

Petroläther-, Benzol- und Methanoleluat werden getrennt aufgefangen und auf das Phenazinderivat verarbeitet. Das Benzoleluat muss die gesamte Tocopherolmenge enthalten. Ist der Petroläther bzw. das Methanoleluat tocopherolhaltig, so war das Oxyd zu schwach bzw. zu stark aktiviert.

Die getrennte Bestimmung von Tocopherol und Tocopheryl-chinon.

Soll das Filtrieren durch Aluminiumoxyd nicht nur zur Vorreinigung des Extraktes dienen, sondern zur getrennten Bestimmung von Tocopherol und Tocopheryl-chinon, so wird nach der Elution des Tocopherols mit 50 cm<sup>3</sup> Benzol noch eine Elution mit 30 cm<sup>3</sup> Methanol zur Elution des Tocopheryl-chinons angeschlossen. Um zu prüfen, ob bei der gewählten Aktivität des Aluminiumoxyds Tocopheryl-chinon nicht durch Benzol eluiert wird, sondern sich quantitativ im Methanoleluat befindet, stellt man sich eine Lösung von Tocopheryl-chinon in Petroläther her, am einfachsten durch Oxydation einer alkoholischen Lösung von Tocopherol mit einer wässrigen Cer(IV)-sulfat-Lösung, Verdünnen mit Wasser und Ausschütteln des Chinons mit Petroläther. Von dieser Lösung trägt man eine bestimmte Menge, entsprechend etwa 50  $\gamma$  Tocopheryl-chinon, auf, eluiert mit 50 cm<sup>3</sup> Benzol und 30 cm<sup>3</sup> Methanol und verarbeitet die Eluate auf das Tocopherol-Phenazinderivat.

Zur ersten Orientierung über die Aktivität des Aluminiumoxyds genügt es, die Tocopherol- bzw. Tocopheryl-chinon enthaltenden Eluate nach der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Methode bzw. der *Furter-Meyer*-Reaktion zu untersuchen; man hat dann aber etwa 200  $\gamma$  Tocopherol bzw. 1—2 mg Tocopheryl-chinon anzusetzen.

Das Abdampfen des Lösungsmittels bei den auf Tocopherol zu untersuchenden Extrakten bzw. Eluaten, insbesondere des Benzols, hat unter vermindertem Druck unter Vermeidung starken Erhitzens zu geschehen; auf die Verwendung eines inerten Gases kann dagegen verzichtet werden.

Wissenschaftliche Laboratorien der  
*F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.* Basel.

## 5. Die Glykogen-Phosphorylierung durch Muskel und Leber bei normalen und adrenaletomierten Tieren

von R. Doetsch.

(28. XI. 44.)

Den ersten direkten Nachweis für die Störung der Phosphorylierung des Glykogens bei nebennierenlosen, adynamen Tieren hat *Schumann*<sup>1)</sup> an Ratten erbracht. Er untersuchte in einem Ansatz aus Muskelbrei, Glykogen und Natriumfluorid die Abnahme des freien Phosphates bzw. die Zunahme der veresterten Phosphorsäure. Dieser Prozess war beim nebennierenlosen adynamen Tier deutlich vermindert. *Verzár* und *Montigel*<sup>2-7)</sup> haben diesen Befund an Muskeln von Ratten, Katzen und Hunden erweitert. Sie konnten

<sup>1)</sup> *Schumann, H.*, *Pflüger's Arch.* **243**, 686 (1940).

<sup>2)</sup> *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Schweiz. med. Wschr.* **71**, 101 (1941).

<sup>3)</sup> *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Verh. Schweiz. Physiologen*, Jan. 1942.

<sup>4)</sup> *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Helv.* **25**, 9 (1942).

<sup>5)</sup> *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Helv.* **25**, 22 (1942).

<sup>6)</sup> *Montigel, C.*, *Helv.* **26**, 883 (1943).

<sup>7)</sup> *Verzár, F.* und *C. Montigel*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **1**, 115 (1943).

zeigen, dass die Geschwindigkeit der Phosphorylierung bei nebennierenlosen Tieren abnimmt und bei mit Desoxy-corticosteron kompensierten Tieren wieder die gleiche Grösse hat wie bei normalen. Insbesondere gelang ihnen aber auch der Nachweis, dass *in vitro* Desoxy-corticosteron auf Muskelbrei adrenalektomierter adynamer Tiere die gleiche Wirkung entfaltet, d. h. die Geschwindigkeit der Phosphorylierung erhöht.

