

# Verdauungsphysiologische Studien an Holothurien

<https://hdl.handle.net/1874/285852>



Apr 192, 1928

**VERDAUUNGSPHYSIO-  
LOGISCHE STUDIEN  
AN HOLOTHURIEN**

**H. A. P. C. OOMEN**

G  
s  
cht  
6  
n















**VERDAUUNGSPHYSIOLOGISCHE  
STUDIEN AN HOLOTHURIEN**

3969 2607

A qu 192, 1926

# VERDAUUNGSPHYSIOLOGISCHE STUDIEN AN HOLOTHURIEN

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD  
VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN  
DE RIJSUNIVERSITEIT TE UTRECHT OP GEZAG VAN  
DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. J. PH. SUYLING,  
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGE-  
LEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAA  
DIER RIJSUNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN  
VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE  
TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 3 MEI 1926, DES  
NAMIDDAGS TEN VIER URE DOOR

**HENRICUS ADRIANUS PETRUS CANISIUS OOMEN**

GEBOREN TE HEES BIJ NIJMEGEN







AAN DE NAGEDACHTENIS  
VAN MIJN VADER



## VOORWOORD

Gekomen aan het einde van mijn biologische studie in de schutse van de Alma Mater, herdenk ik met groote erkentelijkheid allen die mij hielpen dit deel van mijn levensweg voorspoedig af te leggen. En in mijn geest bouw ik hen een monument van dankbaarheid, voor de moeiten die ze aan mij ten koste legden, dat daar mijn geheele leven zal blijven bestaan.

De hoogleeraren en lectoren in de wis-, natuur-, schei- en aardkunde hebben me de fundamenten er toe doen leggen.

Hooggeleerde NIERSTRASZ, WENT, PULLE en RUTTEN, gij deedt me er het voetstuk van bouwen. Gij leerdet mij beurtelings wetenschappelijke nauwgezetheid in theorie en praktijk, maar ook de waarde van de wetenschap voor den geest en voor het leven.

Dat ik tenslotte U, Hooggeleerde JORDAN op dit voetstuk heb geplaatst, dankt gij aan de zeer bekoorlijke wijze waarop gij Uw leerlingen weet in te wijden in de geheimen van het levende organisme. Gij hebt mij langs verschillende wegen getoond, dat het leven zelf meer dan welke andere eigenschap ook de essentie is van het levende wezen en dat de kinetische en meerdimensionale beschouwing van plant en dier belangrijker is dan elke andere. Naast zooveel ander goeds stel ik het in U op zeer hoogen prijs dat gij Uw promovendi een zoo groote vrijheid schenkt, ze dwingt hun eigen krachten te beproeven en uit te buiten en ze opvoedt tot groote zelfstandigheid.

Mijn bijzondere dank gaat thans ook uit naar hen die bijdroegen tot het welslagen van dit proefschrift. Het heeft zich ontwikkeld in de physiologische afdeeling van het Zoologische Station te Napels. Ik hoop dat het geen onwaardige spruit moge zijn van deze met zooveel zorg en kunde toebereide en onderhouden bodem. Den directeur Prof. R. DOHRN ben ik tot hartelijken dank verplicht voor de werkgelegenheid die hij mij



bood. Verder ook de St. Radboudstichting in Utrecht die de financieele bezwaren van het werken in den vreemde aanmerkelijk verlicht heeft.

Dr. E. JOEL te Berlijn getroostte zich vele moeite om de taal waarin het geschreven was te verbeteren. Daarvoor en voor zijn raadgevingen en behulpzaamheid wete hij zich nogmaals van mijn hartelijken dank overtuigd.

Ik mag ook niet vergeten hier mijn dank te betuigen aan Prof. W. E. RINGER die me menigmaal in technische en theoretische moeilijkheden hielp en aan mijn vriend VAN DER HEYDE die niet karig was met kritische opmerkingen.

1

# Verdaunungsphysiologische Studien an Holothurien.

von H. A. P. C. OOMEN.  
(UTRECHT, Holland.)

---

*Estratto dalle « Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli »*  
Vol. VII, 1926.





# Verdaunungsphysiologische Studien an Holothurien.

von H. A. P. C. OOMEN.

(UTRECHT, Holland.)

Mit 10 Textabbildungen, und 25 Tabellen.

(Eingegangen am 22 Dezember 1925).

## Inhaltsübersicht.

Einleitung. . . . .	Seite	3
I. Biologie. Nahrungsaufnahme. Die Nahrung. . . . .	»	5
II. Der Darmtrakt und seine Umgebung. . . . .	»	9
A. Anatomischer Bau . . . . .	»	»
B. Histologischer Bau . . . . .	»	13
C. Die Amöbocyten und die Sekretion. . . . .	»	19
III. Die Verdauungsflüssigkeit . . . . .	»	22
IV. Die Verdauungsenzyme . . . . .	»	31
A. Die Proteasen . . . . .	»	32
B. Die Carbohydrasen. . . . .	»	47
C. Die Lipasen . . . . .	»	56
V. Permeabilität und Resorption . . . . .	»	57
A. Permeabilität und Resorption des Darmtraktes unter physiologischen Umständen . . . . .	»	60
1. Versuche mit Chloriden . . . . .	»	61
2. Versuche mit Glucose. . . . .	»	65
3. Versuche mit Harnstoff . . . . .	»	66
4. Versuche mit Farbstoffen . . . . .	»	67
B. Permeabilität unter pathologischen Verhältnissen . . . . .	»	»
C. Die paradoxe Beschaffenheit der lebenden Darmwand . . . . .	»	69
D. Stoffaufnahme aus der Aussenflüssigkeit . . . . .	»	72
Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	»	79
Literaturverzeichnis . . . . .	»	82

## Einleitung.

Die Tiergruppe der Echinodermen ist durch einige bemerkenswerte Besonderheiten gekennzeichnet. Von vergleichend physiologischer Seite ist des öfteren betont worden, dass sie ein beträchtliches Interesse für sich beanspruchen darf. Die diesbezügliche Literatur muss jedoch als sehr lückenhaft und unzureichend bezeichnet werden. Das wird bereits durch die Zurückhal-



tung und Vorsicht illustriert, mit der JORDAN und WINTERSTEIN sie in ihren vergleichend physiologischen Handbüchern behandeln. Deutlicher geht es vielleicht noch hervor aus der in jüngster Zeit erschienenen Schrift von VAN DER HEYDE, dessen Absicht es war, hier « clearing work » zu leisten.

So häufig z. B. Mollusken und Crustaceen als Versuchsobjekte Verwendung finden, so selten wird mit Vertretern der Echinodermen experimentiert, obgleich sich doch diese in grösserer Zahl und leicht zugänglich an jeder Küste vorfinden. Vergeblich sucht man nach Darstellungen, die mehr beweisen als zerstreute Einzeldaten über ihre Lebensvorgänge und so kann man noch gar nicht daran denken, die Zusammengehörigkeit ihrer Organsysteme oder die Physiologie einer einzigen ihrer fünf Klassen auch nur in groben Zügen zu schildern. Am besten sind wir vielleicht noch über die Klasse der Holothurien unterrichtet. Hier muss die Schrift von P. ENRIQUES « Digestione, circolazione e assorbimento nelle oloturie » als klassisch bezeichnet werden. Aber die von ihm inaugurierte Polemik anlässlich COHNHEIMS « Versuche über Resorption, Verdauung und Stoffwechsel von Echinodermen » harrt noch immer ihrer Entscheidung. Auf dieses Gebiet bezieht sich ferner noch die « Wanderzellen-hypothese » von FRENZEL, deren Wichtigkeit manchmal unterschätzt wird, wenn auch eine genauere Nachprüfung niemals vorgenommen wurde. Gerade derartige offene Fragen liessen mir die Verdauungsphysiologie dieser Tiere anziehend erscheinen. Es kommt noch hinzu, dass die anatomischen Verhältnisse relativ übersichtlich sind und, wie erwähnt, die Tiere an geeigneten Stellen massenhaft vorkommen. Was dieses Gebiet als eine gewisse Einheit erscheinen lässt, ist z. B. die ziemlich weitgehende Individualität des Verdauungsstraktes und seiner Adnexe. In diesem Zusammenhang denke man an den eigentümlichen Autotomieprozess des Darmes, ein wohlbekanntes Phänomen für jeden, der mit diesen Tieren zu arbeiten hatte. So ergab sich der Aufgabenkreis dieser Arbeit, die Verdauungsphysiologie der Holothurien etwas eingehender zu studieren, in der Hoffnung, einen Beitrag liefern zu können zum besseren Verständnis ihrer allgemeinen Organisation.



## I. Biologie. — Nahrungsaufnahme. — Die Nahrung.

Die beiden für die Versuche verwendeten eben erwähnten Arten zeigen in ihrer Form und Lebensweise sehr viel Übereinstimmung. *H. stellati* ist gewöhnlich violett-schwarz mit vielen weissen Pünktchen, die durch die Saugnäpfchen der Pedicellarien gebildet werden. Die Grösse ändert sich sehr erheblich mit dem Kontraktionszustand des Hautmuskelschlauches. Grosse Exemplare erreichen in gestrecktem Zustand eine Länge von 30-40 cm. Wie bei der anderen Art scheint man auch hier je nach dem Fundort bald grössere, bald kleinere Exemplare zu fangen. Während man *H. stellati* meist in den oberflächlichen Wasserschichten findet, und sie unterhalb 10 m kaum mehr anzutreffen ist, zieht *H. tubulosa* im allgemeinen mehr die Tiefe vor und ist unterhalb der erwähnten Tiefe die allein vorkommende Art. Sie ist fast stets grösser als die vorige. Unter Umständen werden Längen bis zu 60 cm beobachtet. — Ihre Bauchseite ist schmutzig weiss oder bräunlich grau während die oberen Partien kastanien- bis schokoladenbraun gefärbt sind. Weder durch Untersuchung des Darminhalts noch durch Beobachtungen an den Fundorten haben sich Unterschiede bezüglich der Lebensweise der beiden Arten ergeben, welche grösser wären, als diejenigen, die man auch innerhalb einer Art feststellen kann.

Man trifft die Holothurien fast ausschliesslich auf sandigem Boden oder wenigstens in der Nähe von Sand, immer zwischen, bei oder unter Algenbuscheln (*Posidonia*), deren Anwesenheit unbedingt notwendig zu sein scheint, um ihnen eine ausreichende Menge von Nahrung zu sichern. Man sucht sie vergeblich auf felsigem, sandfreiem Boden. Bei nicht sehr seichtem Wasser muss das Auge eine besondere Übung haben um die Tiere zu bemerken, da sie sich derartig mit Algenstückchen, Sand und Steinchen bedecken, — zumal *H. stellati* — dass man sie kaum erkennen kann. Ich habe niemals beobachten können, dass die Tiere sich vergraben wie viele dendrochirote Arten. Gewöhnlich kriechen sie langsam auf dem Sande umher, und man bemerkt ihre Anwesenheit erst an den wurstförmigen Exkrementen oder an ihrer Gurkengestalt. Dann und wann findet man sie auch in den Algenbüschen selbst oder in Algenrasen, die senkrechte Wände bewachsen.

Dort besteht ihre ganze Beschäftigung darin, dass sie mit ihren vielen Fühlern die Umgebung abtasten, Nahrungsteilchen



sammeln und rythmisch ihr Atemwasser einsaugen und ausspritzen. Andere Handlungen ereignen sich kaum im Laufe ihres Lebens. Seit ihrer Larvenzeit haben sie äusserst wenig Feinde — wahrscheinlich nur grösste Prosobranchier. Ihre sexuellen Aeusserungen sind sehr passiv. Sie leben immer in Nahrungsfülle. Selbst die geringe Romantik des Seesterndaseins, von dem VAN DER HEYDE (S. 79.) schreibt: «Constantly starving and having almost no reserves these animals live from day to day and have to fight for existence,» hat für unsere Holothurien keine Berechtigung.

Bei alledem ist die Beschaffenheit ihrer Nahrung das wichtigste Moment. LUDWIG gibt als solche für Holothurien im allgemeinen an: «Ausser kleineren und grösseren Sand- und Schlammteilchen, die Reste von kleinen Mollusken, Crustaceen, Würmern, Moostierchen, Korallen, Quallen, Foraminiferen, Radiolarien, Diatomeen, seltener von kleinen Fischen.» SEMPER gibt von einer Art (*Phyllophorus mollis* Sel.), an dass sie sich von Pflanzen nährte. Für meine beiden Arten spielt pflanzliche Nahrung sicher keine untergeordnete Rolle. Es sind Omnivoren, in deren Darmkanal man alle möglichen Nahrungsbestandteile aus ihrer Umgebung findet, sofern sie nur in Form kleiner Partikel aufgenommen werden können, hauptsächlich pflanzlicher und tierischer Detritus. Dieser ist mit Sand und kleinen Steinchen vermischt, deren Menge und Grösse erheblichen Änderungen unterworfen sind. Die meisten Tiere beherbergten in ihrem Darmkanal ziemlich homogenen feinen Sand, aber gelegentlich kam auch eine Füllung ausschliesslich mit erbsengrossen Steinchen vor.

Ich weiss nicht, ob bei den von COHNHEIM angegebenen Daten: «21 g Sand aus Holothuriendärmen enthält 8,1 mg N, 40 g Seesand («frisch eingebracht») 2,6 mg N», unter «Seesand» der Sand der Fundorte zu verstehen ist. Jedenfalls sind die Holothurien imstande, aus dem, was sie vorfinden, eine Auswahl zu treffen. Das lehrt schon die Beobachtung an einem Tier, das in Algenbüschen oder in einem Aquarium herumkriecht, wie dies übrigens auch für die dendrochirote Art *Thyone* gilt, von der PEARSE schreibt: «Th. is apparently a rather indiscriminate feeder but sand was unfrequent in the stomach contents and though particles of sand were seen sticking to the tentacles as they entered the mouth, most of them were brought again as the tentacles emerged». Bis zu einem gewissen Grade sind sie in der Lage, Sand von Nahrungsteilchen zu unterscheiden, wobei sie den



Sand, wie ich annehmen möchte, als Auffüllungsmaterial benutzen.

Aus einer Anzahl mikroskopischer Darminhaltsuntersuchungen gewann ich bei meinen Tieren den Eindruck, dass gewöhnlich mindestens ebensoviele pflanzliche wie tierische Reste vorhanden sind. Als Beispiel bringe ich die Aufzählung der bei einem Tier vorgefundenen Nahrungsbestandteile.

(Protokoll vom 20. VII. 1925.). Tier lebte auf sandigem Boden zwischen *Posidonia* und Algenrasen in ungefähr 4 m Tiefe. Kropfinhalt: Ein Stück *Cladophora prolifera*, einige Stückchen abgestorbener *Posidonia* blätter, Teilchen von *Sphacelaria spec.* und *Stypicolon spec.*, einige kleine Crustaceenlarven, Schalenteilchen von Bivalven, Bryozoen-Kolonien, zahlreiche Foraminiferen in zwei Arten, einige Radiolarien, viele Diatomeen, fast kein Sand, nicht näher bestimmbare Detritusreste. Enddarminhalt desselben Tieres: Viele Reste von *Posidonia* blättern mit Bryozoenkolonien, ein Bruchstück von *Stypicolon*, weisse Reste von Kalkalgen, unbestimmbare, entfärbte Algenreste, leere Skelette von kleinen Crustaceen, Schale einer jungen Mytilide, Nadeln aus Spongienskeletten, leere Foraminiferenschälchen, viele, meist farblose Diatomeenschalen, ein paar unverdaute kleine Eier, wenig Sand.

Was die chemische Analyse der Nahrung anbetrifft, möchte ich auf die bereits erwähnten Stickstoffbestimmungen von COHNHEIM verweisen. Weiterhin habe ich selbst den Gehalt an reduzierbaren und reduzierenden Substanzen von Kropf und Enddarm bestimmt.

Bei einer Anzahl frischer Tiere wurde der Inhalt der Kröpfe und der letzten Darmabschnitte gesammelt und 48 Stunden im Trockenschrank getrocknet. Die Trockensubstanz des

Kropfinhaltes wog: 6,145 g.

die des Enddarms: 11,935 g.

Sodann wurden beide Trockensubstanzen mit je 100 ccm 1N. HCl 3 Stunden digeriert, filtriert, mit NaOH neutralisiert und abermals filtriert. Im Filtrat wurde die Zuckerbestimmung nach SCHOORL vorgenommen. Als Glucose berechnet ergibt sich

für den totalen Kropfinhalt 14,5 mg,

für die totale Enddarmmenge 12,7 mg.

Zwischen Kropfinhalt und Enddarminhalt war also eine Abnahme von 0,236 % auf 0,106 % des Trockengewichts an reduzierende Substanz zu konstatieren.

Tab. I.

TIEDEMANN 1816.	JOURDAN 1883	HAMANN 1884	VOGT & YUNG 1887.	LUDWIG 1892	COHNHEIM 1901.	ENRIQUES 1903.	VAN DER HEYDE 1922.	IN DIESER ARBEIT
		Spehlund				faringe		
Magen	intestin anterior	Oesophagus	oesophage	Speiseröhre		esofago	oesophagus	Schlund
			intestin buccal	Magen		ingluvie	muscular stomach	Kropf
		Drüsenma- gen			Darm . .			Magen
Darmkanal	intestin moyen	(Drüsenm.?)	intestin	Dünndarm		stomaco. .	intestine .	Magendarm
	intestin terminal	Dünndarm				intestino		Darm
Kloake	cloaque	Rektum	cloaque	Enddarm	Kloake	cloaca	cloaca (rectum)	Kloake



## II. — Der Darmtrakt und seine Umgebung.

### A. — Anatomischer Bau.

Bezüglich der Nomenklatur des Darmtrakts begegnet man in der Anatomie der Holothurien, mehr als sonst, einer vollständigen Anarchie. Der mehr oder weniger einförmige Verdauungsschlauch weist keine so auffälligen Erweiterungen auf wie z. B. der Magen anderer Evertebraten und vergeblich sucht man nach etwas, was mit deren Mitteldarmdrüse Ähnlichkeit hätte. Infolgedessen hat jeder Autor, der sich mit dem Bau des Darmtraktes zu beschäftigen hatte, eine ziemlich subjektive und willkürliche Benennung angewandt. So unterscheidet z. B. TIEDEMANN, wohl der erste Autor, der sich eingehender mit der « röhrenförmigen Holothurie » beschäftigte, am Verdauungstrakt einen « Magen », einen « Darmkanal » und eine « Kloake ». Am einfachsten gestaltet COHNHEIM die Namengebung, indem er den ganzen Schlauch schlechthin « Darm » nennt. Den funktionellen und morphologischen Verschiedenheiten entspricht m. E. am besten die von ENRIQUES angewandte Terminologie, die ich im folgenden im wesentlichen aufnehmen werde. Die beigefügte Tabelle (Tab. I.) kann vielleicht übersichtlicher als eine Besprechung die zahlreichen hier vorkommenden Benennungen verdeutlichen <sup>1</sup>.

An dem Verdauungsrohr einer frisch eingefangenen, aufpräparierten Holothurie kann man verhältnismässig leicht folgende Abschnitte unterscheiden :

1. den *Schlund*, ein kurzes wenig muskulöses Stück, das nicht gefärbt ist und zwischen den Fühlerampullen vom Kalkring bis zu einer leicht bräunlich pigmentierten Einschnürung verläuft, die den ersten Sphinkter darstellt, die diesen ersten Abschnitt trennt vom.

2. *Kropf*. Er ist ziemlich stark mit Muskeln versehen, etwa 4-5 cm lang und honigbraun pigmentiert. An beiden Seiten wird er von den proximalen Enden der Gefässstämme eingefasst, die dorsal und ventral den grössten Teil des Darmtraktes begleiten. Kopf und Schlund sind beim frischen Tiere fast stets mit nahrungshaltigem Sand prall gefüllt. In diesem Zustand ist das proximale Ende mehr konisch verjüngt als das distale. Der Kropf

<sup>1</sup> Fast alle angegebenen Namen beziehen sich auf *Holothuria tubulosa*.



wird abgeschlossen durch einen zweiten schokoladenbraun gefärbten Sphinkter, den man immer in kontrahiertem Zustande findet. Seiner dicken Wandung verdankt er wohl den Namen « Muskelmagen ».

3. Der *Magen* hat eine bräunliche Wand, die hier und da unregelmässige vom Tonus abhängige radiale Kontraktionen zeigt und den flüssigen Inhalt ein wenig locker umschliesst. Diese Verdauungsflüssigkeit enthält meistens keine oder nur spärliche Nahrungsteilchen. Er bildet etwa die untere Hälfte des ersten absteigenden Schenkels des Darmtraktes und erstreckt sich dann über den ganzen aufsteigenden Schenkel; in einzelnen Fällen noch eine kleine Strecke darüber hinaus. Während er anfänglich ziemlich schlaff gefüllt erscheint von dieser gelben Flüssigkeit, sieht er in seiner zweiten Hälfte mehr gespannt aus und enthält erst wieder an dieser Stelle zu wurstförmigen Paketchen zusammengeballten Nahrungsmassen. Dieser Teil zeichnet sich aus durch eine dickere muskulöse Wand und ein geringeres Lumen. Wenn ich in den nachstehenden Seiten gerade diesen Abschnitt hervorheben möchte, so werde ich ihm als « *Magendarm* » bezeichnen. Die Grenze zwischen beiden ist bei jedem Individuum verschieden und dadurch schwer aufzufinden, dass beide Teile oft fliessend ineinander übergehen. Magen und Magendarm kennzeichnen sich durch die üppige Entwicklung der Gefässsysteme an ihrer dorsalen und ventralen Seite.

4. Der eigentliche *Darm* ist vom Magen und vom Magendarm deutlich unterscheidbar. Um so verwunderlicher ist es uns, dass seine Grenze niemals von anderen Forschern hervorgehoben wurde. Erstens vereinigen sich in ihrer unmittelbaren Nähe die beiden Gefässgeflechte wieder zu einem einzigen dorsalen und ventralen Gefäss. Zweitens kann man hier im Bau der Wand deutliche makroskopische Verschiedenheiten zwischen den beiden scharf an einander grenzenden Gewebearten feststellen. Die Magenwand ist braun und verhältnismässig weich und grenzt mit einer scharfen Linie an die blasse muskulöse Darmwand, die von der Konsistenz einer Gelatine-Gallerte ist. Wenn diese Übergangsstelle gerade frei von Nahrung ist, markiert sich der Darmanfang durch eine deutliche Verschmälerung. Der Darm bildet den zweiten absteigenden Schenkel der Schlinge in die der Verdauungskanal gewunden ist. An leeren Stellen erscheint er als geschlängeltes Band. Distal mündet er in die geräumige.



5. *Kloake*, die wohl keine grosse Rolle bei der Herausbeförderung der Excremente zu spielen hat. Sie steht hauptsächlich im Dienste der Atmung durch die beiden Kiemenbäume, die von hier aus in die Körperhöhle hineinragen. Durch verschiedene Muskelbänder ist sie im distalen Teil des Hautmuskelschlauches befestigt.

In inniger Verbindung mit dem Darmtrakt stehen die ventralen und dorsalen *Gefässgeflechte*. Sie werden gebildet durch das ventrale und das dorsale Marginalgefäss, das sich distal vom Kropfe vom Verdauungsrohr loslöst. An beiden Seiten bildet sich hier zwischen Gefässstamm und Magen ein ziemlich variables Gefässnetz, das in den Spalten und Lakunen der Magenwand endet. Während aber das ventrale Netz aus einer grossen Zahl einfacher, meist paralleler, hier und da anastomosierender Quergefässe besteht, ist das dorsale ein wesentlich komplizierteres Gebilde. Hier findet man nämlich am ersten absteigenden Ast des Darmtraktes die sogenannten « *Wundernetze* ». Es sind dies eine Anzahl gesonderter Gefässplexus, die dadurch zustande kommen, dass ebensoviele kleine Gefässe sich plötzlich in zahlreiche dickwandige, mehr oder weniger gefärbte Kanälchen aufteilen, um sich nachher wieder zu einem Gefäss zu vereinigen, das in die Bindegewebslakunen der Magenwand einmündet.

Farbe und Grösse der Wundernetze sind erheblichen Schwankungen unterworfen. Einmal findet man winzig kleine braunschwarze, ein anderes Mal sind sie gross und voluminös und gelb oder orangegelb gefärbt. Worauf diese Variabilität zurückzuführen ist, konnte ich nicht feststellen. Die kurze Hungerfrist, der die Tiere in den Aquarien ausgesetzt sein können, hat mir niemals deutliche Veränderungen vor Augen führen können. Ebenso wenig war es möglich, einen Kausalzusammenhang zwischen der erwähnten Variabilität und den Wohnorten der Tiere zu finden. Auch die Anzahl der Wundernetze ist sehr inkonstant.

Diese Variabilität wird auch schon von ENRIQUES betont. Er schreibt: « Ma le possibili varietà di disposizione dei vasi di questo sistema lacunare sono numerosissime ». Länge, Grösse, Farbe und Anastomosen der Wundernetzregion sind individuell ganz verschieden. Aber immer findet man die Wundernetze eingebettet und verwachsen mit den Verzweigungen des linken Kiemenbaums (Abb. 1).



