

Mechanismus der Giftwirkung aromatischer Nitroverbindungen.

II. Mitteilung.

Beeinflussung der Lebensfunktionen isolierter Zellen.

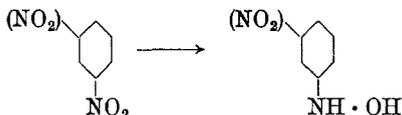
Von

Günther Hertwig und Werner Lipschitz.

(Aus dem anatomischen und pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. Main.)

(Eingegangen am 17. Mai 1920.)

In einer vorhergehenden Arbeit¹⁾ war gezeigt worden, daß lebende Zellen, indem sie atmen, zugeführten aromatischen Nitroverbindungen den Sauerstoff entziehen und sie zu Phenylhydroxylaminen reduzieren, die im Gegensatz zu den ursprünglichen Substanzen schwerste Blutgifte sind, z. B.



Es erschien nun wertvoll — im Hinblick auf die schon festgestellten Reizwirkungen der Phenylhydroxylamine — den Begriff der Giftigkeit dieser beiden Körperklassen zu erweitern und evtl. vorhandene direkte Giftwirkungen der Nitroverbindungen von der indirekten Giftwirkung auf das Blut abzutrennen. Für diesen Zweck erwiesen sich isoliert überlebende bewegliche Zellen als brauchbares Material: einmal die in ihrer Beeinflußbarkeit durch gewisse chemische Stoffe²⁾ schon studierten Froschspermatozoen, weiter Bakterien, z. B. *Proteus vulgaris*.

Ganz parallel zu den an Muskelzellen¹⁾ gemachten Erfahrungen zeigte sich, daß die verschiedenen Nitroverbindungen ungleichmäßig der biologischen Reduktion unterliegen, daß nämlich *m*-Dinitrobenzol oder Dinitrotoluol, mit einer Aufschwemmung der lebenden Zellen gemischt, in eine kräftig gelbe Lösung der *m*-Nitrophenylhydroxylaminverbindung übergeht, die bei Zusatz von Soda rotviolett wird, daß dagegen aus *symm.* Trinitrobenzol oder Trinitrotoluol sich nur in äußerst geringem Umfange ein derartiges Reduktionsprodukt bildet.

Mit der Reduktion der Nitroverbindung geht nun eine Giftwirkung

¹⁾ W. Lipschitz, *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **109**, H. 5. 1920.

²⁾ G. und P. Hertwig, *Arch. f. mikr. Anat.* **83** (II), 267. 1913.

auf die Zellen einher, die sich darin äußert, daß die Beweglichkeit der Zellen bis zu völliger Starre gehemmt wird; diese Erscheinung ließ sich besonders gut an den Spermatozoen beobachten. Man darf daraus schließen, daß entsprechend der Blutgiftigkeit auch die Zellgiftigkeit der Nitroverbindungen eine indirekte ist, die auf der Entstehung von Hydroxylaminen beruht. Eine starke Stütze für diesen Schluß ist die direkt nachgewiesene, die Nitroverbindungen weit übertreffende Giftwirkung der Hydroxylamine.

Die Entscheidung darüber, ob diese Schädigung der Zellen, die durch Versuche mit krystallisiertem β -Phenylhydroxylamin bestätigt wurde, in spezifischer Weise den Kern betrifft nach Art der Spermatozoenschädigung durch Methylenblau, Radiumbestrahlung und andere Agentien¹⁾ oder eine allgemeine Protoplasmaschädigung ist, wurde durch Befruchtungsversuche im letzten Sinne gefällt. Es wurde nämlich ein Gemisch von Dinitrobenzol und Samenfäden sich selbst überlassen; mit herausgenommenen Spermatozoenproben wurden dann normale Froscheier künstlich in regelmäßigen Zeitintervallen befruchtet, bis die Beweglichkeit der letzten Samenfäden durch die Giftwirkung auf ein Minimum sank. Das Resultat dieser Versuche war, daß in allen Fällen, in denen überhaupt noch Befruchtung eintrat, sich ein normaler Embryo entwickelte, was gegen eine isolierte Schädigung der Spermakerne spricht.

Nachdem nun erkannt worden war, ein wie außerordentlich empfindlicher Indicator für die Entstehung kleinster Nitrophenylhydroxylaminmengen die mechanischen Leistungen der Froschspermatozoen seien, wurde noch einmal versucht, die Bedeutung kleiner Narcoticummengen für Steigerung der „Nitro“giftigkeit experimentell zu klären.

