
77	850	980	130	0,5
78	510	410	100	0,5
79	320	300	20	0,5
89	730	720	10	0,5
97	580	400	180	0,5
101	650	830	180	0,5
102	250	350	100	0,5
107	880	840	40	0,5
118	700	540	160	0,5
Mittel	591	555	85	

Mittel aus allen (56) Bestimmungen 574 mg%  
Mittlere Abweichung 15%.

Die, wie die Tabelle zeigt, in einzelnen Fällen reichlich hohen Differenzen zwischen zwei gleich behandelten Zwerchfellhälften dürfen nicht Wunder nehmen, wenn man berücksichtigt, dass die Löslichkeit des Glykogens in alkoholischer Lauge nicht gleich null ist und dass die in den Einzelversuchen von uns bestimmte Glykogenmenge absolut zwischen 1,5 und 0,3 mg lag. Die unvermeidlichen Fehler einer solchen immerhin etwas rohen Bestimmungsmethode, wie die Glykogenanalyse es ist, müssen bei so geringen Mengen Analysenmaterial relativ stark zur Geltung kommen.

TABELLE II

Beide Zwerchfellhälften in Glukose-Ringer plus Insulin, zusammengestellt aus allen Versuchen, auch denen mit unwirksamen Zusätzen

	Vers. no.	a	b	Abweichung	Insulin Einh.
Gruppe I, mit 0,2—0,25% Glukose	35	1050	790	260	2
	37	1100	960	140	2
	37	710	740	30	2
	39	680	580	100	3
	61	1410	1250	160	3
	63	560	520	40	3
	64	660	510	150	2
	65	640	930	290	2
	66	1160	1390	230	3
	67	720	800	80	1
	68	890	940	50	2
	68	800	810	10	3
	69	560	620	60	3
	70	780	740	40	2
Mittel *		837	827	117	
Gruppe II, mit 0,5% Glukose	90	1250	1500	250	2
	91	740	880	140	2
	92	810	820	10	2,5
	97	940	1180	240	2,5
	99	930	770	160	1,25
	101	1140	910	230	2,5
	101	830	1000	170	2,5
	102	1110	970	140	2,5
	105	870	740	130	2,5
	105	930	840	90	2,5
	108	870	900	30	2
	108	660	630	30	2
	115	1380	1590	210	2
	115	1060	990	70	2
	118	1390	1020	370	2
** Mittel		884	908	151	

\* Mittlere Abweichung 14%.

\*\* Mittlere Abweichung 17%.

Tabelle II enthält eine Reihe von Bestimmungen an Zwerchfellhälften, die ebenfalls unter ganz gleichen Bedingungen, aber bei Zusatz von Insulin, ausgeführt waren und aus denen sich Abweichungen von ganz ähnlicher und in Einzelfällen sogar noch höherer Grösse erkennen lassen. Es handelt sich um insgesamt 29 Versuche mit 58 Bestimmungen, wobei wir von der später in anderem Zusammenhang zu würdigenden Unterteilung in zwei Gruppen absehen. Reihe a) liefert einen Durchschnittswert von 920 mg%. Reihe b) einen solchen von 910 mg%. Der Mittelwert aller Plus-Minus-Abweichungen berechnet sich zu 135 mg% (gegenüber 85 mg% in Tab. I), was, bezogen auf den Gesamt-Mittelwert von 905 mg% ca 15% bedeutet, also ebenso viel wie in Tab. I.

Die Tatsache, dass die mittlere Differenz zwischen den Glykogenwerten von je zwei gleich behandelten Zwerchfellhälften 15% beträgt und in einzelnen Fällen darüber hinaus gehen kann, zeigt, dass aus Einzelversuchen keine Schlüsse gezogen werden können. Es sind daher in dieser Arbeit alle Einzelfragen an jeweils einer ganzen Gruppe von Versuchen geprüft worden, mit Ausnahme einiger Probeversuche. Nur da, wo die Ausschläge stets gleich gerichtet und ausserhalb der mittleren normalen Abweichung lagen, konnten sichere Schlüsse gezogen werden. Dies war allerdings in einer Reihe von Versuchsgruppen der Fall.

#### ERGEBNISSE

i. Zuerst wurde untersucht, ob der praeformierte Glykogengehalt, geprüft durch sofortiges Einbringen einer Zwerchfellhälfte in heisse Kalilauge, in der anderen,  $2\frac{1}{2}$  Stunden in glukosehaltiger Lösung bei 37 Grad gehaltenen Hälfte sich verändert. Dass ohne Sauerstoff unter diesen Verhältnissen ein maximaler Glykogenschwund eintritt, ist bekannt und im Vers. no. 30 der Tabelle III nochmals bestätigt worden. Bei Gegenwart von Sauerstoff ist im Mittel keine Zunahme des Glykogens, also keine Synthese zu beobachten. Immerhin stehen unter 12 Versuchen einer Zahl von 8 Plusdifferenzen nur 4 Minusdifferenzen gegenüber, auch ist die mittlere Abweichung mit 20% etwas höher als normal. Ein Einfluss der Glukosekonzentration lässt sich aber nicht sicher erkennen. Auf die sehr auffallende Tatsache, dass die Sofortwerte zwischen 140 und 1600 mg% liegen, kommen wir später in andrem Zusammenhang zurück.

TABELLE III

Eine Zwerchfellhälfte sofort verarbeitet, die Andere  $2\frac{1}{2}$  Stunden in Glukose-Ringer a) ohne  
b) mit Insulin 4 Einheiten

Vers. no.	Sofort	Glukose allein	Abweichung	Glukose Insulin	Differenz	Glukose Konzentr.
a	9	140	310	+ 170		0,5
	11	320	460	+ 140		0,5
	11	350	470	+ 120		0,5
	22	630	770	+ 140		0,5
	24	870	750	- 120		0,1
	31	380	270	- 110		0,5
	46	370	410	+ 40		0,5
	46	350	230	- 120		0,2
	47	320	340	+ 20		0,5
	47	250	260	+ 10		0,2
b	48	1600	1430	- 170		0,5
	102	250	350	+ 100		0,5
	8	330	—		1040	+ 710
	9	180	—		820	+ 640
	48	1620	—		2250	+ 630
(30*)	(400)	(180)	(- 220)			0,5
Mittel **	530	500	104 (20%)	1370	+ 660	

\* ohne Sauerstoff

\*\* ohne Versuch 30

Tab. III enthält auch noch Versuche, die, obwohl vorgreifend, hier hervorgehoben werden. In diesen Fällen — Versuche 8, 9 und 48 — wurde die zweite Zwerchfellhälfte mit Insulin zusammen exponiert. Hier sehen wir dann eine sehr starke Zunahme der Glykogenbildung.

2. Hält man beide Zwerchfellhälften in Ringerlösung, die eine ohne, die andere mit Glukosezusatz, dann ist eine Zunahme in der glukosehaltigen Lösung gegenüber der glukosefreien wohl unverkennbar (Tab. IV), da die Differenzen, obwohl der Grösse nach kaum über den normalen Schwankungen, doch alle auf der Plusseite liegen und die mittlere Abweichung 38% beträgt (normal 15%). Die in normalen Grössenordnungen sich bewegenden Glykogenwerte der ohne Glukosezusatz exponierten Muskeln deuten darauf hin, dass Sauerstoff allein genügt, um dem Zerfall des Glykogens entgegen zu wirken, wie dies ja aus vielen Arbeiten bekannt ist und auch aus den Versuchen der Tab. III hervorgeht.

3. Die obigen Befunde entsprechen, wenigstens andeutungsweise, denen von GEMMILL, der allerdings in glukosehaltiger Lösung schon mit 0,2%, aber besonders bei Zusatz von 0,5% Glukose stärkere Glykogenbildung fand. Ich selbst kann bei der höheren Glukosekonzentration keine Begünstigung der Glykogenbildung gegenüber der

TABELLE IV.

Eine Zwerchfellhälfte in Ringer ohne Glukose, die Andere mit Glukose

Vers. no.	ohne Glukose	mit 0,5% Glukose	Differenz
5	180	290	+ 110
6	160	420	+ 260
127	770	870	+ 100
127	550	710	+ 160
Mittel	415	572	+ 157 (38%)

TABELLE V

Eine Zwerchfellhälfte in Glukose-Ringer 0,2—0,25%, die Andere in 0,5%

	Vers. no.	0,2(0,25)% Glukose	0,5% Glukose	Abweichung
Gruppe a, ohne Insulin	40	820	820	± 0
	42	280	260	— 20
	56	630	400	— 230
	Mittel	577	493	83 (14%)
Gruppe b, mit Insulin	40	780	1260	+ 480
	42	560	660	+ 100
	56	1200	1700	+ 500
	60	710	1080	+ 370
	Mittel	812	1175	+ 362 (45%)

geringeren finden, wie Tab. Va zeigt. Im Gegensatz dazu stehen Versuche mit Insulinzusatz, die in der gleichen Tabelle unter b) zusammengestellt sind. Bei Gegenwart von Insulin in beiden Proben ist die Synthese in der stärkeren Glukoselösung merklich grösser als in der schwächeren.