(\*) Uebersicht des Darmtraktes von einer in der Verdauung begriffenen *Holothuria labiosa*. 1 Kalkring mit Fühlerampullen, 2 Schlund, massig gefüllt mit Schlammbrocken. 3. Sphinkter zwischen Schlund und Kropf, 4. Kropf, prall gefüllt von Nahrungsmassen, 5. Sphinkter zwischen Kropf und Magen, 6. Magen, 7. Magen worin die wenig Schlamm enthaltende Verdauungsflüssigkeit, 8. Wanderstoma, 9. Grenze von Magen und Darm, 10. Darm an den nicht gefüllten Stellen bandförmig zusammengezogen, 11. Kloake, 12. ventrale Gefäßstämme mit Quernastomose, 13. Gonade, 14. Polische Blase, 15. Linker Kiemenbaum. Die Lage derverschiedenen Organe ist die normale, das Tier ist von der Rückseite geöffnet und die Aufhängemeisten sind abgeschnitten.

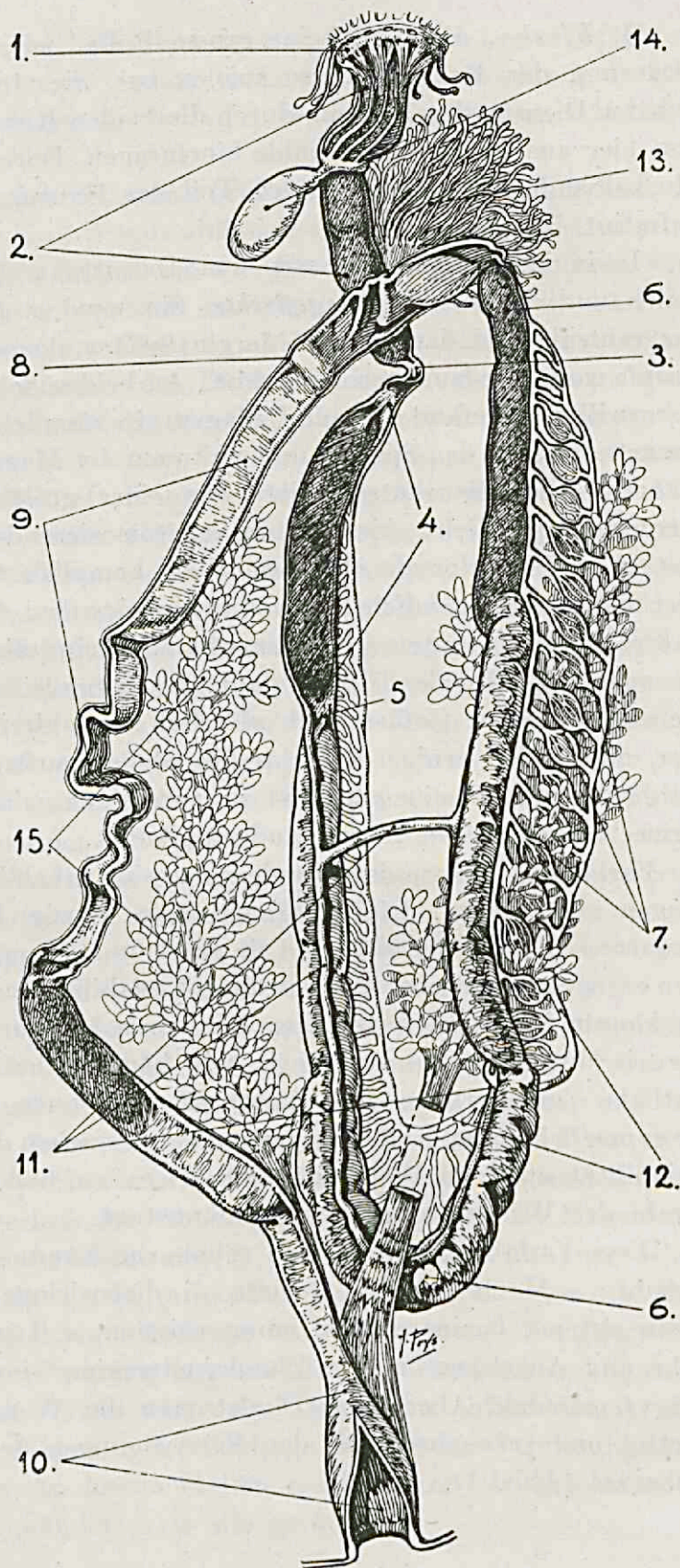


Abb. 1. (\*)



In den dorsalen und ventralen Gefässstämmen sowie in den Quergefässen des ventralen Geflechtes beobachtet man unregelmässige Kontraktionen, die sich langsam fortpflanzen. TIEDEMANN vertrat die Ansicht, dass dadurch eine regelmässige Cirkulation entstehe und auch ENRIQUES hat zu zeigen versucht, dass ein kontinuierlicher Strom vorlag. Verschiedene andere Autoren, (SEMPER, JOH. MÜLLER, BAUR und HEROUARD) fassten diese Bewegung als eine ganz unregelmässige auf. Wenn eine Cirkulation besteht, so ist sie doch wohl sehr langsam, selbst wenn die Kontraktionen längere Zeit regelmässig auftreten. Die Anordnung und der Bau der « Blutgefässe » machen eine regelmässige Strömung in einer einzigen Richtung ziemlich unwahrscheinlich; ohne weiteres ist aber einzusehen, dass aus diesen Pulsationen eine andauernde Durchmischung des Gefässinhalts resultiert.

Proximal endigen beide erwähnten Gefässe in einen unscheinbaren, etwas pigmentierten Gefässring, der einen Zweig an die benachbarten Gonaden abgibt und ausserdem—nach Angaben verschiedener Autoren noch fünf andere kleine Gefässe, die Radialgefässe.

Distal begleiten die grossen Gefässe noch eine kürzere oder längere Strecke den eigentlichen Darm.

In der Wand des Darmtraktes, zumal in der des Magens, sind eigentliche Gefässe nicht nachweisbar. Hier finden sich nur zahllose reichverzweigte, unregelmässige Lakunen in dem Gewebe zwischen Epithel und Muskelschichten.

Schliesslich möchte ich an dieser Stelle noch den innigen Zusammenhang des Darmtraktes mit den « Blutgefässen » hervorheben. Nur hier erreichen diese einen relativ mächtigen Entwicklung, während sie in den anderen Körperregionen lediglich aus spärlichen kleinen Ästchen, die man bisweilen kaum auffinden kann, bestehen.

## B. Histologischer Bau.

Die Wand des Verdauungstraktes lässt im allgemeinen folgende Schichten unterscheiden:

1) das *Epithel*, das in der Kropf und Magengegend kräftig entwickelt ist, während es im eigentlichen Darm schwächer ausgebildet ist. Im Darm folgt es genau den Konturen der äusseren Oberfläche (Abb. 2). Im Kropfe und im Magen ist es dagegen



durch viele in der Längsrichtung verlaufende Gruben und Falzen ausgezeichnet, wodurch seine Oberfläche erheblich vergrössert wird.

Dieses Epithel wird von länglichen, strahlig angeordneten Zellen gebildet, die meistens, so besonders in der Magengegend, schöne grosse Kerne aufweisen.

Von einer Cuticula, einem Stäbchensaum oder einer Wimpe-

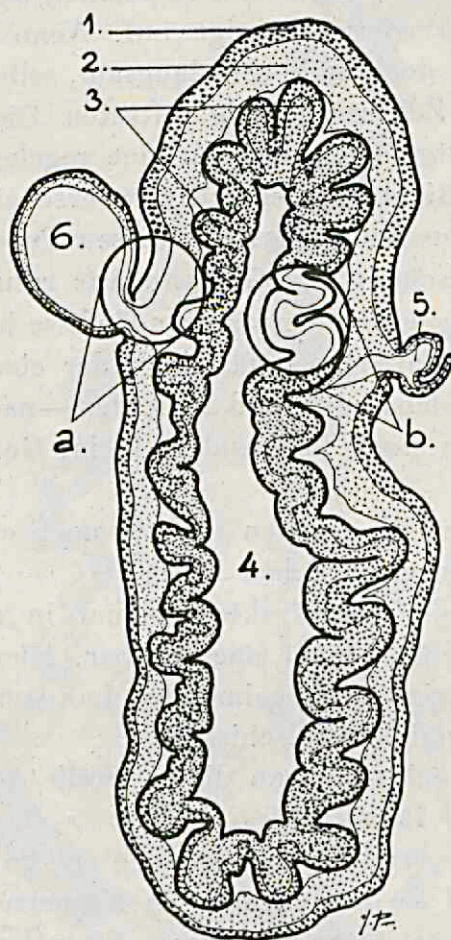


Abb. 2. Schematischer Bau der Magenwand. 1. Peritonealepithel und Muskelschichten, 2. Bindegewebsschichten, 3. Magenepithel, 4. Lumen, 5. dorsales Gefäss, 6. ventraler Gefässstamm. Die eingerahmten Stellen a. und b. sind in den Abbildungen 3 und 4 vergrössert dargestellt.

rung ist weder an den fixierten Präparaten noch am frischen Material etwas zu bemerken.

Schwieriger ist es, am Darmepithel die einzelnen Zellen zu unterscheiden, deren Kerne hier auch nicht so regelmässig angeordnet sind. Auch trifft man in grösserer Zahl, besonders in der oberen hyalen Zone eigenartige, blasenformige ungefärbte



Stellen, die wohl Spuren von ausgeschiedenen Sekreten, wahrscheinlich Schleim darstellen. Unter dem Epithel finden sich. (Tab.3).

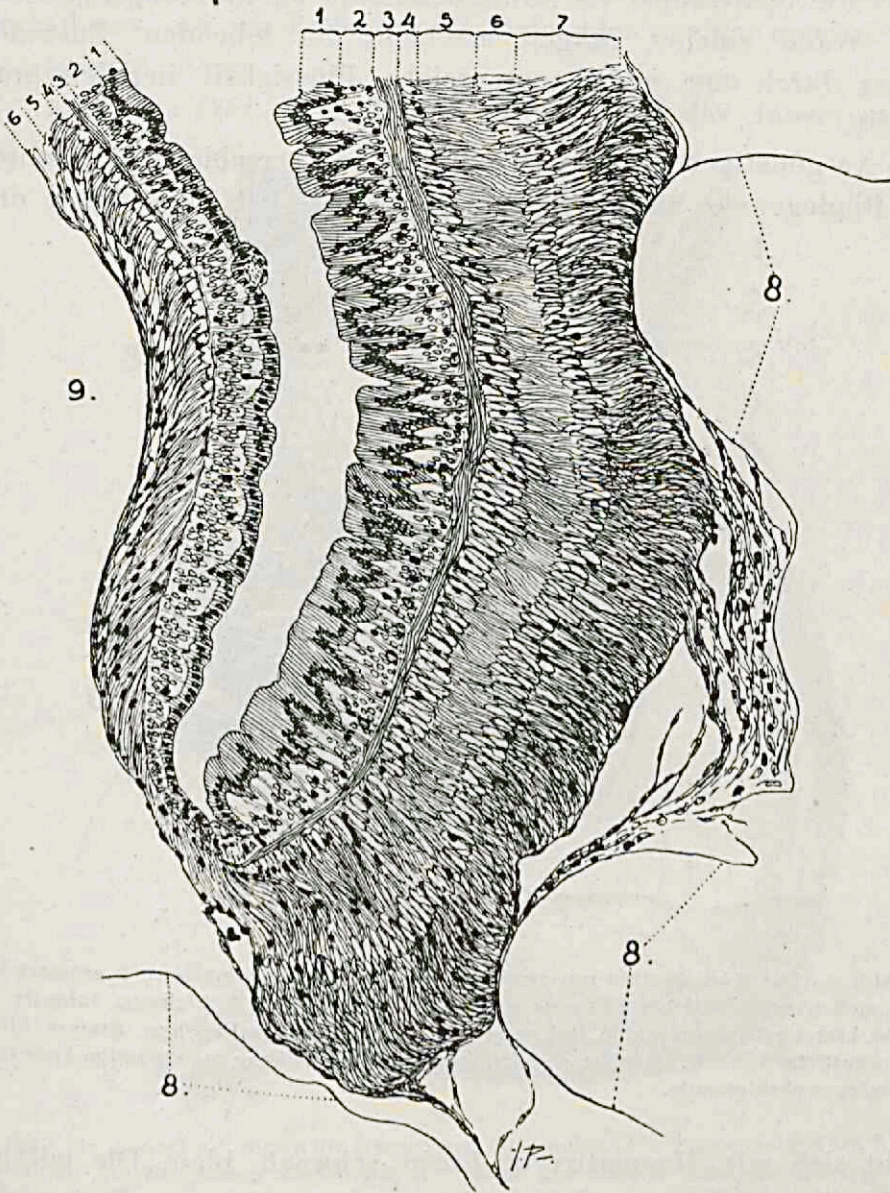


Abb. 3. - Die unteren Schichten der Magenwand und die der Gefäßwand. Beide gehen ununterbrochen in einander über. 1. Peritonealepithel, 2. Längsfaserschicht, 3. Ringfaserschicht, 4., 5., 6., 7., Bindegewebsschichten, 8. Epithel.

2) einige *Bindegewebsschichten*, die zuweilen sich der Epithelschicht dicht anschmiegen, zuweilen geräumige Lakunen offen lassen. Häufig ist das Bindegewebe durch senkrecht auf der Oberfläche stehende Brücken in eine Anzahl Kammern eingeteilt. In den fixierten Präparaten weisen diese Gewebe wegen ihres lockeren Zusammenhangs und ihres Wasserreichtums anscheinliche



Schrumpfungen und Veränderungen auf. Nach Beobachtungen an frischen Geweben glaube ich aber, dass in den Mägen frischer Tiere die Spalträume viel zahlreicher sind als im Hungerzustand. Die Wand solcher Mägen erscheint im lebenden Zustande immer durch eine amöbocytenreiche Flüssigkeit ziemlich prall gefüllt.

An günstigen Schnitten kann man drei verschiedene Schichten am Bindegewebe unterscheiden. Die obere ist die dickste und

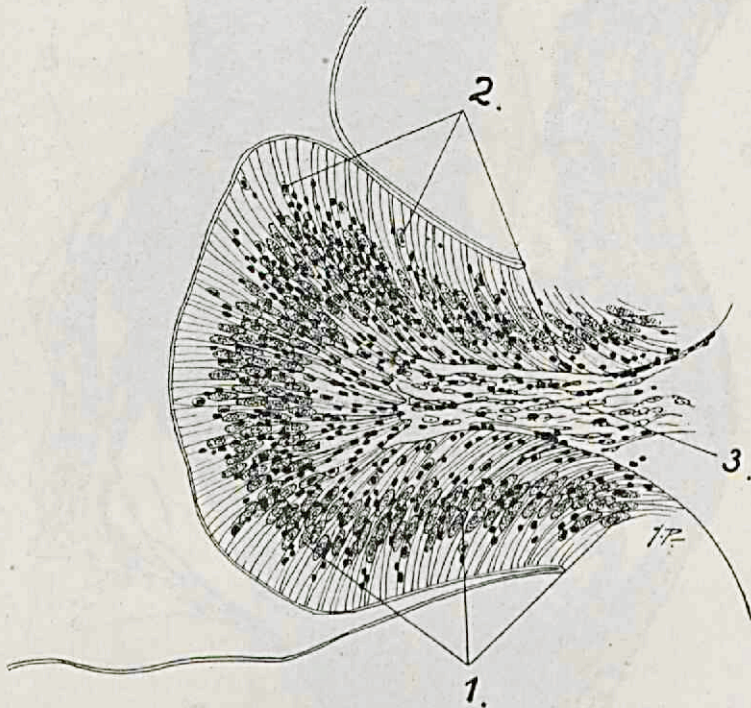


Abb. 4. - Das Magenepithel mit zwei Arten von Kerne. (Haemalaun.) 1. grössere körnige, sich weniger intensiv färbende Kerne der Epithelzellen, 2. kleinere, intensiv gefärbte, hier und da von einem Hof versehene Kernen der Wanderzellen. Erstere bilden eine deutliche Schicht, letzetere durchziehen das Gewebe ohne regelmässige Anordnug. 3. Bindegewebelemente.

färbt sich mit Haematoxylin-Eosin schwach blau. Die mittlere färbt sich rötlicher und intensiver und ist reicher an Fasern. Die untere nimmt nur sehr wenig Farbstoff an. Sie schliesst sich meist dicht an die Muskelschichten an. Alle drei Schichten werden von feinen radial gestellten Fasern gebildet.

3) Die *Muskelschichten* bestehen meist aus einer Lage dicht ineinandergreifender Ringfasern, die von einer Zone von Längsfasern in wechselnder Dicke eingeschlossen wird. Ihre grösste Entwicklung erreichen sie im Kropf und in den beiden Sphinkteren.



4). Das *Peritonealepithel* begrenzt den Darmkanal an der Aussenseite. Es zeigt eine ziemlich variable Entwicklung. Auch diese Schicht prägt sich am deutlichsten wieder in der Magen-  
gegend aus, wo die Zellkerne oft mehr oder weniger regelmässige  
Guirlanden bilden.

ENRIQUES (tav. 2, z. B. fig. 16) zeichnet das innere sowie

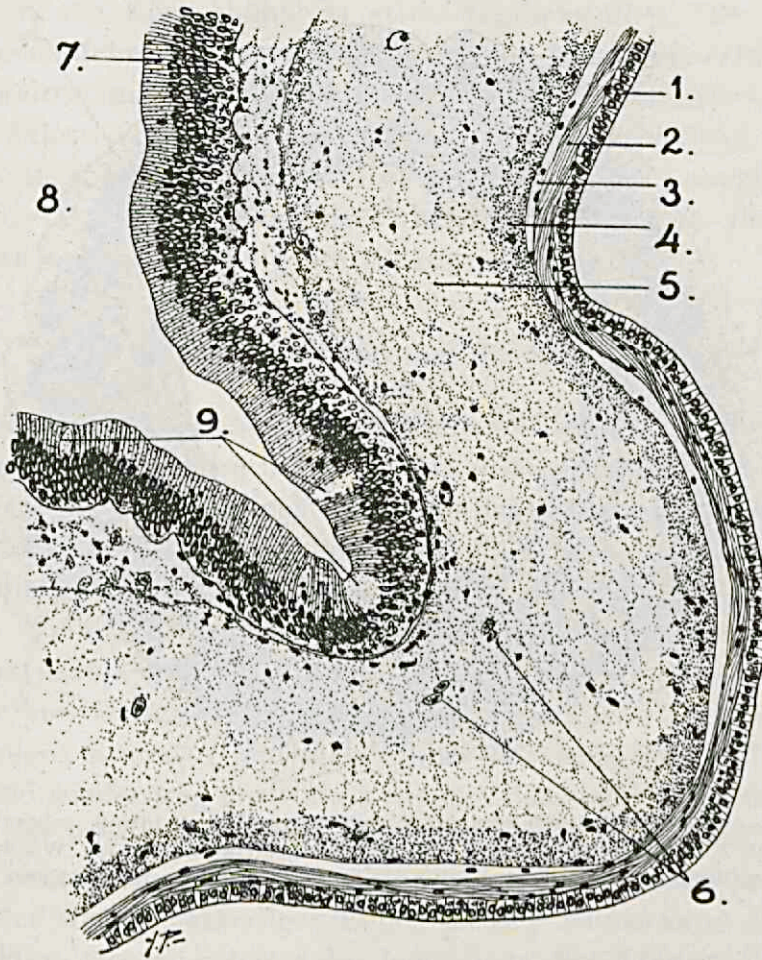


Abb. 5. - Querschnitt durch die Darmwand. (Haemalaun.) 1: Peritonealepithel, 2. Muskelschicht aus Ringfasern bestehend, 3. Grenze der Muskel- und der Bindegewebsschicht, 4. und 5. Bindegewebsschichten, 6. Wanderzellen in dem Bindegewebe, 7. Darmepithel, 8. Lumen des Darmes, 9. Schleimzellen (?) in dem Epithel.

das Peritonealepithel als mit langen Wimpern versehen. Nach JOURDAN wird es von kurzbewimperten Zellen gebildet. Diese sollen von einer wechselnden Zahl von Wanderzellen durchsetzt sein. In meinen Präparaten konnte ich hierüber nichts genaues feststellen.

Das *Blutgefässsystem* hängt auf's innigste mit den Lücken im Bindegewebe des Verdauungstraktes zusammen. Dieser Zusam-



menhang wird besonders von HAMANN hervorgehoben, der von « Blutlakunen » und « Aussackungen » des Darmkanals auch dann zu sprechen pflegt, wenn er die als deutlich gesonderte Schläuche erkennbaren Hauptgefässe und deren Abzweigungen im Auge hat. Ich werde jedoch bei dem traditionellen Namen « Gefässe » für diese doch deutlich unterscheidbaren Kanäle verbleiben, während

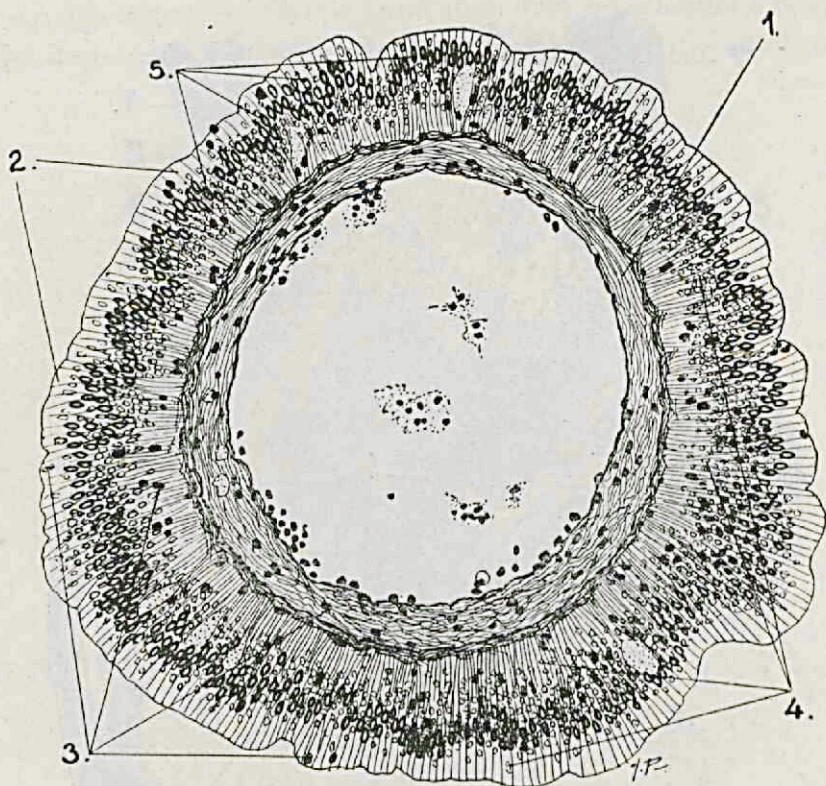


Abb. 6. — Querschnitt durch eins der Wundernetzgefässe. 1. intima, innere Bindegewebsschicht, 2. Peritonealepithel, 3. kleine intensiv gefärbte Kerne der Wanderzellen, 4. die dichroitischen Körnchen, das Sekret der Peritonealepithelzellen, 5. Kerne des Epithels.

ich den Begriff « Lakunen » für die nicht regelmässig begrenzten Räume im Bindegewebe des Darmtraktes reservieren möchte. Auch den Namen « Blut » für den Inhalt dieser Gefässe werde ich aus traditionellen Gründen beibehalten (Abb. 5).

Die Lakunen in der Magenwand hängen an zahllosen Stellen ventral und dorsal mit dem Lumen der Gefässe zusammen. Die äusseren Schichten des Magens sind denn auch dieselben wie die der Gefässe. Die « Intima » wird gebildet von einer dünneren oder dickeren unregelmässig begrenzten Bindegewebsschicht die identisch mit der des Magens ist. Nach aussen begegnet man dem



an den Hauptgefässstämmen nicht wesentlich veränderten Peritonealepithel und an verschiedenen Stellen auch den beiden Muskelfaserlagen der Magenwand. An den Wundernetzen aber erreicht dieses Epithel eine abnorme Dicke und Form. Hier stehen seine Zellen fächerförmig um das enge Lumen. Die grossen Kerne liegen im peripheren Abschnitt. Die Zellenden sind unregelmässig und gegen die Körperhöhle zu etwas angeschwollen. Oft sind sie von feinen dichroitischen bräunlich-grünen Körnchen erfüllt, von denen weiter unten noch die Rede sein wird. Auch hier finde ich in den fixierten Präparaten keine äussere Wimperbekleidung, wie sie ENRIQUES angibt. Die ausserordentliche aktive Bewegung von Amöbocyten in der Nähe der lebenden Organe, ist aber wohl auf keine andere Ursache zurückzuführen.

