

(Aus dem Institut für Physiologie am Kaiser Wilhelm-Institut für medizinische  
Forschung, Heidelberg.)

## Untersuchungen über die Reaktionsänderung des Muskels im Verlauf der Tätigkeit.

Von

M. Dubuisson (Liège).

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. August 1937.)

In einer vorhergehenden Publikation<sup>1</sup> habe ich eine Methode beschrieben, die erlaubt, die Änderungen des  $p_H$  photographisch zu registrieren, die im Muskel während seiner Tätigkeit eintreten. Die Methode basiert auf folgendem Prinzip:

Unter den Substanzen, die die Alkalireserve des Muskels ausmachen, stehen die Bicarbonate an erster Stelle, da die Phosphate sich in organischen Verbindungen befinden, deren Pufferkapazität bei physiologischem  $p_H$  klein ist. In vivo sind die Bicarbonate im Gleichgewicht mit der Kohlensäure des Blutes (etwa 38 mm Hg). In einem System Bicarbonat +  $CO_2$  ist das  $p_H$  gegeben nach der *Hasselbalchschen* Gleichung

$$p_H = p_{K_{CO_2}} + \log \frac{C_{NaHCO_3}}{C_{CO_2}},$$

wobei  $p_{K_{CO_2}}$  eine Konstante ist (6,26 für *Ringer-Lösung*<sup>2</sup>) und die Konzentrationen  $NaHCO_3$  und Kohlensäure in Äquivalenten ausgedrückt sind.

Wenn wir nun einen isolierten Muskel in eine Atmosphäre mit konstantem Kohlensäuregehalt (z. B. 5%) einbringen und ihn reizen, nachdem das Gleichgewicht zwischen der Atmosphäre und dem Muskel hergestellt ist, so wird sich, wenn die Reaktion basisch wird, ein Teil der im Muskel gelösten Kohlensäure in Bicarbonat umwandeln. Diese Kohlensäure wird aus der Außenatmosphäre ergänzt. Das Gegenteil tritt ein, wenn der Muskel sauer wird. Die freigesetzte Kohlensäure tritt in die Atmosphäre über. Der Flüssigkeitsfilm, der die Oberfläche des Muskels bedeckt, weist eine Schwankung seines Kohlensäuregehaltes auf, deren Sinn und Größe von der Richtung und dem Umfang der Reaktionsänderung abhängen. Wenn man auf die feuchte Oberfläche des Muskels eine Glaselektrode aufsetzt und verhindert, daß der Flüssigkeitsfilm unter der Elektrode mit der umgebenden Atmosphäre in Verbindung tritt, so zeigen uns die Potentialänderungen an der Elektrode die Menge der Kohlensäure an, die aus dem Film in den Muskel übertritt und umgekehrt.

<sup>1</sup> *Dubuisson, M.*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **35**, 609 (1937). — <sup>2</sup> *Warburg, O.*: Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Julius Springer 1926.

Kürzlich wurde von mir eine photographische Registrieremethode für diese Potentialschwankungen angegeben<sup>1</sup>, die im Laufe eines Tetanus erhalten werden. Obwohl an der Oberfläche eines aktiven Muskels noch andere Potentialschwankungen entstehen (Aktionsströme, Polarisationspotential des Reizstromes), so wurde angenommen, daß die Kurven nur die Wasserstoffpotentiale wiedergeben; denn an der Oberfläche eines Muskels, der frei von Kohlensäure ist und sich in einer Atmosphäre von reinem Stickstoff befindet, zeigt die Glaselektrode gar keine Potentialschwankungen, aber sofort nach Zufügung von Kohlensäure.

Bei Wiederholung dieser Versuche waren die Resultate weniger konstant, so daß die wirkliche Bedeutung dieser Kurven zum Teil zweifelhaft wurde. Nachdem jetzt eine große Zahl von Vergleichen zwischen den mit der Glaselektrode und mit einer gewöhnlichen indifferenten Elektrode erhaltenen Kurven ausgeführt ist, ist festzustellen, daß ein Teil der ursprünglich registrierten Potentiale Membranpotentiale sind, insbesondere Polarisationspotentiale des Muskels. Die Polarisation ändert sich während seiner Aktivität und steht in Beziehung mit dem Faser-tonus<sup>2</sup> und einige ihrer Komponenten, wie das „Afterpotential“ (Nachpotential), hängen mit dem Stoffwechsel des Gewebes zusammen und ändern sich stark mit der Kohlensäurespannung. Infolgedessen mußte die Methode dahin geändert werden, daß der Kohlensäuretransport durch die Muskelaponeurose unter Ausschluß der Polarisationsströme gemessen werden konnte. Das ist schließlich in befriedigender Weise gelungen.

### Methoden.

Die Glaselektrode ist vom Typus von *MacInnes*<sup>3</sup>. Am unteren Ende eines gewöhnlichen dickwandigen Glasrohres wird eine flache Glasmembran aus Spezialglas aufgeschmolzen<sup>4</sup>. Um ihre Haltbarkeit zu vermehren, haben wir dieser Membran eine größere Dicke gegeben als nach der Vorschrift von *MacInnes*. Sie ist ungefähr  $1-2 \times 10^{-2}$  mm dick und besitzt eine Oberfläche von ungefähr 8 qmm. Solche Membranen haben einen recht großen elektrischen Widerstand, für Gleichstrom ungefähr 700 Megohm<sup>5</sup>.