A. a. O.²⁾ war 1. aus den Befunden anderer Autoren³⁾ über die Steigerung vieler physiologischen Funktionen, speziell der Zellatmung, durch kleine Mengen Narcotica und 2. aus der selbst gefundenen Tatsache des Zusammenhangs der Nitrogiftigkeit mit der Zellatmung gefolgert worden, daß durch kleine Narcoticummengen auf dem Wege über die gesteigerte Zellatmung die Giftwirkung der Nitroverbindungen gesteigert werde, und daß die Löslichkeitssteigerung dieser Substanzen durch z. B. Alkohol demgegenüber keine ausreichende Erklärung für die Steigerung ihrer Giftigkeit darstelle.

Vergleichende derartige Versuche nun von Lipschitz an Kulturen von Rübsamenkeimlingen waren schließlich daran gescheitert, daß die Keime in keinem Stadium des Wachstums von ausreichend übereinstimmender Reduktionskraft, d. h. von ähnlicher Anzahl der Einzel-

¹⁾ Hertwig, l. cit.

²⁾ W. Lipschitz, l. cit. S. 211.

³⁾ Literatur bei Winterstein, Die Narkose. Springer 1919.

zellen, zu gewinnen waren, um Unterschiede der durch gesteigerte Atmung entstehenden Nitrophenylhydroxylaminmengen gegenüber normal entstandenen reproduzierbar zu gestalten. Ein viel günstigeres Material stellten dagegen die Froschspermatozoen dar, von denen bereits durch die Untersuchungen von Oscar Hertwig¹⁾ bekannt war, daß sie auf geringe Alkoholdosen mit gesteigerter Beweglichkeit reagieren.

Es ließ sich nunmehr experimentell ganz allgemein zeigen, daß Narcotica in passenden niederen Dosen einerseits die Beweglichkeit der Zellen für viele Stunden erhöhten — und damit nach vielfachen Versuchen anderer Autoren den Gaswechsel —, andererseits aber in Kombination mit dem reduzierbaren m-Dinitrobenzol eine gegenüber Kontrollen verfrühte Bewegungshemmung bewirkten. Da vorher bereits bewiesen wurde, daß nicht die Nitroverbindung selbst die Zellen schädigt, sondern die biologisch aus ihr entstehende Hydroxylaminverbindung, so scheint die Kausalität zwischen Alkoholfuhr und Verstärkung gewisser Giftwirkungen in folgendem Sinne lückenlos hergestellt zu sein:

Narcotica in kleinen Mengen \longrightarrow gesteigerte Zellatmung \longrightarrow gesteigerte Nitroreduktion \longrightarrow gesteigerte Hydroxylamin-Giftwirkung,

besonders bei Berücksichtigung der früheren Versuche²⁾, nach denen höhere Narcoticumdosen (16% Äthylalkohol, 4% Äther) einerseits Hemmung der Zellatmung, andererseits Hemmung der Nitroreduktion und Hydroxylaminbildung bewirken.

Ganz entsprechende Resultate wie durch kleine Mengen Narcotica wurden durch Nicotin in niedrigen Konzentrationen, von dem bereits früher festgestellt war, daß es die Beweglichkeit der Spermatozoen erheblich steigert, und durch Saponin erzielt, das gleichfalls bewegungsfördernd wirkt*). Durch Kombination dieser Substanzen mit der Nitroverbindung wurde die Giftwirkung weitgehend gesteigert, so daß für die Erklärung, die giftigkeitssteigernde Wirkung der Narcotica beruhe auf Löslichkeitssteigerung der Nitrokörper³⁾, weder Raum noch Bedürfnis mehr bleibt.

Der Mechanismus der Steigerung vitaler Funktionen durch Nicotin und Saponin ist im einzelnen noch nicht als endgültig geklärt zu

¹⁾ O. Hertwig, Sitzungsber. Akad. d. Wiss. **31**. 1912.

²⁾ W. Lipschitz, l. cit.

³⁾ Chilian, Inaug.-Diss. Würzburg 1902. — E. Rost, Enzykl. Jahrb. d. ges. Heilkunde. N. F. 2. Bd. Nitrokörper.

*) Im gleichen Sinne ist die Beobachtung der steigernden Wirkung von kleinsten Mengen Nikotin oder Strychnin auf die Hefegärung verwertbar (Liebig, Annal. **153**, 152. 1870) und der ebenso anfänglich steigernden Wirkung von Ammoniakderivaten, u. a. Nikotin auf die Oxydationsprozesse in den Zellen (E. Grafe, Zeitschr. f. physiol. Chemie **79**, 421. 1912); dabei spielt das sehr differente Teilungsverhältnis zwischen Öl und Wasser für die Wirkung keine Rolle.