### C. Die Amöbocyten und die Sekretion.

Wohl jedem, der auf histologischem Gebiete mit der Echinodermengruppe zu tun hatte, ist der ausserordentliche Reichtum ihrer Gewebe an Amöbocyten aufgefallen. Zumal im Verdauungstrakt der Holothurien ist ihre Häufigkeit in den oben beschriebenen Bindegewebsschichten und in den Wundernetzen überraschend. Auch wenn man ein Stück der lebenden Wundernetze mit dem Mikroskop mustert, wird an ihrer Aussenseite ein angeregter Verkehr von zahllosen Wanderzellen sichtbar. Hier vollzieht sich ein so reges Kommen und Gehen von tausenden von Zellen, die heran- und wieder weg gestrudelt werden, dass man vermuten darf, es hier mit einem der aktivsten Organe des Tieres zu tun zu haben. Weiter kann man beobachten, dass die Amöbocyten einen mehr oder weniger ständigen Belag auf der Aussenwand des Magens bilden, ferner auch das die Umgebung der Kiemen ein Zentrum ihrer Verbreitung in der Körperflüssigkeit darstellt. Man braucht sich demnach nicht zu wundern, dass man den Amöbocyten verschiedene wichtige Funktionen für den Stoffwechsel der Tiere zugeschrieben hat. Ohne auf die ihnen manchmal zugeschriebene excretorische Tätigkeit näher einzugehen, erinnere ich hier nur an die Wanderzellenhypothese von FRENZEL, die durch die Beobachtungen von ENRIQUES aufs neue beleuchtet ist. Letzterer Autor wies darauf hin, wie sehr die dichroitisch grünen Körnchen in den Wundernetzen und den Magenlakunen der Holothurien mit den Fermentkörnchen übereinstimmen, die die Mitteldarmdrüse (« fe-



gato ») der Mollusken produziert. Daher hält er diese Drüse mit den Wundernetzen unserer Tiere für homologe Organe. Seiner Meinung nach wird das Epithel der Wundernetze von Drüsenzellen gebildet, die ihr Sekret an den Inhalt der Netze abgeben. Hier wird es von den Wanderzellen aufgenommen, von einem Häutchen (« membranella ») umgeben und nach den Magenlakunen transportiert. Dort sollen die Körnerhäufchen ihren Amöbocytenanhang verlieren und einzeln durch die Epithelzellen dringen, um sich dann in Lumen aufzulösen.

Meine Beobachtungen stimmen im grossen und ganzen mit denen von ENRIQUES überein. Ein exakter Beweis für seine Hypothese ist aber bei der eigenartigen Organisation der Tiere kaum zu erbringen.

In den grösseren Gefässen des in der Verdauung begriffenen Tieres sieht man sehr viele dieser Häufchen, die aus bräunlich-grünen stark lichtbrechenden Körnern bestehen und umgeben von Amöbocyten den Eindruck erwecken, als werden sie in der Längsrichtung fortgerissen. Es dürfte aber sehr schwierig sein, festzustellen, nach welcher Seite dies geschieht. Maximale Anhäufungen dieses Farbstoffs trifft man in den Bindegewebslakunen der Magenwand und in den Wundernetzen. Mehr zerstreut begegnet man ihnen auch in den Lakunen des Darmes und in der Kiemenwand. Wenn, nach ihrer Form zu urteilen, die Körner auch ein Excretionsprodukt sein könnten, so spricht doch ihre Verbreitung ziemlich stark dagegen.

Trifft dies nicht zu, so gäbe es noch folgende zwei Möglichkeiten: erstens, dass die Körner ein Zwischenprodukt des Nahrungsstoffwechsels bilden, welcher sich jenseits des Magenepithels vollzieht, und von hier aus den Wundernetzen zugeführt werden; zweitens, dass die von ENRIQUES stammende Annahme zutrifft und man hier tatsächlich nicht lokal entstandene Fermente vor sich hat. Unterschiede zwischen Hunger- und Verdauungszustand können uns hier keine Aufklärung verschaffen. Bei der Verdauung beobachtet man nur eine relative Armut an Amöbocyten und an dichroitischen Körnchen, verglichen mit den frischen Präparaten von der Magenwand. Dass dies aber zu deutlichen makroskopischen Färbef differenzen führen könnte, wie ENRIQUES behauptet (S. 6.) habe ich niemals beobachten können. Vielleicht hängt dies mit der kurzen Hungerzeit zusammen, die die Tiere im Sommer auszuhalten imstande sind.



Die Argumente dafür, dass diese Farbkörnchen enzymatischer Natur sind, und nicht ein Zwischenprodukt in der Verarbeitung der Nahrung darstellen, glaube ich in folgenden Punkten zusammenfassen zu können.

1. Fermentkörnchen dieser Art sind bekannt (Mollusken), während derartige Zwischenprodukte niemals beschrieben würden.

2. Bei frischen (verdauenden) Tieren ist der Magen von einer dichroitisch bräunlichen Flüssigkeit erfüllt, die schon nach kurzer Hungerzeit verschwindet (vgl. den Abschnitt : Verdauungsflüssigkeit). Nur diese braune Flüssigkeit enthält Enzyme ; die sie später verdrängende wasserklare nicht. Bei zunehmender Hungerzeit wird die Fermentaktivität des Magenwandextraktes geringer, während gleichzeitig der Farbstoffgehalt abnimmt. Farbstoffgehalt und Enzymwirkung gehen also einander parallel ; und zwar sowohl im Magen, als auch in den Wundernetzen (vgl. Abschnitt : Enzymwirkung). Wenn die Enzyme, wie sonst zu erwarten wäre, in der Magenwand selbst entstünden, so wäre die kräftige Enzymwirkung des Wundernetzentraktes ziemlich rätselhaft.

Die Bindegewebsschichten in den Wundernetzen zeigen immer eine sehr scharfe Abgrenzung gegen das Lumen. An dieser Grenze findet man zahllose Amöbocyten, die dort eine ansehnliche Lage bilden können. In den kleinen Gefäßen füllen sie das Lumen manchmal gänzlich aus. Oft bekommt man den Eindruck, dass es sich hier geradezu um eine Bildungsstätte der Wanderzellen handelt. Man kennt hier auch wohl Teilungsstadien in der Kernmasse und das histologische Bild erinnert einigermaßen an eine lymphoide Drüse. Im Epithel der Wundernetze beobachtet man niemals Amöbocyten an den Stellen, wo sich die Farbstoffkörner noch vereinzelt finden.

Daher stelle ich mir den Sekretionsprozess ungefähr folgendermaßen vor : die Epithelzellen der Wundernetze bilden die dichroitischen Körner, die sich in Häufchen im Bindegewebe ansammeln. Von dort werden sie von den Wanderzellen mitgerissen und nach den Bindegewebslakunen in der Magenwand transportiert. Hier werden die Körnchen frei, dringen durch die Epithelzellen und lösen sich in der Inhaltsflüssigkeit auf.

Dies wäre zweifellos eine bemerkenswerte Bildungsweise von Verdauungsekreten, die sicher nicht nur von vergleichend-physiologischem Interesse sein würde und zu welcher Analogien schwer zu finden sein dürften.



In diesem Zusammenhang möchte ich auf eine eigenartige Enzymsekretion hinweisen, die in jüngerer Zeit M. LOEPER und G. MARCHAL (1. und 2.) beim Menschen aufgedeckt haben. Diese Autoren beobachteten, dass man mit gewissen Nahrungsstoffen, z. B. mit Fleischbrühe, eine erhebliche Sekretion von polynukleären Leukocyten im Magen hervorrufen kann. Ihre Proteasen sind zwar weniger aktiv als das Pepsin; sie können aber dessen Wirkung erheblich steigern. N. FIESSINGER (S. 95) schreibt sogar von ihnen: « Ce qui est intéressant, c'est que ces ferments leucocytaires peuvent intervenir, dans certains estomacs aseptiques et collaborer ainsi d'une façon très précieuse à la digestion ».

Wie dem auch sein mag, die Cooperation der Wundernetze mit dem Magen bietet manche interessante Ausblicke, und viele Probleme harren hier noch ihrer Lösung. Die Bearbeitung dieses Themas würde jedenfalls einen besonders wichtigen Punkt in der noch rätselhaften Verdauungsphysiologie der Echinodermen betreffen.

### III. — Die Verdauungsflüssigkeit.

Wenn man eine frisch eingefangene Holothurie öffnet, findet man immer, weil die Tiere niemals hungern, Nahrungsmassen im Darmtrakt. Diese zeigen fast ausnahmslos eine bestimmte Verteilung. Der Kropf ist stets gefüllt, sodass, wenn z. B. der Darmkanal, wie dies am häufigsten geschieht, vor dem Kropf abreißt, die in ihm enthaltene Nahrung zusammen mit dem vorn befindlichen Sphinkter einen Verschluss bildet, der eher birst, als dass er dem Druck nachgibt. Der eigentliche Magen enthält nur wenig Sandbrocken, die locker in einer goldgelben oder honigfarbenen Flüssigkeit liegen. Dass der eigentliche Magen keine oder nur wenig Nahrung enthält, ist wohl darauf zurück zu führen, dass diese schnell und in kleinen Portionen passiert. In den meisten Fällen reicht die Flüssigkeit bis dort, wo im « Magendarm » oder im Anfang des eigentlichen Darmes die Schlamm Massen sich unter dem Einfluss der Darmperistaltik wieder zu ei- oder wurstförmigen Brocken verdichten. Diese Flüssigkeit füllt unter normalen Umständen niemals prall den Magen. Unter günstigen Umständen kann man aus grossen Tieren 15 bis 20 ccm Magenflüssigkeit gewinnen. Gewöhnlich aber handelt es sich um nicht mehr, als 10 ccm. Zwar sind wie sonst in Hohlorganen die mit



Muskeln versehenen Wände um den Inhalt zusammengezogen, aber ein einfacher Versuch lehrt, dass man unter sehr geringen Druck, auch das doppelte des gewöhnlichen Volums einführen kann.

In dem nächsten Abschnitt möchte ich versuchen, diese eigenartige Flüssigkeit etwas genauer zu charakterisieren.

Zunächst müssen wir uns darüber klar sein, dass wir es hier nicht mit einem Hungersaft zu tun haben. Ich habe schon mehrmals hervorgehoben, dass es bei den Tieren unter natürlichen Verhältnissen keinen eigentlichen Hungerzustand gibt. Während man z. B. bei Schnecken und Krebsen den Vorderdarm mit einer fermentreichen Flüssigkeit gefüllt finden kann, die keine Nahrungsreste enthält, trifft dies für unsere Holothurien nicht zu. Wenn man ein solches Tier an der Nahrungsaufnahme verhindert, indem man es in ein sandfreies Aquarium setzt, so verdrängt in höchstens drei Tagen eine wasserklare Flüssigkeit, die sich in nichts von Seewasser unterscheidet, die Schlammbrocken und den Verdauungssaft. Es ist mir niemals trotz verschiedenartiger Bemühungen gelungen, diesen Prozess rückgängig zu machen. Die Tiere gehen langsam zu Grunde, nachdem sie erst die Eingeweide autotomiert haben. Eine Nahrungsaufnahme, im Aquarium, die auch nur teilweise die Bedürfnisse des Organismus befriedigen könnte, erwies sich als ausgeschlossen.

Um den Saft zu erhalten, präparierte ich das Darmsystem heraus, spülte es gründlich mit Seewasser ab, um es von anhängenden Amöbocyten zu befreien, und fing den nach der Punktion ausfließenden Saft in einem Gefäß auf. Er enthielt dennoch Schlammteilchen, Amöbocyten, Schleim u. s. w. Für die nachstehenden Untersuchungen wurde er erst immer filtriert.

Der frisch gesammelte sandfreie Saft ist mehr oder weniger klar. Trübe Stellen sind ziemlich lokalisiert und erweisen sich mikroskopisch als Amöbocytenhaufen, stark lichtbrechenden Kügelchen, kleinste Nahrungspartikelchen u. s. w. Er filtriert relativ leicht und ist dann völlig durchsichtig und von schöner goldgelber bis honigbrauner Farbe.

Wenn man ihn aber einige Zeit an der Luft stehen lässt, ändert sich die Farbe etwas und bekommt einen Stich ins Grüne, während sich gleichzeitig eine leichte Trübung bildet. Letztere lässt sich mehr oder weniger vollständig durch härteres Filtrierpapier entfernen. In wenigen Fällen, wo die Flüssigkeit klar blieb



und keine grünliche Nachfärbung aufwies, verdunkelte sich die Honigfarbe, sodass sie nach einer Woche bei Aufsicht fast schwarz erschien, bei Durchsicht noch immer bräunlich war. Ich vermute, dass diese Änderung mit der Anwesenheit eines Melaninstoffe bildenden Ferments, etwa einer Tyrosinase (vgl. d. Abschnitt: Verdauungsenzyme) zusammenhängt.

Chloroform und Äther ziehen die Farbe aus, Amylalkohol nimmt sie kaum an und bildet einen milchigen Niederschlag.

Beim Erhitzen entweicht ein starker Geruch; nach Abdampfung entsteht ein ziemlich reichlicher schwarzer Rückstand, der niemals den Geruch von verkohlenden Proteinstoffen abgibt, sondern einen aromatischen angenehmen, sofort zu beschreibenden Duft. Dieser Rückstand ist ziemlich bald ausgeglüht und hinterlässt eine weisse Kruste anorganischer Bestandteile.

Der aufbewahrte Saft zeigt abgesehen von der oben erwähnten Trübung, auch nach Monaten keine bakterielle Zersetzung.

Der Geruch des Saftes, von dem soeben bereits die Rede war, ist sehr auffallend und spezifisch und hat auch schon ENRIQUES Aufmerksamkeit auf sich gelenkt. Ich glaube daran unterscheiden zu können 1. eine säureähnliche Komponente, etwa wie bei Acetylessigsäure, 2. noch einer Estergeruch wie von irgendeinem mehrwertigen Alkohol z. B. Amyl-Heptyl-oder Octylalkohol. Er ist so stark, dass z. B. die etwa 10 ccm, die man von einem Tiere erhalten kann, das ganze Zimmer parfümieren. Beim kochen, zumal mit Säure, tritt besonders die Säurekomponente hervor. Durch starke Chemikalien, wie die für die nachstehenden Reaktionen erforderlichen, verschwindet er nicht. Der Geschmack des Saftes ist bitter.

Neutrales Lakmuspapier rötet sich nach kurzer Zeit bei Berührung mit dem Saft. Genauer wurde die Reaktion festgestellt mit folgender Tropfenmethode. Von einer Anzahl Pufferlösungen mit bekanntem pH wurden eine stets gleiche Zahl Tropfen in die seichten Vertiefungen einer weissen Porzellanplatte, wie sie zur Mischung von Wasserfarben benutzt werden, gegeben. Daneben wurde von den zu untersuchenden Magensaftproben die gleiche Zahl Tropfen ausgezählt. Zu jedem Flüssigkeitsquantum gab man noch einen Tropfen Indikatorlösung (Methylorange, Methylrot, Phenolrot und Neutralrot) und verglich die Farbtöne. Auf diese Weise konnte man den Einfluss der Eigenfarbe ganz ausschalten.



So wurde gefunden, dass bei frischen Saftproben die Reaktion zwischen pH 5,1 bis 5,6 zu liegen pflegt, meist dem sterilen Wert näher.

Es herrscht also eine ausgesprochen saure Reaktion, die sich erheblich unterscheidet von dem leicht alkalischen Seewasser (pH = 8,1 — 8,2).

VAN DER HEYDE (S. 32) fand bei *Thyone* auch eine relativ saure Reaktion (pH 7,2 — 7,9), die im Anfang vom « Intestine » (= Magen?) am stärksten war, CROZIER bei *Stichopus* während der Verdauung ein pH von 4,8—5,5, in « leeren » Tieren 5,0—6,5. Er schreibt dieser Acidität das Vermögen zu, kleine Quantitäten des stark Ca-haltigen Sandes der Korallenriffe, wo die Holothurien leben, auflösen zu können. Während man im Darmkanal von *Holothuria* immer auch kalkhaltige Nahrungstoffe findet, habe ich in den Nahrungsanalysen niemals eine solche Wirkung wahrscheinlich machen können.

Die Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung beim frischen Saft ergab ein  $\Delta$ , das zwischen  $-2,13^{\circ}$  und  $-2,21^{\circ}$  pendelte. Die Gefrierpunktserniedrigung des Aussenwassers betrug  $-2,26^{\circ}$  bis  $-2,28^{\circ}$  C.

Das spezifische Gewicht der Darmflüssigkeit (gesammelt von einer grösseren Anzahl Tieren und einige Zeit gut verschlossen aufbewahrt) betrug 1,04 bei  $15^{\circ}\text{C}$ , das des Aussenwassers 1,03.

Viskosimetrische Bestimmungen mittels OSTWALDS Viskosimeter ergaben folgende Werte:

Durchlaufzeit.

I. für Darmsaft 41,9 Sek., für Seewasser 39,6 Sek.

II. für Darmsaft 34,6 Sek., für Seewasser 33,7 Sek.

in zwei bei verschiedenen Temperaturen angestellten Versuchen. Die Differenzen gegenüber dem Seewasser sind wohl auf den Schleim zurückzuführen, den man auch in dem filtrierten Saft findet.

Die stärkere Beweglichkeit der Oberfläche und die beträchtliche andauernde Schaumfähigkeit waren an sich schon ein Hinweis dafür, dass eine oder mehrere oberflächenaktive Substanzen in der Flüssigkeit enthalten waren.

Die relative Oberflächenspannung wurde gemessen mittels der für den stalagmometrischen Lipasenachweis benutzten Tropfpipette (P. RONA und L. MICHAELIS 1). Zwei Proben von Saft



und eine von Seewasser wurden filtriert und die Tropfenzahl bestimmt. Es ergaben sich nachstehende Werte :

Seewasser		97 — 98 — 98	Mittelwert	97,6
Verdauungssaft	I	151 — 155 — 152	»	152,6
»	II	215 — 221 — 220	»	218,6
»	III	203 — 219 — 213	»	211,6

Eine bestimmte Drehung mittels des Polarimeters konnte nicht beobachtet werden. Ebensowenig bekam man positive Resultate durch die Untersuchung verschiedener Saftproben mittels des Spektroskops.

Eiweiss wurde niemals gefunden. Die Xanthoproteinreaktion gab keine Gelbfärbung, die ADAMKIEWICZ'schen und HELLER'schen Ringreaktionen waren negativ ; Erhitzung allein oder mit Essigsäure gab keinen Niederschlag, ebensowenig Sublimat oder Trichloressigsäure. Wenn man die Flüssigkeit mit dem gleichen Volum Alkohol 96 % oder mit etwass NaOH versetzte, erhielt man einen gelatinösen Niederschlag, den zwar eine Kontrolle mit Seewasser auch gibt, aber nicht in so reichlichem Masse. Die Biuret und Ninhydrinreaktion zur Aufdeckung von Peptidstoffen bezw. Aminosäuren gaben negatives Resultat.

Es konnten weder reduzierende Zucker, noch andere hydrolysierbare Kohlehydrate gefunden werden. FEHLINGS Reaktion war immer negativ ; auch nach Kochen des Saftes mit 1 N. HCl und anschliessender Neutralisation. Um zu unterscheiden, ob vielleicht pentoseartige Stoffe anwesend waren, wurden 5 ccm Saft mit dem halben Volumen HCl versetzt und auf dem Wasserbade gekocht, bis der Salzsäure Überschuss wieder verschwunden war. Ein Stück Filtrierpapier mit einer Lösung von Anilinacetat versetzt, nahm sodann in Dampfe eine rötliche Farbe an. Auch eine zweite Reaktion auf Pentosen (und Pentosan) hatte einen gewissen positiven Erfolg. 5 ccm Saft wurden gemischt mit ebensoviel konzentrierter Salzsäure und ein wenig Phloroglucin dazu gegeben. Nach Kochen auf dem Wasserbade wurde die ursprünglich grünliche Flüssigkeit schmutzig braunrot bei starker Niederschlagsbildung. Dieser löste sich nach Abkühlung und Schütteln mit Amylalkohol im letzterem mit schöner sepiabrauner Farbe. Die Spektralanalyse zeigte aber das für Pentosen erforderliche Absorptionsband zwischen D und E nicht. Doch glaube ich aus diesen



zwei Analysen schiessen zu können, dass ein pentoseartiger Körper im Verdauungssaft enthalten sein könnte.

An besonderen Reaktionen seien noch die Murexidprobe, Reaktion mittels Ferrichlorid und die von UFFELMANN erwähnt, die beide negativ ausfielen und zeigten, dass weder Harnsäure noch Milchsäure in deutlichen Mengen anwesend waren.

ENRIQUES (S.41) hat schon darauf aufmerksam gemacht, dass der Chloridgehalt des Verdauungssaftes stets kleiner ist, als der der Körperflüssigkeit oder des umgebenden Seewassers. Dies ist eine Tatsache, die am frischen Saft immer stark auffällt, wenn die Schwankungen dort auch noch ziemlich erheblich sind. Bei acht Tieren, die am gleichen Tage eingefangen waren, und sich schon durch einen mehrstündigen Aufenthalt im Aquariumwasser an dessen etwas höheren Salzgehalt hatten gewöhnen können, fand ich folgende Werte (bezogen auf den Cl-Gehalt des Aussenwassers) für den Chloridgehalt der Verdauungsflüssigkeit: 81,15 % — 84,5 % — 82,3 % — 90,6 % — 92,1 % — 93,6 % — 92,8 % — 87,6 %, im Mittel also 88,1 %.

Der Aschenrückstand zeigte mit Salzsäure versetzt keine Gasentwicklung. Nach Kochen und Abkühlen behält die Flüssigkeit ihre saure Reaktion. Kohlensäure, ist also nicht vorhanden. Die erwähnte, von CROZIER vermutete Abbauwirkung von Korallenkalk kann also hierin nicht seine Begründung finden.

Schliesslich enthält die Verdauungsflüssigkeit immer nur kleine Mengen der freien Verdauungsfermente. Niemals findet man so einen Reichtum daran wie etwa in den Hungersäften von *Helix* und *Astacus*. Ich möchte das Verhältnis des verdauenden Effektes zwischen diesen und der von Holothurien in der Grössenordnung von 100:1 schätzen. Man vergleiche hierzu weiterhin den folgenden Abschnitt.

Wie ändert sich nun die Zusammensetzung des verdauungsaftes, wenn man die Tiere hungern lässt? Schon nach 2-3 Tagen (im Sommer wenigstens, im Frühjahr dauert es länger, in dieser Jahreszeit leben die Tiere auch merklich länger in den Aquarien) lässt sich keine der sehr charakteristischen oben beschriebenen Eigenschaften mehr feststellen. Die Flüssigkeit unterscheidet sich nicht mehr von dem Wasser, in dem die Tiere leben.

Ich lasse eine tabellarische Zusammenstellung dieser Verhältnisse folgen. Mit römischen Ziffern sind die Saftportionen gemeint, die 2 oder 3 Tieren entstammen und also einen gewissen



Mittelwert angeben. Ich kann hier nur eine kleine Auswahl geben, da nicht in allen Fällen alle Eigenschaften an demselben Saft kontrolliert wurden.

TAB. II.

Saftprobe	Hungerzeit	Geruch	Farbe	pH	$\Delta$ gr. C.	Tropfen zahl	Cl- Gehalt
Seewasser	—	fehlt	keine	8.2	2.26°	99	100.0
I	2 Tage	fehlt	keine	8.0	—	—	96.1
II	0 Tage	stark	braun	5.1	—	—	83.2
III	2 Tage	fehlt	keine	—	2.26°	101	—
IV	0 Tage	stark	braun	—	2.17°	219	—
V	3 Tage	fehlt	keine	8.1	2.16°	—	101.0

Das Fehlen eines Hungersaftes scheint in Beziehung zu stehen mit der kontinuierlichen Nahrungsaufnahme (Schlamm). So garantiert meines Erachtens die Tatsache der kleinen Nahrungsflocken, die sich immer im Magen vorfinden, eine möglichst vollständige Verdauung. Die immer anwesenden Wanderzellen mögen eine grosse Rolle bei der Verdauung und der Resorption spielen, die ich erst später besprechen werde.

Die Flüssigkeit an sich ist im Vergleich mit solchen von anderen Tieren sehr bemerkenswert. Zunächst fällt die totale Abwesenheit von Proteinstoffen und Peptonen auf. Bei fast allen Invertebraten, die imstande sind, Säfte mit freien Enzymen zu produzieren und nicht ausschliesslich durch phagozytäre Vorgänge ihr Nahrungsbedürfnis decken, findet man diese.

Ich nenne hier nur die Schnecken, Tintenfische, Krebse und Krabben.

Die zweite merkwürdige Erscheinung ist die ständige Anwesenheit von Wanderzellen im Darminhalt. Sie wurde meines Wissens nur beobachtet von HAMANN, der von den « Blutzellen » schreibt (S.50): « In besonders grosser Menge trifft man sie im Darmkanal, während in den Lakunen ihre Zahl oft sehr gering erscheint ». Im vorigen Abschnitt sahen wir, dass diesen eine Funktion bei der Enzymsekretion zugeschrieben werden kann; im Kapitel über Resorption, dass sie sich auch an diesem Prozess beteiligen können. An sich braucht man sich nicht über ihre



Verbreitung bis in den Mageninhalt hinein zu wundern; denn bei den Holothurien gibt es wohl keine Flüssigkeit und kein Gewebe, wo sie vermisst werden.

Sodann kommt ein Komplex von Eigentümlichkeiten, die offenbar innig miteinander verknüpft sind, denn getrennt kann man sie niemals in der Verdauungsflüssigkeit nachweisen. Es sind: der Enzymgehalt, die Farbe, der Geruch, die Azidität, das Defizit an Chloriden und die starke Oberflächenaktivität.