TABELLE VI

Eine Zwerchfellhälfte in Ringer-Glukose, die Andere ebenso aber mit Zusatz verschiedener Dosen Insulin

	Vers. no.	Glukose allein	Glukose Insulin	Differenz	Insulin Einh.
Gruppe 1, mit 0,2% Glukose 0,25% Glukose	25	480	600	+ 120	1
	25	410	730	+ 320	2
	27	530	710	+ 180	2
	27	640	650	+ 10	4
	36	420	800	+ 380	2
	38	230	420	+ 190	2
	39	440	550	+ 110	3
	58	270	700	+ 430	2
	59	1030	1410	+ 380	3
	Mittel	495	730	+ 235 (47,5%)	
Gruppe 2, mit 0,5% Glukose	7	670	1100	+ 430	4
	17	490	810	+ 320	4
	18	630	1270	+ 640	4
	19	940	1520	+ 580	4
	20	270	820	+ 550	4
	23	630	770	+ 140	2
	31	380	540	+ 160	4
	44	730	850	+ 120	2
	72	650	1220	+ 570	2
	72	480	800	+ 320	4
	74	640	1070	+ 430	2
	103	760	820	+ 60	4
	106	550	1160	+ 610	3
	116	870	1390	+ 520	2
	117	570	1090	+ 520	2
	120	380	750	+ 370	2
	Mittel	602	999	+ 397 (66%)	

Schon in den bisher dargestellten Versuchsgruppen hatten wir Hinweise darauf gefunden, dass die Begünstigung der Glykogensynthese durch Insulin in unseren Versuchen sehr gut zum Ausdruck kommt \*). Dem speziellen Nachweis dieses Verhaltens

\* Die Insulinlösungen wurden in der Weise bereitet, dass 2 mg des Präparats mit 1 Einheit in 80 gamma in 4 Tropfen n/100 HCl gelöst wurden, worauf mit Ringerlösung auf 2,5 cc verdünnt wurde. 0,1 cc dieser Lösung enthalten also 1 Einheit Insulin. Entsprechend wurde von dem stärkeren, krystallisierten, Insulin mit 1 Einheit in 50 gamma 2 mg in 2,0 cc gelöst. Diese Lösungen wurden kühl aufbewahrt, aber nie länger als 3 Tage, meist sogar nur 2 Tage, sodass immer mit frischen Lösungen gearbeitet wurde.

dienen die in Tab. VI zusammengestellten Versuche, in denen die eine Zwerchfellhälfte mit Glukose-Ringer allein, die andere mit zusätzlich Insulin behandelt wurde. Unter den 25 hier angeführten Versuchen sind 9 mit 0,2 bzw. 0,25% Glukose, 16 mit 0,5% angesetzt, während die Insulindosen meist 2 oder 4 Einheiten betrugen. Bis auf einen zeigen alle diese Versuche beachtliche Zunahmen des Glykogens in der Insulinhaltigen Probe. Sie sind im Mittel absolut und relativ bei der niedrigeren Glukosekonzentration geringer (47%) als bei der höheren (66%).

Berechnet man die Mittelwerte aus sämtlichen Versuchen der Tabelle VI, so steht einem Glykogenwert von 560 mg% ohne Insulinzusatz ein solcher von 900 mg% in den Insulinproben gegenüber. Die Differenz, 340 mg%, entspricht einer Zunahme von 61%. In 16 von diesen 25 Versuchen, wobei diejenigen über 200 mg% zusammen gestellt sind, liegt die Differenz wesentlich höher, nämlich bei 460 mg%, was einer Zunahme von 82% entspricht. Stellt man, wie wir dies zum Schluss aller unserer Versuche getan haben, alle überhaupt gemachten Versuche mit Glukose allein und alle, die außerdem Insulin erhielten, zusammen, auch diejenigen, in denen andere, aber wirkungslose Zusätze gemacht wurden, dann liefern 129 Einzelbestimmungen der ersten Art, also ohne Insulin, einen Mittelwert von 596 mg% denen aus 99 Versuchen mit Insulin ein Mittel von 1213 mg% gegenübersteht. Die Differenz — plus 617 mg% — entspricht einer mittleren Zunahme von 104%.

4. Als wirksame Dosis von Insulin erwies sich in unserer Versuchsanordnung mit Sicherheit die nicht geringe Menge von 2 Einheiten. Die benutzten Präparate enthielten eine Einheit auf 80 bzw 50 Gamma. Zu 10 cc der Suspensionslösung kamen also jeweils mit 2 Einheiten 100-160 Gamma Insulin. Das stärkere der beiden Präparate war krystallisiert. Systematische Versuche über die unterste Grenze der Wirkung, wobei auch die Glukosekonzentration zu berücksichtigen wäre, habe ich noch nicht machen können, doch habe ich den Eindruck, dass man unter 1 Einheit nicht herunter gehen

TABELLE VII

Beide Zwerchfellhälften erhalten Insulin, aber die Zweite doppelt so viel wie die Erste

Vers. no.	Insulindosis 1 (Einheiten)	Glykogen	Dosis 2 (Einheiten)	Glykogen	Glukose %	Abweichung
41	1	350	2	670	0,5	+ 320
41	2	560	4	1070	0,5	+ 510
43	1	940	2	910	0,5	- 30
43	2	1100	4	1100	0,5	± 0
45	1	850	2	680	0,5	- 170
45	2	730	4	600	0,5	- 130
57	2	940	4	780	0,5	- 160
58	2	600	4	810	0,2	+ 210
59	3	2100	6	2520	0,2	+ 420
60	3	840	6	930	0,25	+ 90
95	2,5	1190	5	880	0,5	- 310
95	1,25	850	2,5	1270	0,5	+ 420
Mittel		920		1020		231 (24%)

sollte und dass 2-4 Einheiten angemessen waren. Dosen ähnlicher Größenordnung sind auch von GEMMILL benutzt worden bei einem Gesamtvolume der Suspensionslösung von nur 2 cc. Die Hoffnung, eine lineare Beziehung zwischen Insulinkonzentration und Synthesewirkung, messbar am Glykogengehalt, aufzufinden, erfüllte sich nicht.

Wie Tabelle VII zeigt, erhält man beim Vergleich zweier sonst gleich angesetzter Zwerchfellhälften, von denen die eine doppelt soviel Insulin erhält wie die andere, ganz widersprechende und sehr ungleichartige Resultate. Die Mittelwerte liegen jedenfalls ganz nahe beieinander, die mittlere Abweichung allerdings liegt, als Folge der starken Schwankungen, mit 24% wirklich höher als in den Versuchen der Tab. II.

5. Einer weiteren Analyse der Insulinwirkung dienen die Versuche, die in den Tabellen VIII und IX aufgeführt sind. Die erstgenannte zeigt, dass beim Fehlen von Glukose, aber in Anwesenheit von Sauerstoff, Insulin keine Glykogenvermehrung macht. Sein Angriffspunkt muss also in der ersten Phase des Aufbaues liegen, bei dem vitalen Vorgang der Coriester-Bildung aus Glukose und Phosphat. Das ist ja auch der Grund, warum man in nicht intakten Systemen, z.B. im Muskelbrei, keine Insulinwirkung beobachten kann. Denn hier fehlt ja auch die Fähigkeit der Coriester-Bildung aus Glukose. Andererseits zeigt Tab. IX, wie zu erwarten, dass auch Sauerstoff unentbehrlich ist, dass also Glukose allein nicht genügt. Insulin hemmt nicht einmal den im erstickenden Muskel sich vollziehenden Glykogenzerfall.