bezeichnen, ebenso wie die atmungssteigernde und — wohl auf dieser Basis erklärbare therapeutische — Wirkung kleiner Metallsalzmengen¹⁾. Immerhin geben gerade für die Auffassung der Saponin- und Nicotinwirkung Versuche J. Loeb's u. a. über künstliche Entwicklungserregung unbefruchteter Seeigeleier eine Handhabe. Loeb²⁾ fand, daß Saponin durch seine lipoidlösenden Eigenschaften befähigt ist, die Membranbildung und embryonale Entwicklung — also mechanische Leistungen — von Seeigeleiern anzuregen —, ein Vorgang, der nach Loeb wohl an die Verflüssigung der oberflächlichen Zellipoide gebunden ist und bei größerer Intensität zur Cytolyse führt. — Im gleichen Sinne sind nach S. Isaac und K. Möckel³⁾ die Saponinwirkungen am hämatopoetischen Apparat zu beurteilen; ihr Wesen beruht auf einer Wucherung der zelligen Elemente in den Blutbildungsstätten Knochenmark und Milz.

Ebenso wie Saponin wirkt auch Nicotin in niedrigen Dosen auf das unbefruchtete Seeigelei entwicklungserregend, wie Wassilieff⁴⁾ gezeigt hat. Übrigens läßt sich der gleiche Effekt auch mit Strychnin nach Versuchen von Richard Hertwig⁵⁾ erzielen und parallel damit eine Steigerung der Beweglichkeit von Spermatozoen.

Hand in Hand mit dieser Steigerung der mechanischen Leistungen der Samenfäden ist ungezwungen auch die ihres Gaswechsels anzunehmen. In demselben Sinne hat J. Loeb⁶⁾ die entwicklungserregende Wirkung dieser Substanzen auf das Seeigelei begleitet von einer Steigerung der oxydativen Vorgänge angenommen, eine Hypothese, für die Warburg⁷⁾ den experimentellen Beweis brachte. Er beobachtete nämlich, daß das Eindringen des Spermakopfes in die reife Seeigeleizelle mit einer plötzlichen Änderung der Eioberfläche einhergeht, andererseits mit einem raschen Emporschnellen der Atmung auf das 5—10fache, und fand Entsprechendes bei künstlicher Entwicklungserregung des Eies.

Man hat also wahrscheinlich ganz allgemein, wie bei der Eizelle so auch bei den Samenfäden, die Wirkung der Narcotica, des Saponins, Nicotins und anderer Zellgifte als eine noch näher zu definierende Veränderung der Zellmembran oder Zellstruktur aufzufassen, die eine Steigerung der Zellfunktionen zur Folge hat und damit in unserem Falle eine mit der Zellatmung verknüpfte gesteigerte Nitrogiftwirkung.

1) Warburg, *Ergebn. d. Physiol.* **14**, 253. 1914.

2) Loeb, *Arch. f. Physiol.* **132**. 1908.

3) Isaac und Möckel, *Zeitschr. f. klin. Medizin* **72**, H. 3/4.

4) Wassilieff, *Biol. Zentralbl.* **22**. 1902.

5) R. Hertwig, *Festschrift f. Gegenbaur.* 1896.

6) Loeb, *Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies.* Springer, Berlin 1909. S. 51—59.

7) Warburg, *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **57**, 1. 1908.

Experimentelles.

I. Reduktion der Nitroverbindungen durch Aufschwemmungen von *Bac. proteus vulgaris*.

Zwei 24-Stunden-Schrägagarkulturen von *Proteus vulg.*¹⁾ werden in je 2 cem physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe einer Platinöse aufgeschwemmt, vereinigt und durch Schütteln sorgfältig vermischt und homogenisiert. Je 1 cem dieser Aufschwemmung wird mit einem Überschuß der feingepulverten Nitroverbindungen durchgeschüttelt und öfters umgerührt.

Zeit	m-Dinitrobenzol	2,4-Dinitrotoluol-1	symm.Trinitrobenzol	Trinitrotoluol
1 ^h	braunstich. Gelbf.	—	—	—
1½ ^h	filtriert: braunstichige Gelbfärb. + 1 Tropfen Sodalösung: kräftige Violettf.	Gelbfärbung	Gelbfärbung	farblos
	<div style="border-top: 1px solid black; width: 100%; margin-bottom: 5px;"></div> kräftige Rosafärb. unverändert farblos Färbung verblaßt allmählich			

Deutliche Reduktion zu Nitrophenylhydroxylaminverbindungen tritt also nur bei den Dinitroverbindungen ein.

II. Reduktion der Nitroverbindungen durch Froschspermatozoen und Eintritt der Giftwirkung. Mechanismus der Zellgiftwirkung des m-Nitrophenylhydroxylamins.