Ich glaube hier nicht irre zu gehen, wenn ich sie alle auf eine einheitliche Sekretion zurückführe. In dieser wären dann zu unterscheiden 1) die Enzyme, 2) ein brauner, aromatisch riechender, saurer oberflächenaktiver Körper, der mit seinem osmotischen Druck den der mangelnden Salzmengen ersetzt oder mehrere Körper, die zusammen den gleichen Effekt ausüben. Es dürfte schwer sein, hier zu entscheiden, um welche Substanz oder Substanzen es sich handelt. Einen Hinweis nach einer bestimmten Richtung geben uns nur die beiden Pentosenreaktionen. Die Fällungen durch Alkohol und Lauge beruhen ebenfalls auf den in Frage stehenden Substanzen. Wenn man den ersteren Niederschlag auswäscht, in Wasser löst und in einer Porzellanschale erhitzt, bekommt man eine grünliche, sauer riechende und lakmusrötende Flüssigkeit. Später bildet sich reichlich eine schwarze Kohlenstoffkruste, die nach Glühung einen nur schwachen Aschenbelag hinterlässt. Der Niederschlag der Laugeprobe zeigt durch seinen Geruch bei der Erhitzung und durch die Verkohlung, dass auch hier wirklich organische Substanzen mitgerissen sind. Bei weiterer Erwärmung des Trockenrückstandes entsteht ein stechender Geruch. Wenn man den Saft mit dem gleichen Volume konz. Schwefelsäure versetzt, gibt es eine mässige Gasentwicklung. Bei der Erhitzung wird die Probe braunrot und es entsteht ebenfalls ein charakteristischer saurer, stechender Geruch, der qualitativ dem des frischen Saften gleicht, aber in ungleich höherer Konzentration. Sättigung mit Ammoniumsulfat verursacht keinen Niederschlag.

Ich kann vorläufig alle diese Tatsachen nur mit der Hypothese in Einklang bringen, dass ein kohlehydratartiger Stoff im Verdauungssaft vorkommt, der Pentosenreaktionen gibt, sauer reagiert, durch Alkohol und Lauge, nicht aber durch Säure gefällt wird, FEHLING nicht reduziert und nicht durch Ammoniumsulfat



gefällt wird. Der erwähnte Geruch dürfte diesem Stoff sicher zukommen, wahrscheinlich aber auch die Farbe.

Eine genauere Charakterisierung hoffe ich möglichst bald nachholen zu können.

Ich kenne nur einen Fall, in dem man bei anderen Tieren etwas Analoges bezüglich der Verdauungsflüssigkeit gefunden hat. Es ist das der von BOTTAZZI beschriebene Magensaft von *Aplysia*. Der filtrirte Saft von 7 Exemplaren von *Aplysia limacina*, die in voller Verdauung begriffen waren, hatte (S. 320) « une couleur jaune verdâtre qui rappelle celle du miel, riche de detritus alimentaire. Le liquide filtré, très limpide plus ou moins fortement coloré, suivant la concentration, présente une réaction très acide au papier de tournesol, à la phenolphthaleine (?O.) à la tropeoline (?O.) etc. Le liquide gastrique (en moindre quantité) des animaux à jeun est acide, lui aussi, bien que le jabot et les estomacs soient entièrement vides d'aliments. » — « Toutefois, quelque forte que soit l'acidité du contenu gastrique, les reactifs ne démontrent pas la présence d'acide mineral libre. Il s'agit donc probablement d'un acide organique. » Mit KOH bildet sich ein gelatinöser, wenig wasserlöslicher Niederschlag. Mit 2 ½ vol. Alkohol gibt die enteweisste Flüssigkeit in der Hitze (95°C.) einen reichlichen weissen Niederschlag. Weiter führt er eine Zahl von Reaktionen der Extrakte der Mitteldarmdrüse an, die z.T. auch für den Saft als solchen zuzutreffen scheinen. So z. B.) eine rote Farbe die entsteht, wenn man den mit Lauge entstandenen Niederschlag mit ein paar Tropfen Cu SO<sub>4</sub> versetzt, und die bei Erhitzung in Orange übergeht.

Es ist mir jedoch nicht gelungen, eine derartige Reaktion in der Verdauungsflüssigkeit der Holothurien nachzuweisen.

BOTTAZZI vermutet, dass die Azidität des Saftes von einem kohlenhydratartigen Körper bedingt wird, der sich aus dem Pentosan von *Ulva*, der ausschliesslichen Nahrung der Aplysien, bildet. Er nennt diesen Körper deshalb « acide pentosique », ohne jedoch daran die üblichen Pentosereaktionen untersucht zu haben. Allein wenn er den Extrakt der Mitteldarmdrüse auf längere Zeit mit Salzsäure kocht, ist eine bedeutende Reduktion des in Alkali gelösten Kupfersulfats nachweisbar.

Wenn man die gemeinsamen Eigenschaften beider Verdauungssäfte resumiert, ist ersichtlich :



1. dass sie etwa die gleiche Farbe haben, (wenn auch, nach BORTAZZI diese vom Aplysiensaft verursacht wird, indem sich aus der Nahrung chlorophyllähnliche Farbstoffe herauslösen);

2. dass man hier vergeblich sucht nach dem Eiweissgehalt der andere Evertebraten kennzeichnende Hungersäfte;

3. dass beide eine saure Reaktion aufweisen, die nicht auf eine Mineral- sondern auf eine organische Säure zurück zu führen ist;

4. die eigentümliche, aber leider in beiden Fällen noch ungenügend bestätigte Tatsache, dass beide einen pentoseähnlichen Stoff enthalten, der vielleicht mit der soeben erwähnten organischen Säure identisch ist.

Meines Wissens nach wurde, ausser von B., niemals ein Hunger- oder Verdauungssaft bei Wirbellosen beschrieben, dessen Azidität von einer organischen Säure verursacht wird. Diese Tatsache wird vielleicht eher dadurch begründet, dass dieses ausgebreitete Untersuchungsgebiet noch so völlig brach liegt, als dass derartige Fälle so selten sein dürften. Denn, wie ich z.B. vor einiger Zeit Gelegenheit hatte, mich zu vergewissern, reagiert der braune Hungersaft des Flusskrebsses ebenfalls sauer (pH etwa 5.0) und auch hier wird die Anwesenheit einer Mineralsäure bestritten.

Eine Bearbeitung, in diesem Sinne, der vergleichende Physiologie der Verdauung, würde m.E. sehr fruchtbar sein und dürfte noch manche unvermutete Verhältnisse klar machen können.

#### IV. Die Verdauungsenzyme.

Daten über Verdauungsenzyme finden sich bei COHNHEIM, ENRIQUES, CLERC und VAN DER HEYDE. Was die Ansichten über die Anwesenheit von Proteasen anbetrifft, so stehen sich auch hier wieder die Ansichten der beiden erstgenannten Autoren diametral gegenüber. COHNHEIM gelang es nicht, ein proteolytisches Enzym zu finden, während ENRIQUES allein schon durch das Zusammenbringen einer Fibrinflocke mit der Verdauungsflüssigkeit einen « *effetto potentissimo* » erzielte. VAN DER HEYDE hat einige Verdauungsversuche mit Hühnereiweiss und Gelatine angestellt, wobei er das Substrat entweder mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alkalisch machte oder mit  $\text{HCl}$  ansäuerte. In beiden Fällen konnte er eine proteolytische Wirkung nachweisen. Von den für die Kohlehydrate in Betracht kommenden Fermenten beschreibt COHNHEIM; « 1. ein



diastatisches Ferment, das Stärke in lösliche reduzierende Körper umwandelt, 2. ein invertierendes Ferment, das Rohrzucker in Dextrose und Lävulose spaltet ». ENRIQUES und CLERC fanden eine Amylase und eine Invertase, VAN DER HEYDE hat bei *Thyone* nur letztere feststellen können. Die meisten dieser Daten beziehen sich auf Gewebeextrakte.

Eine Lipase wird nur von CLERC erwähnt.

Ich selbst habe mich etwas eingehender mit den Proteasen und Carbohydrasen beschäftigt, weil ich glaubte, dass eine genauere Kenntnis der verschiedenen tierischen Enzyme nicht nur den Zoophysiologyen, sondern auch den Biochemiker interessieren dürfte.

#### A. Proteasen.

Als Substrat benutzte ich meist Lösungen von Witte-Pepton. Dieser Stoff zeichnet sich durch leichte Löslichkeit und konstante Zusammensetzung aus, während die biologische Schwierigkeit, dass das Witte-Pepton wahrscheinlich wenig mit der natürlichen Stickstoffnahrung der Tiere übereinstimmen wird, praktisch kaum beseitigt werden kann. Gewöhnlich wurden die Substratlösungen auf ein pH gebracht, das ungefähr mit dem im Darminhalt herrschenden übereinstimmte. Die Extrakte wurden folgendermassen bereitet: Zerreiben der Organe mittels gewaschenen und geglühten Seesandes, Extraktion mit wenig Seewasser, dem in manchen Versuchen etwas Alkohol beigelegt war, Durchpressen durch ein Leinentuch. Die Extrakte enthalten also immer noch viel Organeiweiss.

Die Hydrolyse wurde mittels der SÖRENSEN'schen Formultiration gemessen. Die Verdauungsgemische befanden sich in Erlenneyer-Kölbchen, aus denen in bestimmten Zeitabständen ein aliquoter Teil entnommen und titriert wurde. Die Neutralisation geschah mit 0, 2 N. NaOH. Als Mass der Hydrolyse werden im folgenden die zur Neutralisierung benötigten ccm Natronlauge angegeben. Im allgemeinen bewegt sich der Titrationsfehler um 1 ccm. 0,2 N. NaOH.

Zunächst überzeugte ich mich davon, dass sowohl die Wundernetze, die Wand des Darmkanals wie auch die Verdauungsflüssigkeit selbst eine Protease enthalten.



Von 5 Holothurien, die bei 18° C. vier Tage im Aquarium gehungert hatten, und deren Darm fast schlammfrei war, wurde die gelbe Verdauungsflüssigkeit gesammelt und Extrakte aus der Magenwand und den Wundernetzen hergestellt. Die beiden letzteren hatten ungefähr gleiche Konzentration an Gewebe. Substrat: 5 % ige Wittepeptonlösung in aq. dest. + Thymol, mit einer Spur NaOH auf pH 7,5 gebracht. Temperatur 41° C  $\pm$  1°. Zur Titration wurden immer 10 ccm. angesetzt. W.N. Extr. = Wundernetzextrakt. Die drei letzten Versuche dienen zur Kontrolle.

TAB. III.

Substrat:	Enzym- Präparat:	Bindung v. 0. 2 N. NaOH nach			Zunahme in 66 Std.
		0 Std.	18 Std.	66 Std.	
50 ccm Pept - Lös.	5 ccm Verd. Saft	2,10	2,65	3,40	1,30
Idem	7 ccm W. N. Extr.	2,60	3,30	4,20	1,60
Idem	7 ccm Magenextr.	2,45	5,00	7,95	5,50
Idem	7 ccm aq. dest.	2,00	2,15	2,30	0,30
50 ccm aq. dest.	7 ccm W. N. Extr.	0,50	0,65	0,60	0,10
Idem	7 ccm Magenextr.	0,40	0,65	0,65	0,25

Die Protease findet sich also in allen drei benutzten Präparaten, am meisten in der Magenwand.

Die zweite Frage, die ich zu beantworten versuchte, war, ob das Vorkommen dieser Proteasen konstant ist, und welche Einflüsse ihre Quantität ändern können.

Im vorigen Kapitel fand ich eine Beziehung zwischen Farbe, Geruch, Azidität usw. der Verdauungsflüssigkeit. Daher interessierte es mich, ob diese Abhängigkeit sich auch erstreckt auf den Proteasengehalt.

Dass dies wirklich zutrifft, geht z. B. aus dem folgenden Protokoll hervor.

Von 5 Tieren, die vier Tage bei 18° C. gehungert hatten, wurden die Verdauungsflüssigkeiten gesammelt.



Es ergaben sich folgende Werte :

TAB. IV.

Probe	Farbe	Volum	pH
I	Farblos	18 ccm	7,3
II	Goldgelb	21 ccm	< 6,0
III	Hellgelb	20 ccm	6,8
IV	Goldgelb	7 ccm	< 6,0
V	Gelblich	23 ccm	6,6

Sodann wurden von den verschiedenen Flüssigkeitsportionen je 5 ccm gegeben zu 50 ccm 5 % Witte-Peptonlösung. Die Ergebnisse ersieht man aus :

TAB. V.

Substrat :	Enzym- Präparat :	Bindung v. 0,2 N. NaOH nach			Zunahme in 66 Std.
		0 Std.	18 Std.	66 Std.	
50 ccm Lös.	5 ccm Verd. Saft. I.	2,10	2,20	2,50	0,40
Idem	Idem II.	2,15	3,35	4,30	2,15
Idem	Idem III.	2,05	2,20	2,65	0,60
Idem	Idem IV.	2,15	3,20	4,30	2,15
Idem	Idem V.	2,10	2,25	2,75	0,65

Voranstehende Tabelle zeigt überdies, dass die individuellen Schwankungen ziemlich gross sind; so erreicht ein Tier schneller, als das andere den Zustand, den ich als « Hunger » bezeichnen zu können glaube, nämlich die Verdrängung des Verdauungssaftes durch Seewasser. Sobald die Nahrung aus dem Darne verschwunden ist, kann man auch eine Abnahme des Proteasegehaltes feststellen, zunächst in der Verdauungsflüssigkeit, später auch in der Magenwand. Hierfür ein Beispiel.

Von je 4 Holothurien, die 1, 3 und 7 Tage gehungert hatten, wurden die Verdauungsflüssigkeiten gesammelt. (70 bzw. 60 bzw. 20 ccm) und die Mägen mit entsprechenden Mengen Seewas-



ser extrahiert. Substrat: 4,5 % ige Witte-Peptonlösung in aq. dest + Thymol, auf pH 7 gebracht. Temperatur 41° C. Titrierte Mengen 10 ccm.

TAB. VI.

Substrat:	Enzym- Präparat	Bindung v. 0,2 N. NaOH. nach			Zunahme in 49 Std.
		0 Std.	23 Std.	40 Std.	
60 ccm Lösung	Verd. Saft 7 Tage 10 ccm	2,80	2,90	2,95	0,15
Idem	Verd. Saft 3 Tage 10 ccm	2,80	2,85	3,00	0,20
Idem	Verd. Saft 1 Tag 10 ccm	2,85	4,00	4,50	1,65
Idem	Mag.-Extr. 7 Tage 10 ccm	3,15	4,50	5,25	2,10
Idem	Mag.-Extr. 3 Tage 10 ccm	3,25	5,10	6,25	3,00
Idem	Mag.-Extr. 1 Tag 10 ccm	3,10	5,30	6,40	3,30
Idem	Mag.-Extr. gekecht 1 Tag 10 ccm	3,10	3,30	3,35	0,25

Die Darminhalte der Tiere, die 3 bzw. 7 Tage gehungert hatten, liessen die proteolytische Wirkung vermissen. Sie sind praktisch nicht vom Seewasser zu unterscheiden. In der Magenwand ist die Protease länger als im Verdauungssaft selbst bei extremen Hungertieren noch nachzuweisen.

Änderungen im Proteasegehalt der Wundernetze lassen sich viel schwieriger feststellen, weil die Extrakte kaum dosiert werden können. Ich erhielt jedoch den Eindruck, dass der Proteasegehalt ziemlich konstant bleibt.

Die Konzentration ist offenbar am höchsten in der Magenwand. Vergleichen des Proteasegehaltes der Wundernetze und der Magenwand findet man bereits in der ersten Tabelle. Wir bringen hier eine weitere, in welcher Magen- und Darmextrakte, die von



gleich viel Ausgangsmaterial stammten, sowie Verdauungsflüssigkeit untereinander verglichen werden.

Von 4 frischen Tieren mit noch gefülltem Darm wurden die Verdauungsflüssigkeiten gesammelt, und aus Magen und Darm Extrakte mit entsprechenden, minimalen Mengen Seewasser hergestellt. Der Darmextrakt ist im Gegensatz zum Magenextrakt sehr reich an Schleim. Die sonstigen Bedingungen wie im vorangehenden Versuch.

TAB. VII.

Substrat :	Enzym- Präparat	Bindung v. 0,2 N. NaOH nach			Zunahme in 96 Std.
		0 Std.	26 Std.	96 Std.	
30 ccm Lösung	7 ccm Darm-Extr	2,65	2,90	3,85	1,20
Idem	7 ccm Mag.-Extr.	2,85	6,70	10,10	7,25
Idem	7 ccm Verd-Flüssigk.	2,50	4,05	5,35	3,15

Sodann sollte die hier vorliegende Protease etwas näher charakterisiert werden, um sie vielleicht mit einigen besser studierten Enzymen vergleichen zu können.

Zunächst versuchte ich zu entscheiden, welche Proteinstoffe hydrolysiert werden, und ob sich etwa je nach dem verwendeten Substrat quantitative Unterschiede nachweisen liessen.

Hierzu wurden aus verschiedenen Gruppen der Proteinstoffe, je ein Vertreter gewählt. Für die Proteosen und Peptone: Wittepepton, für die Scleroproteine; Gelatine, für die Phosphoproteine: Natrium-Kaseinat aus Kasein (Hammarsten), und für die Globuline gereinigtes Blutfibrin.

Von den ersten drei Eiweissstoffen verwendete ich 4 % ige Lösungen, die auf ungefähr pH 7 gebracht waren, von dem Fibrin eine feine 4 % ige Suspension in aq. dest. Extrakte und Verdauungssaft von Holothuriern wurden in der üblichen Weise gewonnen, die weiteren Daten stimmen ebenfalls mit denen der vorigen Versuche überein.



TAB. VIII.

Substrat	Enzym- Präparat	Bindung v. 0.2 N. NaOH nach			Zunahme in 97 Std.
		0 Std.	31 Std.	97 Std.	
50 cem Pept. Lös.	5 cem Extr.	2,70	3,95	5,40	2,70
50 cem Gelät. Lös.	Idem	1,05	1,20	1,45	0,40
50 cem Na-Kas.	Idem	1,35	2,10	2,85	1,50
50 cem Fibrin	Idem	0,25	1,05	1,05	3,35
50 cem aq. dest.	Idem	0,25	—	0,30	0,05
50 cem Pept. Lös.	5 cem Verd. Saft.	2,30	3,05	3,35	1,05
50 cem Gelät. Lös.	Idem	0,90	1,10	1,25	0,35
50 cem Na-Kas.	Idem	1,15	1,60	2,15	1,00
50 cem Fibrin	Idem	0,15	0,50	1,15	1,00

Weitere Experimente wurden angestellt, um dem Einfluss der Temperatur auf die Hydrolyse zu ermitteln. Die Resultate findet man in der nächsten Tabelle.

Versuchsbedingungen wie früher. Substrat: 4 % ige neutrale Peptonlösung.

TAB. IX.

Substrat	Enzym- Präparat	Temp. Gr. C.	Bindung v. 0,2 N. NaOH nach			Zunahme in 106 Std.
			0 Std.	22 Std.	106 Std.	
60 cem Lösung	5 cem Extrakt	15,0	3,15	3,65	4,80	1,65
Idem	Idem	29,5	3,15	4,15	6,05	2,90
Idem	Idem	40,5	3,10	4,70	9,05	5,95
Idem	Idem	51,0	3,15	5,25	8,45	5,30
Idem	5 cem gekochtes Extrakt.	40,5	3,20	3,30	3,40	0,20



Zu den charakteristischsten Eigenschaften eines proteolytischen Enzyms gehört erstens, dass es bestimmte Proteinstoffe bis zu einem gewissen Grade hydrolysiert und dass diese seine Wirksamkeit eine bestimmte Abhängigkeit von der herrschenden Wasserstoffionenkonzentration zeigt.

Es gehörte nicht zum Aufgabenkreis dieser Arbeit, die Protease der Holothurien erschöpfend zu studieren, ich hoffe, später genauere Daten hierüber zu bringen. Ich habe mich darauf beschränkt, den Einfluss der Reaktion auf die Verdauung auch von Wittepepton zu studieren. Dieses Substrat erschien mir, vor allem aus technischen Gründen, am zweckmässigsten.

Es wurden eine Anzahl 4 % iger Pepton-Puffergemische hergestellt, deren pH nach den Reihen von CLARK und LUBS mittels 1/10 mol. saurem Kaliumphthalats, 1/10 mol. sauren Kaliumphosphats, 1/10 mol. Borsäure gelöst in 1/10 mol. KCl, 1/10 mol. HCl bzw. NaOH reguliert war. Ferner diente noch eine 4 % ige Peptonlösung in aq. dest als Kontrolle. Auf diese Weise entstand eine Reihe von Gemischen mit folgendem pH: 3,2; 4,2; 5,2; 6,2; 7,2; 8,2; 9,2, denen je 5 ccm Magenextrakt zugesetzt wurden. Die Verdauungsgemische wurden in üblicher Weise nach bestimmten Zeitintervallen, ohne verhergehende Neutralisation, mit Formol titriert. Sie gaben nach der alkalischen sowohl, wie nach der sauren Seite einen verschieden starken Niederschlag, der bei der weiteren Untersuchung vernachlässigt wurde. Thermostat 40°C.  $\pm$  1°. NaOH-Bindung des Peptonkontrollgemisches; 2,40 ccm.-Fehlergrenze;  $\pm$  0,15 ccm. etwas höher als sonst, da sich der Farbumschlag in den Puffergemischen schwieriger feststellen liess.

TAB. X.

pH des Gemisches	NaOH - Bindung in			Zunahme in 162 Std.
	0 Std.	75 Std.	162 Std.	
3,2	4,95	6,40	7,75	2,80
4,2	4,15	5,75	6,85	2,70
5,2	3,05	5,35	7,05	4,00
6,2	4,25	6,75	8,95	4,70
7,2	3,30	6,25	8,80	5,50
8,2	3,80	7,80	12,45	8,65
9,2	3,00	8,70	11,90	8,90



Da es in dem soeben wiedergegebenen Versuch zu keiner deutlichen optimalen Reaktion gekommen war, und man zu der Vermutung gelangen könnte, dass bereits ohne Ferment eine Hydrolyse eintreten könnte, wurde weiterhin folgender Versuch durchgeführt.

In einer Reihe von Puffergemischen, ebenso wie die vorigen zubereitet, mit den folgenden pH: 2,8; 4,4; 5,6; 6,4; 6,8; 7,6; 8,2, wurden je 50 ccm mit 5 ccm Magenextrakt und in der Kontrollserie mit 5 ccm aq. dest. versetzt. Beide Serien wurden sodann titriert.

Zeichenerklärung; + E = mit Enzym, — E = ohne Enzym.

TAB. XI.

pH des Gemisches	Bindung von 0,2 N. NaOH nach						Zunahme in	
	0 Std.		22 Std.		75 Std.		75 Std.	
	+ E	— E	+ E	— E	+ E	— E	+ E	— E
2,8	5,20	5,10	5,60	5,10	6,00	5,15	0,80	0,05
4,4	4,05	3,75	4,50	3,80	4,85	3,95	0,80	0,20
5,6	2,50	2,35	3,60	2,40	4,65	2,50	1,15	0,15
6,4	4,05	3,70	5,00	3,60	5,90	3,90	1,85	0,20
6,8	3,55	3,15	4,60	3,20	4,65	3,30	2,10	0,20
7,6	2,70	2,40	4,00	2,45	5,15	2,55	2,40	0,10
8,8	3,05	2,95	4,90	3,05	6,95	3,00	3,90	0,05

Hieraus ergibt sich einerseits, dass sich im pH-Gebiete zwischen 2,8 und 9,2 offenbar kein Optimum für die Hydrolyse findet, und andererseits, dass die Selbstverdauung des Substrates sich innerhalb der Fehlergrenzen bewegt. Ohne Ferment tritt also bei den in Frage kommenden Wasserstoffionenkonzentrationen keine Hydrolyse ein. Die Verdauung wird nur durch Fermentwirkung hervorgerufen und zwar in steigendem Masse mit der Zunahme des pH. Anschliessend gebe ich hier eine graphische Darstellung der mitgeteilten Daten (Abb. 7).