Bereits in ihrer ersten Arbeit haben *Verzár* und *Montigel* zu Befunden von *Helve*<sup>1)2)</sup> Stellung genommen. Dieser hatte bei Untersuchung der gleichen Frage keine Unterschiede zwischen normalen und nebennierenlosen Tieren beobachtet. *Verzár* und *Montigel* zeigten jedoch, dass während der langen Versuchzeiten, die *Helve* benützt hat, die Unterschiede zwischen normalen und adrenalektomierten Tieren verwischt werden, auch wenn sie in kürzeren Zeiten deutlich vorhanden sind. *Helve*<sup>3)</sup> hat nun die Frage neuerdings wieder aufgegriffen. Er bestätigt die Beobachtung von *Verzár* und *Montigel* über die schnelle Erreichung des Maximums der Veresterung bei 37°. Seine Versuche sind alle bei dieser Temperatur und teils mit Natriumhydrogencarbonat, teils mit Phosphatpuffer ausgeführt worden. Er findet auch jetzt keinen Unterschied zwischen normalen und adrenalektomierten Tieren. Seine Versuche mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer zeigen, dass bei 37° in 20 Min. das Maximum der Veresterung nahezu erreicht ist. Es ist nun sehr wahrscheinlich, dass auch er einen Unterschied zwischen normalen und adrenalektomierten Tieren gefunden hätte, wenn er nach noch kürzeren Zeiten untersucht oder aber bei Zimmertemperatur gearbeitet hätte. Ferner sind seine Versuche mit Phosphatpuffer nicht zum Vergleich mit unseren heranziehbar, denn Zusatz von Phosphat beeinflusst weitgehend die Geschwindigkeit der Phosphorylierung<sup>4)</sup>. Es verbleiben somit zum Vergleich nur die in seiner Tabelle IV enthaltenen 4 scheinoperierten und 8 adrenalektomierten Tiere. Andere sind nur in längeren Perioden untersucht.

In Tabelle II und III hat *Helve* die Gewichte und Gewichtsabnahmen seiner Versuchstiere angegeben. Mit sehr wenigen Ausnahmen liegen die Tiergewichte alle über 250 g. Es ist unzweckmässig, für derartige Versuche so schwere Tiere zu benützen, da ausgewachsene Tiere oft akzessorische Nebennieren haben. Wir wissen von unserem Tiermaterial, dass das in etwa 10% der Fälle vorkommt und dass solche Tiere auch ohne Nebennieren am Leben bleiben.

Aus den Angaben *Helve*'s lassen sich ferner die Gewichtsverluste der operierten Tiere berechnen. Diese schwanken zwischen 0,1%

<sup>1)</sup> *Helve, O.*, Suomen Kemist. (Acta Chem. Fenn.) B. 10, 2 (1937).

<sup>2)</sup> *Helve, O.*, Bioch. Z. 306, 343 (1940).

<sup>3)</sup> *Helve, O.*, Acta physiol. Scand. 7, 108 (1943).

<sup>4)</sup> *Montigel, C.*, Helv. 26, 833 (1943).

und 15 % und liegen meist unter 10 %. So geringe Gewichtsverluste haben wir bei unsern adrenalektomierten Tieren, falls sie wirklich adynam waren, selten gesehen. Wir wagen die Behauptung, dass Tiere, die einen so kleinen Gewichtsverlust aufweisen, nicht adynam gewesen sein können. Leider gibt *Helve* nicht an, wie er auf Adynamie geprüft hat.

Wir haben keinen Grund, an der einwandfreien Operationstechnik von *Helve* zu zweifeln, die er in seiner ersten Arbeit ausführlich beschrieben hat. Wir möchten aber doch bemerken, dass bei Untersuchungen über die Nebennieren, nach Erfahrungen, die uns bekannt geworden sind, die Exstirpation oft nicht einwandfrei durchgeführt wird. Zertrümmern der Nebennieren kann zu Regeneration aus den Bruchstücken führen und muss deshalb unbedingt vermieden werden. Es dürfen die Nebennieren deshalb nicht Stück für Stück herausgenommen werden. Wir exstirpieren durch einen Schnitt in der Lumbalgegend mit dem elektrischen Messer, ergreifen die Nebennieren mit einer Spezialpinzette mit Öse und durchtrennen den Stiel ohne Unterbindung ebenfalls mit dem elektrischen Messer und möglichst weit von der Nebenniere entfernt.