Der Inhalt der Samenblasen oder — in den meisten Fällen — der wässrige Extrakt (0,3proz. NaCl-Lösung) der Hoden²⁾ kräftiger Temporariermännchen wurde soweit mit 0,3proz. NaCl-Lösung verdünnt, daß eine Zellsuspension von gleichmäßig grauweißer Farbe entstand, in der die Spermatozoen in lebhafter Bewegung sich befanden. Gleiche Mengen dieser Suspension wurden dann auf kleinen Uhrgläsern sorgfältig mit den feingepulverten Nitroverbindungen durchmischt und in feuchter Kammer aufbewahrt. Zur mikroskopischen Betrachtung wurden — möglichst unter Fernhalten von Krystallen — jeweils kleine Proben der Suspension auf einem Objektträger mit der gleichen Kochsalzlösung auf das Doppelte verdünnt und unter einem Deckglas sofort betrachtet. Die Resultate gehen aus folgender tabellarischer Übersicht hervor:

¹⁾ Für ihre freundliche Überlassung sagen wir dem Direktor des Hygien. Instituts, Herrn Geh.-Rat Prof. Neisser, und seinem Assistenten Herrn Dr. Klein herzlichen Dank.

²⁾ Zur Methodik vgl. G. und P. Hertwig, Arch. f. mikr. Anat. 83 (II), 270. 1913.

Substanz		Dinitrobenzol	Dinitrotoluol	Trinitrobenzol	Trinitrotoluol
Vers.-Nr.	Vers.-Dauer				
1.	1 $\frac{1}{2}$ ^h	Spermatozoen starr; Farbe der Suspension: gelb; bei Sodazusatz: violett, allmählich verblassend			Spermatozoen noch gut bewegl. Farbe der Suspension: schwach gelb; bei Sodazusatz: unverändert
2.	1 $\frac{1}{2}$ ^h	Spermatozoen noch gut beweglich. Farbe: gelb.	Spermatoz. starr; Farbe: gelb + Soda: rosa		Spermatoz. gut beweglich. Farbe: schwach gelb
	1 $\frac{1}{4}$ ^h	Spermat. fast sämtlich starr: Farbe bei Sodazusatz stark rosa			Spermat. schwach beweglich. Farbe: bei Sodazusatz: unverändert
3.	3 $\frac{3}{4}$ ^h		Spermatoz. starr; Farbe nach Sodazusatz: rosa		
	1 $\frac{1}{4}$ ^h	Spermetoz. starr. Soda-Reakt.: rosa			Spermatoz. gut beweglich
	2 ^h				Spermat. schwach beweglich. Soda-Reaktion: —
4.	1 $\frac{1}{2}$ ^h	Spermatoz. mäßig beweglich; Gelbfärbung	Spermatoz. mäßig beweglich, Gelbfärbung		Spermatoz. gut beweglich. Farbe unverändert
	1 $\frac{1}{4}$ ^h	Spermatoz. starr; starke Gelbfärbg. Soda-R.: kräftig rosa, allmählich verblassend	Spermatoz. starr; starke Gelbfärbg. Soda-R.: violett, allmählich verblassend		Spermatoz. gut beweglich
	1 $\frac{1}{2}$ ^h				Soda-R.: —
5.	1 ^h	Spermatoz. starr; Gelbfärbung		Spermatoz. in guter Bewegung. Farbe bräunlich.	
	1 $\frac{1}{2}$ ^h			Spermatoz. gut bewegl. Soda-R.: ??	
6.	1 $\frac{1}{2}$ ^h	Gelbfärbung;		Braunfärbung	
	1 ^h	Spermatoz. starr; Soda-R.: stark viol., allmähl. verbläss.		Spermatoz. gut beweglich	
	2 ^h			Spermat. teils gut, teils schwach bewegl., teils starr. Soda-R.: fraglich	

Substanz		Dinitrobenzol	Dinitrotoluol	Trinitrobenzol	Trinitrotoluol
ers.-Nr.	Vers.-Dauer				
7.	1 ^h 10' 2 ^h 2 ^{3/4} h 3 ^h 20'				Sp. voll beweglich " " " " " " ,, noch ganz gut beweglich Soda-R.: —
8.	2 ^{3/4} h 4 ^{1/4} h 10 ^{3/4} h				Sp. gut beweglich " " " ,, sämtlich starr Soda-R.: schwächst rosa
9.	1 ^h				Eskulenten-Sp. in ihrer Beweglichkeit geschädigt Soda-R.: schwächst rosa
10.	1 ^h 2 ^h 10' 3 ^h				Eskulenten-Sp. lebhaft beweglich viele lebhaft bewegl. Beweglichkeit eingeschränkt Soda-R.: —

Aus diesen Versuchen ergibt sich mit aller Deutlichkeit, daß die Giftwirkung der Nitroverbindungen auf die Spermatozoen mit dem Auftreten der Nitrophenylhydroxylaminreaktionen parallel geht: Gelbfärbung in neutraler, Rotviolettärbung in sodaalkalischer Lösung, und daß diejenigen Nitroverbindungen, die eine minimale Reduktion eingehen, auch von unverhältnismäßig geringerer Giftwirkung sind. Die Leichtigkeit der biologischen Reduzierbarkeit der Nitroverbindungen ist bei allen untersuchten Zellarten (Muskelzellen¹⁾, Bakterien, Spermatozoen) in gleichem Sinne abgestuft: 1. Dinitrobenzol und -toluol, 2. Trinitrobenzol, 3. Trinitrotoluol. Immerhin ließ sich auch an dieser letzten Substanz zeigen, daß sie schließlich in sehr geringem Umfange reduziert wird, und daß entsprechend der dann erkennbaren schwächsten Rosafärbung durch Sodazusatz, die Spermatozoen abgetötet werden.