Schliesslich versuchte ich, auch auf quantitativem Wege näher zu bestimmen, welche Produkte durch die Hydrolyse gebildet werden; qualitative Angaben können hier im allgemeinen nur wenig Anhaltspunkte geben. Vergewärtigt man sich die grosse



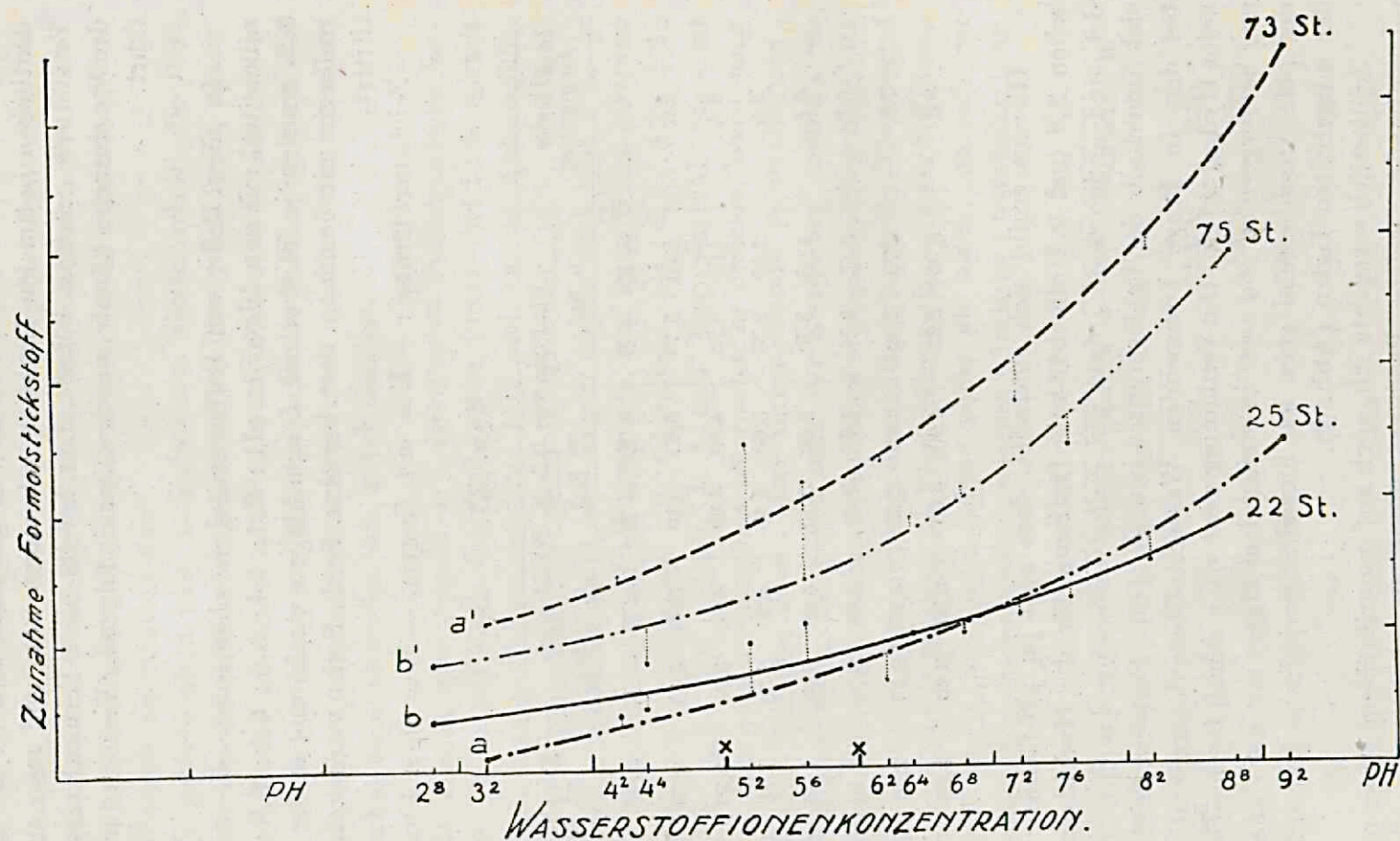


Abb. 7. — Abhängigkeit der Proteasewirkung von der Wasserstoffionenkonzentration, a Versuchserie der Tabelle, ..., b und b Versuchserie der Tabelle..



Zahl der Spaltprodukte, die durch die Hydrolyse entstehen können, so ist es meines Erachtens unzweckmässig, nach dem Verdauungsprozess die Substrate lediglich auf die Anwesenheit einiger Aminosäuren oder auf Aminosäuren überhaupt zu kontrollieren, z. B. auf Tyrosin mit MILLON's Reagens oder auf Tryptophan mit Bromwasser oder mittels der nicht immer gleichmässig arbeitenden Ninhydrinreaktion. Zwar ist es möglich, in einem bestimmten Zeitpunkt der Verdauung die vorhandenen Verdauungsprodukte qualitativ und quantitativ zu bestimmen, aber die meisten Verfahren sind für meine Zwecke äusserst umständlich. Dabei bleibt auch noch zu bedenken, dass die hier verwendeten Enzymquantitäten äusserst gering sind. Die relativ einfache Formoltitration in Stadien nach V. ENRIQUES und J. K. GJALDBAEK gibt zwar einen Eindruck vom Fortschreiten des Spaltungsprozesses, kann aber nicht eigentlich quantitativ genannt werden. Bessere Aussicht schien die in neuerer Zeit von R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ veröffentlichte Alkoholtitration zu versprechen. Diese beruht darauf, dass ebenso wie Formol auch Alkohol die bei der Verdauung entstandenen  $\text{NH}_2$ -Gruppen für eine weitere Dissoziation unwirksam macht, und dadurch die Carboxylgruppen alkalimetrisch bestimmbar werden. Bei einem Alkoholgehalt von 50 % werden unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator alle Polypeptide und 28 % der Aminosäuren, bei einem Alkoholgehalt von 90 % unter Verwendung von Thymolphthalein alle Polypeptide und Aminosäuren für die Titration zugänglich. Durch eine einfache Berechnung kann man hieraus die Aminosäuren und Polypeptide quantitativ ermitteln.

Um unsere Protease mit anderen proteolytischen Enzymen vergleichen zu können, haben wir ihre Wirksamkeit mit der von Trypsin verglichen.

Substrate: Neutrale 4 % ige Wittepeptonlösung und 4 % ige Lösung von Na-Kaseinat,  $\text{pH} \pm 7,5$ . Enzympräparat: 1. Magenextrakt von Holothurien wie üblich bereitet. 2. 0,5 % ige Lösung von Trypsin-Kahlbaum. 9 Versuche:

- I. 80 ccm Peptonlösung mit 50 ccm Trypsinlösung.
- II. Idem mit 5 ccm Magenextrakt.
- III. 70 ccm Na-Kaseinatlösung mit 5 ccm Trypsinlösung.
- IV. Idem mit 5 ccm Magenextrakt.



Konservierung Thymol; Thermostat: 35° C. Es wurden je 5 ccm titriert, das erste Mal mit 6,6 ccm Alkohol 88 % und Phenolphthalein, das zweite Mal mit 95 ccm Alkohol 95 % und Thymolphthalein versetzt. Angenommen die 1. Alkalibildung sei = a, die 2. = b, die Alkalibindung für die Aminosäuren = x, die für die Polypeptide = y, dann findet man x und y aus den Formeln:

$$x = \frac{100}{72} (b - a) \text{ und } y = b - x.$$

Der Titrationsfehler ist ziemlich gross:  $\pm 0,07$  ccm 0,2 N. NaOH, weil die Flüssigkeiten dann und wann trübe sind. Dieser Fehler kann sich noch stärker ausprägen nach Anwendung der obigen Formeln. In der folgenden Tabelle ist die Alkalibildung wieder ausgedrückt in ccm 0,2 N. NaOH.

Zeichenerklärung: A.S. = die für die Aminosäuren benötigte Bindung von Lauge. P.P. = die der Polypeptide.

TAB. XII.

Zeit in Std.	Peptonlösung				Na-Kaseinatlösung			
	Mit Trypsin		Mit Magenextrakt		Mit Trypsin		Mit Magenextrakt	
	A. S.	P. P.	A. S.	P. P.	A. S.	P. P.	A. S.	P. P.
0	0,42	0,53	0,42	0,68	0,50	0,20	0,40	0,35
41	0,70	0,80	1,04	0,73	0,62	0,90	0,53	0,57
96	0,65	1,47	1,87	1,73	0,80	1,20	0,40	0,95
Zunahme in 96 Std.	0,23	0,94	1,45	1,05	0,30	1,00	(0,00)	0,60

Die Resultate obiger Tabelle werden weiter unten im Zusammenhange mit den übrigen Ergebnissen besprochen.

Aus diesen Versuchsreihen ersehen wir erstens, dass sich die Protease bei unseren Tieren unter natürlichen Bedingungen in den Wundernetzen, in der Magenwand, wie auch frei in der Verdauungsflüssigkeit befindet. Dass letztere das Ferment in verhältnismässig geringer Konzentration enthält, lässt sich leicht aus der Ernährungsweise der Tiere verstehen. In der Darmwand scheint keine oder nur wenig Protease vorzukommen. Im Hungerzustande reichert sich die Protease nicht wie bei vielen anderen Invertebraten im Hungersaft an, wie z. B. bei *Astacus* und *Octopus*, sondern verschwindet



im Gegenteil aus der Verdauungsflüssigkeit, die offenbar durch Seewasser ersetzt wird. Vielleicht bildet dies z. T. die Erklärung dafür, dass es COHNHEIM nicht gelang, bei den Holothurien eine Protease nachzuweisen. Es erklärt aber andererseits nicht, dass seine « Darmextrakte » (er meint offenbar vom ganzen Darmkanal) Fibrin unverdaut liessen. Weiterhin bestreitet C., dass eine Selbstverdauung der Darmwand stattfindet. Hierzu kann ich nur bemerken, dass es entschieden leichter ist, aus Magen, der 24 Stunden sich selbst überlassen war, als aus dem entsprechenden fri-

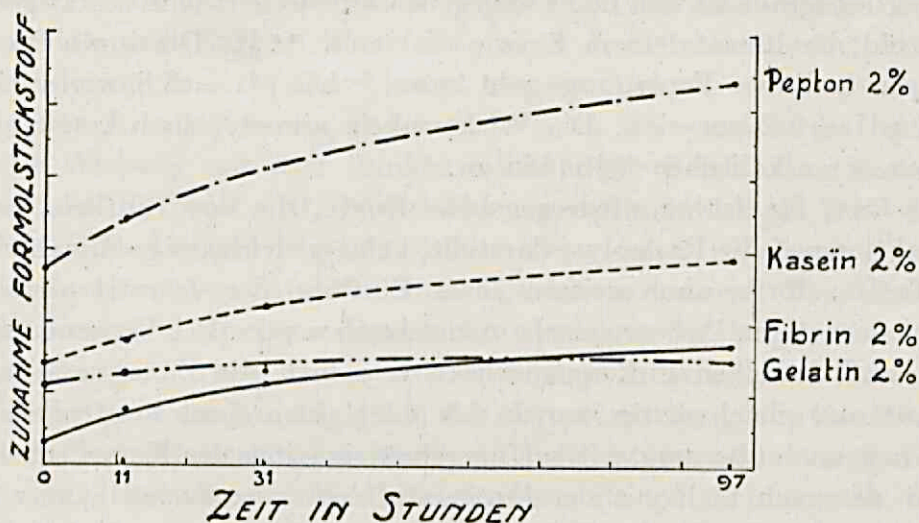


Abb. 8. - Der Einfluss des Substrates auf die Wirkung der Proteasen. Zunahme der Formolstickstoffbindung von vier verschiedenen Verdauungsgemischen mit den gleichen Enzymmengen.

schen Organ Extrakte herzustellen. Eigentliche Versuche über Autolyse habe ich nicht angestellt.

Wenn ENRIQUES (S. 12) schreibt, dass er « per mezzo del succo gastrico » eine sehr starke Fibrinverdauung bekommen habe, so möchte ich dies nach meinen Versuchen dahin einschränken, dass bei andern Invertebraten (*Astacus*) der proteolytische Effekt des Verdauungssaftes doch ungleich stärker ist.

Was die Eigenschaften der Protease anbetrifft, so ist sie also zweifellos imstande, alle untersuchten Proteinstoffe anzugreifen. Dabei zeigen sich aber deutliche quantitative Unterschiede. In neutralem Milieu ist ceteris paribus die Verdauung von Wittepeton maximal, dann kommt Fibrin, dann Na-Kaseinat, während Gelatine nur eine sehr geringe Hydrolyse erfährt (Abb. 8).



Aus den Versuchen bei verschiedenen Temperaturen von 15 bis 51° C. geht hervor, dass ein Optimum bei 40° C. festzustellen war; zwischen 40° und 50° bestand eine breite optimale Zone.

Vom Einfluss der Reaktion auf die Proteolyse gibt ENRIQUES (S. 11) an, dass die Verdauung in schwach saurem Milieu stattfindet, ohne jedoch zu bestreiten, dass sie auch bei alkalischer Reaktion vor sich gehen könne. VAN DER HEYDE (S. 21) konstatierte Wirksamkeit sowohl bei Verdauungsproben, die mit HCl angesäuert bzw. mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> basisch gemacht waren. Die genauen Reaktionsgrade werden nicht angegeben. Meine Versuche bestätigen sowohl die Resultate von E. wie die von v. D. H. Die durch Proteasen bedingte Verdauung geht sowohl bei pH = 2,8 wie auch bei pH = 9,2 vor sich. Die Wirksamkeit nimmt jedoch konstant nach der alkalischen Seite hin zu.

Dass die früher wiedergegebene Kurve, die den Einfluss der Reaktion auf die Proteolyse darstellt, keine gleichmässige Zunahme aufweist, dürfte ohne weiteres dem Einfluss der benutzten verschiedenartigen Puffergemische zuzuschreiben sein. Bei Verwendung ein und desselben Puffergemisches ist jedoch die Zunahme konstant und gleichmässig, wovon ich mich in andern Kontrollversuchen noch überzeugte. Die Unregelmässigkeiten der Kurve scheinen demnach nicht mit der Wasserstoffzahl zusammenzuhängen, sondern mit der Beschaffenheit der Anionen. Es war mir technisch nicht möglich, ein einheitliches Puffergemisch mit einem breiteren pH-Gebiet herzustellen.

Nimmt man gemäss der üblichen Definition von Trypsin an, dass es stärkere Wirksamkeit bei alkalischer Reaktion habe, dann würde die hier studierte Protease « ein » Trypsin darstellen. Bevor man jedoch eine derartige Klassifizierung vornimmt, scheint es mir angebracht zu sein, den Begriff Trypsin genauer zu umschreiben.<sup>1</sup>

Dabei stellt sich heraus, dass die in der Literatur vorliegenden Angaben über die Abhängigkeit der Trypsinwirkung von der Wasserstoffzahl sehr auseinandergehen. L. MICHAELIS und H. DA-

---

<sup>1</sup> Ich möchte es nicht unterlassen hier aufmerksam zu machen auf die neuesten Untersuchungen von WILLSTÄTTER und Mitarbeitern (Abhandlungen über Pankreasenzyme, Zeitschr. physiol. Chemie, 1925). Das Trypsin-Erepsin-Problem ist hierdurch in ein ganz anderes Licht gerückt worden. Auch für die Verdauungsphysiologie der Wirbellosen bieten W.'s Ergebnisse manche aussichtsreiche Gesichtspunkte.



VIDSOHN (2.) fanden bei der Spaltung von Pepton durch Pankreatin (Zeit 60-90 Min., Formoltitration) eine breite optimale Zone zwischen pH 7 und 9, während unterhalb von  $\text{pH} = 4$  keine Wirksamkeit zu erkennen war. S. PALITZSCH und L. E. WALBUM studierten die Verflüssigung von Gelatine durch Trypsin und fanden hierbei, ein Optimum das abhängig von der Temperatur zwischen pH 8,0 und 9,9 schwankte. W. E. RINGER (1. und 2.) dagegen konnte kein Optimum ermitteln. Bei der Lösung von Fibrin und der Spaltung von dialysiertem Serumeiweiß nahm die Enzymwirkung mit der Alkalinität zu, bis bei pH 11,8 eine schnelle Destruktion des Enzyms stattfand. Nach J. H. NORTHROP bezieht sich die optimale Wirkung nicht auf das Enzym selber, sondern auf das Eiweißsubstrat und zwar in dem Sinne, dass die maximale Wirkung mit dem Punkte vollständiger Salzbildung zusammenfällt. Er findet z. B. für Gelatine ein Optimum bei pH 7,4—8,0 für Globin bei pH 10,4. E. WALDSCHMIDT-LEITZ behauptet, dass die Resultate von RINGER dadurch fehlerhaft seien, dass dieser die durch die Reaktion verursachte Autolyse des Substrates vernachlässigte. Wenn man aber die von RINGER gebrachten Kurven, die sich auf die Abhängigkeit der Trypsinwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration beziehen, ansieht, so muss einem dies ziemlich unwahrscheinlich vorkommen. Bei  $\text{pH} \pm 12,0$  geht die Vernichtung des Enzyms ungleich schneller vor sich, als die durch die OH-Zahl bedingte Autolyse des Substrates. WALDSCHMIDT-LEITZ misst die Wirkung eines Pankreaspräparates auf eine 3 % ige Gelatinelösung in 60 Minuten und bei 30° mittels der Alkoholtitration, wobei er sich durch ein geeignetes Puffergemisch ein pH zwischen 5,5 und 9,7 herstellte. Dabei findet er das Optimum « bei pH 8,2—8,7 während ein breiter optimaler Bereich von pH etwa = 7,7 bis  $\text{pH} = 9,1$  sich erstreckt ».

Bezüglich der Technik sind meine Versuche am ehesten mit denen von MICHAELIS und DAVIDSOHN zu vergleichen, während meine Resultate für die Meinung von RINGER sprechen.<sup>1</sup> In den

---

<sup>1</sup> Es ist nicht nur das » Trypsin « der höheren Säuger, das sich in seiner pH-Abhängigkeit so benimmt. Nach den neuesten im Druck befindlichen Untersuchungen des Herrn Professor RINGER deren Mitteilung er mir hier schon freundlichst gestattete, nimmt auch die Wirkung der pflanzlichen Protease Papaine (aus der *Carica papaya*) und ebenfalls der sich im Hungersaft vom Flusskrebs befindlichen Protease immer zu, bis endlich der gesteigerte Alkaligehalt eine schnelle Vernichtung herbeiführt.



beiden, oben wiedergegebenen Protokollen ist bei dem angewendeten pH-Gebiet kein Optimum zu bemerken. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass die verschiedenen Autoren als Massstab des Wirkungsoptimums nicht ohne weiteres untereinander vergleichbare Erscheinungen zugrunde legten. Abgesehen davon ist bei den Fällen, wo Wittepepton als Substrat verwendet wurde, noch mit der Möglichkeit zu rechnen, dass bei verschiedenen aktuellen Reaktionen die Art der Hydrolyse nicht die gleiche bleibt, sodass die wiedergegebene Kurve die Summe mehrerer Reaktionen gleicher oder verschiedener Art darstellen kann.

Bevor man also nicht zu einer besseren Kenntnis und schärferen Klassifizierung der Proteasen gekommen ist, täte man gut, Begriffe wie « Pepsin », « Trypsin », « Erepsin » in der Physiologie der Evertebraten nicht zu verwenden. Neuere Untersuchungen haben ja übrigens gelehrt, dass der Neutralitätspunkt durchaus keine natürliche Grenze zwischen den verschiedenen proteolytischen Enzymen darstellt.

Aus den Resultaten der Alkoholtitration geht nun hervor, dass die in Frage kommende Protease imstande ist, sowohl Polypeptide als Aminosäuren aus Wittepepton und Kasein zu bilden. Die früher gegebene Tabelle, die die Substrate miteinander vergleicht, zeigte, dass die Verdaulichkeit von Wittepepton grösser ist, als die von Na-Kaseinat. Gleiche Ergebnisse habe ich mit der Alkoholtitration erhalten, während jedoch Trypsin beide in gleicher Weise zu verdauen scheint. Hierüber hinausgehende Schlüsse bezüglich der Aktivität des Ferments im Tiere selbst wage ich nicht zu ziehen. Wir wissen ja durchaus nicht, inwieweit unser Substrat mit der Nahrung des Tieres übereinstimmt, abgesehen davon, dass es sich dort auch unter ganz anderen Verhältnissen befindet.

Ich möchte hier noch bemerken, dass mir die Alkoholtitration von WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ ein wertvolles Hilfsmittel bei der Unterscheidung der Wirkungsweisen der Proteasen zu sein scheint.

Sie ist allerdings selbst in der vereinfachten Form wegen der grossen Quantitäten Alkohol, die sie erfordert, kostspielig, während andererseits die indirekte Bestimmungsweise — Alkaliverbrauch von Aminosäuren und Polypeptiden — die Fehlergrenze erweitert. Ein Vorteil aber ist, dass der Umschlagpunkt bei trüben und leicht gefärbten Flüssigkeiten besser bestimmbar ist, als mittels der Formoltitration.



### Tyrosinase.

Bei vielen Verdaunungsversuchen mit Proteinen wird die Flüssigkeit, meist erst nach längerer Zeit dunkel oder gar schwarz. Dies geschieht in Versuchen, bei denen die Hydrolyse nur kurze Zeit erfordert und weiter hauptsächlich bei Verwendung von Magenextrakten. In den Versuchsreihen, in denen die Abhängigkeit der Fermentwirksamkeit von dem herrschenden pH studiert wurde, ergab sich, dass nur der Inhalt der mittleren Gläser (pH 4,4—8,2) schwarz wurde, während die Proben von pH 2,8—4,2 und die bei 9,2 ihre ursprüngliche Farbe beibehielten. Offenbar kommt also auch hier eine Tyrosinase vor, d. h. ein oxydierendes Enzym, das imstande ist, zyklische Körper wie Tyrosin in Melanine überzuführen. Weitere Versuche habe ich nicht angestellt, und die Frage, ob und wie der Stoff im Tier wirkt, muss ich unentschieden lassen. Manchmal nimmt auch die filtrierte Darmflüssigkeit nach einiger Zeit eine dunkle, fast schwarze Farbe an, die auch BIEDERMANN an der Darmflüssigkeit hungernder Raupen beobachtet hat; er führt diese Erscheinung auf die gleiche Ursache zurück.

#### A. Die Carbohydrasen.

Auch beim Studium der Carbohydrasen habe ich mich möglichst bemüht, quantitative Methoden anzuwenden, um die Resultate untereinander besser vergleichbar zu machen. Meistens habe ich mich zu diesem Zwecke einer von SCHOORL (1. und 2) angegebenen jodometrischen Titration bedient, wobei das durch die Zucker reduzierte  $\text{CuO}$  von einer Fehlinglösung bestimmter Zusammensetzung gemessen werden kann. Um reduzierende Disaccharide von Monosacchariden unterscheiden zu können, benutzte ich BARFOED's Reagens. Da in einigen Fällen zwei Arten von reduzierendem Zucker gebildet werden können, und in einigen andern die von SCHOORL (1.) gegebene Tabelle das Reduktionsvermögen nicht angibt, ziehe ich es hier im allgemeinen vor, den Reduktionswert der Verdauungsgemische in cem 0,1 N. Thiosulfatlösung auszudrücken. (1 cem Thiosulfat entspricht  $\pm 3,3$  mg. Glucose bzw.  $\pm 3,1$  mg invertierte Saccharose bzw.  $\pm 2,8$  mg Amylum; weitere Details findet man in der zitierten Tabelle).

Zunächst versuchte ich festzustellen, ob und wo kohlenhydratspaltende Enzyme zu finden waren.



Von frischen Tieren wurde Magenextrakt und Verdauungsaft gewonnen. Hiervon wurden je 5 ccm zugefügt zu je 50 ccm 1) einer 2 % igen Lösung von löslicher Stärke in aq. dest., 2) einer 4 % igen Saccharoselösung in aq. dest. Konservierung mit Thymol. Thermostat 41°. Zuckerbestimmung in 4 ccm; diese entsprechen bezw. einem totalen Amylumgehalt in von 72 mg, oder einem totalen Saccharosegehalt von 144 mg.

TAB. XIII.

Thiobindung von		n a c h			Zunahme in 97 Std.	Thio- Bindung in %
		0 Std.	15 Std.	97 Std.		
50 ccm Am. Lös.	5 ccm Mag. Extr.	0,10	6,60	11,25	11,15	4,6
Idem	5 ccm Verd. Flüssigkeit	0,00	0,75	1,10	1,10	4,5
50 ccm Sacch. Lös.	5 ccm Mag. Extr.	0,20	11,25	15,20	15,00	33
Idem	5 ccm Verd. Flüssigkeit	0,10	2,00	3,75	3,65	8

Sowohl Magenwand wie Verdauungsflüssigkeit enthalten also eine Amylase und eine Invertase, aber wie bei den Proteasen findet sich nur wenig Enzym frei in der Verdauungsflüssigkeit. Dass man auch die wirksameren Präparate aus der Magenwand erhält, dürfte aus folgendem Protokoll hervorgehen.

Von frischen Tieren wurden in je gleichem Volumen Seewasser Extrakte hergestellt und zwar aus der Magenwand, den Wundernetzen und der Darmwand.

Der letztgenannte Extrakt ist insofern schwer zu dosieren, als er ausserordentlich reich an viskösem Schleim ist, welcher sogar die Filtration verhindert.

Darum wurde hier der Organbrei mit Sand zum Substrat zugefügt und die Quantität nach Augenmass bestimmt. Substrate: 2 % ige Amylose und Saccharoselösungen; in jedem Versuch 50 ccm mit 5 ccm Extrakt. Bestimmung des Reduktionswertes in 5 ccm, übereinstimmend mit 90 mg Amylose bezw. Saccharose. Thymol. Temperatur 30° C.



TAB. XIV.

Substrat + Enzym:		cem 1/10 N. Thiobindung			Spaltungsgrad in %
		Zunahme nach 75 Std.	Spaltungsgrad in %	nach 90 Std.	
50 cem Amylose	+ 5 cem Mag. Extr.	11,50	39	—	—
50 cem Sacch.	+ 5 cem Mag. Extr.	12,70	45	—	—
50 cem Amylose	+ 5 cem W. N. Extr.	—	—	3,55	12
50 cem Sacch.	+ Idem	—	—	2,35	8
50 cem Amylose	+ Darmextr.	—	—	3,45	11
50 cem Sacch.	+ Idem	—	—	2,05	7

Aus den eben erwähnnten technischen Gründen entschloss ich mich, für die weiteren Versuche nur Magenextrakte zu verwenden.