Es schien uns deshalb von Wichtigkeit, diese Versuche an einer grossen Reihe von normalen und adrenalektomierten Tieren zu wiederholen. Ferner sollten verschiedene Kontrollen zeigen, ob möglicherweise das allfällige Hungern oder der Temperatursturz der Tiere in der Krise nach Adrenalektomie die Ursache der verminderten Phosphorylierung sein könnte. Ferner wurden noch Versuche über Glykogen-Phosphorylierung der Leber angestellt, die wir bisher nicht untersucht hatten.

#### Methodik.

Zu unsern Versuchen benützten wir die gleiche Methodik, die *Schumann*<sup>1)</sup> sowie *Verzár* und *Montigel*<sup>2)</sup> beschrieben haben. Unsere Versuche sind bei Zimmertemperatur (18—22° C) gemacht worden, weil dann der Phosphorylierungsprozess langsamer verläuft und dadurch die Unterschiede deutlicher werden.

Zu den Versuchen wurden ausschliesslich männliche weisse Ratten von 70—200 g aus der Zucht des Institutes verwendet.

#### Versuche.

##### I.

Versuche an Muskeln von 32 normalen Tieren ergaben die in Tabelle I zusammengestellten Resultate. In dieser und den nächsten Tabellen wird zuerst der direkt bestimmbare P in mg pro 100 g Muskulatur in den verschiedenen Inkubationszeiten angegeben. Die Grösse der Phosphorylierung wird ausgedrückt in % P, die nach 15 Min. bzw. 30 Min. verestert sind. Wir bestimmen also zuerst in Punkt 0 den gesamten direkt bestimmbaren, also nicht veresterten Phosphor und bestimmen dann weiter, wieviel

<sup>1)</sup> *Schumann, H., Pflüger's Arch.* **243**, 686 (1940).

<sup>2)</sup> *Montigel, C. und F. Verzár, Helv.* **25**, 9 (1942).

weniger in gegebenen Zeiten direkt bestimmbar ist. Die Differenz gegenüber dem ursprünglich bestimmten freien Phosphor ist der veresterte Phosphor.

Wie die Tabelle I zeigt, ergibt sich als Mittel der 32 Versuche nach 15 Min. 41,6% und nach 30 Min. 59,4% esterifizierter Phosphor. Diese Zahlen entsprechen denen, die früher von andern angegeben wurden<sup>1-6)</sup>.

**Tabelle I.**  
Normaltiere ♂ 70—200 g. Versuchstemperatur 18—22°.

No.	0'	7'	15'	30'	60'	Ester P	Ester P	Ester P	Ester P
	mg	mg	mg	mg	mg	15'	30'	15'	30'
						mg	mg	%	%
1	78	45	31	26	19	47	52	60	66,8
2	70	—	47	37	29	23	33	32,8	47,1
3	81	—	—	19	—	—	51	—	62,9
4	74	58	39	29	29	35	45	47,3	60,7
5	94	63	50	39	26	44	68	46,8	72,3
6	84	53	47	39	26	37	45	44,0	53,6
7	92	53	45	29	21	47	63	51,0	68,4
8	71	47	29	19	13	42	52	59,2	73,2
9	77	58	40	29	21	37	48	48,0	62,4
10	60	37	29	21	17	31	39	51,6	65,0
11	65	52	43	26	23	22	39	33,6	60,0
12	55	31	16	10	—	39	45	71,0	81,8
13	92	71	55	32	32	37	60	40,0	65,0
14	66	50	40	40	34	26	26	39,4	39,4
15	79	71	45	24	13	34	55	43,0	69,6
16	71	71	50	40	31	21	31	29,6	43,6
17	89	71	45	34	29	44	65	49,4	73,0
18	58	42	34	26	23	24	32	41,2	55,2
19	68	32	24	13	—	44	55	64,6	81,0
20	57	52	44	31	23	13	26	20,8	45,5
21	57	37	34	29	21	23	28	40,4	49,1
22	68	52	34	26	18	34	42	50,0	61,7
23	85	—	62	50	—	23	35	27,0	41,2
24	94	—	—	24	—	—	70	—	74,5
25	91	—	—	26	—	—	65	—	71,4
26	106	—	—	32	—	—	74	—	69,9
27	120	—	—	62	—	—	58	—	48,3
28	72	53	45	33	29	27	39	37,5	54,1
29	71	63	47	41	32	24	30	33,8	42,2
30	79	64	52	42	21	27	37	34,2	46,8
31	91	68	59	—	26	32	—	35,2	—
32	85	68	64	—	50	19	—	22,3	—
Mittelwert								41,6	59,4

<sup>1)</sup> Schumann, H., *Pflüger's Arch.* **243**, 686 (1940).