Das Innere des Rohres wird mit n/10-Salzsäure gefüllt. Die Membran wird außen auf den Flüssigkeitsfilm, der den Muskel umhüllt, aufgesetzt. Um Austausch von Kohlensäure zwischen der Atmosphäre der Kammer und dem Flüssigkeitsfilm unter der Elektrode zu vermeiden, ist diese am unteren Ende mit einer Kautschukmanschette versehen, die fest auf den Muskel aufgedrückt ist und so den Film von *Ringer*-Lösung von der Atmosphäre trennt. In die saure Flüssigkeit

<sup>1</sup> *Dubuisson, M.*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **35**, 609 (1937). — <sup>2</sup> *Monnier u. Dubuisson*: Arch. internat. Physiol. **85**, 38 (1934). — <sup>3</sup> *MacInnes and Belcher*: J. amer. chem. Soc. **53**, 3315 (1931). — <sup>4</sup> Die Formel dieses Spezialglases, das zur Zeit von „The Corning Glass Co., New York“ hergestellt wird, ist zuerst beschrieben von *MacInnes and Dole*: J. amer. chem. Soc. **52**, 29 (1930). Seine Zusammensetzung ist: SiO<sub>2</sub> 72%; Na<sub>2</sub>O 22%; CaO 6%. — <sup>5</sup> Dieser Widerstand ist hauptsächlich ein Polarisationswiderstand (Widerstand und Kapazität), der sich mit der Frequenz des Meßstroms ändert [*MacInnes and Belcher*: J. amer. chem. Soc., **52**, 29 (1930)].

innerhalb der Elektrode taucht eine Elektrode aus Silberchlorid nach *d'Arsonval*, hergestellt nach Angaben von *Brown*<sup>1</sup>. Die Haltbarkeit dieser ist auch in verdünnten Lösungen sehr groß. Zu ihrer Herstellung wird am oberen Ende des Rohres, das die Glasmembran trägt, ein Platindraht eingeschmolzen, der zunächst elektrolytisch mittels eines Ag-K-Doppelsalzes von Cyanid versilbert und dann nachträglich chloriert wird. Auch als Ableitungselektrode dient eine solche nach *d'Arsonval*. Nach der Chlorierung wird diese mit *Ringer*-Lösung gefüllt.

In den früheren Versuchen war diese Ableitungselektrode an der Sehne des Gastrocnemius angebracht. Hierdurch werden zu leicht Polarisationsströme

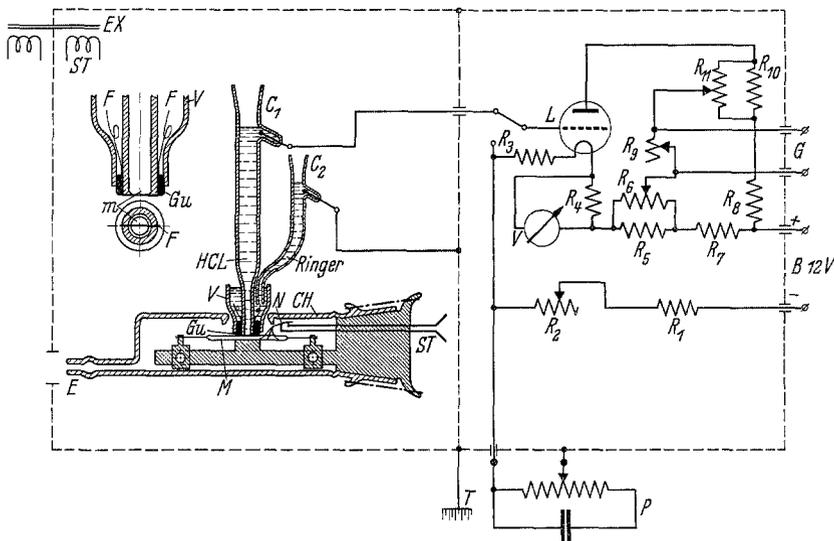


Abb. 1. Schema der Muskelkammer, der Elektroden und des Röhrenvoltmeters. *B* Klemmen der 12 Volt-Batterie. *C*<sub>1</sub> Elektrode, mit  $n/10$  HCl gefüllt, und am unteren Ende mit einer Glasmembran verschlossen (*m*). *C*<sub>2</sub> mit *Ringer*-Lösung gefüllte Ableitungselektrode. *CH* Glaskammer mit *E*, Zuleitungsrohr für das Gasgemisch. *EX* Reizspule. *F* Baumwollfaden, der die Verbindung zwischen den beiden Elektroden herstellt. *G* Klemmen für das Galvanometer. *Gu* Gummimanschette um das untere Ende der Glaselektrode. *L* Gécovolve-Verstärkerröhre, Typ T. *M* Muskel, *N* Nerv. *P* Potentiometer. *R*<sub>1</sub> 8 Ohm; *R*<sub>2</sub> 25 Ohm; *R*<sub>3</sub> 22 Ohm; *R*<sub>4</sub> 40 Ohm; *R*<sub>5</sub> 22 Ohm; *R*<sub>6</sub> 1000 Ohm; *R*<sub>7</sub> 11 Ohm; *R*<sub>8</sub> 5000 Ohm; *R*<sub>9</sub> 10 000 Ohm; *R*<sub>10</sub> 110 Ohm; *R*<sub>11</sub> 1000 Ohm. *ST* Reizdrähte. *T* Erde. *V* Glasgefäße für Ableitungselektrode.

registriert. Diese Polarisationsströme werden vermieden, wenn man von 2 genau gleich aktiven Punkten im Muskel ableitet. Das ist nur der Fall, wenn sie außerordentlich dicht benachbart innerhalb einer homogenen Zone des Gewebes liegen. Nach verschiedenen Vorversuchen wurden deshalb die Glaselektrode und die Ableitungselektrode so miteinander verbunden, daß sie praktisch an derselben Stelle lagen. Die Abb. 1 zeigt die neue Anordnung.

Ein dünner Baumwollfaden, mit *Ringer*-Lösung getränkt, geht vor der Glasmembran vorbei und geht zwischen dem Kautschukschlauch und der Glaswand der Glaselektrode nach oben, wo er in ein kleines Schälchen eintaucht, das mit *Ringer*-Lösung gefüllt ist und in dem ihrerseits die Ableitungselektrode nach *d'Arsonval* endet. Im ganzen ist bei dieser Anordnung das Membranpotential an der Glasmembran und an dem Baumwollfaden immer dasselbe, so daß nur noch die Wasserstoffpotentiale an der Glasmembran übrig bleiben.

<sup>1</sup> *Brown*: J. amer. chem. Soc. 56, 646 (1934).