Es blieb noch übrig, an analysenreinen Substanzen beider Körperklassen: der Nitro- und Hydroxylaminverbindungen direkt zu zeigen, daß die starken Giftigkeitsunterschiede ihnen in gleicher Weise gegenüber Zellen zu eigen sind, wie es bezüglich des Methämoglobinbildungsvermögens bereits¹⁾ bewiesen wurde. Für diesen Zweck wurde hier jedoch nicht das m-Nitrophenylhydroxylamin mit m-Dinitrobenzol

¹⁾ W. Lipschitz, l. cit.

verglichen, weil erst eine Lösung in 20proz. Alkohol sich einige Zeit klar hält und damit die Alkoholwirkung auf die Spermatozoen das Wirkungsbild trüben würde, sondern das in Wasser lösliche β -Phenylhydroxylamin mit dem in Wasser gut emulgierbaren Nitrobenzol. Es ist selbstverständlich, daß die Phenylhydroxylaminkristalle stets ganz frisch in der 0,3proz. NaCl-Lösung gelöst und sofort zum Versuch benutzt wurden, da die Lösung sich beim Stehen an der Luft in kurzer Zeit durch Abscheidung von Azoxybenzol trübt.

Es wurden stets gleiche Mengen Spermatozoensuspension und Reagenslösung miteinander gemischt und die Reagenskonzentration im fertigen Gemisch berücksichtigt:

Zeit	Nitrobenzol	Zeit	β -Phenylhydroxylamin
	Konzentration 0,5%		0,1%
1'	Spermatozoen gut beweglich	$\frac{1}{2}'$	Spermatozoen gut beweglich
4'	„ mäßig „	$2\frac{1}{2}'$	die meisten Spermatozoen starr
8'	„ schwach „		
17'	„ fast sämtlich starr		
	Konzentration 0,05%		0,05%
4'	} Spermatozoen in lebhafter Bew.	2'	Spermatozoen gut beweglich
20'		5'	viele Spermatozoen starr
		8'	die meisten Spermatozoen starr
		10'	ein kleiner Rest ganz schwach beweglich

Diese starken Giftwirkungen des Phenylhydroxylamins, von denen die Giftigkeit der entsprechenden Nitroverbindung um das Vielfache übertroffen wird, stehen in guter Übereinstimmung mit der keimtötenden Kraft und der Zellgiftigkeit des Hydroxylamins (NH_2OH) selbst, die von O. Loew¹⁾ beobachtet wurde.

Es war nun die Frage zu beantworten, ob die Zellschädigung der Phenylhydroxylamine eine elektive Wirkung auf den Zellkern darstelle, oder ob im Loew'schen Sinne die Hydroxylamingruppe „ein Gift in des Wortes allgemeinsten Bedeutung“ sei. Die folgenden Versuche sprechen für die letzte Auffassung.

Konzentrierte durch Zerzupfen der Hoden gewonnene Samenmilch wurde mit Dinitrobenzolkristallen sorgfältig verrührt. Aus dem Gemisch wurde dann nach steigenden Zeitintervallen durch Verdünnen mit 0,3proz. Kochsalzlösung die zur Besamung geeignete Spermakonzentration hergestellt. Da es von Wichtigkeit war, eine direkte Giftwirkung auf die Eier zu vermeiden, also keine Dinitrobenzolkristalle mit den Eiern in Berührung gebracht werden durften, wurde gewartet, bis sich die Krystalle in dem verdünnten Gemisch zu Boden

¹⁾ O. Loew, Arch. f. d. ges. Physiol. **35**, 516. 1885. — Vgl. L. Lewin, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **25**, 306. 1889.

gesenkt hatten, und erst dann unter Vermeidung des Bodensatzes die Samenflüssigkeit mit einer Pipette auf die Eier gespritzt, die mittels eines Glasstabes auf Uhrschildchen aufgesetzt worden waren.