<sup>2)</sup> Montigel, C. und F. Verzár, *Schweiz. med. Wschr.* **71**, 101 (1941).

<sup>3)</sup> Montigel, C. und F. Verzár, *Verh. Schweiz. Physiologen*, Jan. 1942.

<sup>4)</sup> Montigel, C. und F. Verzár, *Helv.* **25**, 9 (1942).

<sup>5)</sup> Montigel, C. und F. Verzár, *Helv.* **25**, 22 (1942).

<sup>6)</sup> Montigel, C., *Helv.* **26**, 883 (1943).

Tabelle II.  
Adrenalektomierte Tiere ♂ 70—200 g.  
Versuchstemperatur 18—22°.

No.	0'	7'	15'	30'	60'	Ester P	Ester P	Ester P	Ester P
	mg	mg	mg	mg	mg	15' mg	30' mg	15' %	30' %
100	87	71	66	66	40	21	21	24,1	24,1
101	63	63	52	50	50	11	13	17,4	20,6
102	89	79	76	66	47	13	23	14,6	25,8
103	95	85	68	65	79	27	30	28,4	31,6
104	68	60	60	50	50	8	18	11,7	26,4
105	84	76	71	71	—	13	13	15,4	15,4
106	100	—	89	—	60	11	—	11,0	—
107	84	73	66	63	—	18	21	21,4	25,0
108	105	100	92	68	60	13	37	12,4	35,2
109	66	60	60	52	40	6	14	9,0	21,2
110	81	73	—	53	—	—	28	—	34,6
111	89	81	71	50	34	18	39	20,2	43,8
112	89	84	84	76	—	5	13	5,6	14,6
113	92	79	71	66	—	21	26	22,8	28,2
114	70	62	47	39	—	23	31	32,8	44,2
115	93	70	57	62	—	36	31	38,7	33,3
116	109	—	70	50	—	39	59	35,7	54,1
117	94	—	—	42	—	—	52	—	44,6
118	96	—	47	29	—	49	67	51,0	69,7
119	75	52	29	13	—	46	62	61,3	82,6
120	122	122	101	34	—	21	88	17,2	72,1
121	135	86	76	47	—	59	88	43,6	65,1
122	114	—	—	42	—	—	72	—	63,1
123	125	—	—	52	—	—	73	—	41,6
124	125	—	—	50	—	—	75	—	60,0
125	125	—	98	—	—	27	—	21,6	—
126	75	65	62	39	—	13	36	17,6	48,0
127	117	—	93	57	—	24	60	22,5	51,2
128	130	—	91	65	—	39	65	30,0	50,0
129	107	—	81	60	—	26	47	24,3	43,9
130	96	—	—	57	—	—	39	—	59,4
131	78	—	68	55	—	10	23	12,8	29,4
132	98	—	62	34	—	36	64	36,7	65,0
133	117	94	75	50	37	42	67	39,5	57,1
134	91	—	—	55	—	—	36	—	39,4
135	83	—	—	70	—	—	13	—	15,6
136	75	65	62	39	—	13	36	17,6	48,0
137	91	85	72	—	49	19	—	20,8	—
138	92	79	67	—	50	25	—	54,3	—
139	86	67	59	—	52	27	—	31,4	—
140	94	61	49	—	32	45	—	47,8	—
141	104	—	62	42	—	42	62	40,3	59,6

Tabelle II (Fortsetzung).

No.	0'	7'	15'	30'	60'	Ester P	Ester P	Ester P	Ester P
	mg	mg	mg	mg	mg	15' mg	30' mg	15' %	30' %
142	104	—	65	42	—	39	62	37,4	59,6
143	182	—	94	73	—	88	109	48,3	60,0
144	85	—	59	46	—	26	39	30,6	45,8
145	46	—	29	19	—	17	27	37,0	58,7
146	117	94	75	50	37	42	67	35,9	57,2
147	92	85	79	—	71	13	—	14,1	—
148	83	67	—	—	58	16	—	19,3	—
149	89	81	60	—	36	29	—	32,5	—
150	89	81	71	70	34	18	19	20,2	21,3
151	91	60	37	21	—	54	70	59,2	76,8
152	114	—	45	34	—	69	80	—	51,7
153	109	—	47	37	—	62	72	56,9	66,0
154	112	88	57	—	—	55	—	—	49,0
155	143	—	112	—	—	31	—	—	21,6
156	88	—	70	62	—	18	26	20,4	29,5
157	87	71	66	66	40	21	21	24,0	24,0
Mittelwert								28,4	44,1

II.