*Elektrische Registrierung.*

Die Ströme von der Glasmembran werden durch ein Röhrenvoltmeter verstärkt, analog dem kürzlich beschriebenen<sup>1</sup>. Als Röhre diente eine Gécovalve, London, Typ T. Der Verstärkungsfaktor in Volt ist etwas unter 1. In Ampere kann er beträchtlich sein und hängt von dem Widerstand an den Enden der Potentialdifferenz ab, die zu messen ist. Bei den Bedingungen, unter denen ich arbeitete ruft ein Millivolt, das auf das Gitter wirkt, eine momentane Schwankung von  $1 \times 10^{-7}$  Amp. im Anodenkreis hervor. Die Heizung der Röhre wird durch eine Batterie von 12 Volt und 100 Amperestunden besorgt. Mittels eines Widerstandes wird die Abgabe der Stromquelle so geregelt, daß das Voltmeter 4 Volt anzeigt. Dann ist die Spannung an den Enden des Heizfadens gerade 1 Volt und das Gitter auf  $-2,2$  Volt aufgeladen. Im Anodenkreis wird mittels einer *Wheatstone*-Brücke kompensiert, die Kompensation wird mittels der Widerstände  $R_6$  und  $R_{11}$  eingestellt.

Die Messungen werden, wenn der Muskel in Ruhe ist, wie folgt ausgeführt: Der Umschalter wird nach rechts gelegt, derart, daß das Gitter direkt mit dem Heizfaden verbunden ist<sup>2</sup>. Man kompensiert den Anodenstrom genau durch Betätigung der Widerstände  $R_6$  und  $R_{11}$ .

Der Umschalter wird dann nach links gelegt, um die Glaselektrode und das Potentiometer einzuschalten. Man ändert jetzt die Potentiometerstellung P so, bis der Galvanometerstrom wieder Null ist und berechnet so das  $p_H$  des Gewebes in der Ruhe im Vergleich zu einer Bezugslösung. Wenn jetzt der Muskel gereizt wird und eine Änderung des  $p_H$  auftritt, so zeigt das Galvanometer eine Schwankung, deren Sinn und Größe photographisch registriert werden können. Das benutzte Galvanometer ist das von *Zernicke* (Zc), fabriziert von P. J. Kipp und *Zonen* (Holland); seine Periode ist ungefähr 1 Sek., wenn es aperiodisch schwingt. Die Ausschläge des Lichtflecks wurden in einem Photographion (von *Jaquet*) registriert, dessen Papiergeschwindigkeit zwischen 1 und 25 m pro Minute reguliert werden kann.

Die Montage des Stromkreises verlangt eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen. Die Röhre und die Elektroden müssen sorgfältig gegen äußere Störungen geschützt sein. Ich benutze einen Kasten aus Eisenblech, der durch eine vertikale Wand aus Eisen in 2 Abschnitte geteilt ist; in dem rechten befindet sich die Röhre, der Kompensationsstrom und der Umschalter in der linken Kammer die Elektrode und die Lösungen bzw. der Muskel.

Die Röhre wird auf einen weichen Kautschukschwamm aufgesetzt, um die Triode vor mechanischen Vibrationen zu bewahren. Die Röhre ist von einer eigenen Panzerung umgeben, die nur unterbrochen ist an den Stellen des Ausganges der Drähte vom Gitter, der Anode und des Heizfadens. Die Stabilität des Instrumentes ist ausgezeichnet. Wenn es 1 Stunde lang angeheizt ist, so sind die spontanen Stromschwankungen an der Anode unter  $1 \times 10^{-8}$  Ampere in 15 Min.

*Reizstrom.*

In allen Versuchen geschieht die Reizung mittels einer Induktionsspule, die mit 4 Volt betrieben ist. Einzelreize sind Öffnungsschläge. Die Tetani werden mit 20 Unterbrechungen pro Sekunde erzeugt.

<sup>1</sup> *Dubuisson, M.*: J. of Physiol., **90**, 47 P. (1937). — <sup>2</sup> Es ist gleichgültig, ob diese Verbindung noch durch einen Widerstand von derselben Größenordnung wie der der Glaselektrode (etwa 1000 Megohm) oder direkt hergestellt wird. Ein Widerstand von 1000 Millionen Ohm ist unter den Bedingungen der Funktion der Röhre nahezu ein Kurzschluß, da zwischen dem Gitter und Heizfaden ein solcher von  $10^{16}$  Ohm besteht.

*Ausführung der Versuche.*

Der Muskel, Gastrocnemius oder Sartorius vom Frosch, mit seinen Nerven präpariert, wird unter strikt isometrischen Bedingungen fixiert. Der Halter ist am Stopfen der Glaskammer befestigt. Die Kammer wird mit *Ringer*-Lösung +  $2 \times 10^{-2}$  NaHCO<sub>3</sub> gefüllt. Nachdem 1 Stunde lang Sauerstoff + CO<sub>2</sub> durch die Ringerlösung durchgeperlt sind, wird sie entfernt. Die Kammer wird jetzt mit einem Gemisch von N<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> durchströmt. Dann wird die Elektrode auf den Muskel aufgedrückt.

In dem Augenblick, wo die Elektrode mit dem Flüssigkeitsfilm in Kontakt kommt, entspricht das gemessene p<sub>H</sub> ziemlich gut demjenigen, das man nach *Hasselbalch* berechnet, wenn man als p<sub>KCO<sub>2</sub></sub> 6,26 annimmt, als NaHCO<sub>3</sub> die vorgelegten  $2 \times 10^{-2}$  m und als C<sub>CO<sub>2</sub></sub> die Konzentration der gelösten Kohlensäure. Dieses p<sub>H</sub> bleibt aber nicht konstant, es verringert sich progressiv während der ersten 5–10 Min., um sich dann auf einen Wert zu stabilisieren, der im allgemeinen unter dem berechneten liegt. Die Differenz kann ziemlich beträchtlich sein. Bei 21° in einer Atmosphäre von 95% N<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, wo das p<sub>H</sub> der *Ringer*-Lösung 7,28 sein sollte, findet man als konstantes Endpotential Werte zwischen 7,18 und 6,43 mit einem Mittel von 6,90. Mit 16% CO<sub>2</sub> (theoretisch p<sub>H</sub> 6,76) variiert das p<sub>H</sub> des Flüssigkeitsfilms ebenso zwischen p<sub>H</sub> 6,25 und 6,63 (Mittel 6,47). Mit 66% CO<sub>2</sub> (theoretisch p<sub>H</sub> 6,16) schwankt das p<sub>H</sub> des Films zwischen 6,38 und 6,16 (Mittel 6,29).