Zur Feststellung, welche Carbohydrate durch die Verdauungsfermente angegriffen werden, bediente ich mich 2 % iger Lösungen von Glykogen, Raffinose, Saccharose, Maltose und Laktose und versetzte dieselben mit Magenextrakt.

50 cem Lösung mit 5 cem Extrakt. Nach 75 Stunden wird der Reduktionswert mit SCHOORLS Titrationsverfahren bestimmt. Weiter wurden zwecks Unterscheidung der Monosaccharide je 5 cem zu 50 cem siedender Lösung von frischbereitetem BARFOEDS Reagens zugefügt und damit 3 Minuten gekocht. Es ergaben sich folgende Resultate.

TAB. XV.

Substrat	Reduktion mit FEHLING, in cem. 0,1 N Thiolösung	Reduktion mit BARFOED
Amylose	11,50	mässig
Glykogen	7,20	keine
Raffinose	0,60	keine
Saccharose	12,70	sehr stark
Maltose		stark
Laktose		keine



Aus voranstehender Tabelle ist ersichtlich, dass Amylose, Glykogen, Saccharose und Maltose verdaut werden, während Raffinose und Laktose refraktär scheinen für die anwesenden Enzyme. Vergleichen wir bei der Reduktion mit BARFOED's Reagens die ansehnlichen Unterschiede zwischen Saccharose und Amylose, die mit FEHLING fast denselben Reduktionswert gaben, dann wird klar, dass die Amylose in Disaccharide (Maltose) und Monosaccharide gespalten sein muss. Die rotviolette Farbe der Jodreaktion weist darauf hin, dass die Amylose selbst fast verschwunden und zum Teil in Erythrodextrin übergeführt ist. Das Ausbleiben der Reduktion mit BARFOED's Reagens lässt darauf schliessen, dass das Glykogen nicht bis zu den Monosacchariden abgebaut ist. Die Jodreaktion andererseits zeigt, dass es auch noch z. T. in unveränderter Form anwesend ist

Eine weitere Versuchsreihe beschäftigte sich mit dem Einfluss der Temperatur.

Je 20 ccm 2 % ige Saccharose- bzw. Amyloselösung wurden mit 3 ccm auf übliche Weise hergestellten Extraktes versehen. Konservierung: Thymol. 4 ccm wurden titriert. Reduktionswert nach 14 Stunden bestimmt. 4 ccm entsprechen  $\pm 70$  mg reduzierbaren Zuckers. Fehlergrenze + 0,2 ccm Thio = 1 %.

TAB. XVI.

Substrat	Temp.	Zunahme in ccm 1/10 N Thio	Spaltungsgrad in %
Amylose	20°	3,60	15
Idem	37°	4,30	18
Idem	57°	1,55	6
Saccharose	20°	1,25	6
Idem	37°	3,80	17
Idem	57°	0,00	—

In beiden Fällen ist also 37° optimal, während die Wirkung bei 57° C. schon stark gehemmt bzw. aufgehoben ist.

Die Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration wurde auf dieselbe Weise wie bei den Proteasen bestimmt. Mittels der Puffergemische von CLARK und LUBS wurden Lösungen von Amy-



lose und Saccharose auf ein bestimmtes pH gebracht und mit Magenextrakt versehen. Nur bei den Gemischen mit der stärksten sauren bzw. stärksten alkalischen Reaktion ( $\text{pH} = 2,8; 4,2; 9,0$ ) wurde eine Kontrolle gemacht, bei welcher statt Magenextrakt das gleiche Volumen aq. dest. zur Verwendung kam.

Von 10 Tieren wurde Magenextrakt gewonnen, im ganzen 40 ccm. Zu jeder Probe wurden 20 ccm Substrat und 3 ccm Extrakt verwendet. Substrate 2% ige Lösungen von Amylose und Saccharose mit Thymol. Wegen der Zusammensetzung der Puffergemische vgl. die entspr. Protease-Protokolle, ferner auch KOLTHOFF (S. 118). Temp.  $39^{\circ}\text{C}$ . Je 4 ccm titriert, die einem Totalkohlehydratgehalt von  $\pm 70$  mg entsprechen. Die Ziffern bedeuten ccm 0,1 N. Thiosulfat, Fehler  $\pm \%$ .

TAB. XVII.

Substrat	pH	Thiobindung nach			Zunahme in 72 Std.	Spaltungsgrad in % 72 Std.
		0 Std.	24 Std.	72 Std.		
Am. + Mag. Extr.	2,8	0,3	1,0	3,2	2,9	12
Am. + aq. dest.	2,8	0,3	0,13	0,2	—	—
Am. + Mag. Extr.	4,2	0,3	4,7	8,0	7,7	34
Am. + aq. dest.	4,2	0,5	0,3	0,5	—	—
Am. + Mag. Extr.	5,6	0,3	8,4	11,2	10,9	46
Idem	6,6	0,3	8,8	10,8	10,5	44
Idem	7,6	0,3	7,8	9,4	9,1	38
Idem	9,0	0,3	4,7	6,3	6,0	25
Am. + aq. dest.	9,0	0,3	0,4	0,3	—	—
Sacch. + Mag. Extr.	2,8	0,6	1,9	4,3	3,7	16
Sacch. + aq. dest.	2,8	0,4	2,5	7,0	6,6	30
Sacch. + Mag. Extr.	4,2	0,4	2,3	2,5	2,0	9
Sacch. + aq. dest.	4,2	0,8	0,5	0,5	0,1	0,4
Sacch. + Mag. Extr.	5,6	0,5	9,3	12,7	12,2	56
Idem	6,6	0,4	11,2	14,8	14,4	66
Idem	7,6	0,1	10,0	12,2	12,1	55

In beiden Versuchsreihen kommt es demnach zu einem deutlichen Optimum. Es könnte auffallen, dass in den Saccharose-



versuchen bei  $\text{pH}=2,8$  der ohne Enzym erhaltene Reduktionswert viel höher ist, als der mit Enzym. Ich glaube, diese Tatsache dem Umstande zuschreiben zu dürfen, dass im letzteren Falle das Eiweiss des Magenextrakts eine Hemmung darstellte.

Die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Wasserstoffzahl geht aus der hier folgenden Kurve hervor. (Abb. 10).

Um schliesslich noch eine Vorstellung vom Verlauf der Hydrolyse in vitro zu geben, seien die folgenden Kurven beigelegt, worin die quantitative Zunahme der reduzierenden Zucker in % vom totalen Reduktionswert ausgedrückt ist (Abb. 10). In beiden Fällen wurde die vereinfachende Annahme gemacht, dass die Spaltung komplett verläuft, d. h. dass alle reduzierenden Körper denselben Reduktionswert geben wie die Glucose.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich erstens, dass die Verteilung der Carbohydrasen im Darmsystem in grossen Zügen mit der der Proteasen übereinstimmt. Wir finden amylolytische und sacharolytische Enzyme in den Wundernetzen, der Magenwand, der Darmwand wie auch frei im Verdauungsflüssigkeit. Der Magenwandextrakt enthält auch hier am reichlichsten das Ferment.<sup>1</sup> Die Konzentration der in der Verdauungsflüssigkeit enthaltenen Enzyme ist hier wieder klein.

Die in der Nahrung des Tieres wahrscheinlich in Betracht kommenden Carbohydrate, wie Stärke und Zucker, werden bis auf die Monosaccharide herunter gespalten, während auch ich mir über die Zwischenprodukte der Glykogenspaltung keine Vorstellung bilden konnte. Auch das bei der Stärkehydrolyse entstehende Produkt Maltose wird gespalten, während jedoch ein anderes Disaccharid, Laktose, nicht angegriffen wird. Eine « abnorme » Zuckerart wie die Raffinose wird ebenfalls nicht abgebaut. Im Zusammenhang damit sei mitgeteilt, dass ich in Versuchen, die ich früher mit Extrakten aus den Radialdivertikeln des Seesterns *Astropecten aurantiacus* anstellte, zu genau den gleichen Resultaten gelangte. Über Cytasen sind keine Versuche angestellt worden. Dass ein derartiges Enzym anwesend ist, macht der Vergleich des natürlichen Inhalts im vorderen und hinteren Abschnitt des Darmkanals wahrscheinlich. Während man im Kropf

---

<sup>1</sup> Auch hier wieder lassen sich die kraftigsten Enzympräparate bereiten aus Extrakten der Gewebe, im Gegensatz zu dem was man sonst zu finden pflegt.



reichlich lebensfrische Algenstückchen findet, sind diese im End-

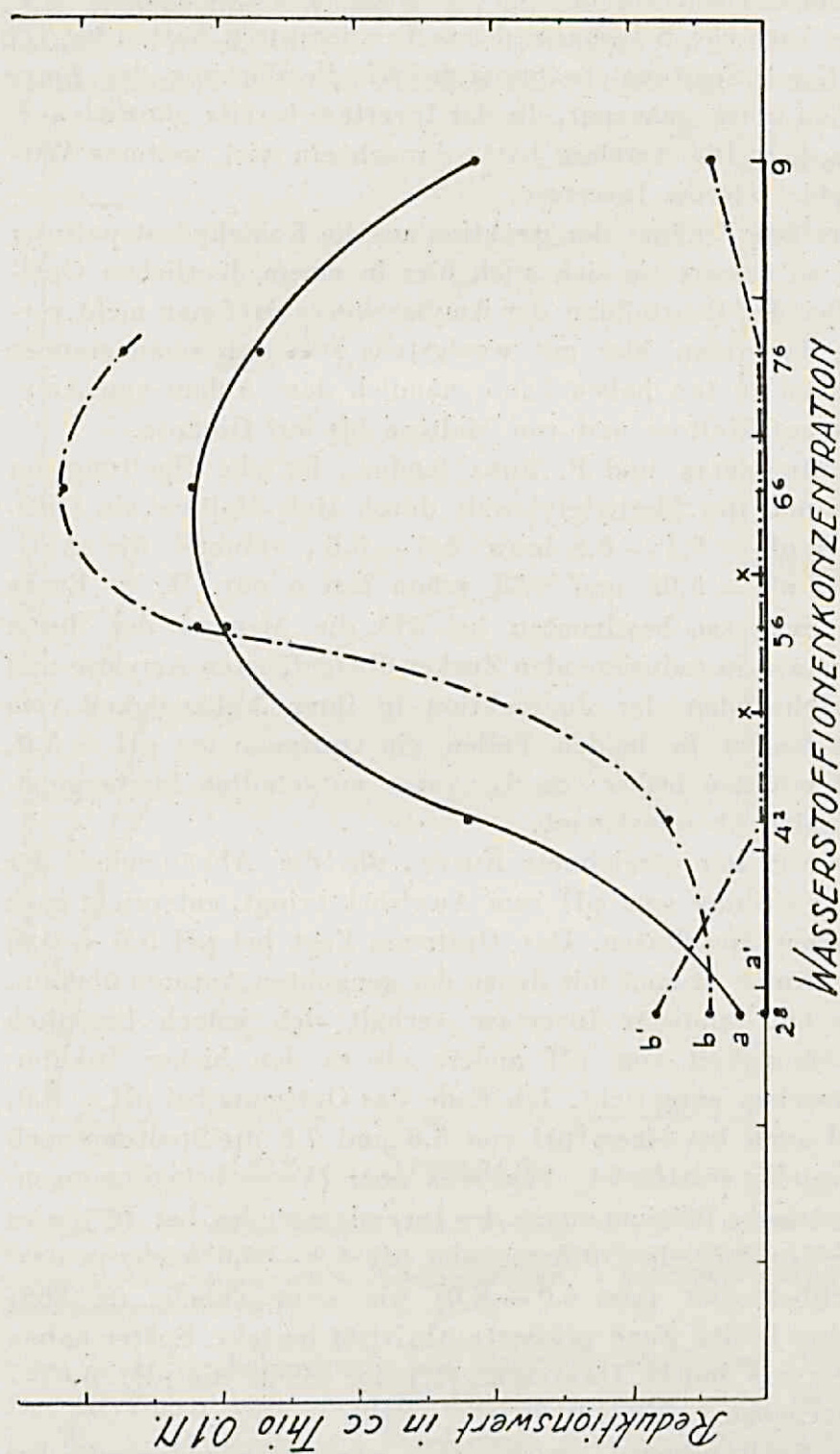


Abb. 9.—Einfluss des Substrates auf die Wirkung der Karbohydrasen. Zunahme des Reduktionswertes bei verschiedenen Substraten mit den gleichen Enzymmengen.

darm meist entfärbt und teilweise aufgelöst. Bei harten Geweben



wie z. B. in toten Posidoniablattresten, und Holzstückchen ist aber niemals eine Veränderung der Struktur nachweisbar.

Die Versuche bei verschiedenen Temperaturen hatten bei 37° eine optimale Spaltung, während bei 57° die Wirkung der Amylase schon stark gehemmt, die der Invertase bereits gänzlich aufgehoben war. Die Amylase hätte danach ein viel weiteres Wirkungsgebiet als die Invertase.

Was den Einfluss der Reaktion auf die Kohlehydratspaltung betrifft, so äussert sie sich auch hier in einem deutlichen Optimum. Bei der Beurteilung der Amylasekurve darf man nicht vergessen, dass man hier mit wenigstens zwei sich summierenden Reaktionen zu tun haben kann, nämlich dem Abbau von Amylose bis auf Maltose und von Maltose bis auf Glukose.

L. MICHAELIS und P. RONA fanden, für die Spaltung der Maltose und des Methylglykosids durch Hefe-Maltase ein Optimum bei  $\text{pH} = 6,1 - 6,8$  bzw.  $5,8 - 6,6$ , während die Aktivität bei  $\text{pH} = 5,02$  und  $7,71$  schon fast 0 war. H. v. EULER und O. SVANBERG bestimmten bei 37° die Mengen der durch Malzdiastase in reduzierenden Zucker übergeführten Amylose und das Verschwinden der Jodreaktion in ihrer Abhängigkeit vom pH. Sie fanden in beiden Fällen ein Optimum um  $\text{pH} = 5,0$ , das gut mit den früher von L. ADLER mitgeteilten hierhergehörigen Zahlen übereinstimmt.

Die von mir gezeichnete Kurve, die die Abhängigkeit der Amylasenwirkung vom pH zum Ausdruck bringt, entspricht ganz den obigen Resultaten. Das Optimum liegt bei  $\text{pH} 5,6 - 6,6$ , und die Kurve stimmt mit denen der genannten Autoren überein.

Die hier studierte Invertase verhält sich jedoch bezüglich der Abhängigkeit vom pH anders als es den bisher bekannten Tatsachen entspricht. Ich finde das Optimum bei  $\text{pH} = 6,6$ , während auch bei einem pH von 5,6 und 7,6 die Spaltung noch sehr ausgiebig stattfindet. SÖRENSEN aber (Versuchsbedingungen: polarimetrische Bestimmungen des Inversionsgrades bei 18°) wies für Hefe-Invertin ein Optimum von  $\text{pH} 4,4 - 4,6$  nach, in dessen Nachbarschaft (von 4,0 — 6,0) wie seine Tabelle (S. 268) zeigt, eine breite Zone grösserer Aktivität besteht. Später haben L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN (1.) eine solche von  $\text{pH} = 3,01 - 5,19$  angegeben (Abb. 10).

Der Spaltungsgrad erweist sich nach 24 Stunden mit den verwendeten Extraktmengen, übereinstimmend mit etwa 6—8 %



frischen Magengewebes, als ziemlich stark. Amylose gibt dann keine Blaufärbung mit Jod mehr, nur einen rötlich-violetten Farbenton, während ein Teil schon als Glukose vorhanden ist. Der Reduktionswert nach 75 Stunden bei 34° beträgt in den Amy-

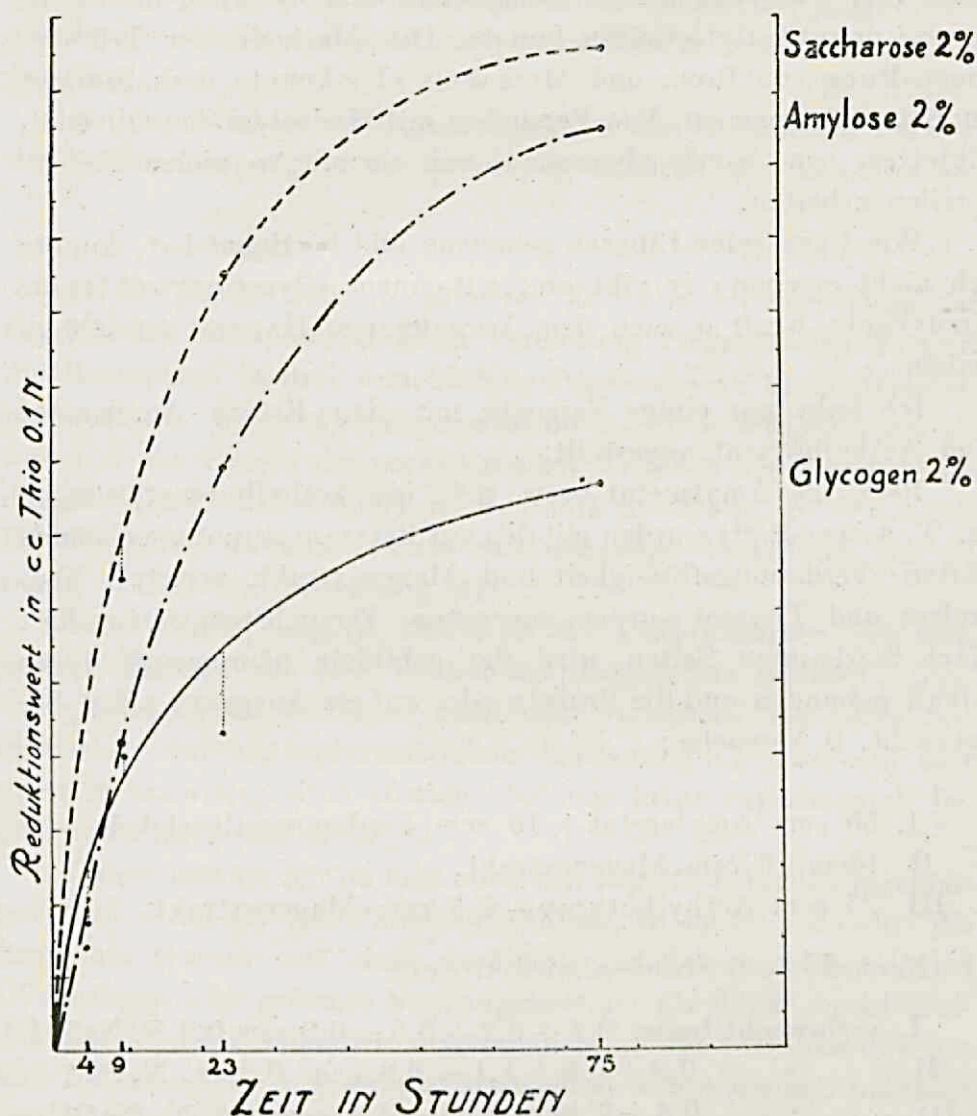


Abb. 10. — Einfluss der Reaktion auf die Wirkung von Amylase und Invertase a Puffergemische mit Amylose und Enzym, a Kontrolle Puffergemische mit Amylose ohne Enzym. b Puffergemische mit Saccharose und Enzym, b Kontrolle: Puffergemische mit Saccharose ohne Enzym.

lose- und Saccharoseversuchen ungefähr 45 % vom Totalwert. Das Glykogen wird ebenfalls abgebaut, aber nicht so schnell als die Amylose und die Saccharose. Auch scheint die Spaltung nicht so komplett zu verlaufen als bei den beiden erstgenannten Stoffen.



## C. — Die Lipasen.

Die Beschaffenheit der verwendeten Extrakte (trübe Verunreinigungen durch Gewebeteilchen) führte im Verein mit technischen und methodischen Schwierigkeiten dazu, dass ich hier nicht streng quantitativ arbeiten konnte. Die Methode der Tributyrinspaltung von RONA und MICHAELIS (1.) konnte deshalb nicht in Betracht kommen. Von Versuchen mit Hydrolyse von Olivenöl, Eidotters usw. wurde abgesehen, weil sie mit zu vielen Fehlerquellen arbeiten.

Wie CLER seine Lipasen gemessen und bestimmt hat, konnte ich nicht ersehen; er gibt an, mit einem Glyzerinextrakt eine lipolytische Kraft 6 nach dem Vorgang von HANRIOT erreicht zu haben.

Ich habe nur einige Versuche mit den Estern Amylacetat und Aethylbutyrat angestellt.

10 % ige Amylacetat-bezw. 8 % ige Aethylbutyratlösungen (z. T. suspendiert) wurden mit den auf Esterase zu untersuchenden Säften: Verdauungsflüssigkeit und Magenextrakt. versetzt. Neutralrot und Thymol wurden zugegeben. Versuchstemperatur 35°. Nach bestimmten Zeiten wird die gebildete Säuremenge durch Alkali gebunden und die Probe wieder auf ihr Ausgangs-pH = 8,0 gebracht. 3 Versuche:

- I. 50 ccm Amylacetat + 10 ccm Verdauungsflüssigkeit.
- II. Idem + 5 ccm Magenextrakt.
- III. 25 ccm Aethylbutyrat + 2,5 ccm Magenextrakt.

Nach 2, 4, 8 Stunden wird titriert.

- I. verbraucht bezw.  $0,2 + 0,2 + 0,5 = 0,9$  ccm 0,2 N. NaOH.
- II. »  $0,9 + 0,8 + 1,1 = 2,8$  ccm 0,2 N. NaOH.
- III. »  $0,4 + 0,45 + 0,55 = 1,4$  ccm 0,2 N. NaOH.

Auch Esterasen sind also bei unsern Tieren vorhanden und zwar ebenfalls wieder frei in der Verdauungsflüssigkeit wie auch in dem Magenwandextrakt. Die Quantität in dem letzteren erscheint aber auch hier wieder ungleich grösser.

Aus einem weiteren Versuch mit Wundernetzen ergab sich, dass auch dort Esterasen zu finden sind, ungefähr in gleicher Menge wie in Magenwandextrakt.



## V. Permeabilität und Resorption.

Auch von physiologischen Standpunkt erscheint der Wirbeltierdarm verglichen mit den entsprechenden Organen anderer Tiere als höchst entwickelt und differenziert. Es sei hier nur hingewiesen auf die Produktionsweise der Enzyme und die sehr vollkommene Resorption.

Bei den Wirbellosen begegnen wir bei den einfachsten Formen der Verdauungsphagozytose als einzigem Mittel zur Assimilation.

G. C. HIRSCH hat in jüngster Zeit eine Unterordnung der Begriffe der intraplasmatischen Verdauung vorgenommen. Er teilt die Resorption in drei verschiedene Prozesse ein; a). « *Molekel-permeation* », b). « *Kolloidpermeation* », c). « *Phagocytose* », wobei er die Grösse der permeierenden Teilchen als Masstab annimmt. (bzw. a.  $< 0,001 \mu$ , b.  $0,001 \mu - 01 \mu$ , c.  $> 0,1 \mu$ ). Es will mir vorkommen, dass eine derartige Verteilung von zu wenig praktischer Bedeutung ist.

Seine Behauptung (S. 185.), es sei: « heute schwer, von denjenigen Tieren, die eine Verdauungsphagozytose besitzen, physiologische Typen zu bilden nach dem Verhältnis der intraplasmatischen zur extraplasmatischen Verdauung », wird auf weit grössere Schwierigkeiten stossen, solange keine experimentell begründeten Kriterien vorliegen.

Daher möchte ich im folgenden den Begriff « Verdauungsphagozytose » nur für jene Fälle vorbehalten, in denen entweder die Beute als Ganzes von einer amöboiden Zelle umschlossen wird (Protozoen), oder grössere Nahrungspartikel als solche in amöboiden Zellen oder Plasmodien aufgenommen werden. Ob hier das von VON MÖLLENDORFF angewandte Kriterium, « mit dieser Aufnahme von Partikeln müssen deutlich wahrnehmbare Gestaltsveränderungen der Resorptionszellen verknüpft sein », Anerkennung verdiene, muss m. E. bis auf weitere Untersuchungen dahingestellt bleiben.

Ich möchte diesen Begriff nicht mehr verwenden, sobald nur allerfeinste feste Teilchen, z. B. Tuschkörnchen hindurchgeschleust werden können, ohne dass dies Gestaltsänderungen der in Betracht kommenden Zellen herbeiführt, wie in VON MÖLLENDORFF's Versuchen an den Därmen von Mäusesäuglingen geschah, ebenso auch in den von mir und VAN DER HEYDE beschriebenen Tuschespeiche-



rungen in den Rektaldivertikeln von *Asterias rubens*, (vielleicht auch in den Tuschefütterungsversuchen von VONK bei Austern).

Es wäre vielleicht angebracht hier von einer « N a n n o p h a g o z y t o s e » zu reden.

Auch die im Laufe dieses Kapitels zu beschreibende Erscheinung, wo wandernde Elemente in einem nicht phagozytären Magenepithel « phagozytieren » (S. 129) bedingt, wie mir vorkommt, einen neuen Namen. In dieser Hinsicht könnte ich z. B. weiter auf die « Phagozytose von Flüssigkeiten » im Sinne DE HAAN's verweisen.