Es wurden an 58 adrenaletomierten adynamen Tieren Versuche ausgeführt. 47 sind in 15 Min., 48 (z. T. andere Tiere) in 30 Min.-Perioden untersucht. Die Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt. Besonders hervorgehoben sei, dass die nebennierenlosen Tiere nur dann zum Versuch verwendet wurden, wenn sie deutlich adynam waren. Dies pflegt zwischen dem 5. und 10. Tag nach der Adrenaletomie einzutreten. Die Prüfung auf Adynamie geschieht am einfachsten so, dass man die Tiere auf ein vertikales Drahtgitter stellt. Normale Tiere klettern an diesem hinauf, adynamie Tiere fallen nach kurzer Zeit herab. Jedoch gibt auch diese Prüfung nicht immer eine klare Entscheidung, und zur Beurteilung des Zustandes der Tiere muss auch die Gewichtsabnahme herangezogen werden. Unsere adynamen Tiere zeigen nach der Adrenaletomie einen durchschnittlichen Gewichtsverlust von 18,5% mit einer Schwankung zwischen 8,7% bis 31%.

Die in der Tabelle II zusammengestellten Befunde ergeben einen Mittelwert von 28,4% nach 15 Min. bzw. 44,1% nach 30 Min. esterifizierten Phosphor. Diese Werte liegen sehr wesentlich unterhalb denen von normalen Tieren.

III.

Es könnte der Einwand erhoben werden, dass die Verlangsamung der Phosphorylierung nach Adrenaletomie eine Folge des Hungerns dieser Tiere sei. Denn tatsächlich fressen diese besonders in der Krise weniger oder gar nicht.

Um den Einfluss des Hungerns zu kontrollieren, haben wir Kontrollversuche an 5 normalen hungernden Ratten gemacht. Die Nahrungskarenz bei beliebiger Wasseraufnahme wurde auf 5 Tage beschränkt, weil nebennierenlose Tiere höchstens so lange, meist viel kürzere Zeit, mit der Nahrungsaufnahme aussetzen. Der Gewichtsverlust dieser normalen hungernden Tiere betrug im Mittel 14,2%, mit einer Schwankung von 13% bis 15,6%.

Die Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt. Die Phosphorylierung war, wie der Mittelwert von 54,0% bzw. 66,5% nach 15 bzw. 30 Min. zeigt, nicht vermindert. Der Mittelwert liegt im Gegenteil sogar etwas höher als bei normalen Tieren, was jedoch in Anbetracht der nur geringen Versuchszahl keine weitere Bedeutung hat.

**Tabelle III.**  
Hungertiere.  
Fünf Tage Nahrungsentzug.

No.	0'	7'	15'	30'	Ester P 15'	Ester P 30'	Ester P 15'	Ester P 30'
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	%	%
500	90	52	39	31	51	59	56,7	65,5
501	93	75	47	29	46	64	49,5	68,7
502	88	60	47	26	41	62	46,6	70,4
503	93	60	39	26	54	67	53,0	72,0
504	96	55	39	23	57	73	59,4	76,0
Mittelwert							54,0	66,5

IV.

Es konnte ferner auch daran gedacht werden, dass die verlangsamte Phosphorylierung eine sekundäre Folge der Abkühlung der Tiere ist. Diese tritt bei niedriger Umgebungstemperatur bei adrenaletomierten Tieren besonders leicht ein.

Wir haben deshalb 22 normale Ratten verschieden lange Zeit bei einer Umgebungstemperatur von + 4° C. im Kühlschrank gehalten. In der Tabelle IV ist die Zeit angegeben, während welcher die Tiere in der Kälte waren („Kälte-dauer h“), sowie die sogleich danach direkt vor der Tötung gemessene Temperatur im Rektum („R.T.“). Letztere war nicht gesunken. Die Wärmeregulation funktionierte also trotz vieltägigem Aufenthalt bei dieser Temperatur normal.