TABELLE VIII

Versuche mit beiden Zwerchfellhälften in Ringer ohne Glukose; die eine Hälfte erhält Insulin

Vers. no.	Ringer	Ringer Insulin	Differenz	Einh. Insulin
94	530	460	— 70	2,5
103	410	330	— 80	4

6. Als Antagonisten der Insulinwirkung im Kohlenhydratumsatz gelten die Hormone der Nebenniere. Vom Adrenalin des Marks wissen wir, dass es die Glykogenolyse in der Leber ebenso fördert, wie Insulin sie hemmt. Im Muskel besteht ein ähnlicher Antagonismus, insofern als Adrenalin den Zerfall des Muskelglykogens zu Milchsäure fördert, während Insulin ihn, allerdings nicht sehr ausgesprochen, hemmt. Was die Glykogen-Neogenese aus Eiweiss und Fett in der Leber betrifft, so wird sie durch Insulin eingeschränkt, durch Rindenhormon und durch Adrenalin (vielleicht auf dem Wege über das Rindenhormon) begünstigt. Nur über die Wirkung des Rindenhormons auf den Kohlenhydratstoffwechsel des Muskels besteht noch keine Klarheit. Man könnte meinen, dass dem bekannten Glykogen-aufbauenden Einfluss des Insulins eine diesen Aufbau hemmende Wirkung des Cortins gegenüber stehen müsse. In der Tat hat VERZAR

TABELLE IX

Versuche ohne Sauerstoff aber mit Glukose 0,5%. Eine Hälfte Insulin

Vers. no.	Glukose allein	Glukose Insulin	Differenz	Insulin Einh.
30	160	190	+ 30	4
106	140	140	± 0	3,75

TABELLE X

Eine Zwerchfellhälfte erhält nur Glukose-Ringer, die Andere ausserdem Propandiol 2 : 1, 0,1 cc. Glukosekonzentration 0,2 %

Vers. no.	Glukose allein	Glukose Propandiol	Abweichung
26	430	360	— 70
32	1100	810	— 290
33	1070	1070	± 0
34	720	750	+ 30
Mittel	830	750	98 (12 %)

diese Theorie zu stützen gesucht <sup>3</sup>. Indessen haben sowohl ich selbst <sup>4</sup>, wie SMITS <sup>5</sup> sowie HELVE <sup>6</sup> seine Ergebnisse über die Hemmung der Phosphorolyse im Muskelbrei nebenrienenloser Ratten nicht zu bestätigen vermocht, und überdies glauben wir, dass aus solchen Versuchen überhaupt keine Schlüsse auf das Verhalten der phosphorylierenden Synthese im intakten Muskel gezogen werden können. Dennoch könnte, der Lage der Dinge nach, VERZAR'S Vorstellung richtig sein — nur ist sie bisher nicht bewiesen. Ich habe mich daher in zahlreichen Versuchen bemüht, einen Einfluss des Rindenhormons und insbes. des Desoxycorticosterons auf den Synthesevorgang im isolierten Zwerchfell nachzuweisen.

7. Da das Desoxycorticosteron in 1,2 Propandiol-Wasser 2 : 1 gelöst war, musste zunächst geprüft werden, ob Propandiol allein den Glykogenbestand verändert und ob Insulin bei Gegenwart von Propandiol unverändert wirksam ist. Die angewandte Menge von 0,1 cc der Propandiollösung auf 10 cc Glukose-Ringer entsprach der später verwendeten Menge der Desoxycorticosteronlösung. Tab. X beweist, dass Propandiol an sich nichts ausmacht und Tab. XI, dass Insulin plus Propandiol unverändert wirksam ist. Die Zunahme von 65% bei einer Glukosekonzentration von 0,5% ist als normal zu bezeichnen und entspricht genau der aus Tab. VI, Gruppe 2 errechneten.

8. In der Tab. XII sind die Versuche zusammengestellt, in denen die eine Zwerchfellhälfte nur Propandiollösung, die andere 0,1 bis 0,05 cc einer 1% igen Lösung von Desoxycorticosteron in Propandiol 2 : 1 erhielt. Die Mengen des Sterons, 1 bzw 0,5 mg auf 10 cc Glukose-Ringer, sind also ziemlich gross. Wie man sieht, stimmen die Mittelwerte der Versuche ohne und mit Desoxycorticosteron sehr nahe überein; eine Wirkung

TABELLE XI

Eine Hälfte erhält Glukose-Ringer plus 0,1 cc Propandiol 2 : 1, die Andere dasselbe plus Insulin. Glukosekonzentration 0,5 %

Vers. no.	Glukose Propandiol	Glukose Propandiol Insulin	Differenz	Insulin Einh.
20	270	820	+ 550	4
36	520	800	+ 280	2
44	730	850	+ 120	2
19	940	1520	+ 580	4
Mittel	590	997	+ 407 (65 %)	

TABELLE XII

Eine Zwerchfellhälfte erhält Glukose-Ringer plus Propandiol, die Andere 0,05—0,2 cc einer 1%igen Lösung von Desoxycorticosteron bzw. seines Acetats in Propandiol

Vers. no.	Glukose Propand.	Glukose Desox.cort.	Abweichung	cc der Propand. bzw. Des.cort. lösung	Glukose %
13	380	250	— 130	0,1	0,5
13	440	260	— 180	0,2	0,5
15	280	390	+ 110	0,1	0,5
16	760	680	— 80	0,1	0,5
12	1400	1090	— 310	0,1	0,5
12	1460	1500	+ 40	0,05	0,5
33	1600	1330	— 270	0,1	0,2
34	480	560	+ 80	0,1	0,2
III	460	510	+ 50	0,05 *	0,5
Mittel	807	730	— 139 (17%)		

\* Acetat.

ist nicht zu sehen. Tab. XIII lässt erkennen, dass, wenn die Kontrollhälfte entweder nur Propandiol oder Desoxycorticosteron, die andere Hälfte Desoxycorticosteron plus Insulin erhielt, die durch Insulin bedingte Zunahme, unter Berücksichtigung der Glukosekonzentration, normal ist. Endlich geht aus Tabelle XIV hervor, dass, wenn beide Hälften Insulin erhalten, die eine ausserdem nur Propandiol, die andere dagegen Desoxycorticosteron in Propandiol, im Mittel die gleichen (hohen) Glykogenwerte erhalten werden mit einer mittleren Abweichung von 17%.

TABELLE XIII

Eine Zwerchfellhälfte in Glukose-Ringer plus 0,1 cc Propandiol-Wasser 2 : 1, die Andere mit Glukose-Ringer plus 1% Desoxycorticosteron in Propandiol

	Vers. no.	Glukose Propand.	Glukose Des. cort. Insulin	Differenz	Propand. bzw. Des. cort. cc	Insulin Einh.
Gruppe 1, mit 0,2 % Glukose	36	290	360	+ 70	0,1	2
	38	230	420	+ 190	0,1	2
	39	440	550	+ 110	0,1	3
	Mittel	320	443	+ 123 (39%)		
Gruppe 2 mit 0,5 % Glukose	44	1320	1570	+ 250	0,1	2
	116	870	1390	+ 520	0,05 *	2
	117	570	1090	+ 520	0,05 *	2
	Mittel	920	1350	+ 430 (47%)		

\* Des. acet.

Literatur S. 233.

TABELLE XIV

Eine Zwerchfellhälfte Glukose-Ringer, Propandiol und Insulin, die Andere Glukose-Ringer 1%, Desoxycorticosteron in Propandiol und ebenfalls Insulin

Vers. no.	Glukose Propand. Insulin	Glukose Desoxyc. Insulin	Abwei- chung	Propand. bzw. Des. cort. cc	Einh. Insulin	Glukose %
21	1820	1480	— 340	0,1	2	0,5
21	1340	1240	— 100	0,2	2	0,5
22	900	890	— 10	0,2	2	0,5
32	1350	1070	— 280	0,2	2	0,2
35	670	690	— 20	0,2	2	0,2
116	950	900	— 50	0,05	2	0,5
117	1120	700	— 420	0,05	2	0,5
III	750	1070	— 320	0,05	2	0,5
Mittel	1112	1005	192 (17%)			

Aus alledem ersieht man, dass die aus theoretischen Erwägungen vermutete Hemmung des Glykogenaufbaues bzw. der Insulinwirkung durch Corticosteron durch unsere Versuche keine Stütze erhält.

9. Noch eindeutiger negativ waren die Versuche mit Cortin. Das Praeparat stammte von der Firma Organon. Verwendet wurden verschiedene Dosen, zwischen 0,1 und 2,0 cc. Die Kontrollen erhielten die entsprechende Menge des aus 0,9% NaCl bestehenden Lösungsmittels. Man sieht, dass Cortin weder allein noch in Kombination mit Insulin einen Einfluss auf den Glykogengehalt ausübt, dass es also die Insulinwirkung nicht vermindert.