Auf diese Weise wurden vier Versuche angestellt, indem der Samen 15, 30, 45 und 50 Minuten mit dem Dinitrobenzol in Berührung blieb. Noch länger ließ sich die Einwirkung der Substanz nicht fortsetzen, da durch die Giftwirkung die Beweglichkeit der Samenfäden so stark litt, daß sie die Eihüllen nicht mehr zu durchdringen vermochten. Schon bei den 45- und 50-Minutenversuchen blieb eine große Anzahl der Eier unbesamt, nur 20% furchten sich, während bei den kürzer dauernden Versuchen fast alle Eier sich teilten. In allen Versuchen verlief die Furchung und Gastrulation völlig normal, und es wurde eine große Anzahl kräftiger Larven erhalten, die bis zum 14. Tage, an dem der Versuch beendet wurde, keinerlei Entwicklungsstörungen zur Schau trugen.

III. Steigerung der Giftigkeit von m-Dinitrobenzol durch Kombination mit Alkohol, Chloralhydrat, Nicotin und Saponin.

Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß für das Gelingen des Nachweises einer Giftigkeitssteigerung eine niedrige Konzentration der Spermatozoen von größter Bedeutung ist. Befinden sich nämlich in dem Gemisch mit Dinitrobenzol zu viel atmende Zellen, so geschieht die Reduktion in einem solchen Umfange, also das Absterben der Samenfäden durch Hydroxylaminwirkung mit solcher Schnelligkeit, daß keine zeitlichen Unterschiede mehr deutlich festzustellen sind. Man hat in diesem Falle also die gleichen Schwierigkeiten, die Lipschitz in seinen Versuchen mit Rübensamenkeimlingen vorfand.

Es läßt sich nicht angeben, wie hoch die Konzentration der Samenfäden zu wählen ist oder wie hoch sie in den Versuchen war, da ja die Froschhoden ganz verschieden stark spermatozoenhaltig sind. Immerhin möge als Anhalt dienen, daß die Spermatozoenaufschwemmung, die im Versuch benutzt wurde, eine zart-graue Flüssigkeit darstellte, die nach Verdünnen auf die Hälfte bei mikroskopischer Betrachtung und einer Vergrößerung 330:1 mäßig zahlreiche, einzeln schwimmende Zellindividuen enthielt, — und die nach Beendigung der Versuche noch nicht erkennbar gelb oder bei Sodazusatz rosa wurde.

Selbstverständlich wurde für die Vergleichsreihen das Material stets von der gleichen sorgfältig homogenisierten Spermatozoenverdünnung mit gleicher Pipette entnommen, und zwar wurden für jeden Einzelversuch 5 Tropfen der Stammsuspension auf einem passenden Uhrschildchen mit 5 Tropfen der Reagenslösung (stets 0,3% NaCl enthaltend) oder — in den Kontrollen — mit 5 Tropfen der NaCl-Lösung und mit

a) Äthylalkohol.

Vers.-Nr.	Konzentration	Zeit	Hauptversuch	Hauptkontrolle ohne Reagens	Reag.-Kontr. ohne Dinitrobenzol
1	5%	60'	Spermatoz. schwächer beweglich als im Kontrollversuch	Spermatozoen gut beweglich	
		90'	deutl. schlechter beweglich als im Kontrollversuch	Spermatozoen mäßig gut beweglich	Spermatoz. gut beweglich
2 u. 3 wurden gemeinsam angesetzt, um d. Konstanz d. Erscheinungen unter gleichen Bedingungen zu beweisen.	5%	60'	etwa die Hälfte der Sperm. starr, die andere noch gut beweglich	Sp. alle gut beweglich	
		75'	die Mehrzahl starr	Sp. mäßig gut beweglich, doch erheblich besser als im Hauptversuch	Spermatoz. gut beweglich
	5%	60'	etwa die Hälfte der Sperm. starr, die andere noch gut beweglich	Sp. sämtlich gut beweglich.	
		75'	die Mehrzahl starr	Sp. mäßig gut beweglich, doch deutlich besser als im Hauptversuch	Spermatoz. gut beweglich
4 u. 5 cf. 2 u. 3	2,5%	45'	sehr lebhaft Bewegung	lebhaft Bewegung noch ganz gute Beweg.	sehr lebhaft Bewegung
		60'	lebhaft Bewegung		
	75'	schwache „	„ „ „ „		
	90'	ganz schwache Bewegung; die meisten Spermatoz. völlig starr			
2,5%	45'	sehr lebhaft Bewegung	lebhaft Bewegung noch ganz gute Beweg.	sehr lebhaft Bewegung	
	60'	lebhaft Bewegung			
	75'	schwache „			„ „ „ „
	90'	schwächste Bewegung; die meisten Spermatozoen völlig starr			
b) Chloralhydrat					
1	0,05%	60'	alle Spermatozoen starr	Sp. gut beweglich	Sp. gut bewegl.
		75'		viele Sp. starr	
2	0,05%	30'	lebhaft Bewegung	lebhaft Bewegung	Sp. gut bewegl.
		45'	gute Beweglichkeit	gute Beweglichkeit	
		60'	viele Sp. starr, vereinzelte noch schwach beweglich	„ „	
		90'		viele Sp. starr	
		6 ^h			
3 u. 4 cf. 2 u. 3 unter a)		40'	Sp. mäßig gut bewegl.	gut beweglich	Sp. in lebh. Bew.
		60'	viele starr	„ „	
		80'	sämtlich starr	viele starr, andere noch gut beweglich	
		90'			

b) Chloralhydrat (Fortsetzung). Konzentration 0,05‰.