Die gefundenen Mittelwerte der Phosphorylierung von 42,8% und 54,3% nach 15 bzw. 30 Min. entsprechen durchaus denjenigen, die wir an normalen Tieren in Tabelle I gefunden haben. Die Phosphorylierung wird also durch die Abkühlung nicht vermindert.

Allerdings ist, wie die Tabelle IV zeigt, in einem Drittel der Fälle von den Muskeln der gekühlten Tiere weniger phosphoryliert worden (Nrn. 73, 77, 81, 83, 86, 87, 89). Da aber in Zweidrittelmehrzahl die genau so behandelten Tiere normal phosphoryliert haben, so können wir diese Fälle nur als Zufälle buchen, deren Ursache nicht klar ist und weiter untersucht werden soll.

V.

Wie bereits einleitend erwähnt, haben wir unsere Untersuchungen auch auf die Leber ausgedehnt. Über die Phosphorylierung des Glykogens in der Leber von normalen Tieren liegt eine ausführliche Untersuchung von *Ostern* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> vor. Auch in der Leber wird das Glykogen über phosphorylierte Zwischenstufen abgebaut, allerdings nicht in derselben Weise, wie vom quergestreiften Muskel. Nach den Angaben von *Ostern* hemmt in der Leber NaF den weitem Abbau des intermediär entstandenen *Emlden*-Esters. Es war von grossem Interesse, zu untersuchen, ob die Phosphorylierung des Glykogens auch mit Leberbrei adrenaletomierter adynamer Tiere vermindert ist, gegenüber dem von normalen.

<sup>1)</sup> *Ostern, P., Herbert, D. und Holmes, E., Biochem. J. 33, 1858 (1939).*

Tabelle IV.

Kältetiere.

Umgebungstemperatur 4° C.

No.	Kälte- dauer h	R.T.	0' mg	15' mg	30' mg	Ester P 15' mg	Ester P 30' mg	Ester P 15' %	Ester P 30 %
70	3	37 <sup>7</sup>	52	23	23	29	29	55,7	55,7
71	3	38 <sup>2</sup>	81	39	24	42	57	51,8	70,4
72	4	37 <sup>9</sup>	81	40	26	41	55	50,6	67,6
73	6	38 <sup>2</sup>	73	42	29	31	44	42,5	39,6
74	15	38 <sup>1</sup>	62	31	18	31	44	50,0	71,0
75	15	38 <sup>5</sup>	76	42	29	34	47	44,7	61,7
76	15	38 <sup>2</sup>	78	34	26	44	52	56,3	66,6
77	24	37 <sup>3</sup>	60	52	47	8	13	13,3	21,6
78	24	37 <sup>8</sup>	62	—	26	—	36	—	58,0
79	24	37 <sup>8</sup>	83	55	34	28	49	33,7	59,0
80	26	38 <sup>1</sup>	78	52	26	26	52	33,3	66,6
81	27	38 <sup>2</sup>	62	42	42	20	20	32,2	32,2
82	70	37 <sup>2</sup>	83	52	32	31	51	37,3	61,4
83	72	—	91	—	60	—	31	—	34,1
84	76	37 <sup>7</sup>	75	39	34	36	41	48,0	54,6
85	96	37 <sup>6</sup>	52	—	29	—	23	—	44,2
86	96	38 <sup>0</sup>	55	—	34	—	21	—	38,2
87	96	37 <sup>9</sup>	34	—	31	—	3	—	8,8
88	96	38 <sup>1</sup>	42	19	19	23	23	54,7	44,7
89	144	37 <sup>8</sup>	55	52	26	3	29	5,4	52,7
90	192	37 <sup>8</sup>	76	24	19	52	57	68,3	75,0
91	336	38 <sup>1</sup>	65	26	18	39	47	60,0	72,2
Mittelwert								42,8	54,3

Bezüglich der Methodik dieser Versuche hielten wir uns an die Angaben von *Ostern* und Mitarbeitern. Der Versuchsansatz ist fast identisch mit dem, den wir für unsere Muskelversuche benützen. Er besteht aus 1 cm<sup>3</sup> 2-proz. Glykogen-Lösung, 1 cm<sup>3</sup> 0.01-m. NaF, 1 cm<sup>3</sup> Phosphat-Puffer nach *Sørensen* 0.0111-m., p<sub>H</sub> 7,17 und 0,5 g Leberbrei. Letzterer wurde durch Zerreiben hergestellt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde mit 6 cm<sup>3</sup> 7-proz. Trichloressigsäure enteiwisst und der freie Phosphor bestimmt.