TABELLE XV

Eine Zwerchfellhälfte in Glukose-Ringer, die Andere dazu Cortin-Gruppe 1. In Gruppe 2 erhalten beide Hälften ausserdem noch Insulin

	Vers. no.	Glukose	Glukose Cortin	Ab- wei- chung	Glukose Insul.	Glukose Insul. Cortin	Ab- wei- chung	Gluk. %	Insul. Einh.	Cort. cc
Gruppe 1	11	280	350	+ 70				0,5	—	1
	14	550	480	— 70				0,5	—	1,0
	14	670	750	+ 80				0,5	—	0,5
	15	430	500	+ 70				0,5	—	2,0
	Mittel	480	520	72 (15%)						
Gruppe 2	22				780	1250	+ 470	0,5	2	1,0
	37				1100	960	— 140	0,2	2	0,1
	37				710	740	+ 30	0,2	2	0,1
	39				680	580	— 100	0,2	3	1,0
	Mittel				818	882	185 (23%)			

10. Ganz anders verliefen die Versuche, die mit einem aus den Nebennieren der verwendeten Ratten hergestellten Frischextrakt angestellt wurden. Zu dem Zweck wurden die frisch entnommenen beiden Nebennieren im Mörser mit jeweils 2 cc Ringerlösung verrieben und die Aufschwemmung entweder direkt oder nach Filtrieren durch Glaswolle oder endlich nach Zentrifugieren verwendet. Nähere Angaben finden sich bei den betr. Tabellen.

Tabelle XVI enthält die Versuche ohne und mit Insulinzusatz. Beim Vergleich zwischen Glukose-Ringer ohne und mit Zusatz von Nebennierenextrakt (Gruppe 1) sieht man, dass unter 5 Versuchen eigentlich nur ein Mal eine starke Senkung des Glykogengehalts unter der Einwirkung des Extrakts eintrat. Im Durchschnitt liegen die Mittelwerte bei 738 mg% ohne und 586 mg% mit Extrakt, sind also im Mittel nur um 21% vermindert. Sehr eindrucksvoll ist aber das Ergebnis in der zweiten Gruppe, wo die eine Zwerchfellhälfte nur Insulin, die andere Insulin plus Extrakt erhielt. In allen Fällen verursachte der Extrakt eine praktisch vollständige Aufhebung der Insulinwirkung. Dem Mittelwert von 1204 mg% Glykogen ohne Extrakt steht der Wert von 572 mg% (—52%) mit Extrakt gegenüber; letzterer ist ein typischer Normalwert.

TABELLE XVI

In der ersten Gruppe erhält eine Zwerchfellhälfte Glukose-Ringer ohne, die Andere dasselbe mit Nebennierenextrakt. In der zweiten Gruppe erhalten beide außerdem Insulin. Extrakt jeweils aus 4 Frischen Nebennieren mit 2 cc Ringer-Lösung verrieben, teils unfiltriert, teils filtriert, oder zentrifugiert. Glukose-Konzentration überall 0,5%, Insulin 2 Einheiten

	Vers.no.	Glukose	Glukose Extrakt.	Differ.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Extrakt	Differ.	Extrakt cc
Gruppe 1	77	850	980	+ 130				0,5
	78	510	410	— 100				0,4
	79	320	300	— 20				0,8
	88	1350	840	— 510				1,0
	96	660	400	— 260				0,6
	Mittel	738	586	— 152 (21%)				
Gruppe 2	77				1240	630	— 610	0,5
	78				1290	440	— 850	0,4
	79				1050	610	— 440	0,8
	80				1120	620	— 500	0,8
	81				1320	560	— 760	1,0
	Mittel				1204	572	— 632 (52%)	

11. Nachdem sich gezeigt hatte, dass Cortin unwirksam war, muss man die starke Wirkung des Extrakts der Nebennieren auf den Markanteil, also auf das Adrenalin zurückführen, obwohl in der intensiv mit Sauerstoff durchströmten Lösung Adrenalin kaum beständig sein sollte. Es wurden zur Klärung der Frage daher Versuche mit reinem Adrenalin angesetzt.

TABELLE XVII

In der ersten Gruppe erhält eine Zwerchfellhälfte Glukose-Ringer, die Andere dasselbe plus Adrenalin. In der zweiten Gruppe erhalten beide Hälften Insulin und die Eine dazu Adrenalin. In einer dritten Gruppe, die sonst wie die Zweite angesetzt ist, wurde die Adrenalin-Ringer-Lösung vor Zusatz des Muskels mit Sauerstoff behandelt (30-40 Minuten). In der Vierten schliesslich stehen Versuche mit verringertem Adrenalinzusatz. Glukose stets 0,5%; Insulin 2 Einh.

	Vers.no.	Glukose	Glukose Adre-nalin	Differ.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Adre-nalin	Differ.	Adre-nalin Gamma
Gruppe 1	86	550	280	— 270				50
	87	680	450	— 230				50
	88	710	460	— 250				50
	85	450	370	— 80				50
	102*	500	270	— 230				75
	Mittel	576	366	— 210 (36%)				
Gruppe 2	80				2070	1600	— 470	100
	81				1090	560	— 530	100
	82				1000	540	— 460	50
	84				980	420	— 560	50
	86				900	460	— 440	50
	87				1020	630	— 390	50
	125				840	500	— 340	50
	Mittel				1130	673	— 457 (40%)	
Gruppe 3, vorher mit $O_2$ behandelt	85				880	750	— 130	50
	125				770	320	— 450	50
	126				850	430	— 420	50
	126				630	280	— 350	50
	128				1300	740	— 560	50
	128				1480	1050	— 430	50
	Mittel				985	595	— 390 (40%)	
Gruppe 4	82				910	740	— 170	20
	84				690	520	— 170	20
	Mittel				800	630	— 170 (21%)	

\* Sofort.

In der Tabelle XVII sind die hierher gehörenden Versuche in mehreren Gruppen zusammengestellt. Gruppe 1 zeigt, dass 50 gamma Adrenalin (gewogen als Base und in HCl mit neutraler Reaktion gelöst) entschiedener als der Gesamtextrakt der Drüse

den Glykogengehalt senkt, als Folge der bekannten fördernden Wirkung auf den Glykogenabbau. Andererseits zeigt Gruppe 2, dass Adrenalin in Dosen von 100-50 Gamma die Insulinwirkung völlig aufhebt.

Zuerst glaubte ich annehmen zu sollen, dass die Gegenwart des Gewebes der Muskeln die Oxydation des Adrenalin verhindert (das Adrenalin war bis dahер nach dem Einbringen der Muskeln versucht worden). Es wurden daher eine Reihe von Versuchen so angesetzt, dass zuerst die adrenalinhaltige Ringer-Glukoselösung 30 bis 40 Minuten lang bei 37 Grad mit Sauerstoff durchströmt und dann erst das Zwerchfell-präparat zugesetzt wurde. Wie man sieht, Gruppe 3, wird dadurch das Ergebnis keineswegs beeinflusst. Die Wirkung des Insulins wurde vielmehr in genau dem gleichen Masse vermindert wie in den Versuchen der Gruppe 2. Es liegt sehr nahe, anzunehmen, dass vielleicht das eigentlich wirksame, dem Insulin antagonistisch wirkende Prinzip nicht das Adrenalin selbst sondern ein Oxydationsprodukt ist, wobei daran erinnert sei, dass z.B. die gerinnungsfördernde Wirkung des Adrenalin beim Zusatz zu Blut nach ROSKAM u. DEROUAUX<sup>7</sup> auf der Bildung von Adrenochrom beruht. Leider machten die Kriegsverhältnisse durch Stilllegung der Laboratoriumsarbeit eine Prüfung dieser unbedingt recht interessanten Frage unmöglich. — Gruppe 4 der Tabelle XVII weist darauf hin, dass mit 50 gamma Adrenalin etwa die Grenze dessen erreicht ist, womit 2 Einheiten Insulin unwirksam gemacht werden können. Denn mit 20 Gamma war keine völlige Aufhebung, sondern nur noch eine Abschwächung der Wirkung möglich (Versuche 82 u. 84).

12. Die Aufhebung der Insulinwirkung durch Adrenalin (bzw. sein Oxydationsprodukt) könnte entweder dadurch zustande kommen, dass der durch Adrenalin bedingte gesteigerte Glykogenzerfall die aufbauende Wirkung des Insulins überkompeniert, oder dadurch, dass auf irgend eine Weise das Insulin durch Adrenalin unwirksam gemacht wird. Die erste Alternative will uns nicht gerade wahrscheinlich vorkommen,

TABELLE XVIII

Alle Versuche ohne Glukose. In der ersten Gruppe erhält eine Zwerchfellhälfte nur Ringer-Lösung, die Andere dazu Adrenalin. In der zweiten Gruppe bekommen beide Insulin und die Eine dazu Adrenalin. Insulindosis stets 4 Einh.