Im allgemeinen sind die Differenzen beim Sartorius kleiner als beim Gastrocnemius, ferner für kleine Muskeln geringer als für große und ebenso für eine Spülung der Muskeln während 2 Stunden in *Ringer*-Lösung geringer als für 1 Stunde. Daraus geht hervor, daß diese Differenzen allein verursacht sind durch mangelhaftes Gleichgewicht zwischen dem äußeren und dem inneren CO<sub>2</sub> des Muskels, wobei das letztere meistens größer ist als das erstere. Ein Teil dieses CO<sub>2</sub> im Muskel stammt wahrscheinlich aus der Veratmung des Sauerstoffes, der sich im Muskel gelöst findet im Augenblick, wo man die sauerstoffgesättigte *Ringer*-Lösung wegnimmt, um sie durch das N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gemisch zu ersetzen. Man würde also p<sub>H</sub>-Werte erhalten, die den berechneten näher liegen, wenn man dünne Muskeln von großer Oberfläche benutzt und sie länger in sauerstoffgesättigter *Ringer*-Lösung und dann auch in N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasatmosphäre vor dem Anfang der Messung hält. Dies ist aber nicht unumgänglich nötig, weil wir ja nur das genaue p<sub>H</sub> des Films am Beginn des Versuches kennen wollen; da wir von den beiden möglichen Variablen C<sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> und C<sub>CO<sub>2</sub></sub> die erstere ganz genau bestimmen können<sup>1</sup>, so können

<sup>1</sup> Die Bicarbonatreserve in dem Film aus *Ringer*-Lösung, der den Muskel bedeckt, ist, nachdem das Gleichgewicht hergestellt ist, =  $2 \times 10^{-2}$  Mol. Diese Zahl ist manometrisch nach *Warburg* festgestellt und dabei gefunden, daß eine Bicarbonatlösung, die  $2 \times 10^{-2}$  Mol. ist, sich nicht ändert, wenn ein Muskel während 1 Stunde in einem kleinen Volumen von ihr gebadet ist.

wir stets die im Muskel gelöste Kohlensäure berechnen

$$p_H = 6,26 + \log \frac{C_{\text{NaHCO}_3}}{C_{\text{CO}_2}}, \quad p_H = 6,26 - 1,70 - \log C_{\text{CO}_2} \quad \text{und} \quad \log C_{\text{CO}_2} = 4,56 - p_H.$$

Diese Gleichung ist von allgemeiner Anwendung. Kennen wir also das  $p_H$  am Ausgang des Versuches, so können wir auch die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in dem Film der *Ringer*-Lösung und infolgedessen im Muskel in diesem Augenblick berechnen.

Wenn der Muskel gereizt wird, ändert sich das  $p_H$  des Films, d. h. die  $\text{CO}_2$ -Konzentration darin. Aber diese ist erst gleich der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Muskel, wenn das Diffusionsgleichgewicht hergestellt ist. Das ist sicher erreicht, wenn die  $p_H$ -Änderung konstant geworden ist.

Alle Punkte der Kurve, für welche  $\frac{d p_H}{d t} = 0$  ist, erlauben also, die  $\text{CO}_2$ -Konzentration des Muskelinnern zu berechnen. Die Differenz dieser  $\text{CO}_2$ -Konzentration und der initialen gibt uns die Äquivalente Säure oder Base an, die im Muskel in diesem Zeitraum gebildet sind. Die Differenz wird ausgedrückt in Kubikmillimeter  $\text{CO}_2$  pro Gramm Gewebe. Wenn z. B. das Anfangs- $p_H = 6,63$  ist und das  $p_H$  zur Zeit  $t = 6,69$ , dann gilt  $\log C_{\text{initial CO}_2} = -2,02$  und  $\log C_t \text{CO}_2 = -2,08$ , was gibt  $C_{\text{initial CO}_2} = 9,55 \times 10^{-3}$  und  $C_t \text{CO}_2 = 8,31 \times 10^{-2}$ . Differenz  $= +1,24 \times 10^{-3}$  Mol. pro Liter. Dies entspricht pro Kubikzentimeter  $1,24 \times 22,4 \text{ cmm} = 27,7 \text{ cmm CO}_2$ . Wenn man annimmt, daß in 1 ccm Muskel 80% wäßrige Lösung ist, welche imstande ist, Gas zu absorbieren und die Löslichkeit der Kohlensäure die gleiche ist wie in Wasser, so hat man  $\frac{27,7}{0,8} = 34,6 \text{ cmm CO}_2$  pro Gramm Muskel. Für die Punkte, wo  $\frac{d p_H}{d t} \neq 0$  ist, können wir nur sagen, daß die Kohensäurekonzentration des Muskels größer oder kleiner ist, da wir die Zeitkonstante der Diffusion nicht kennen.

In den folgenden Belegen sind die Änderungen des  $p_H$  vernachlässigt worden, die während der Kontraktion selbst eintreten. Diese Veränderungen sind sehr variabel, sowohl nach Größe wie Vorzeichen und bisher ließ sich nicht mit Sicherheit ausschließen, daß außer den Variationen des  $p_H$  auch noch Artefakte auftreten durch Verschiebung von Fasern, die die Kapazität des Gitterkreises ändern können und ähnliches.