Vers.-Nr.	Zeit	Hauptversuch	Hauptkontrolle ohne Reagens	Reag.-Kontroll. ohne Dinitrobenzol	
3 u. 4 cf 2 u. 3 unter a)	40'	Sp. mäßig gut bewegl.	gut beweglich	Sp. in lebh. Bew.	
	60'	viele starr	" "		
	80'	sämtlich starr	viele starr, andere noch gut beweglich		
	90'				
5	30'	sehr lebhaft Bewegung	sehr lebhaft Bewegung	Sp. voll bewegl.	
	60'	viele Spermatoz. starr	gute Beweglichkeit		
	90'	alle Spermatozoen starr	Sp. mäßig gut bewegl.		
6 u. 7	45'	Sp. mäßig gut bewegl.	gut beweglich	Sp. voll bewegl.	
	75'	die meisten starr, der Rest schwach bewegl.	" "		
	90'	alles starr	mäßig gut beweglich		
	45'	Sp. mäßig gut bewegl.	gut beweglich		Sp. voll bewegl.
	75'	die meisten starr, der Rest schwach bewegl.	mäßig gut beweglich		
	90'	alles starr	" " "		

c) Nikotin. Konzentration 0,05‰.

1	45'	Alle Sp. starr, Gemisch stark gelb, + Soda: rosa	Spermat. gut beweglich	Sp. voll bewegl.
	60'		" " "	
	75'		die meisten starr, Gem. gelb, + Soda: rosa	
2	45'	Spermat. gut beweglich	Kontrolle 1 } Spermat. gut bew.	noch gute Bew.
	60'	alle Sp. starr, Gemisch gelb, + Soda: rosa	" 2 } gut bew.	
	90'		Kontrolle 1 } nur vereinz. Sp. noch beweglich	
	6 ^h		" 2 }	
3	30'	Sp. in sehr lebh. Beweg. viele starr, einige noch schwach beweglich	Sp. in sehr lebh. Bew. Spermatoz. gut bewegl.	gute Beweglichk.
	60'			
	90'		Sp. mäßig gut bewegl.	
4	30'	Sp. mäßig gut bewegl. alle starr	Spermat. gut beweglich	sehr lebh. Bew.
	45'		" " "	
	60'			
5, 6 u. 7	60'	viele Sp. starr, vereinz. noch schwach bewegl.	Spermat. gut beweglich	Sp. lebhaft beweglich
	60'	viele Sp. starr, vereinz. noch schwach bewegl.	Spermat. gut beweglich	
	60'	alles starr	Spermat. gut beweglich	

c) Nikotin. Konzentration 0,05 %₀. (Fortsetzung).

Vers.-Nr.	Zeit	Hauptversuch	Hauptkontrolle ohne Reagens	Reag.-Kontr. ohne Dinitrobenzol
8, 9 u. 10	45'	Sp. mäßig gut bewegl.	Spermat. gut beweglich	
	75'	Spermat. sämtlich starr	Sp. mäßig gut bewegl.	
	45'	Sp. mäßig gut bewegl.	Spermat. gut beweglich	
	75'	Spermat. sämtlich starr	Sp. mäßig gut bewegl.	
	45'	Sp. mäßig gut bewegl.	Spermat. gut beweglich	
	75'	Spermatozoen starr	Spermat. gut beweglich	

Steigerung der Giftigkeit des Trinitrotoluol durch Chloralhydrat und Nicotin.
Konzentration 0,05 %₀.