	Vers.no.	Ringer	Ringer Adrenal.	Differ.	Ringer Adrenal.	Ringer Adrenal. Insulin	Differ.	Adrenal. Gamma
Gruppe 1	121	940	700	— 240				50
	122	650	460	— 190				50
	123	950	670	— 280				100
	124	390	320	— 70				50
	Mittel	732	538	— 194 (27%)				
Gruppe 2	121				360	640	+ 280	50
	122				410	720	+ 310	50
	123				450	600	+ 150	100
	124				340	350	+ 10	50
	Mittel				390	578	+ 188 (48%)	

wenn man aus den Ziffern der Tabelle XVII Gruppe 1 sowie Tab. XVIII ersieht, dass die Glykogen-spaltende Wirkung des Adrenalins viel zu gering ist, um die Aufhebung der Insulinwirkung, wie sie sich in den Versuchen der Gruppe 2 derselben Tabelle offenbart, zu erklären. Milchsäureanalysen wären geeignet, diese Fragen weiter zu klären; leider bot sich uns dazu bisher noch keine Möglichkeit.

Im Zusammenhang solcher Überlegungen schien es uns interessant, zu prüfen, ob sich, entsprechend dem Antagonismus des Adrenalins gegenüber dem Insulin auch umgekehrt eine Hemmung des durch Adrenalin bedingten Glykogenabbaues durch Insulin nachweisen lässt. Diese Frage war aus leicht ersichtlichen Gründen nur in Versuchen zu beantworten, in denen keine Glukose anwesend war, eine Anordnung, von der wir wissen (Tab. VIII), dass sie eine Glykogenzunahme nicht in Erscheinung treten lässt. In Tab. XVIII sind Versuche zusammengestellt, in denen entweder die eine Zwerchfellhälfte Adrenalin, die andere keines erhält, oder wo beide Hälften Adrenalin, die eine ausserdem noch Insulin bekommt. Wir sehen, dass im ersten Fall, erwartungsgemäss, eine, wenn auch nicht erhebliche, so doch regelmässige Minderung des Glykogengehalts unter der Einwirkung von Adrenalin vorhanden ist. Im zweiten Fall, wo also beide Hälften unter der glykogenmindernden Wirkung des Adrenalins stehen, hat in 3 von 4 Versuchen das Insulin dieser Minderung entgegengewirkt, sodass der Glykogenwert höher liegt als in der Kontrolle mit Adrenalin allein. Daraus wird man schliessen können, dass die an sich geringe glykogenmindernde Wirkung des Adrenalins in unseren Versuchen durch Insulin gehemmt, wenn nicht aufgehoben wird.

Anhangsweise wurde auch das Benzedrin, als Vertreter der dem Adrenalin verwandten Stoffe in unserer Versuchsanordnung geprüft. Aus den beiden in Tab. XIX aufgeführten Versuchen sieht man, dass diese Substanz völlig unwirksam ist. In diesem Fall ist allerdings auch nicht mit der Bildung wirksamer Oxydationsprodukte zu rechnen.

#### TABELLE XIX

Beide Zwerchfellhälften erhalten Insulin, die Eine ausserdem Benzedrinsulfat. Glukose 0,5 %

Vers.no.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Benzedrin	Differenz	Insulin Einh.	Benzedrin sulf. mg
91	1280	1390	+	110	0,2
92	600	730	+	130	0,5

Als Hormone, die den Kohlenhydratumsatz beeinflussen, haben wir noch Thyroxin bzw. Schilddrüsenextrakt sowie Hypophysenvorderlappenextrakt an unserem Versuchsstoff geprüft. Ueber die Dosierung sowie die Art der Herstellung der Extrakte ist das Nötige bei den Tabellen angegeben.

13. Tab. XX gibt die Ergebnissen wieder, die bei Verwendung vor Thyroxin sowie eines Extrakt aus frischen Ratten-Schilddrüsen gewonnen wurden. Sowohl ohne wie mit gleichzeitigem Insulinzusatz besteht eine gewisse Tendenz zur Erhöhung der Glykogenwerte unter Thyroxin insofern, als von insgesamt 10 Versuchen 7 Plusdifferenzen aufweisen und nur drei Minusdifferenzen. Auch sind die mittleren Abwei-

TABELLE XX

Eine Zwerchfellhälfte erhalt nur Glukose-Ringer, die Andere ausserdem Thyroxin. In der zweiten Gruppe erhalten ausserdem beide Hälften noch 2 Einheiten Insulin. Glukosekonzentration 0,5 %

	Vers.no.	Glukose	Glukose Thyrox.	Ab- weichung	Glukose Insulin	Glukose Insulin Thyrox.	Ab- weichung	Thyrox. mg
Gruppe 1	109	380	620	+ 240				0,1
	110	830	720	- 110				0,3
	113	700	1080	+ 380				Extrakt*
		Mittel	637	807	243 (38%)			
Gruppe 2	109				610	700	+ 90	0,1
	110				1620	2220	+ 600	0,3
	112				1580	1410	- 170	0,2
	112				1550	1860	+ 310	0,3
	114				1150	1020	- 130	0,3
	114				1030	1250	+ 220	0,5
	113				850	1120	+ 270	Extrakt*
	Mittel				1200	1370	256 (21%)	

\* Extrakt von 10 frischen Rattenschilddrüsen in 3 cc Ringer; davon 0,9 cc zum Versuch.

chungen mit 38 bzw. 21% ziemlich gross. Die Mittelwerte liegen aber doch nicht weit genug von einander ab, um eine die Glykogen-Bildung begünstigende Wirkung des Thyroxins sicher zu stellen oder eine Begünstigung der Insulinwirkung bestimmt behaupten zu dürfen. Variation der Dosen von 0,1 bis 0,5 mg gab keine besonderen Anhaltspunkte.

14. Die in Tab. XXI zusammengestellten, mit Extrakten aus Hypophysen bzw. aus Vorderlappen angestellten Versuche haben, wie man sieht, ebenfalls kein klares Resultat gehabt. Versuche 89 und 90, mit frischen Extrakten von Rattenhypophysen gemacht, sind durch die einander direkt widersprechenden an sich erheblichen Differenzen ganz unklar. Die übrigen, zum Teil mit hoch konzentrierten Vorderlappen-Extrakten aus Rinderhypophysen angestellten Versuche hatten negatives Ergebnis, und das gleiche gilt für den Versuch 108 bei Verwendung eines Hinterlappenextrakts vom Rind. Eine kontrainsuläre Wirkung ist also bei den Hypophysenversuchen nicht in Erscheinung getreten. Wenn es zutrifft, was auf Grund vieler Arbeiten anzunehmen ist, dass die kontrainsuläre Wirkung des Hypophysenvorderlappenextrakts auf dem adrenotropen Hormon beruht und die Folge einer vermehrten Nebennierenfunktion ist, dann wäre allerdings in unserer Versuchsanordnung auch eine Wirkung nicht zu erwarten.

15. Einer Prüfung wert erschien uns die Frage, ob etwa Acetylcholin die Glykogenbildung bzw. die Insulinwirkung beeinflusst und ob es vielleicht die Insulin-hemmende Wirkung des Adrenalin aufhebt oder abschwächt. Tab. XXII lässt erkennen, dass die

## TABELLE XXI

Eine Zwerchfellhälfte kommt in Glukose-Ringer plus Insulin, die Andere erhält außerdem noch Hypophysenextrakt.

Extrakt aus Rattenhypophysen; 2 Hypophysen in 1 cc Ringer verrieben. Extrakt aus Ringerhypophysen (Vorder- bzw. Hinterlappen); mit Ringer im Verhältnis 3 cc auf 1 g verrieben, zentrifugiert

Vers.no.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Extrakt	Abweichung	Extrakt	Insulin Einh.
89	1340	720	— 620	Ratte	2
90	850	1340	— 490	„	2
91	740	880	— 140	„	2
92	810	820	— 10	„	2
108	660	630	— 30	Rind 0,1 cc	2,5
100	1140	910	— 230	„ 0,15	2,5
100	830	1000	— 170	„ 0,15	2,5
Mittel	910	900			
108	870	900	— 30	Rind Hinterlappen	2,5

Antwort auf diese Fragen negativ ausfiel. Weder ohne noch mit Insulin zeigt sich eine Wirkung des Acetylcholins in den angewandten nicht geringen Dosen, und die Aufhebung der Insulinwirkung durch Adrenalin liess sich durch Acetylcholin nicht hemmen.

16. Schliesslich haben wir noch die für den Kohlenhydratstoffwechsel belangreichen Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und C im Zwerchfellversuch geprüft. Alle 3 standen in reiner Form zur Verfügung. Die angewandten Dosen gehen aus den Tabellen hervor (no. XXIII, XXIV und XXV), die hier ohne weiteren Kommentar zusammengestellt sind und aus denen nur zu ersehen ist, dass entgegen unserer Erwartung die Glykogenbildung, sowohl beim Fehlen wie bei Gegenwart von Insulin durch diese Vitamine keine Veränderung erfuhr. (Die relativ hohe mittlere Abweichung in der ersten Gruppe der Tab. XXIII (Vit. B<sub>1</sub>) ist wohl durch die zu kleine Versuchszahl bedingt). Die Frage, ob vielleicht bei Kombination mehrerer Vitamine eher Resultate zu erwarten sind, konnte ich nicht mehr prüfen.