#### *Normaler Muskel.*

Ob man mit Einzelschlägen reizt, 4—20mal pro Minute oder mit einer Reihe von Tetani von 0,5, 1 oder 2 Sek. Dauer, die durch Ruheperioden zwischen 2 Sek. bis 2 Min. unterbrochen sind, die allgemeine Form der Kurven bleibt dieselbe: Das  $p_H$  steigt progressiv zu Beginn der Kontraktionen, erreicht ein Maximum und fällt dann wieder ab, was auch das Anfangs- $p_H$  sei (Abb. 2). Dieses Ergebnis bestätigt die

älteren Messungen von *Lipmann* und *Meyerhof*<sup>1</sup> und *Meyerhof*, *Möhle* und *Schulz*<sup>2</sup>. Wenn man die Kohlensäureabsorption berechnet, die dem

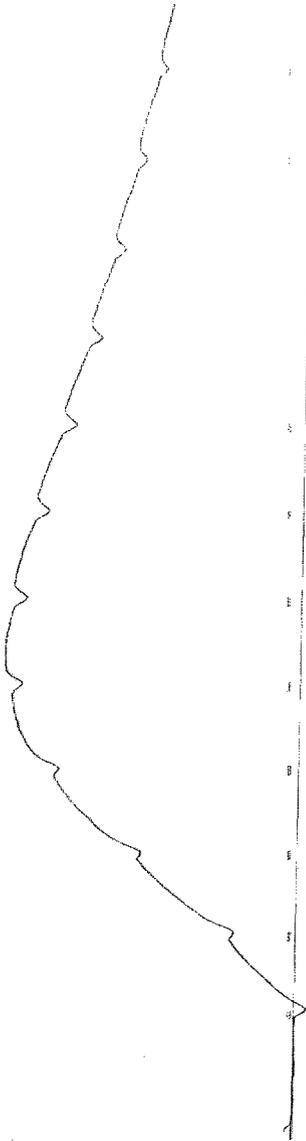


Abb. 2. Photographisch registrierte Kurve des pH-Verlaufes in dem den Sartorius bedeckenden Flüssigkeitsfilm bei einer Serie von 2 Sek. Tetani mit Ruhepausen von 20 Sek. Die Reizzeiten sind unten als schwarze Striche wiedergegeben. Normalmuskeln im Gleichgewicht mit 66% CO<sub>2</sub>/34% N<sub>2</sub>. Anfangs-pH 6,37. Alkalinisierung nach oben. Das Maximum der Alkalinisierung, das nach dem 5. Tetanus eintritt, entspricht einer CO<sub>2</sub>-Aufnahme von 112 cmm pro Gramm Muskel. Es ist nicht sicher, daß die während der Reizung beobachteten Schwankungen pH-Änderungen entsprechen.

maximalen p<sub>H</sub> auf der Kurve entspricht, so ergeben sich Werte, die beträchtlich gemäß dem Ausgangs-p<sub>H</sub> des Muskels variieren. In Tabelle 1 und Abb. 3 sind eine Reihe der Resultate vereinigt. Die erhaltenen Ziffern sind analog denen, die von *Meyerhof*, *Möhle* und *Schulz*<sup>2</sup> publiziert sind, welche die Kohlensäureabsorption manometrisch bestimmt haben. Bei Muskeln, die mehr oder weniger im Gleichgewicht mit 5% Kohlensäure waren, wurde von mir eine maximale Alkalinisierung gemessen, die 27,8 cmm CO<sub>2</sub> pro Gramm Muskel entspricht (Mittel aus 13 Messungen), während *Meyerhof*, *Möhle* und *Schulz*<sup>2</sup> 34,3 cmm fanden (Mittel von 3 Messungen, Tabelle 9 a. a. O.). Mit 16% und 66% CO<sub>2</sub> habe ich bzw. 52,3 (2 Messungen) und 144 cmm CO<sub>2</sub> (5 Messungen) gefunden, die genannten Autoren aber 68,0 cmm (3 Messungen) und 176,0 cmm CO<sub>2</sub> (4 Messungen).

*Meyerhof*, *Möhle* und *Schulz* haben diese Kohlensäureabsorption im wesentlichen auf die Freisetzung von Kreatin und Phosphat bei der Hydrolyse des Phosphagens bezogen. Sehen wir, ob die jetzt erhaltenen Zahlen mit dieser Hypothese übereinstimmen.

Nach den Zahlen von *Meyerhof*, *Möhle* und *Schulz*<sup>2</sup> hängt der Umfang des Zerfalls der Kreatinphosphorsäure, ausgedrückt in Milligramm H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

<sup>1</sup> *Lipmann* u. *Meyerhof*: *Biochem. Z.* **227**, 84 (1930). — <sup>2</sup> *Meyerhof*, *Möhle* u. *Schulz*: *Biochem. Z.* **246**, 285 (1932).

pro Gramm Muskel (Sartorius) zum Teil vom Ausgangs- $p_H$  ab. Bei  $p_H \sim 7,26$  zeigt sich im Mittel ein Zerfall von  $0,87 \text{ mg H}_3\text{PO}_4$  bei ungefähr  $6,44 : 1,23 \text{ mg H}_3\text{PO}_4$ , bei ungefähr  $6,16 : 1,33 \text{ mg H}_3\text{PO}_4$  für 100 Zuckungen. Das Maximum der Alkalinisierung wird bei  $p_H 7,0$  erreicht beim zweiten oder dritten 2 Sek.-Tetanus oder nach 20 bis 30 Einzelzuckungen; bei  $p_H 6,7$  beim dritten oder vierten Tetanus, bei  $p_H 6,4$  beim vierten oder fünften Tetanus und zwischen  $p_H 6,2$  und  $p_H 6,8$  bei etwa 60—100 Einzelzuckungen. Aus der Elektrotitrationskurve der Kreatinphosphorsäure vor und nach der Spaltung berechnet sich andererseits die Quantität Base, die je nach dem  $p_H$  bei der Spaltung frei wird. Die in der folgenden Übersicht gegebenen Werte für die Basenäquivalente, die einem bestimmten  $p_H$  entsprechen und die zugehörigen Werte für den Quotienten  $\frac{\text{g H}_3\text{PO}_4}{\text{cm CO}_2}$  sind auf Grund einer neuerdings von Meyerhof, Schulz und Schuster<sup>1</sup> aufgenommenen Elektrotitrationskurve in Tabelle I berechnet. Für den Äquivalenzfaktor 1 ist dieser Quotient  $\frac{98}{22400} = 4,4 \times 10^{-3}$ .