In Tabelle V sind 18 Versuche mit Lebern von normalen Ratten zusammengestellt. Sie ergeben eine Phosphorylierung von 26,2% bzw. 33,8% nach 15 bzw. 30 Minuten.

In Tabelle VI sind Versuche an 16 adrenaletomierten adynamen Tieren zusammengestellt. Diese ergeben im Mittel nur 7,8% und 15,0% Phosphorylierung, also wesentlich weniger als bei den den Normaltieren gefunden wurde.

### Diskussion.

In der Tabelle VII sind die Mittelwerte aus den vorangehenden Tabellen zusammengestellt. Es ist die Zunahme des veresterten P in % des Ausgangswertes nach 15 und 30 Min. angegeben. Schon die Beobachtung dieser Werte allein zeigt, dass Muskel ebenso wie Leber

**Tabelle V.**  
Leber. Normale Ratten ♂.

No.	0' mg	15' mg	30' mg	Ester P 15' mg	Ester P 30' mg	Ester P 15' %	Ester P 30' %
300	117	75	65	42	52	35,8	44,4
301	122	83	83	39	39	31,9	31,9
302	117	—	70	—	47	—	40,0
303	109	75	60	34	49	31,2	45,0
304	114	83	70	31	44	27,1	38,6
305	125	99	86	26	39	20,8	31,2
306	130	86	86	44	44	33,8	33,8
307	117	83	83	34	34	29,0	29,0
308	135	117	117	18	18	13,3	13,3
309	120	80	62	40	58	33,3	48,4
310	130	88	88	42	42	32,3	32,3
311	122	104	102	18	20	14,7	16,4
312	150	118	96	32	54	21,3	36,0
313	197	179	143	18	54	9,1	27,4
314	195	145	143	50	52	25,6	26,6
315	180	146	—	34	—	18,9	—
316	117	60	47	57	70	48,6	59,8
317	127	93	88	34	39	26,7	30,7
318	168	136	128	32	40	19,0	23,7
Mittelwert						26,2	33,8

**Tabelle VI.**  
Leber. Adrenalektomierte adynome Ratten.

No.	0' mg	15' mg	30' mg	Ester P 15' mg	Ester P 30' mg	Ester P 15' %	Ester P 30' %
116	148	146	118	2	30	1,3	20,2
200	124	110	78	14	46	11,3	37,1
118	136	132	120	4	16	2,9	11,7
201	158	140	130	18	28	11,4	17,4
119	150	120	118	30	32	20,0	21,3
120	156	144	120	12	36	7,7	23,0
121	158	146	140	12	18	7,6	11,4
320	214	190	181	24	33	11,2	15,4
133	194	194	194	0	0	0	0
122	168	160	156	8	12	4,7	7,1
123	160	156	150	4	10	2,5	6,2
125	168	138	130	30	38	17,8	22,6
152	234	210	194	24	40	10,2	17,1
153	220	208	176	12	44	5,4	20,0
155	246	234	220	12	26	4,8	10,5
156	195	182	158	13	37	6,6	18,9
Mittelwert						7,8	15,0

adrenalektomierter Tiere wesentlich langsamer phosphorylieren als die von normalen. Ferner geht hervor, dass weder Hungern noch Abkühlung die Herabsetzung der Phosphorylierungen erklärt, denn beides war in den entsprechenden Kontrollserien wirkungslos.

**Tabelle VII.**

Mittelwerte der Tabellen I—VI.

Zunahme des veresterten P in % des Ausgangswertes nach

Muskel von	15'	30'
normalen Tieren . . . . .	41,6	59,4
adrenalektomierten adynamen Tieren	28,4	44,1
hungrnden Tieren . . . . .	54,0	66,5
Tieren bei 4° C . . . . .	42,8	54,3
Leber von		
normalen Tieren . . . . .	26,2	33,8
adrenalektomierten adynamen Tieren	7,8	15,0

Die Versuchsreihen mit Muskel sowie mit Leber normaler und adynamer Tiere wurden statistisch ausgewertet. Die Reihen wurden auf Signifikanz der Differenz der Mittelwerte berechnet. Hierbei wurde das Verfahren zur statistischen Auswertung zweier vergleichbarer, voneinander unabhängiger Reihen verwendet (*Koller*<sup>1)</sup>). Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII zusammengestellt. Es bedeutet:

- M = arithmetisches Mittel der Versuchsreihe
- n = Anzahl der Beobachtungen
- f = Abweichung (Fehler) der Einzelbeobachtung vom arithmetischem Mittel

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum f^2}{n(n-1)}} = \text{mittlere Abweichung (mittlerer Fehler) des Mittelwertes}$$

Der Quotient  $t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\sigma m_1^2 + \sigma m_2^2}}$  lässt erkennen, ob die Abweichung der Mittel-

werte zweier Reihen nur im Zufallsbereich liegt oder versuchsbedingt, d. h. signifikant ist. Eine Signifikanz der Abweichung der Mittelwerte ist nur dann gegeben, wenn das berechnete t grösser ist als der „Grenzwert t“, bei einer bestimmten Überschreitungswahrscheinlichkeit. Wir benützten dazu den Wert t bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $\epsilon = 0,27\%$  und der gegebenen Anzahl der Beobachtungen (*Koller*<sup>1)</sup>: Tabelle S. 37).

Aus der Tabelle VIII ergibt sich, dass t in allen 4 Versuchsreihen grösser ist als der Grenzwert t. Es besteht also ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsreihen mit normalen und nebenierenlosen Tieren, sowohl nach 15 Min. als nach 30 Min. und ebenso für Muskeln wie für Leber.

Das Resultat, dass die Phosphorylierung des Glykogens bei adrenalektomierten adynamen Tieren vermindert ist, ist demnach auch statistisch bewiesen.

<sup>1)</sup> *Koller, S.*, Graphische Tabellen zur Beurteilung statistischer Zahlen, Dresden/Leipzig 1940.

Tabelle VIII.

Muskel von	Zeit	M	n	$\sigma_m$	t	Grenzwert t <sup>1)</sup>
normalen Tieren . . . . .	15'	41,6	27	2,4	} 4,1	3,1
adrenalektomierten adynamen Tieren	15'	28,4	47	2,14		
normalen Tieren . . . . .	30'	59,4	30	2,2	} 4,5	3,1
adrenalektomierten adynamen Tieren	30'	44,1	48	2,6		
Leber von						
normalen Tieren . . . . .	15'	26,2	18	2,2	} 7,3	3,24
adrenalektomierten adynamen Tieren	15'	7,8	16	1,3		
normalen Tieren . . . . .	30'	33,8	18	2,6	} 5,8	3,24
adrenalektomierten adynamen Tieren	30'	15,0	16	1,95		

Es sei hier noch besonders erwähnt, dass ausser den 58 adrenalektomierten Tieren, über welche hier berichtet wird, in den früheren Arbeiten von *Verzár* und *Montigel*<sup>2)</sup> diese Abnahme der Phosphorylierung bei weiteren 53 Ratten, 8 Katzen und 2 Hunden nachgewiesen wurde, denen ebensoviele Normaltiere gegenüberstehen. Das zur Verfügung stehende Versuchsmaterial ist so gross, dass die Abnahme der Phosphorylierung bei nebennierenlosen, adynamen Tieren als bewiesen betrachtet werden kann.

Zusammenfassung.

1. Die Phosphorylierung von Glykogen durch Muskeln normaler Tiere beträgt im Mittel von 32 Versuchen nach 15 Min. bzw. 30 Min. 41,6% bzw. 59,4% des freien Phosphors.
2. Bei 58 adrenalektomierten und adynamen Tieren sind die entsprechenden Zahlen 28,4 bzw. 44,1%.
3. Die statistische Auswertung zeigt, dass diese Differenz signifikant ist. Damit ist bewiesen, wie auch früher schon gezeigt wurde, dass bei adrenalektomierten Tieren die Glykogenphosphorylierung abnimmt.
4. Auch die Leber von adrenalektomierten Tieren phosphoryliert weniger Glykogen als die von normalen. Bei normalen Tieren wurde 26,2% bzw. 33,8% und bei adrenalektomierten adynamen 7,8% bzw. 15,0% gefunden. Auch diese Unterschiede sind statistisch gesichert.
5. Kontrollversuche an normalen Hungertieren zeigen keine Abnahme der Phosphorylierung.
6. Kontrollversuche an gekühlten Tieren zeigen ebenfalls keine Abnahme der Phosphorylierung.

Basel, Physiologisches Institut der Universität.

<sup>1)</sup> Bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $\epsilon = 0,27\%$  und der gegebenen Anzahl der Beobachtungen.

<sup>2)</sup> Siehe Fussnoten 2—7 auf Seite 31.