## TABELLE XXII

Eine Zwerchfellhälfte erhält nur Glukose-Ringer, die Andere dasselbe mit Acetylcholin. In der zweiten Serie erhalten beide Insulin, die Eine dazu Acetylcholin und in einem Fall außerdem Adrenalin

Vers.no.	Glukose	Glukose Acet.chol.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Acet.chol.	Acet.chol. mg	Insulin Einh.
97	580	400	—	—	2 × 0,1	
97	—	—	940	1180	2 × 0,1	2,5
99	—	—	930	770	2 × 0,2	1,25
99	—	—	1140	470 *	2 × 0,2	1,25

\* plus 50 gamma Adrenalin.

TABELLE XXIII

Eine Zwerchfellhälfte erhält nur Glukose-Ringer, die Andere ausserdem Vitamin B<sub>1</sub> als reine Substanz. In der zweiten Gruppe ebenso, aber beide ausserdem Insulin. Glukosekonzentration 0,5%, Insulin 2 Einh.

	Vers.no.	Glukose	Glukose Vit. B <sub>1</sub>	Ab- weichung	Glukose Insulin	Glukose Vit. B <sub>1</sub> Insulin	Ab- weichung
Gruppe 1	61	700	840	+ 140			
	63	300	500	+ 200			
	63	390	380	- 10			
	Mittel	463	573	183 (40 %)			
Gruppe 2	61				1410	1260	- 150
	63				560	520	- 40
	64				660	510	- 150
	Mittel				877	763	- 114 (13 %)

TABELLE XXIV

Eine Zwerchfellhälfte erhält Glukose-Ringer, die Andere dasselbe plus Lakto-flavin. In der zweiten Gruppe erhalten beide Hälften ausserdem Insulin

	Vers. no.	Glukose	Glukose Laktofl.	Ab- weichung	Glukose Insulin	Glukose Insulin Laktofl.	Ab- weichung	Lakto. flav. mg	Insul. Einh.	Glukose %
Gruppe 1	65	480	330	- 150				0,25		0,2
	66	580	630	+ 50				0,1		0,2
	69	570	530	- 40				0,1		0,2
	70	340	350	+ 10				0,2		0,2
	Mittel	492	460	62 (13 %)						
Gruppe 2	65				640	930	+ 290	0,25	2	0,2
	66				1160	1390	+ 230	0,1	3	0,2
	67				720	800	+ 80	0,1	1	0,2
	68				890	940	+ 50	0,1	2	0,2
	68				800	810	+ 10	0,1	3	0,2
	69				560	620	+ 60	0,1	3	0,2
	70				780	740	- 40	0,2	2	0,5
	115				1060	990	- 70	0,2	1	0,5
	115				1380	1590	+ 210	0,2	2	0,5
	Mittel				888	980	115 (14 %)			

TABELLE XXV

Eine Zwerchfellhälfte in Glukose-Ringer, die Andere ebenso plus Ascorbinsäure. In der zweiten Abteilung erhalten beide Hälften ausserdem Insulin. Glukose-konzentration 0,5 %

Vers.no.	Glukose	Glukose Ascorb.	Ab- weichung	Glukose Insulin	Glukose Insulin Ascorb.	Ab- weichung	Ascorb. mg	Insul. Einh.
101	650	830	+ 180				3	
108	700	540	- 160				1	
101				1110	970	- 140	3	2,5
118				1390	1020	- 370	1	2,0

17. Ferner seien in Tab. XXVI einige Einzelversuche zusammengestellt, die lediglich als Orientierungsproben zu werten sind. Sie zeigen, dass NaF die Glykogenbildung, auch bei Gegenwart von Insulin, hemmt, dass Zinkacetat, allerdings in recht hoher Dosis (20 mg%) die Insulinwirkung aufhebt, ohne doch die normale Glykogenbildung in Glukose-Ringer zu beeinflussen (Schwermetallwirkung?), dass acetessigsaurer Natrium in Dosen von 5 und 10 mg die Insulinwirkung nicht beeinflusst und dass auch 1 mg Coffein, entgegen der Erwartung, keinen Einfluss ausübt. Ich bemerke ausdrücklich, dass diese Einzelversuche zu allgemeinen Schlüssen keine Berechtigung geben.

TABELLE XXVI  
Verschiedene Einzelversuche. Glukose 0,5 %

Vers.no.	Glukose	Glukose mit Zus.	Glukose Insulin	Glukose Insulin mit Zus.	Zusatz	Insulin Einh.
54	620	330			0,13 cc N-NaF	
54			940	520	0,13 cc N-NaF	4
73	340	300			2 mg Zinkacet.	
73			1040	450	2 mg Zinkacet.	2
98	440	700			2 mg Zinkacetat	
98			630	390	2 mg Zinkacetat	1,25
105			870	740	5 mg Na-Acetacetat	2,5
105			930	840	10 mg Na-Acetacetat	2,5
107	880	840			1 mg Coffein	
107			1650	1230	1 mg Coffein	2

18. Ein sehr interessanter Befund wurde, leider ganz zuletzt und unmittelbar vor Aufhören der Arbeitsmöglichkeit, gemacht. Es handelt sich um Versuche an den Zwerchfellen nebennierenloser, adynamer Ratten, die am 4ten bzw. 5ten Tage post operationem zum Versuch kamen. Tab. XXVII lehrt, dass in den 3 Versuchen die an sich, wie bekannt, sehr niedrigen Glykogenwerte solcher Muskeln durch Insulin zwei Mal ganz unbeeinflusst blieben. Im dritten Versuch (129 b) war eine Wirkung allerdings unverkennbar, wenn auch der absolute Wert immer noch bemerkenswert klein ist. Jedenfalls bekommt man den Eindruck, als ob bei diesen Tieren Insulin wenig wirksam

TABELLE XXVII

Nebennierenlose Ratten. Eine Zwerchfellhälfte erhält Ringer-Glukose, die Andere dasselbe mit 2 Einheiten Insulin. Glukose 0,5%

Vers.no.	Glukose	Glukose Insulin	Differenz
129	330	440	+ 110
129	330	620	+ 290
130	460	500	+ 40

sei, wobei dann noch das jeweilige Stadium der Folgen der Nebennierenentfernung eine Rolle spielen mag. Es bedarf keines Hinweises, wie wichtig es wäre, diese Versuche auszudehnen und insbes. durch solche zu ergänzen, in denen Cortin bzw. Desoxycorticosteron zugesetzt wird. Wir hoffen, dass wir selbst oder vielleicht ein anderer Untersucher, hierdurch angeregt, diese Proben ausführen wird. Gerade im Hinblick auf die oben zitierten Vorstellungen von VERZAR, die durch dessen eigne Versuche sowie durch unsere Nachprüfung der seinigen sich nicht stützen lassten, wären Experimente der von uns vorgeschlagenen Art von entschiedener Bedeutung.

19. Anhangsweise sei auf eine Beobachtung hingewiesen, die vielleicht in Beziehung steht mit früheren Befunden von mir und meinen Mitarbeitern<sup>7</sup>. Es fällt an und für sich sehr auf, dass die Glykogenwerte, so insbes. die Sofortwerte und ebenso die ohne andere Zusätze ausser Glukose bei 37 Grad gehaltenen, ausserordentlich variieren. Sie liegen zwischen ca 130 und 1600 mg%. Dabei ist aber das eigentlich Bemerkenswerte die Tatsache, dass die Zwerchfelle von zwei gleichzeitig untersuchten Tieren fast durchweg Glykogengehalte gleicher Größenordnung haben. Die Ziffern sind also bei beiden Tieren jeweils niedrig oder bei beiden mittelgross oder bei beiden hoch. Die Höhe der Werte wechselt also mit dem Tag bzw. dem Zeitpunkt der Untersuchung, nicht aber mit dem Individuum (Beispiele Tab. XXVIII). Wir hatten uns früher in einer Reihe von Arbeiten mit einem ganz ähnlichen Phänomen beim Gehalt der Muskeln an anorganischem (direkt bestimmbarer) Phosphat eingehend beschäftigt und uns unter den verschiedensten Verhältnissen und unter Heranziehung aller meteorologischen Daten bemüht<sup>8</sup>, zwischen Wetter und Muskelchemismus Beziehungen aufzufinden. Wie so

TABELLE XXVIII

Beispiele für die gleiche Größenordnung der Glykogenwerte bei zwei gleichzeitig untersuchten Tieren a und b

Datum	a	b	Bemerkung
15.11.43	320	350	Sofort bestimmt in Glukose
24.11.43	1400	1460	" "
29.11.43	380	250	" "
15.1.44	530	640	" "
10.1.44	480	410	" "
2.3.44	370	350	Sofort bestimmt
3.3.44	320	250	" "
8.3.44	1600	1620	" "
1.9.44	770	550	" in Ringer

viele andere Untersucher auf diesem Gebiet mussten auch wir zum Schluss resignieren, ohne Sicherheit zu erlangen. Jedenfalls ist es interessant, dass auch der Glykogengehalt ähnliche, offenbar durch äussere Faktoren irgendwelcher Natur verursachte gleichgerichtete Schwankungen bei gleichzeitig untersuchten Tieren aufweist.