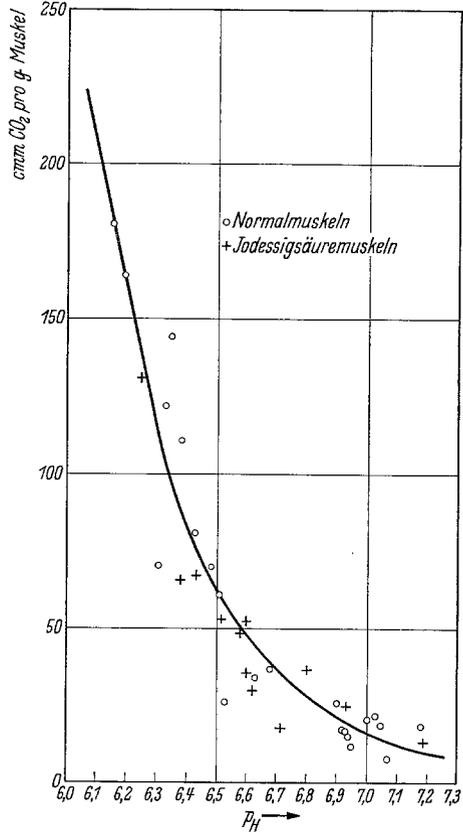


Abb. 3. Kurve der maximalen Kohlensäureabsorption (mm pro Gramm Muskel) in normalen und Jodessigsäuremuskeln in Abhängigkeit vom Anfangs- $p_H$  des Flüssigkeitsfilms, der den Muskel bedeckt.

Tabelle I.

$p_H$	Äquivalente	$\frac{\text{H}_3\text{PO}_4}{\text{CO}_2}$	$p_H$	Äquivalente	$\frac{\text{H}_3\text{PO}_4}{\text{CO}_2}$
—	1,00	$4,4 \cdot 10^{-3}$	6,60	0,62	$7,1 \cdot 10^{-3}$
—	—	—	6,50	0,66	$6,65 \cdot 10^{-3}$
7,20	0,34	$13,0 \cdot 10^{-3}$	6,40	0,70	$6,30 \cdot 10^{-3}$
7,00	0,40	$11,0 \cdot 10^{-3}$	6,20	0,75	$5,85 \cdot 10^{-3}$
6,80	0,50	$8,8 \cdot 10^{-3}$	6,10	0,78	$5,65 \cdot 10^{-3}$

<sup>1</sup> Meyerhof, Schulz u. Schuster: Biochem. Z. 1937 im Druck.

Tabelle 2. Maximale CO<sub>2</sub>-Absorption für normale Muskeln.  
[Tetani von 2 Sek. oder isolierte Einzelzuckungen (Versuche x).]

1	2	3	4	5	6
Nr.	Muskel	% CO <sub>2</sub> in der Kammer (approx.)	pH initial	pH-Maximum	emm CO <sub>2</sub> verbraucht pro g Muskel
122	S*	5	6,95	7,01	+ 12,9
94	S	5	7,07	7,11	+ 8,7
111	S	5	6,43	6,50	+ 81,0
106	S	5	6,93	6,99	+ 17,3
105	S	5	6,92	6,98	+ 18,0
125 x	S	5	6,94	7,00	+ 15,5
123 x	S	5	7,03	7,145	+ 23,2
112	S	5	6,51	6,59	+ 61,5
93	S	5	6,90	6,99	+ 26,6
91	G**	5	7,00	7,09	+ 21,2
92	G	5	7,18	7,31	+ 19,6
75	G	5	6,68	6,755	+ 37,7
74	G	5	7,05	7,14	+ 19,4
79	G	16	6,48	6,58	+ 70,0
81	G	16	6,63	6,69	+ 34,7
89	G	33	6,31	6,37	+ 70,5
82	G	33	6,53	6,566	+ 26,7
120	S	66	6,38	6,49	+ 112,0
126	S	66	6,152	6,27	+ 180,0
119	S	66	6,35	6,508	+ 144,0
124 x	S	66	6,19	6,317	+ 164,0
127	S	66	6,33	6,452	+ 122,0

Tabelle 3. Maximale Kohlensäureabsorption für jodessigsäurevergiftete Muskeln, die mit Tetani gereizt sind.

1	2	3	4	5	6
Nr.	Muskel	% CO <sub>2</sub> in der Kammer (approx.)	pH initial	pH-Maximum Schlußwert	emm CO <sub>2</sub> verbraucht pro g Muskel
123	S*	5	7,18	7,27	+ 14,0
98	S	5	6,93	7,02	+ 25,4
96	S	5	6,80	6,90	+ 37,2
99	S	5	7,11	7,21	+ 18,3
97	S	5	6,62	6,67	+ 30,5
118	S	16	6,60	6,70	+ 52,8
117	S	16	6,43	6,51	+ 67,2
101	S	16	6,25	6,36	+ 131,0
114	S	33	6,58	6,66	+ 49,0
115	S	33	6,515	6,58	+ 53,5
116	S	33	6,60	6,66	+ 36,0
121	S	66	6,38	6,45	+ 66,0

\* Sartorius. — \*\* Gastrocnemius.

Indem man diesen Werten Rechnung trägt, kann man die theoretische Alkalinisierungskurve für den Kreatinphosphorsäurezerfall bei verschiedenem p<sub>H</sub> berechnen (Kurve A auf Abb. 4). Die theoretische Alkalinisierung ist, wie man sieht, bei alkalischem p<sub>H</sub> viel beträchtlicher als die wirklich gemessene (Kurve X, Abb. 4). Das kann nicht überraschen, weil gleichzeitig eine gewisse Quantität Milchsäure frei wird. Wenn man sich hier auf die Analysen von *Meyerhof*, *Möhle* und *Schulz* stützt<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> *Meyerhof*, *Möhle* u. *Schulz*: Tabelle 5, a. a. O.