Vers. Nr.	Zeit	Kontrolle ohne Reagens*)	Hauptversuch mit Chloralhydrat	Hauptversuch mit Nikotin	
1	1 ^h 10'	Temporärer-Sperm. voll bew.	voll beweglich	die weitaus meisten gut bew.	
	2 ^h	"	die meisten bewegl., aber wenig lebhaft	einzelne noch gut, die meisten kaum mehr beweglich	
	2 ^h 40'	"	"	alle fast völlig starr	
	3 ^h 20'	noch ganz gut bew.	schwächste Beweg.		
2	2 ³ / ₄ ^h	gut beweglich		gut beweglich	Nikotin-Kontrolle ohne Trinitrotoluol
	4 ¹ / ₄ ^h	" "		" "	
	10 ³ / ₄ ^h	alle starr; Soda-R: schwächst rosa		alle starr Gem.gelblich, schwach rosa (bei Sodazusatz)	gut beweglich rein weiß, auch nachdem Trinitrotoluol frisch hineingerührt war
3	1 ^h	Eskulenten-Sp. in ihrer Bewegung geschäd.; Soda-R: schwächst rosa		Spermat. in ihrer Bewegung geschädigt; rosa	
4	1 ^h	lebhaft beweglich		bei einem Teil Bew. erhalten	
	2 ^h 10'	viele " "	ein großer Teil noch bew., aber weniger lebh. als Kontrolle	fast alles starr	
	3 ^h	Beweglichk. erhalt., aber eingeschränkt; Soda-R: —	wie Kontrolle	" " "	

*) Die Versuche dieser Kolumne sind identisch mit den Versuchen Nr. 7—10 auf S. 281 der Arbeit.

Mengen von etwa 10 mg feingepulvertem Dinitrobenzol so gründlich vermischt, daß alle Teile der Flüssigkeit mit Kryställchen durchsetzt waren. Die — übrigens gleich großen — Uhrgläser wurden in feuchter Kammer bei Zimmertemperatur aufbewahrt und noch zweimal in Abständen von $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde mit Hilfe einer Nadel durchgerührt. Zur Beobachtung der Wirkung wurde ein kleiner Tropfen dem Gemisch entnommen und, mit einem großen Tropfen 0,3proz. NaCl verdünnt, unter dem Deckglas mikroskopisch betrachtet.

Die Beobachtungszeit beginnt mit dem beendeten Einrühren des Dinitrobenzols. Die Reagenskonzentration bezieht sich auf das fertige Gemisch.

d) Saponin.

Vorversuche:

1. Gleiche Mengen einer Spermatozoenaufschwemmung und einer 0,1proz. Saponinlösung (0,3% NaCl) werden gemischt und herausgenommene Proben unter dem Mikroskop beobachtet. Endkonzentration des Saponins also 0,05%. Nach 1 Min. lebhafte Bewegung der Spermatozoen, nach 2 Min. ganz vereinzelt Spermatozoen noch in Bewegung, die meisten aber sind bereits tot, indem sie eigentümlich gekrümmte Formen zeigen: Ösenbildung. Wiederholung des Versuches ergibt das gleiche Resultat.

2. Gleiche Versuchsanordnung mit einer 0,01proz. Saponinlösung. Also Endkonzentration 0,005%. Nach 1 Min. Spermatozoen in erheblich gesteigerter Bewegung, nach 85 Min. Spermatozoen in lebhafter Bewegung, die gegenüber einer saponinfreien Kontrolle noch gesteigert erscheint.

Damit ist also eine 0,005proz. Saponinlösung als bewegungssteigernd gegenüber Froschspermatozoen festgestellt.

Vers.-Nr.	Zeit	Hauptversuch mit Dinitrobenzol	Hauptkontrolle ohne Saponin	Saponinkontrolle
1 u. 2	40'	Gute Bew. der Sperm.	Gute Bew. der Sperm.	Sp. in sehr lebh. Bewegung
	70'	" " " "	" " " "	
	85'	die meisten Sperm. in gestreckt. Form starr, wenige noch schwach beweglich	" " " "	
	105'	alles starr	noch schwache Beweg. der Spermatozoen	
	40'	gute Beweg. der Sperm.	gute Beweg. der Sperm.	Sp. in sehr lebh. Bewegung
	70'	" " " "	" " " "	
	85'	viele Sperm. starr, wenige noch schwach bew.	" " " "	
	105'	alles starr	schwache Bew. der Sp.	

Steigerung einer physiologischen Zellfunktion (Atmung) durch Gifte als Ursache einer gesteigerten heterogenen Giftwirkung (der Nitroverbindungen) ist also ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen.

Damit ist aber zugleich ein wohldefiniertes Beispiel für den potenzierenden Synergismus von Giften gewonnen: Man sieht z. B. von kleinen Alkoholdosen an Menschen oder isolierten Zellen nur geringe Wirkungen und betrachtet anderseits kleine Mengen der Nitrokörper als nur mäßig starke Gifte. Ganz anders aber wird die Wirkung bei Kombination beider: Der Alkohol greift an der Zellstruktur an, vergrößert die aktive Oberfläche und steigert dadurch die Zellatmung; die Nitrogruppe greift in die Zellatmung ein und wird bei ihrer Steigerung in die giftige Hydroxylamingruppe in einem Maße umgewandelt, dessen Größenordnung daraus hervorgeht, daß die oxydo-reduktiven Zellprozesse durch kleine Mengen Narcotica auf das Vielfache ansteigen.