### ZUSAMMENFASSUNG UND BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Entsprechend schon bekannten Tatsachen finden auch wir, dass, im Versuch am isolierten Zwerchfellmuskel der Ratte, der bei Sauerstoffabwesenheit sich vollziehende rapide Abbau des Glykogens bei Zufuhr von Sauerstoff völlig gehemmt wird. Ist außerdem Glukose in der Nährflüssigkeit zugegen, so steigt der Glykogengehalt, wenn auch nur in geringem Masse, während der Exposition in Sauerstoff-durchströmter Ring-erlösung an. Diese Zunahme wird, wie schon GEMMILL zeigte, durch Insulin sehr stark begünstigt. Der periphere Angriff des Insulins am Kohlenhydratstoffwechsel des Muskels lässt sich auf diese Weise eindeutig darstellen. Als eigentlichen Angriffspunkt dieser Wirkung muss man die Bildung des Glukose-1-Phosphats (Coriesters) aus Glukose und Phosphat betrachten, als desjenigen Vorgangs, der obligat sauerstoff- und struktur-abhängig ist. Wie zu erwarten, fehlt jede Zunahme des Glykogens, wenn man Insulin ohne Glukosezusatz einwirken lässt und natürlich erst recht, wenn zwar Glukose aber kein Sauerstoff gegenwärtig ist. Im Übrigen ist die Grösse der durch Insulin bewirkten Glykogensynthese innerhalb gewisser Grenzen von der Glukosekonzentration abhängig. Dagegen konnte im Rahmen der hier verwendeten Insulindosen zwischen 1 und 6 Einheiten pro Zwerchfellhälfte von ca. 0,1 g Gewicht keine Beziehung zwischen Insulin-konzentration und Grösse der synthetischen Wirkung sichergestellt werden.

Die Wirkung des Insulins auf die Synthese des Glykogens aus Glukose wurde durch Nebennierenextrakt und ebenso durch Adrenalin in Dosen von 100—50 gamma vollkommen aufgehoben, während sowohl Desoxycorticosteron als auch ein Rindenextrakt (Cortin-Organon) keine Wirkung erkennen liessen. Dieser Befund ist deshalb interessant, weil er uns zeigt, dass der Antagonismus des Adrenalins im Kohlenhydratstoffwechsel gegenüber dem Insulin nicht nur die Glykogenolyse in der Leber betrifft, sondern ebenso stark auch die Glykogensynthese im Muskel. Die starke Begünstigung des Uebergangs von Blutglukose in Muskelglykogen durch Insulin ist ja neben und mit der Hemmung der Glykogenolyse in der Leber Ursache der Insulin-Hypoglykaemie. Adrenalin hebt beide Wirkungen auf. Umgekehrt muss die Ursache der Adrenalinhyperglykaemie nicht nur, wie man es bisher wohl ausschliesslich tat, in der verstärkten Zuckerausschüttung aus der Leber, sondern ebenso in der durch das Adrenalin bedingten Hemmung des Übergangs von Blutglukose in Muskelglykogen gesehen werden. Dass ein Antagonismus besteht, dass also auch die den Glykogenabbau im Muskel fördernde Wirkung des Adrenalins durch Insulin gehemmt wird, konnten wir ebenfalls zeigen. Das Fehlen einer Benzedrin-wirkung gegenüber dem Insulineffekt beweist erneut, dass dieses, ebenso wie andere Verwandte des Adrenalins, im Kohlenhydratstoffwechsel unwirksam ist.

Aus der Tatsache, dass die Adrenalinwirkung trotz Gegenwart von reichlich Sauerstoff und unvermindert auch dann zustande kommt, wenn man die adrenalinhaltige Ringer-Glukoselösung vor Einbringen des Muskels 30-40 Minuten bei 37 Grad mit Sauerstoff behandelt, lässt sich vermuten, dass das dem Insulin entgegen wirkende Prinzip nicht Adrenalin selbst, sondern ein Oxydationsprodukt davon ist. Diese für das Gesamtproblem der Wirkung des Adrenalins auf den Kohlenhydratstoffwechsel sehr wichtige Frage bedarf dringend weiteren Studiums.

Acetylcholin erwies sich als wirkungslos, vermochte auch die Insulin-hemmende Wirkung des Adrenalins nicht abzuschwächen.

Die mit Thyroxin angestellten Versuche deuten, wenn auch nicht sicher, eine Verstärkung der Glykogensynthese an, insbes. auch der durch Insulin gesteigerten. Dagegen hat sich keine Wirkung von Hypophysen- oder Hypophysen-Vorderlappen-Extrakt feststellen lassen, weder im Versuch ohne noch im Versuch mit gleichzeitigem Insulinzusatz. Ebenso wenig gelang in unserer Versuchsanordnung der Nachweis einer Wirkung der für den Kohlenhydratstoffwechsel wichtigen Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und C.

Unter den vereinzelten Probeversuchen mit verschiedenen sonstigen Substanzen interessiert die Synthesehemmung durch NaF, sowie die Aufhebung der Insulinwirkung durch Zusatz eines Metallsalzes (Zinkacetat).

Keinerlei Wirkung ergab sich in Versuchen mit Zusatz von acetessigsaurem Natrium.

Einige wenige Versuche, die mit dem Zwerchfell nebnierenloser Ratten ange- setzt wurden, deuten auf die Möglichkeit hin, dass bei diesen Tieren die Insulinwirkung auf die Glykogensynthese gehemmt ist. Auch diese interessante Frage bedarf weiterer eingehender Untersuchung. Die grosse Zahl der Versuche gab schliesslich Gelegenheit zu der Beobachtung, dass, aehnlich wie es früher schon für den Phosphatgehalt der Muskeln gezeigt wurde, auch der Glykogengehalt der Muskeln mit dem Tag bzw. dem Zeitpunkt der Untersuchung sehr stark wechselt, aber bei gleichzeitig untersuchten Tieren, unabhängig vom Individuum, in annähernd gleicher Höhe liegt.

### RÉSUMÉ ET DISCUSSION DES RÉSULTATS

Conformément aux faits déjà connus, nous constatons, que dans des essais faits sur le muscle du diaphragme isolé du rat, la décomposition rapide du glycogène qui se produit eu l'absence d'oxygène se trouve complètement inhibée en présence de l'oxygène. En outre, si le liquide nutritif contient du glucose, la teneur en glucose croît, ne serait ce que dans une faible mesure, pendant l'exposition dans la solution de Ringer traversée par un courant d'oxygène. Cette augmentation de glucose est très fortement favorisée par l'insuline, comme l'a déjà montré GEMMILL. L'attaque périphérique du métabolisme de l'hydrate de carbone du muscle par l'insuline peut être observée nettement de cette façon. La formation de glucose-1-phosphate (éther-sel de CORI) à partir du glucose et du phosphate doit être considérée comme le point d'attaque proprement dit de cette action en tant que processus dépendant nécessairement de l'oxygène et de la structure. Comme on pouvait s'y attendre, il ne se produit aucune augmentation de glycogène quand on fait agir l'insuline sans addition de glucose et, à plus forte raison, en présence du glucose, mais en l'absence d'oxygène. Du reste, la quantité de glycogène résultant de la synthèse par l'insuline dépend dans certaines limites de la concentration du glucose. Par contre, aucune relation entre la concentration d'insuline et la grandeur de la synthèse n'a pu être établie avec certitude dans le cadre des doses d'insuline employées ici entre 1 et 6 unités par semi-diaphragme du poids de 0.1 g environ.