sieht man, daß, abgesehen von großen individuellen Schwankungen, die Milchsäurebildung nicht sehr vom  $p_H$  des Muskels abhängt. Sie ist für ungefähr 100 Zuckungen im Mittel 0,730 mg Milchsäure pro Gramm Muskel bei  $p_H$  7,3 und 0,690 mg bei  $p_H$  6,4. Ferner ist der Äquivalenzfaktor der Milchsäure = 1 im ganzen physiologischen  $p_H$ -Bereich. Danach kann die Kurve für die Säuerung des Muskels durch die gerade Linie B der Abb. 4 dargestellt werden, für die Gegend unterhalb  $p_H$  6,4, wo Meßwerte fehlen, ist diese Gerade punktiert. Als Resultante für die Spaltung der Kreatinphosphorsäure und die Milchsäurebildung ergibt sich die Kurve C, die, wie man sieht, nach der anderen Richtung ebenso von den experimentell erhaltenen Werten abweicht. Nun weicht wahrscheinlich die Kurve B für die Milchsäure ziemlich stark von den hier zugrunde zu legenden Werten ab. Die Berechnung stützt sich auf Analysen nach ungefähr 100 Einzelzuckungen. Im alkalischen  $p_H$ -Bereich wird aber das Maximum der Alkalinisierung viel früher erreicht; bei  $p_H$  7,2 z. B. schon nach 20 Kontraktionen, und die Bildung der Milchsäure ist nicht der Zahl der Kontraktionen proportional, sondern relativ um so geringer, je kleiner die Zahl der Kontraktionen eines frischen Muskels ist. Daher sind die Werte der Kurve B höchstwahrscheinlich zu groß.

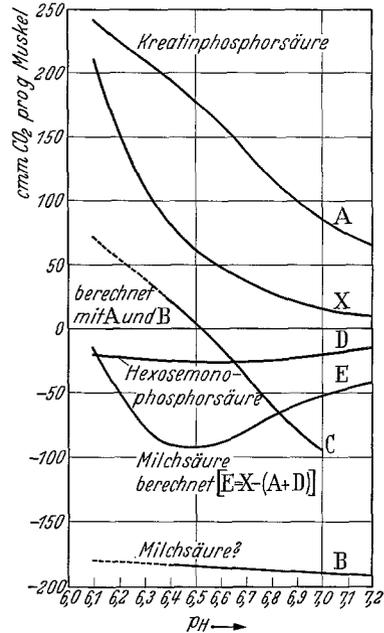


Abb. 4. Normale Muskeln. Abszisse Anfangs- $p_H$ ; Ordinate Absorption (+), oder Freisetzung (-) von  $CO_2$  (cm pro Gramm). X Experimentell erhaltene Kurve (Messungen wie Abb. 3). Die anderen Kurven aus chemischen Daten berechnet.

Andererseits wird ein gewisser Teil des bei der Spaltung des Phosphagens freiwerdenden Phosphats zu Hexosemonophosphat verestert, und zwar nach den Bestimmungen von K. Lohmann<sup>1</sup> etwa 0,310 mg  $H_3PO_4$  pro Gramm Muskel für die ersten 3—5 Tetani à 5 Sek. Die dementsprechende  $CO_2$ -Menge ist durch die Kurve D (Abb. 4) dargestellt. Damit die Resultante der Kurven A (Phosphagen), D (Hexosemonophosphat) und der gebildeten Milchsäure superponierbar der experimentell gefundenen Kurve X wird, müßte man für die Milchsäure die Kurve E annehmen ( $E = X - [A + D]$ ). Danach würde die Milchsäure von  $p_H$  7,2 bis  $p_H$  6,5 ansteigen und zwischen  $p_H$  6,5 und 6,1 rasch abnehmen. Im Augenblick läßt sich diese Annahme weder bestätigen noch widerlegen.

<sup>1</sup> Lohmann K.: Biochem. Z. **227**, 39 (1930). Vgl. auch G. T. and C. F. Cori.: J. of biol. Chem. **99**, 593 (1933).

*Jodessigsäurevergiftete Muskeln.*

Die einzige Differenz, die sich zwischen dem vergifteten Muskel (Sartorius: 1 : 25 000 Monojodessigsäure während 60 Min.) und dem normalen Muskel ergibt, ist, daß bei dem ersteren, wenn die maximale

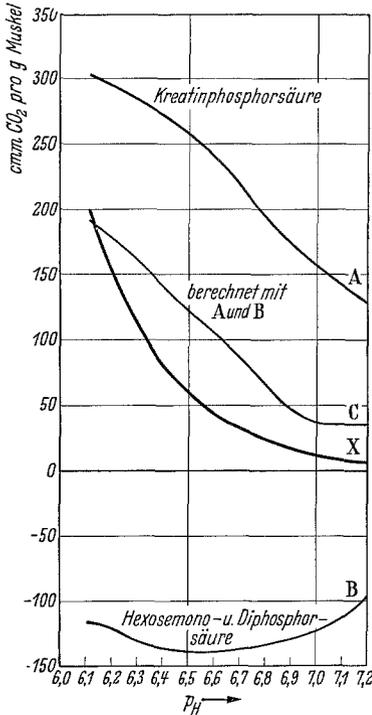


Abb. 5. Jodessigsäurevergiftete Muskeln. Abszisse und Ordinate wie Abb. 4. X Experimentell erhaltene Kurve, die übrigen berechnet.

Tabelle 7<sup>1)</sup>, so müßte die Kohlensäureabsorption in Abhängigkeit vom  $p_H$  der Kurve A von Abb. 5 entsprechen. Man sieht, wie weit sie von der experimentellen Kurve X abweicht. In diesem Fall wissen wir aber, daß das freigesetzte Phosphat sich in ein Gemisch von Hexosemonophosphat und Hexosediphosphat umwandelt, deren Elektrotitrationkurven<sup>2, 3</sup> ergeben, daß ihre Bildung mit einer Säuerung des Milieus verbunden sein muß. Wenn man mit *Lundsgaard*<sup>4</sup> annimmt, daß der gebildete Ester zu  $\frac{1}{3}$  Hexosemonophosphat, zu  $\frac{2}{3}$  Hexosediphosphat ist, so kann man die Kohlensäureabgabe berechnen, die aus

Alkalinisierung erreicht ist, das  $p_H$  sich nicht mehr ändert. Quantitativ ist die maximale Alkalinisierung in beiden Fällen dieselbe, und zwar für alle Ausgangs- $p_H$ -Werte (vgl. ○ und + auf der Kurve Abb. 3 und die Tabellen 2 und 3).