Die soeben erwähnte Verdauungsphagozytose kann bei den meisten Wirbellosen durch andere Vorgänge unterstützt und ergänzt werden.

Zum Beispiel *Helix*, das klassische Beispiel hierfür, hat einen total permeablen Darm (Dialysierschlauch), der also auch hindurchdiffundierende Nahrungsstoffe an das umgebende Blut abgeben kann, ferner eine Mitteldarmdrüse, die sowohl phagocytär als auch resorptiv tätig ist. (JORDAN 2.).

Es erhebt sich nun die Frage, welchem Typ das Verdauungssystem einer Holothurie angehört. Die beiden über diesen Gegenstand vorliegenden hauptsächlichsten Arbeiten zeichnen sich durch den schlagenden Gegensatz aus, zu denen die Autoren in ihren Ergebnissen gelangen. Während COHNHEIM für die Durchgängigkeit isotonischer Lösungen wie z. B. Seewasser eine aktive Resorption annimmt, fasst er im übrigen die Darmwand als eine einfache Diffusionsmembran auf, die für Zucker und Salze in beiden Richtungen permeabel ist.

Durch ENRIQUES wurden diese Resultate in ihren Hauptpunkten widerlegt. Er führt COHNHEIM's Ergebnisse auf fehlerhafte Versuchsbedingungen zurück. Aus seinen Versuchen ergibt sich eine absolute Semipermeabilität des Darmes, während eine aktive Resorption von isotonischem Inhalt nicht stattfindet.

Dies in Kürze die Kontroverse, auf die meines Wissens bisher von keiner Seite, auch nicht erneut von COHNHEIM, weiter eingegangen wurden.

Die Darstellung von ENRIQUES weist dem Holothuriendarm eine Sonderstellung zu, die im Zusammenhang mit den von den niederen Tieren her bekannten verdauungsphysiologischen Tatsachen nicht ohne weiteres verständlich ist.



### A. Die Permeabilität und die Resorption unter physiologischen Umständen.

Meine erste Aufgabe bestand also darin, den Darm auf seine Permeabilität zu untersuchen. Um meine Resultate mit denen von ENRIQUES und COHNHEIM unmittelbar vergleichen zu können, wählte ich möglichst die von den genannten Autoren gebrauchten Methoden. Weitere Versuchsmöglichkeiten liegen hier auch kaum vor. Eine Versuchsanordnung, wie sie z. B. JORDAN und BEGEMANN bei Schnecken und Fröschen, und in jüngster Zeit A. WASSILJEFF bei Fröschen verwendeten: Füllung und Unterbindung des Darms beim lebenden Tiere, kommt hier nicht in Betracht, weil die Holothurien auf jeden stärkeren Reiz mit Autotomie des Darmes usw. reagieren. Infolgedessen wurden die hier mitgeteilten Versuche am isolierten Darm angestellt.

Meine Anordnung war dabei folgende: Die Tiere wurden durch einen raschen Längsschnitt, unter sorgfältiger Schonung des Darmkanals aufgeschlitzt. Sodann entfernte ich den ganzen Verdauungsschlauch und präparierte mit feiner Schere die Wundernetze und das weitere Gefäßsystem möglichst dicht an der Oberfläche ab. Magen, Magendarm oder Darm wurden dann geleert, wenn nötig ausgespült, an einem Ende mittels eines starken Baumwollfadens abgeschnürt und aus einer Bürette mit der Versuchslösung gefüllt. Während der Operation schwamm das Organ in einem kleinen Präparierbecken. Es wurde dafür gesorgt, dass der verhältnismässig zarte Magen niemals prall gefüllt war. Der muskulöse Darm musste gewöhnlich unter etwas grösserem Drucke mit Inhalt versehen werden. Nach der Füllung wurde ein am anderen Ende des Darmes schon gesclungener Faden zugezogen. Möglichst vorsichtig wurde dann das Organ in das endgültige Becken übertragen, durch dessen Aussenwasser ständig  $O_2$  perlte. Wenn die Versuchsbedingungen es zuließen, wurde die Aussenflüssigkeit kontinuierlich erneuert. In solchen Versuchen, wo es der späteren Behandlung nicht schaden konnte, war die Innenflüssigkeit zur Entdeckung etwaiger Lecker Stellen mit einem Farbstoff versetzt. Nach Ablauf des Versuchs wurde das Darmstück an den Fadenenden aus der Flüssigkeit herausgenommen, schnell und nicht zu vorsichtig auf weichem Fliesspapier getrocknet (bei diesem Vorgehen konnten evtl. noch nachträglich undichte Stellen



nachgewiesen werden.), mittels einer kleinen Schere geöffnet, der Inhalt unter sanftem Druck über einer mit Trichter versehenen Bürette entleert, und das Endvolumen festgestellt.

Um gelöste Substanzen zu messen, habe ich in den ersten Experimenten stets mit Seewasser bzw. aq. dest. nachgespült, unterliess es aber bald, da es, z. B. in den Chloridversuche, die Fehlergrenzen nur vergrösserte.

Aus den Vorversuchen hatte sich ergeben, dass man, um sicher zu sein, an überlebenden und nicht an absterbenden Därmen zu arbeiten, die Dauer der Permeabilitätsversuche keinesfalls über 18 Stunden ausdehnen darf. Bei längerer Dauer werden die Resultate durch die wechselnde Vitalität der einzelnen benutzten Stücke äusserst inkonstant. Auch hier prägt sich wieder eine ziemlich starke Individualität von Organen aus, die im übrigen unter gleichen Bedingungen verarbeitet wurden. Im allgemeinen dauerten meine Experimente etwa 6 Stunden, wobei die Stücke fortwährend peristaltische Bewegungen zeigten, die ich allerdings nicht als ausschliessliches Kriterium für die Vitalität des Darmepithels beurteilen möchte, da sie ja von durchaus anderen Gewebeelementen abhängt. So habe ich z. B. beobachtet, dass ein mit 0,4 % Glucose-Seewasser gefüllter Magen seine peristaltischen Bewegungen sofort einstellte; hier dürfte man kaum an eine unmittelbare Vergiftung denken.

Auch in diesen Versuchen möchte ich den Unterschied zwischen Magen und Darm aufrechterhalten, weil Organe, die in histologischer und chemischer Beziehung Differenzen aufweisen, sich auch in physikalisch-chemischer Beziehung von einander unterscheiden könnten.

Ich habe mich immer bemüht, für die Versuche ganz frische Tiere zu verwenden, möglichst solche, die durch mehrstündiges Verweilen in Aquarium vom Darminhalt frei waren.

## 1. Versuche mit Chloriden.

Zunächst galt es zu entscheiden, ob bei unserem Versuchsmaterial echte Resorption vorkommt, d. h. ob entgegen den osmotischen Gesetzen eine isotonische Lösung aus dem Inhalt nach aussen verschwindet. Es wurden dazu eine Anzahl Mägen und Därme mit Seewasser gefüllt und in strömendes kräftig von Sauerstoff durchperlt Seewasser gehängt.



Das Anfangsvolum ergab sich aus der Bürettenablesung vor und nach der Einfüllung, das Endvolum ist die zurückgefundene Flüssigkeitsmenge. Der absolute Chloridgehalt wurde nach MOHR's Titrationismethode mit  $\text{AgNO}_3$  bestimmt. Man gibt zu der Chloridlösung ein paar Tropfen neutraler Kaliumchromatlösung und gibt so viel  $\text{Ag NO}_3$  hinzu, bis eine bleibende Fällung von rotem Silberchromat entsteht. 1 ccm O. 2 N.  $\text{Ag NO}_3 = 7,094$  mg Cl. Dauer des Versuchs : 6 Stunden. Fehlergrenze  $\pm 0.15$  ccm vom Volumen der Einfüllungsflüssigkeit und  $\pm 0.3$  ccm O. 2 N.  $\text{Ag NO}_3$ .

TAB. XVIII.

Objekt	Länge in cm	Anfangs- volumen ccm	End- volumen ccm	Gesamt - Cl - Wert in ccm 0,2 N $\text{AgNO}_3$	
				vorher	nachher
1. Darm	25	1,7	1,8	5,5	5,6
2. Magen	25	7,1	7,1	22,9	23,3
3. Darm	35	5,8	5,6	18,7	18,3
4. Magen	30	3,0	3,4	9,7	10,3
5. Magen	40	9,1	9,2	29,3	30,0

Diese Reihe zeigt ohne weiteres, dass unter genügenden Vorsichtsmassregeln *keine* Resorption stattfindet. Sobald man aber die Versuche zu lange dauern lässt, z. B. 20 oder mehr Stunden, oder keine Ventilation vornimmt, oder die Darmstücke zu stark füllt, gelangt man zu stark schwankenden Resultaten.

Gewöhnlich zeigen dann auch die verwendeten Organe schon pathologische Veränderungen, werden schlaff und brüchig, das Darmepithel löst sich ab usw. Derartige Organstücke kommen für die Volumen- und Chloridbestimmungen gar nicht in Betracht; sie platzen bereits während des Abtrocknens auf dem Fliesspapier.

Erwähnt sei noch, dass sich meines Erachtens für derartige Versuche mehr die massanalytische Bestimmung von Volum und gelöster Substanz als die gewichtsanalytische empfiehlt, wie sie z. B. noch in neuerer Zeit bei YONGE an *Nephrops*-därmen zur Anwendung kam. Die Fehlergrenze ist hier bei ersterer Bestimmungsart einerseits bei einiger Übung kleiner, andererseits vermeidet man den Wasserverlust, der durch das « Durchschwitzen » bei einem derartig gefüllten Organ nicht ausbleiben kann.







TAB. XX.

Aussen : Seewasser. Innen : Seewasser + 0,8 % NaCl.

Objekt	Länge in cm	Anfangs- volum ccm	End- volum ccm	6 Stunden	
				Gesamt - Cl - Gehalt in in ccm 0,2 N. Ag NO <sub>3</sub> vorher	nachher
11. Magendarm	16	1,9	2,4	7,3	7,8
12. Magen	35	4,6	5,7	17,7	18,5
13. Darm	40	3,9	4,7	15,0	15,1
14. Magen	35	6,1	7,2	23,4	23,0
15. Magen	50	15,1	17,8	—	—
16. Darm	18	1,5	1,9	5,8	5,8

TAB. XXI.

Aussen : Verdünntes Seewasser. Innen : Seewasser.

Objekt	Länge in cm	Anfangs- volum ccm	End- volum ccm	5 Stunden	
				Gesamt - Cl - Gehalt in in ccm 0,2 N. Ag NO <sub>3</sub> vorher	nachher
17. Magen	12	4,9	5,2	15,8	15,3
18. Darm	38	4,9	5,7	15,8	16,5
19. Magen	17	4,0	4,6	12,9	13,2

TAB. XXII.

Aussen : Seewasser 0,8 % NaCl. Innen Seewasser.

Objekt	Länge in cm	Anfangs- volum ccm	End- volum ccm	7 Stunden	
				Gesamt - Cl - Gehalt in in ccm 0,2 N. Ag NC <sub>3</sub> vorher	nachher
20. Magen	30	8,5	7,0	27,4	28,0
21. Darm	12	1,0	0,8	3,2	3,1
22. Darm	20	3,9	3,2	12,6	12,5
23. Darm	14	1,1	0,9	3,5	3,6



Aus den Tabellen ist ohne weiteres ersichtlich, dass eine Permeation der Chloride nach keiner Richtung stattfindet. Während aber der Chloridgehalt dauernd um dem Anfangswert pendelt, zeigt das Flüssigkeitsvolumen stets eine ausgesprochene Zu- oder Abnahme, je nachdem der Inhalt des Organs mit Bezug auf die Aussenflüssigkeit hypo- oder hypertonisch ist. Für die Chloride ergibt sich also unter meinen Versuchsbedingungen eine absolute Impermeabilität oder doch eine sehr schwere Durchgängigkeit. Das Wasser permeiert aber leicht.

Die Frage war nun, ob andere gelöste Stoffe sich ebenso verhalten.

Benutzt wurden folgende Substanzen: Glucose, Ureum, Methylenblau und Trypanblau.

## 2. Versuche mit Glucose.

Um pathologische Verhältnisse auszuschliessen, und mich möglichst den physiologischen Bedingungen zu nähern, erschien es mir angebracht, die Konzentration dieser relativ ungewöhnlichen Stoffe recht niedrig zu wählen. Zunächst verwendete ich zu qualitativen Versuchen eine 1 % ige Glucoselösung in Seewasser, entstanden durch die Mischung von 1 Teil 20 % iger Glucose und 19 Teilen Seewasser. (Diese Lösungen sind ungefähr isotonisch).

In bestimmten Zeitabständen wurde dann in der Aussenflüssigkeit auf Glucose mittels FEHLINGS Reagens gefahndet, wobei aber erst nach längerer Zeit eine Reduktion auftrat. In der Vermutung, dass hier eine Vergiftung durch den Zucker vorliegen könnte, wurden die Versuche nochmals quantitativ wiederholt, und zwar mit einer 0.4 % igen Glucoselösung. Die Bestimmung der Glucose wurde mittels SCHOORL's Titration (vgl. Abschnitt über Karbohydrasen) vorgenommen.

Es stellte sich heraus, dass meine Technik nicht genügend genau war bei der Bestimmung kleinster Glukosemengen, die hier passieren können. Jedenfalls konnte keine Permeation, die sich ausserhalb der Fehlergrenze bewegte, beobachtet werden. In den verschiedenen Versuchen, wo ich die Durchgängigkeit von kleinen Mengen nur mit qualitativen Methoden gemessen habe, erhielt ich immer nur ein negatives Ergebnis innerhalb der Vitalitätsdauer der Organe.



Wenn also unter physiologischen Umständen eine Permeierung der Glukose bestehen dürfte, so ist sie jedoch allenfalls äusserst gering.

### 3. Versuche mit Harnstoff.

Als zweiter Nicht-Elektrolyt kam Harnstoff zur Verwendung, der für das Darmgewebe, wohl als ziemlich indifferenter Körper angesehen werden darf. Weiter lässt er die beiden Eigenschaften der Harnsäure (die als Exkretionsprodukt bei den Echinodermen eine ziemlich grosse Rolle zu spielen scheint): relative Giftigkeit und geringe Löslichkeit, vermissen. Die quantitative Bestimmung in der Aussenflüssigkeit geschah mittels der Xanthhydrol-Methode von FOSSE.

Es wurden Lösungen von 0.4 und 0.8 % Harnstoff in Seewasser verwendet. Eine Korrektur für die allerdings sehr geringe  $\Delta$ -Erhöhung wurde nicht angebracht. Zwei Versuchsreihen; Jedesmal 50 ccm Aussenwasser mit ständiger O<sub>2</sub>-Versorgung. Nachherige  $\bar{u}^+$ -Bestimmung in 10 cc.

*Erste Reihe; 0,4 % ige  $\bar{u}^+$  Lösung.*

TAB. XXIII.

Objekt	Länge in ccm	Flüssigkeits- Volumen cm	Total- $\bar{u}^+$ -Gehalt		Zeit Min.
			bei Beginn des Versuchs innen mg	bei Schluss des Versuchs aussen mg	
Magen	20	2,5	100	0	170
Magen	12	2,6	104	0	120
Magen	10	2,3	90	0	110
Seewasser- Kontrolle	—	—	—	0	—

*Zweite Reihe: 0,8 % ige  $\bar{u}^+$  - Lösung.*

Magen	—	4.1	328	0	210
Darm	—	2.9	232	0	210

Ergebnis. Weder Harnstoffkonzentrationem von 0,4 ‰, noch solche von 0,8 ‰ sind imstande, die Magen- oder die Darmwand zu passieren.



#### 4. Versuche mit Farbstoffen.

Hier wurden nicht nur Darmstücke ohne Gefäße, sondern auch solche, bei denen das Gefäßsystem gänzlich intakt gelassen war, verwendet. Diese letzteren Versuche werden noch eingehender im Abschnitt über Resorption besprochen; solange die Organe im überlebenden Zustand waren, trat *kein* Farbstoff (weder Methylenblau noch Trypanblau) hindurch. Diese Art Versuche stellen geradezu eine Methode dar, um das Überleben von derartigen Organstücken kontrollieren zu können. So beobachtete ich einmal, dass ein vollständiger Darmkanal mit einer 0,1 % igen Lösung von Trypanblau versehen, 12 Stunden lang, bei ständiger O<sub>2</sub>-Durchlüftung keinen Farbstoff durchtreten liess. Nach Abstellung der Ventilation war jedoch 24 Stunden später die Peristaltik verschwunden und die Aussenflüssigkeit himmelblau gefärbt.

Auch diese Experimente lassen sich also dahin zusammenfassen, dass der überlebende Magen oder Darm Farbstoffe wie Methylenblau oder Trypanblau nicht permeieren lässt.

#### B. Die Permeabilität unter pathologischen Verhältnissen.

Wie gestalten sich aber die Ergebnisse, wenn man bei den Versuchen etwas weniger vorsichtig zu Werkgeht?

Wir haben schon früher darauf hingewiesen, dass bei ausgedehnter Versuchsdauer die Resultate unsicherer und schwankender werden. Das Endergebnis ist hier, wie ich mich in Versuchen mit anisotonischen Chloridlösungen überzeugen konnte, dass die Magendarmwand sich wie eine vollkommene permeable Membran, also wie ein Dialysierschlauch verhält.

Man könnte sich fragen, ob auch der künstlich vergiftete Darm Abweichungen vom vitalen Verhalten zeigt. Bei derartigen Versuchen würde aber das Darmepithel durch Mittel wie Sublimat, Formol, Alkohol, Natriumfluorid u. s. w. sofort brüchig werden und sich ablösen, was natürlich zu unbrauchbaren Werten bezügl. Volum und Cl-Wert führen würde.

Um die Eigenschaften des geschädigten Darmepithels studieren zu können, wurden deshalb unter sonst gleichen Bedingungen wie bei den Chlorid- und den früheren Glucoseversuchen einige Darmabschnitte mit hochkonzentrierten, aber ungefähr isotonischen Glu-



coselösungen gefüllt. Nach etwa zwei Stunden wurde der Gehalt an Chloriden und Glucose in der Innen- und Aussenflüssigkeit bestimmt. Als Füllung benutzte ich eine 18 % ige Glucoselösung, 2. eine etwa 9 % ige Glucoselösung mit Seewasser, 3. eine 4.5 % ige Glucoselösung mit Seewasser. Beide letzteren wurden durch Verdünnung von Glucose 18 % mit Seewasser hergestellt. Aus der Analyse der Innenflüssigkeit ergibt sich folgende Tabelle:

TAB. XXIV.

Objekt	Zeit	Volum der Innen-Flüssigkeit		Glucosegehalt der Innenflüssigkeit		Chloridgehalt der Innenflüssigkeit in ccm 0,2 N. AgNO <sub>3</sub>	
		vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
	Min.	ccm	ccm	mg	mg	ccm	ccm
Darm	140	5,0	8,8	900	557	0,0	21,0
Magen	135	5,0	7,8	900	670	0,0	17,0
Darm	125	5,0	—	450	298	8,0	18,5
Magen	105	3,6	4,1	160	81,5	8,6	12,0

Derartigen abnormen Verhältnissen ist also die lebende Darmwand nicht gewachsen. Ob abgestorben oder überlebend, was hierbei ziemlich gleichgültig sein dürfte, wird sie von beiden Seiten mit Gewalt passiert; die Chloride wandern von aussen nach innen, und die Glucose in umgekehrter Richtung. Einen zweiten Versuch stellte ich noch an, um zu entscheiden, ob diese Schädigung von der Richtung abhängt, in welcher die Kristalloide die Darmwand zu passieren suchen. Hierzu legte ich mit Seewasser gefüllte Darmschlingen in 19 % ige Glucoselösung und machte wiederum eine Analyse der Innenflüssigkeit.

TAB. XXV.

Objekt	Zeit in Min.	Volum der Innen-Flüssigkeit		Glucosegehalt der Innenflüssigkeit		Chloridgehalt der Innenflüssigkeit in ccm 0,2 N. AgNO <sub>3</sub>	
		vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
		ccm	ccm	mg	mg	ccm	ccm
Darm	250	3,5	0,75	0,0	106	11,2	0,9
Magen	250	6,8	2,4	0,0	213	21,8	3,2



Die Aufhebung der normalen Verhältnisse scheint offenbar von beiden Selten gleicherweise vor sich zu gehen. Sowohl Glucose wie Chloride (letztere vielleicht noch schneller) durchbrechen von beiden Seiten das geschädigte Epithel.

Alle diese Experimente stimmen also eindeutig mit denen von ENRIQUES überein. Es kann keinem Zweifel unterliegen, dass COHNHEIM's Ergebnisse auf fehlerhafte Versuchsbedingungen zurückzuführen sind. Um ein einziges Beispiel zu nennen: man kann doch kaum von einer so zarten Membran wie das Magenepithel erwarten, dass sie einen fast doppelt so hohen osmotischen Druck wie sonst, und einen Zuckergehalt von 20 %, der zur Kandierung genügen dürfte, 18 bis 22 Stunden auszuhalten vermag, ohne in ihrer Vitalität geschädigt zu werden! (S. 26.) Die von mir mitgeteilten Tatsachen über das Verhalten von Magen- und Darmwand unter pathologischen Bedingungen zeigen deutlich genug, wie empfindlich unser Versuchsmaterial ist. Ich kann mich daher der Kritik von E. über diesen Teil der COHNHEIM'schen Arbeit durchaus anschliessen und glaube daher hier weiter nicht darauf eingehen zu brauchen <sup>1</sup>.

### C. Die paradoxe Beschaffenheit der lebenden Darmwand.

Wenn man die oben wiedergegebenen Resultate mit den bei anderen Tieren bezüglich der Resorption gewonnenen vergleicht,

---

<sup>1</sup> Wenn COHNHEIM in seinen Permeabilitätsversuchen den eingebrachten Zucker am Schlusse nicht mehr oder nur noch teilweise zurückfinden kann, nimmt er an, dass der fehlende Anteil » verbrannt « sei, ohne aber Beweise für diese Hypothese zu bringen.

Um zu entscheiden, inwieweit überhaupt das lebende Darmgewebe der Holothurie ein Verschwinden des Zuckers bzw. eine Glucolyse herbeizuführen vermag, stellte ich folgenden Versuch an:

In zwei Bechergläser wurden ca. 900 mg Glucose zu je 250 ccm Seewasser zugesetzt. Der Inhalt des einen Glases wurde zum Kochen gebracht und unmittelbar darauf der totale Darmtrakt (aber ohne Wundernetze) eines grossen Tieres in die siedende Flüssigkeit hineingelegt. In das zweite Glas kam ein möglichst gleich grosses frisch entnommenes Organ, das ständig mit Sauerstoff ventiliert wurde. Nach 3 Stunden wurde in jedem Becken der Gesamt-Glucose-Gehalt bestimmt. Das erste — die erwärmte Portion also — enthielt noch 880 mg Glucose, das Gefäss mit dem lebenden Darm 870 mg. Da 10 mg hier innerhalb der Fehlergrenze der Methode liegen, kann man wohl sagen, dass hier zumindest keine nennenswerte Glucolyse vorgelegen haben kann.



so bemerkt man, dass der Darmkanal unserer Holothurien einen schwer zu verstehenden Sonderfall bildet. Wenn die mitgeteilten Versuche unter physiologischen Bedingungen gemacht sind, ihre Ergebnisse also eine biologische Funktion des lebenden Darmwandgewebes darstellen — und in der Tat hat ja, wie ich zeigte, der abgestorbene Darm andere Eigenschaften — wie gestaltet sich dann hier die Resorption? Der histologische Bau kann uns hier keine Aufschlüsse bringen. Wir haben früher gesehen, dass der ganze Darmkanal, vom Kropf bis zur Kloake, eine ununterbrochene Innenbekleidung von Epithelzellen hat. Distinkte Öffnungen, durch die ein mechanisches Wegströmen des nahrungsbergenden Inhaltes stattfinden könnte, fehlen. Wie kann in einem Tiere, bei dem die lebende Darmwand weder resorptionsfähig, noch imstande ist, andere Stoffe als Wasser passieren zu lassen, die verdaute Nahrung dem Stoffhaushalt zugute kommen?

Ich möchte von vornherein darauf aufmerksam machen, dass für dieses Verhalten hauptsächlich das Epithel verantwortlich zu machen ist, denn Muskelschichten und Endothel sind durchzogen von « Blut » lakunen und von den Öffnungen der bei der Präparation abgeschnittenen Gefässe. Lakunen und Gefässe stehen in kontinuierlicher Verbindung.

Bei dem in Verdauung begriffenen Tier muss dieses Epithel also auf irgendeine Weise durchlässig werden. Es fragt sich, ob sich experimentell entscheiden lässt, wie dieses vor sich geht.

Die einfachste Methode wäre die, den Tieren durch künstliche Fütterung irgendwelche Indikator-Substanzen zuzuführen, die man später in den Geweben nachweisen könnte. Dies kommt aber leider nicht in Betracht, weil sie in den Aquarien nicht fressen und anderseits kaum dazu zu bringen sind, passiv in den Darmkanal eingebrachte Nahrung bei sich zu behalten, ohne den Verdauungstrakt gänzlich zu autotomieren. Zwar kann man die Tiere in Seewasser das mit einem indifferenten Stoff gefärbt ist, und kräftig mit Sauerstoff durchlüftet wird, längere Zeit in Leben halten. Und dabei treten, wie wir sehen werden, eigenartige Beziehungen zwischen Tier und Aussenwasser zu tage, man kann aber, wie ich meine, derartige Versuchsumstände nicht benutzen, um die Funktion der normalen Darmwand zu studieren.