L'effet de l'insuline sur la synthèse du glycogène à partir du glucose a été complètement annihilé par l'extrait de glande surrénale ainsi que par l'adrénaline à doses de 100-50 gammas, tandis que le Désoxycorticostéron, de même qu'un extrait de la partie corticale (cortine „Organon“) n'ont produit aucun effet visible. Ce résultat est intéressant en ce sens qu'il nous montre que l'antagonisme existant entre l'adrénaline et l'insuline dans le métabolisme de l'hydrate de carbone concerne non seulement la glycogénolyse dans le foie, mais aussi et dans la même mesure la synthèse du glycogène dans le muscle.

La forte activation de la transformation du glucose du sang en glycogène du muscle par l'insuline est, de concert et concomitamment avec l'inhibition de la glycogénolyse dans le foie, cause de l'hypoglycémie de l'insuline. L'adrénaline supprime ces deux effets. Inversement, la cause de l'hyperglycémie de l'adrénaline ne doit plus être vue seulement, comme on le faisait exclusivement jusqu'à présent, dans le déversement plus intense du sucre sans le foie, mais aussi dans l'inhibition de la transformation du glucose du sang en glycogène du muscle causée par l'adrénaline. Nous avons également pu constater l'existence d'un antagonisme et, par conséquent, une inhibition par l'insuline de l'action activatrice sur la décomposition du glycogène dans le muscle. L'absence d'une action de la benzédrine contrecarrant l'effet de l'insuline prouve de nouveau que la benzédrine, de même que d'autres substances apparentées à l'adrénaline, est inactive dans le métabolisme de l'hydrate de carbone.

Du fait que malgré la présence d'une abondante quantité d'oxygène l'adrénaline produit également son effet au même degré quand on traite par l'oxygène pendant 30 à 40 minutes à 37° la solution du glucose Ringer contenant de l'adrénaline avant d'y introduire le muscle, on peut présumer que le principe contrecarrant l'effet de l'insuline est non pas l'adrénaline elle-même, mais un produit d'oxydation de cette dernière. Ce point

très important pour tout le problème de l'effet de l'adrénaline sur le métabolisme de l'hydrate de carbone exige une étude ultérieure.

L'acétylcholine s'est avéré inactive et n'a pas pu non plus affaiblir l'action inhibitrice de l'adrénaline vis à vis de l'insuline.

Les essais faits avec la thyroxine indiquent un renforcement de la synthèse du glycogène et, en particulier, de la synthèse du glycogène activé par l'insuline. Par contre, aucune action de l'extrait d'hypophyse ou du lobe antérieur de l'hypophyse n'a pu être constatée, pas plus dans l'épreuve sans addition d'insuline que dans l'épreuve avec addition de la même substance. Nous n'avons pas non plus réussi à prouver dans notre épreuve l'action importante de la vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et C pour le métabolisme de l'hydrate de carbone.

Parmi les diverses épreuves faites avec diverses autres substances, l'inhibition de la synthèse par le NaF, ainsi que la suppression de l'effet de l'insuline par l'addition d'un sel métallique (acétate de zinc) nous intéresse.

Aucun effet n'a été constaté dans les essais faits avec addition d'acétylacétate de sodium.

Quelques rares essais faits avec le diaphragme de rat sans glandes surrénales indiquent qu'il est possible que chez ces animaux l'effet de l'insuline sur la synthèse du glycogène soit inhibée. Ce point intéressant exige lui aussi de nouveaux essais très précis.

Enfin, la multiplicité des essais a permis également d'observer que, de même qu'on l'a déjà montré autrement pour la teneur des muscles en phosphate, la teneur en glycogène des muscles varie très fortement avec le jour ou le moment de l'épreuve, mais que pour des sujets étudiés simultanément, elle est approximativement la même, quel que soit l'individu considéré.

#### SUMMARY AND DISCUSSION OF RESULTS

In accordance with already known facts we find that, in experiments with the isolated diaphragm muscle of the rat, the rapid decrease in the glycogen content takes place in the absence of oxygen is completely checked when the supply of oxygen is renewed. When, moreover, the nutritive liquid also contains glucose, the glycogen content increases, if only slightly, during exposure in Ringer's solution through which oxygen passes. This increase is furthered considerably — as GEMMILL has already shown — by insulin. The peripheral effect of insulin on the carbohydrate metabolism of the muscle is thereby clearly demonstrated. The formation of glucose phosphate (Cori ester) from glucose and phosphate should be regarded as the actual point of attack of this action, i.e. as the starting point of a process necessarily dependent upon oxygen and structure. As might be expected, there is no increase of glycogen whatever when insulin is applied without supplying glucose, and of course still less when glucose, but no oxygen, is present. Moreover, the extent of the glycogen synthesis effected by insulin depends within certain limits upon the degree of concentration of the glucose. On the other hand, no relation could be established, within the limits of the insulin doses applied in this case — between 1 and 6 units per half-diaphragm of about 0.1 g in weight — between the concentration of the insulin and the extent of the synthetic effect.

The effect of insulin on the synthesis of glycogen from glucose was completely nullified by an extract of the adrenal gland, and also by adrenalin, in doses of 100-50 gamma, whereas both desoxycorticosterone and an extract of the cortex (Cortin-organon) proved to have no effect. This fact is particularly interesting because it shows that the antagonism of adrenalin in the carbohydrate metabolism toward insulin exists not only in the case of the glycogenolysis in the liver, but also, and just as strongly, in the case of glycogen synthesis in the muscle. Apart from, and in addition to, the glycogenolysis in the liver, it is the strong stimulus given by insulin to the conversion of blood glucose into muscular glycogen which is the cause of the insulin hypoglycaemia. Adrenalin puts a check on both these actions. Conversely, the cause of adrenalin hyperglycaemia should not — as has been done almost exclusively up to the present — be sought merely in the increase in the secretion of sugar from the liver, but also in the check exercised by adrenalin on the conversion of blood glucose into muscle glycogen. We have been able to show also that

there exists an antagonism, i.e., that the effect of adrenalin in furthering the decrease in glycogen content in the muscle is checked by insulin. The absence of any benzedrine effect as compared with the insulin effect proves once more that benzedrine, as well as other substances akin to adrenalin, are ineffective in the carbohydrate metabolism.

From the fact that, notwithstanding the presence of sufficient oxygen, the effect of adrenalin is in no way lessened, providing the Ringer's glucose solution containing adrenalin is treated with oxygen at a temperature of 37° C before introducing the muscle, it may be suspected that the substance working in opposition to insulin is not adrenalin itself, but a derivative of it produced by oxidation. This question, which is important in relation to the whole problem of the action of adrenalin upon the carbohydrate metabolism, urgently needs further study.

Acetylcholine proves ineffective; neither did it weaken the action of adrenalin in checking the effect of insulin.

Experiments with thyroxin appear to indicate — though not quite definitely — an increase in the glycogen synthesis, notably also when the latter has been intensified by insulin. On the other hand, no action could be demonstrated by extracts of either hypophysis or pituitary anterior lobe, either with or without the simultaneous addition of insulin. Neither did we succeed, in our series of experiments, in proving the existence of any action on the part of Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and C, which are important for carbohydrate metabolism.

Among the single experiments made with various substances, checking of the synthesis by NaF, and nullification of the action of insulin by the addition of a metallic salt (zinc acetate) are interesting.

No effect was obtained in experiments with the addition of sodium aceto-acetic acid.

A few experiments performed with the diaphragm of rats with extirpated adrenal gland pointed to the possibility that, in these animals, the action of insulin upon glycogen synthesis is checked. This interesting problem, too, deserves further close investigation. Finally, the majority of experiments justify the view that, as was shown previously in the case of the phosphate content of the muscles, their glycogen content, too, varies very greatly according to the day and time of examination, but it is approximately the same in animals examined simultaneously whatever the individual case under consideration.

#### LITERATUR.

- 1 CH. L. GEMMILL, *Bull. John Hopkins Hosp.*, **66** (1940) 232; *idem, Am. J. Physiol. Proceed.* (1941) 291; G. F. KOEPPF, H. W. HORN, C. L. GEMMILL, G. W. THORN, *Am. J. Physiol. Proceed.* (1941) 353.
- 2 O. RIESSER, *Schweizer. Med. Wochenschrift*, im Druck.
- 3 F. VERZAR, MONTIGEL, *Helvet. chim. acta*, **25** (1942) 922.
- 4 O. RIESSER, *Enzymol.*, **11** (1945) 323.
- 5 H. SMITS, *Enzymol.*, **11** (1945) 334.
- 6 E. HELVE, *Scandinav. Physiol. Acta*, **7** (1944) 108.
- 7 ROSKAM, DEVOUAUX, *Acta Biol. Belg.*, **3** (1943) 83.
- 8 O. RIESSER u. Mitarbeiter, *Biochem. Z.*, **275** (1935) 169; **277** (1935) 399; **288** (1936) 238; **294** (1937) 268.

Eingegangen den 26. März 1946.