Der Eingriff, die Bildung der Milchsäure durch Vergiftung zu verhindern oder sie jedenfalls sehr beträchtlich herabzusetzen, ändert also nicht den Verlauf der Kurve bis zu dem Augenblick, wo die maximale Alkalinisierung erreicht ist. Dies entspricht dem erwähnten Umstand, daß scheinbar die Säuerung durch Milchsäure in diesem Abschnitt nicht genügend in Erscheinung tritt.

Ebensowenig wie für die normalen Muskeln kann für die vergifteten Muskeln die Spaltung der Kreatinphosphorsäure allein die experimentelle  $CO_2$ -Kurve erklären. Wenn man 1,75 mg  $H_3PO_4$  pro Gramm vergifteter Muskeln für den totalen Zerfall der Kreatinphosphorsäure ansetzt (Mittel von

<sup>1</sup> Die Zahlen dieser Tabelle entsprechen den bis zum Einsatz der Starre ermüdeten Muskeln. *Meyerhof, Möhle und Schulz*: Biochem. Z. **246**, 285 (1932). —

<sup>2</sup> *Meyerhof, O. u. K. Lohmann*: Biochem. Z. **185**, 113 (1927). — <sup>3</sup> *Meyerhof, O. u. J. Suranyi*: Biochem. Z. **178**, 427 (1926). — <sup>4</sup> *Lundsgaard*: Biochem. Z. **227**, 51 (1930).

der Veresterung von 1,75 mg  $H_3PO_4$  herrühren müßte. Die Elektrotitrationskurve von Hexosemonophosphorsäure wurde mittels eines reinen Präparats von Monoester neuerdings von *Ph. Schuster* in diesem Laboratorium<sup>1</sup> wiederholt. Die folgende Tabelle 4 gibt die Äquivalenzwerte für beide Ester in Abhängigkeit vom  $p_H$ . Die dafür berechnete  $CO_2$  wird durch die Kurve B der Abb. 5 dargestellt. Die Resultante von B und A ergibt die Kurve C. Man sieht, daß in diesem Falle die Übereinstimmung der berechneten und der experimentellen Kurve durchaus befriedigend ist; wenn man die Unsicherheit in der Größe des Phosphagenzerfalls berücksichtigt, der von einem Muskel zum anderen sehr schwanken kann, so kann man keine bessere Übereinstimmung erwarten. Die Änderung der Kohlensäure, die sich in einem vergifteten Muskel im Verlauf seiner Aktivität zeigt, erklärt sich also genügend durch die Berücksichtigung der beiden chemischen Vorgänge: der Hydrolyse der Kreatinphosphorsäure und der Bildung von Hexosephosphorsäuren.

Tabelle 4.

$p_H$	Äquivalente Hexosemonophosph. Ester	Äquivalente Hexosediphosph. Ester	$p_H$	Äquivalente Hexosemonophosph. Ester	Äquivalente Hexosediphosph. Ester
7,20	0,21	0,24	6,50	0,36	0,32
7,00	0,28	0,30	6,40	0,34	0,32
6,80	0,32	0,33	6,20	0,30	0,29
6,60	0,35	0,33	6,10	0,28	0,28

### Zusammenfassung.

Es wird eine Methode beschrieben, die erlaubt, photographisch die  $p_H$ -Änderung zu registrieren, die in einem Film aus *Ringer*-Lösung vor sich geht, der einen tätigen Muskel bedeckt. Die Änderungen des  $p_H$  werden verursacht durch Änderungen in der Konzentration des  $CO_2$  des Muskels. Unter gewissen Bedingungen ist es möglich, diese Änderungen der Konzentration des Muskels quantitativ zu bestimmen. Es ist in systematischer Weise die Änderung der Alkalireserve des Muskels im Verlauf seiner anaeroben Tätigkeit als Funktion des Anfangs- $p_H$  bestimmt worden. Ob nun die Kontraktionen normal oder „lactacid“ sind, so sind die ersten 20—100 Einzelzuckungen oder die ersten 2—5 Tetani zu 2 Sek. durch eine fortschreitende Alkalinisierung des Muskels charakterisiert. Diese Alkalinisierung ist dieselbe, ob Milchsäure gebildet wird oder nicht (aber dafür Hexosemonophosphat) und ist um so beträchtlicher, je niedriger das Anfangs- $p_H$  liegt. Bei den darauf folgenden Kontraktionen wird der normale Muskel saurer mit einer Geschwindigkeit, die nicht vom Anfangs- $p_H$  abhängt, während der vergiftete Muskel in Kontraktur eintritt ohne weitere  $p_H$ -Änderung.

<sup>1</sup> *Schuster, Ph.*: Unveröffentlichte Versuche.

Wenn man für einen vergifteten Muskel als Funktion des Anfangs- $p_{\text{H}}$  berechnet a) die theoretische Alkalinisierung, die durch den Zerfall der Kreatinphosphorsäure herbeigeführt wird und b) die theoretische Säuerung, die durch Bildung eines Gemisches von Hexosemonophosphat und Hexosediphosphat verursacht werden, so findet man eine recht gute Übereinstimmung zwischen Rechnung und Versuch.

Schwieriger ist die Erklärung für den normalen Muskel. Man muß hier berücksichtigen a) die Alkalinisierung durch den Zerfall der Kreatinphosphorsäure, b) die Säuerung durch Milchsäure und Hexosemonophosphorsäure. Damit die Resultante der 3 Vorgänge der experimentellen Kurve superponierbar wird, muß man eine Milchsäurebildung annehmen, die viel schwächer ist als sie aus dem Mittel für 100 Zuckungen berechnet ist und die von dem Anfangs- $p_{\text{H}}$  des Muskels abhängig ist.

Es sei mir erlaubt, Herrn Professor *Meyerhof* und dem Personal des Instituts für Physiologie des Kaiser Wilhelm-Instituts für medizinische Forschung meinen ergebensten Dank für die Gastfreundschaft und Beratung während meines Aufenthaltes in Heidelberg auszusprechen.

---