Ich wandte mich daher schliesslich folgender Versuchsanordnung zu. Ich entnahm ganz frischen Tieren, die sich vermutlich im Zustand der Verdauung und der Resorption befanden, das ganze



Darmsystem (d. h. also Darmkanal mit Gefässsystem und rechtem Kiemenbaum) und legte es in ein kleines Becken, das mit der Körperhöhlenflüssigkeit des gleichen Tieres gefüllt war. Ein  $O_2$ -Strom deckte das Sauerstoffbebedürfnis der lebenden Gewebe und jagte gleichzeitig die entstehende Kohlensäure hinaus. — Nach kurzer Zeit koagulierten die Amöbocyten zu Schlieren und Fäden, worauf wir hier nicht weiter eingehen wollen. Darauf füllte ich vorsichtig, nachdem ich den Darm distal abgebunden hatte, einige ccm Methylenblau oder Trypanblaulösung in Seewasser ein, und schnürte dann auch am proximalen Ende ab. Der Farbstoff mischte sich nunmehr langsam mit dem übrigen Darminhalt und gelangte, wenn nicht zu viel Sand im Darm vorhanden war, schliesslich in ein Paar Stunden bis an das andere abgebundene Ende.

Drei Versuche zeigten nach 4 Stunden (keines dieser Experimente wurde über 5 Stunden ausgedehnt) bei makroskopischer und mikroskopischer Kontrolle keine auffällige Veränderung. Der Farbstoff war nicht herausdiffundiert, sondern befand sich immer noch im Darmlumen, während weder eine diffuse noch eine lokalisierte Anfärbung der Wand zu bemerken war. Das einzige, was ich hier hervorheben möchte, war, dass Plasmodien und Schlieren von den in der Darmflüssigkeit enthaltenen Amöbocyten sich intensiv blau gefärbt hatten.

Zwei weitere Experimente mit Methylenblau ergaben noch wichtigere Ergebnisse. Während bei Schluss des Versuches die Füllungsflüssigkeit fast völlig entfärbt war, bis auf wenige tiefblaue Amöbocytenschlieren, sah bereits makroskopisch die Magenwand blau aus. Bei der Untersuchung unter dem Präpariermikroskop zeigten sich Cuticula und Epithel ungefärbt, wohingegen sich in den Darmlakunen fast nur Amöbocyten vorfanden, die den Farbstoff zu grossen blauen Vakuolen gespeichert hatten. Weiter waren blaue Amöbocyten in dem grossen ventralen Gefäss zu beobachten, und an Schnitten (vom lebenden Gewebe) konnte man hier und da bemerken, wie die Wanderzellen durch die Anastomosen im Begriffe waren, von den Lakunen her in das Gefäss einzudringen oder bereits dort angekommen waren.

Die Wanderzellen sind also offenbar imstande, gelöste Produkte aus dem Magenlumen in die Gefässe zu transportieren. Hier sind also Stoffe dem Mageninhalt entzogen worden und zwar nicht direkt durch die



Epithelzellen, sondern offenbar unter Umgehung derselben von wandernden Elementen.

Ich glaube hier für die von ENRIQUES und mir gezeigten paradoxen Eigenschaften des Darmkanals, nämlich das Fehlen einer aktiven Resorption seitens der Magen- und Darmwand und ihre Undurchlässigkeit für gelöste Körper die Erklärung gefunden zu haben: Die Wanderzellen können sich vielleicht mit den im Magencavum befindlichen Substanzen beladen und diese nach den Gefäßen transportieren.

Diese Art des Farbstofftransportes habe ich nur im Magen deutlich erkennen können.

#### D. Stoffaufnahme aus der Aussenflüssigkeit.

An zweiter Stelle kommen hier jene Versuche zur Erörterung, wo Tiere in ein Milieu gebracht waren, welches Farbstoffe oder Nahrungssubstanzen enthielt.

Da ENRIQUES (S. 46) aus einem derartigen Versuch weitergehende Schlüsse auf die Resorptionsmöglichkeiten zieht, möchte ich auch auf diese Dinge etwas ausführlicher eingehen.

E. setzte eine Anzahl Holothurien in 10 Liter Seewasser, dem er « ein Glas Milch » und etwas NaCl (um Hypotonie auszugleichen) zugefügt hatte. In verschiedenen Zeitabständen nahm er Tiere heraus und fand: « nel sangue dei vasi e della cavità coelomatica — delle goccioline di grasso, ed è difficile stabilire dove prima; ma attorno ai loro vasellini, interpositi con essi, esistono dei cumuli di gocce molto interessanti. »

Diese weissen Häufchen werden durch Fettröpfchen gebildet. Gleichzeitig war ein eiweissartiger Niederschlag zu bemerken, den E. auf Kasein bezieht. Er legt sich die Frage vor, ob diese Tröpfchen und Körnchen den Gefäßen entstammen und sich in die Leibeshöhle begeben, oder umgekehrt. « È evidente che i cumuli non potrebbero addensarsi attorno alle reti in quella maniera come fanno, se fossero un ammassamento delle gocce contenute nel sangue coelomatico: se rimanessero semplicemente arrestati dai sottili vasellini, dovrebbero fissarsi anche intorno agli altri vasellini, mentre che i cumuli si trovano soltanto intorno alle reti. — Siamo dunque costretti a ritenere che la via seguita dal grasso e dalle sostanze proteiche nell'assorbimento sia quella conforme alla ipotesi fatta ». (D. h. dass die Adsorbenda aus dem



Darminhalt in die Gefäße übergehen.) Er beobachtete weiter, dass diese Fetttröpfchen mit der Zeit wohl in der Leibeshöhlenflüssigkeit zunehmen, aber nicht im « Blut » der Gefäße und folgerte hieraus, dass sie so schnell (« con altrettanta rapidità ») die Wand der Wundernetze passieren, dass keine Anhäufung im Gefäßssystem erfolgen kann. Die Wundernetze der Holothurien würden also die gleiche Arbeit leisten wie die Mitteldarmdrüse der Mollusken: sie scheiden digestive Enzyme ab und dienen gleichzeitig der Resorption.

Meines Erachtens könnte man noch an andere weitgehende Schlüsse denken. Man könnte annehmen, dass wenn verdünnte Milch — die eine Lösung (Kasein) und eine Emulsion (Fettkügelchen) darstellt — derartig leicht durch den Darmtrakt aufgenommen wird, auch unter natürlichen Bedingungen im Seewasser gelöste Substanzen via Darmtrakt dem Stoffhaushalt des Tieres zugute kommen könnten, ja dass dies auch für suspendierte geformte Nahrung z. B. Nannoplankton zuträfe. Ich möchte hier aber hervorheben, dass ENRIQUES nirgendwo erwähnt, ob sich die Milch im Darmkanal selbst vorfindet. Seine ganze Darlegung bezieht sich nur auf den Gefäßinhalt, aber der Darm selbst und seine Rolle bei diesem eigenartigen Vorgang wird nicht besprochen. Daher glaubte ich noch einige diesbezügliche Versuche anstellen zu sollen.

### I. Versuche mit Kongorot.

Erstens brachte ich ein paar Tiere in eine 0,05 % Lösung von Kongorot, die sich z. T. noch in feiner Suspension befand. Nach  $\frac{1}{2}$ , 1 und 2 Stunden wurde konstatiert, dass beide Kiemenbäume mit roten Körnchen und Häufchen vollgepfropft waren. Das Ende des Darmes zeigte nur da, wo es in die Kloake mündet, eine 3 bis 4 cm. weit vorgedrungene Rotfärbung. Nach dem Zentrifugieren war ein sehr schwach rötlicher Ton in der Körperflüssigkeit wahrnehmbar; einzelne Amöbocyten enthielten rote Einschlüsse.

### II. Versuche mit Glucose.

Ein paar weitere Tiere wurden in ein 0.5 % ige Glucose enthaltendes Gefäß mit Seewasser gesetzt. Gute Durchlüftung. Die Tiere zeigten gänzlich normales Verhalten. Nach einer Stunde wurde von



einem Tier die Körperhöhlenflüssigkeit gesammelt und zentrifugiert. Sowohl Zentrifugat wie aufgekochter Amöbocytenrückstand zeigten nach Prüfung mit FEHLING's Reagens die Abwesenheit von Zucker. Nach zwei Stunden wurde bei einem zweiten Tier mittels SCHOORLS Titration in 25 cm zentrifugierter Körperhöhlenflüssigkeit eine quantitative Glucose-Bestimmung ausgeführt. Ergebnis: 2.5 mg Glucose, d. h. innerhalb der Fehlergrenze. Man bedenke, dass jeder Kubikcentimeter Aussenwasser 5 mg Glucose enthält und dass beide Flüssigkeitssysteme nur durch die dünne Kiemenwand voneinander geschieden waren. Aufgekochter Amöbocytenrückstand enthielt keine Glucose.

### III. Versuche mit Methylenblau.

Einige Tiere wurden in ein Becken mit Methylenblau-Seewasser gesetzt. Nach bestimmten Zeitintervallen kontrollierte ich, ob und wo im Innern etwas vom Farbstoff nachzuweisen war. Um zu verhindern, dass die in den Kiemen enthaltene blaue Flüssigkeit sich mit der perivisceralen Flüssigkeit mischen könnte, setzte ich die Tiere vor der Präparation jedesmal etwa 10 Minuten in frisches Wasser. Nach mehreren Stunden ergab sich in jedem Falle, dass die Körperhöhlenflüssigkeit gefärbt war, und zwar, wie sich beim Zentrifugieren zeigte, hauptsächlich die Amöbocyten. Das distale Ende des Darms wurde ebenfalls blau, und zwar mit zunehmender Versuchsdauer intensiver und extensiver. Eine Anfärbung des Kropfinhaltes wurde niemals beobachtet. Dehnte man den Versuch über längere Zeit, z. B. 24 Stunden aus, dann war die Farbe an den oben genannten Stellen besonders kräftig geworden. Ausserdem hatte sich dann noch eine blauer Belag von gefärbten Wanderzellen auf dem ganzen Darmtrakt gebildet, vornehmlich an der Magenwand und den Wundernetzen. Gleichzeitig hatte die Menge der in der Körperflüssigkeit anwesenden Wanderzellen sehr deutlich abgenommen.

Auch auf anderen Geweben, z. B. auf den Muskeln und den Gonaden konnte dieser blaue Belag nachgewiesen werden. Der Darminhalt war ebenfalls gefärbt, wobei sich das Maximum in seinem hinteren Abschnitt ergab, während vorn (in Kropfe z. B.) fast kein Farbstoff zu finden war.



## IV. Versuche mit Milch.

Endlich stellte ich auch Versuche an, bei denen Holothurien eine Zeit lang in Seewasser verblieben, dem eine kleine Menge Milch zugesetzt war. Dies schien die Tiere stärker zu reizen, als die in den vorigen Versuchen benutzten Stoffe, denn ziemlich bald, nach etwa 6 bis 10 Stunden wurde gewöhnlich der Darm autotomiert. Bei einer Versuchsdauer von ca. 4 Stunden fand ich die Leibeshöhle mit einer mehr als sonst trüben Flüssigkeit gefüllt. Zwischen den Wundernetzen fanden sich weisse Schlieren, wahrscheinlich aus koaguliertem Milcheiweiss bestehend, die sich im Mikroskop von unzähligen Amöbocyten umgeben zeigten. Diese konnte man zwar auch in der Flüssigkeit selber beobachten, aber immerhin wies die Umgebung des Gefässsystems eine deutliche Anhäufung auf. Die mikroskopische Beobachtung lehrte im übrigen, dass die Flüssigkeit grosse Massen von Fetttröpfchen enthielt, von denen nicht immer mit Bestimmtheit gesagt werden konnte, ob sie in Wanderzellen eingeschlossen oder frei suspendiert waren.<sup>1</sup> Auch der distale Darmabschnitt war von Fetttröpfchen und Eiweissniederschlägen erfüllt, wohingegen weder im Magen noch im Kropfe derartiges zu finden war. Ob auch der Inhalt der Gefässe solche Einschlüsse aufwies, konnte ich leider nicht entscheiden.

Ich glaube die Resultate dieser Experimente dahin zusammenfassen zu dürfen, dass die Wand des Kiemenbaums unter gewissen Umständen für gelöste oder fein suspendierte Stoffe permeabel ist. Diese Permeabilität ist aber nicht die einer Diffusionsmembran, sondern wird ganz oder wenigstens hauptsächlich von den Wanderzellen vermittelt. Wenn also die Membran « leckt », geschieht dieses an den Stellen, wo sich die Wanderzellen vorfinden.

Die Beobachtung der normalen Kiemenwand lehrt übrigens, dass auch dort mannigfache Einschlüsse vorkommen, die teilweise

---

<sup>1</sup> In einem weiteren Versuch mit durch Trypanblau gefärbter Milch, fand ich ebenfalls beide Stoffe zurück in den Amöbocyten der Körperhöhle. Der Farbstoff war eingeschlossen in deutliche blaue Vakuolen, während ich auch Fettkügelchen und Eiweisschlieren an und in den Wanderzellen beobachten konnte.



sogar als Excrete angesehen werden! (Vergleiche den Abschnitt über den Bau des Magen-Darmkanals). Auch an der Innenseite der Kiemenwand ist immer ein ständiger Verkehr von Wanderzellen nachzuweisen, die diese Einschlüsse anscheinend mitschleppen. Umgekehrt können auch Stoffe aus der Kiemenhöhle von Amöbocyten hereingeholt werden, wie wir oben gesehen haben. Es wäre hier sinnlos, an Schädigungen des zarten Kiemenbaumes zu denken. Und wenn dies wirklich zuträfe, so können die einheitlichen Ergebnisse dieser relativ harmlosen Versuche uns darüber belehren, dass diese Läsionen, diese lecken Stellen eine biologische Bedeutung für das Tier haben. Die Anhäufungen von Niederschlagsschlieren in der Nähe der Wundernetze lässt sich ungezwungen durch die Tatsache erklären, dass dort stets ein sehr reger, wohl der lebhafteste Verkehr von Wanderzellen stattfindet.

Die Vermutung von ENRIQUES, dass in seinen Versuchen die Milch durch die Darmtraktwand hindurch in die Gefäße und von dort in die Leibeshöhle gelangt war, möchte ich nach den oben angeführten Experimenten als unzutreffend bezeichnen. Dass die Nahrungsstoffe aus dem Magenumen in die Gefäße übergehen, steht für mich ebenso fest wie für E. Aber die anatomischen und physiologischen Verhältnisse lassen nicht die von ihm in diesem Fall angenommene Nahrungsaufnahme zu, wenigstens nicht bei normalen Tieren.

Die Durchlässigkeit der Kiemen führt uns auf die Frage, ob sie auch beim normalen Tier für die Ernährung in Betracht kommen. Was die Aufnahme fester Teilchen — z. B. Planktonten — anbetrifft, glaube ich dies bezweifeln zu können, weil man niemals derartige Einschlüsse in den Wanderzellen findet. Mit der zweiten Möglichkeit — ob vielleicht an dieser Stelle dem Körper gelöste Nahrung zuströmen kann — be rühren wir den Fragenkomplex der viel umstrittenen PÜTTER'schen Theorie.

Es liegt nicht in meiner Absicht, neue hierhergehörige Tatsachen zusammenzustellen. Ich möchte lediglich im Zusammenhang mit den soeben referierten Versuchen einige Bemerkungen zu PÜTTER's Arbeiten machen und kurz auf die Kritik eingehen, der sie begegneten.

Dem unbefangenen Leser muss es auffallen, dass die PÜTTER'sche Theorie hauptsächlich wegen der ihr zugrunde liegenden



Versuchstechnik und- Methodik angegriffen wurde; dagegen hat man kaum untersucht, ob seine Auseinandersetzungen mit den physiologischen Funktionen der in Betracht kommenden Gewebe vereinbar sind. Meines Wissens gibt es z. B. keine Untersuchungen, die sich mit der Frage beschäftigen, ob Fischkiemen imstande sind, gelöste Stoffe aus dem Wasser aufzunehmen<sup>1</sup>. Diese Frage ist vom biologischen Standpunkt aus wohl bedeutungsvoller als die z. B. von VAN DER HEYDE angeführten (S. 100) Argumente, dass PÜTTER's Bestimmung der gelösten organischen Verbindungen im Wasser fehlerhaft sei, oder dass seine Angaben über die CO<sub>2</sub>-Produktion von Holothuriern nicht die von BOHN ausgesprochene Meinung berücksichtigen, dass die Echinodermen durch bestimmte Pigmente oder Symbionten bei Belichtung O<sub>2</sub> bilden können.

Ich kennen nur zwei Arbeiten, die sich mit der physiologischen Seite dieses Problems beschäftigt haben. Die erste ist von CHURCHILL, der Muscheln in Wasser hielt, dem er verschiedene Nahrungsstoffe (z. B. neutrale Seife, Eieralbumin und Stärke) zugesetzt hatte. Er beobachtete, wie die Kiemenzellen von im Albumin-Wasser lebenden Tieren nicht schrumpften im Gegensatz zu denen der Kontrolltiere, wie sich Fetttröpfchen im Kiemenepithel der « Seifen-Tiere » ansammelten und das vielleicht auch mit Jod blau gefärbte Stärke aufgenommen wurde. Derartige Resorption fand ausschliesslich im Kiemenepithel statt und nicht an anderen Stellen der Körperbekleidung. Er stellte weiter fest, dass die in den Kiemen aufgenommenen Fetttröpfchen durch Amöbocyten nach den anderen Körpergeweben transportiert wurden. Die Äusserungen des Autors über die Art der Aufnahme — phagocytär oder diffus als Lösung — sind nicht recht klar. Jedenfalls konstatiert er die Möglichkeit einer Aufnahme gelöster Stoffe.

<sup>1</sup> KRIZENECKY berichtet in der Riv. di Biologia (VI-1924-S. 601-613, besonders 603) über Kaulquappen, die mit ausschliesslich gelöster Nahrung bis zur vollkommenen Metamorphose gelangen und teilt mit, dass wenn man diese Nahrungsart noch mit Verfütterung « geformter » Nahrung kombiniert, « eine mächtige Steigerung des Kaulquappenwachstums hervorgerufen » wird.

Das Vermögen der Kaulquappen, gelöste Stoffe aufzunehmen, wird m. E. schon wahrscheinlich gemacht durch die vielen Angaben über die Wirkung gelöster Inkrete auf das Wachstum der Tiere, wenn man nicht gerade annimmt, dass diese Stoffe wieder durch Aufnahme ungeheurer Quantitäten Wasser via Darmkanal ihren Einfluss ausüben.



Die zweite Arbeit — von M. E. CANEGALLO — handelt gleichfalls von den Ernährungsmöglichkeiten der Muscheln. Ihre Versuchsbedingungen stimmen im grossen und ganzen mit denen CHURCHILL's überein. Sie hielt die Tiere in Seife- und Milchlösungen und fahndete dann in den Geweben mit Sudan III-Färbung auf Fett. Eine reichliche Aufnahme fand sie im Darmepithel, was an sich nicht verwunderlich erscheinen dürfte, und weiter: « Scarse goccioline giallo-rosse dentro le cellule epiteliali delle lamelle branchiali ed ancor più raramente nelle cellule del tessuto lacunare ». Ob diese sich dort von aussen her gesammelt haben, oder ob sie dorthin durch zirkulierende Wanderzellen verschleppt sind, vermag sie nicht zu entscheiden.

Wenn man CHURCHILL's und CANEGALLO's Ergebnisse an Unionen mit den meinigen an Holothurien vergleicht, so sieht man, dass in den beiden ersten Fällen zumindest die Möglichkeit gegeben ist, dass durch die Kiemen gelöste Substanzen aufgenommen werden; in Falle der Holothurien, wo ein vorheriger Umweg der Wanderzellen über den Darm ausgeschlossen war, wird diese Möglichkeit zur Gewissheit.

Und weiter wird ersichtlich, dass auch an dieser Stelle wieder die Wanderzellen, wenn nicht ausschliesslich, so doch zum grössten Teil den Transport auf sich nehmen.

Nicht nur die Magenwand sondern auch die Kiemenwand unserer Tiere stellt also eine Membran mit Poren dar, an deren präformierten oder funktionellen Stomata die Wanderzellen sitzen. Hiermit ist die prinzipielle Möglichkeit für eine Art Nahrungsaufnahme gegeben, wie sie PÜTTER vielen Wassertieren zuschreibt. Es ist jedoch nicht meine Aufgabe, zu entscheiden, inwieweit dieser Eigenschaft bei den Holothurien praktische Bedeutung zukommt.

Schiesslich möchte ich darauf aufmerksam machen, dass von vielen Autoren (ich nenne DANIELSEN und KOREN, und HEROUARD) die Entfernung von Fremdkörpern wie Farbstoffe, Tusche u. s. w. durch Wanderzellen via Kiemenbäume öfters als Excretionsprozess beschrieben ist. HEROUARD findet sogar Stomata in der Kiemenwand von *Stichopus*, die hierzu präformiert sein dürften. Die Permeation scheint also in beiden Richtungen gleichmässig stattfinden zu können und unabhängig zu sein von den Mengen und der Beschaffenheit der aussen und innen befindlichen Substanzen.

Zusammenfassend möchte ich die Hypothese aufstellen, dass gelöste Nahrungsstoffe im Magen durch Wanderzellen aus dem



Inhalt « gesogen » werden, dass die so beladenen Wanderzellen sich in die Gefässe begeben und sodann:

1) durch diese zu den nahrungsbedürftigen Geweben gelangen;

2) durch die Gefässwand hindurch in die Leibeshöhle kommen und von dort aus die nicht mit Gefässen versehenen Gewebe versorgen. — Ob es zutrifft, dass die durch die Kiemen mögliche Aufnahme von feinst verteilten oder gelösten Stoffen praktische Bedeutung für die Nahrungszufuhr hat, muss ich unentschieden lassen.

### Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Von *Holothuria tubulosa* und *Holothuria stellati*, den beiden zu meinen Versuchen gebrauchten Arten, wird die Nahrungsbiologie beschrieben. Vom Kropf- und Enddarm-inhalte machte ich teils mikroskopische, teils chemische Analysen.

2. Es wird eine Übersicht der vielerlei Namen gegeben, die frühere Autoren den Teilen des Darmkanals verliehen. Der Autor schliesst sich hauptsächlich denen von ENRIQUES an und begründet ausführlich die Einteilung in Kropf, Schlund, Magen, Magendarm und Darm, anlässlich der Unterschiede in Form und Funktion. Die Bedeutung und der Bau des Gefässsystems, und der Wundernetze werden erörtert.

Die Wand des Darmkanals besteht aus den folgenden Schichten; *a.*) das Epithel, *b.*) mehrere Bindegewebsschichten, *c.*) eine Muskelschicht, bestehend aus radiären und Längsfasern, *d.*) das Peritonealepithel. Diese Schichten sind alle von Wanderzellen, die auch in allen weiteren Geweben dieser Tiere ungemein zahlreich sind, durchsetzt.

Die Vermutung, dass die verschiedenen Stoffe (Enzyme, usw.) der Verdauungsflüssigkeit in den Wundernetzen entstehen erweist sich als begründet. Sie werden mit Hilfe der Wanderzellen als dichroitisch grüne Körnchen nach dem Magen, in dessen Lumen sie sich auflösen, befördert.

3. In der Natur hungern unsere Tiere nie. Im Gegensatz zu dem übrigen Verdauungstrakte enthält ihr Magen nur wenig Nahrungsmengen, ist aber immer mit einem eigentümlichen Verdauungssaft gefüllt. Dieser ist gold- bis grünlich braun, verbreitet



einen ganz charakteristischen Geruch, hat einen bitteren Geschmack und reagiert sauer, (pH etwa 5,1).

Trotz seines um etwa 12 % geringeren Gehaltes an Chlor, verglichen mit dem Seewasser, ist seine Gefrierpunktserniedrigung diesen ziemlich gleich. ( $\Delta = -2,13-2,21^{\circ}\text{C.}$ ) Er hat einen hohen Stalagmometerwert und bildet einen dauernden Schaum. Viskosimetrische Bestimmungen ergeben ungefähr den Seewasserwert. Eiweiss- und Biuretreaktionen sind negativ. Der Saft enthält geringe Quantitäten Proteasen, Carbohydrasen und Lipasen. Die Azidität wird von einer organischen Säure verursacht. Wanderzellen sind immer darin anwesend. Der filtrierte Saft erleidet kaum eine bakterielle Zersetzung.

In Hungertieren ersetzt das Seewasser innerhalb weniger Tage die oben erwähnte Flüssigkeit.

4. Auch die Extrakte der Magenwand und der Wundernetze enthalten Proteasen, Karbohydrasen und Lipasen. Es fehlt jedoch dem eigentlichen Darm fast an jeglichen Verdauungsenzymen.

In grössten Konzentrationen findet sich die Protease in der Magenwand. Mit der Abhängigkeit ihrer Wirkung vom Substrate und von der Temperatur hat der Autor sich eingehend befasst. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration wurde bei der Spaltung von Wittepepton untersucht. Hier findet man zwischen  $\text{pH} = 2,8$  bis  $9,2$  eine Hydrolyse, die allmählich nach der alkalischen Seite hin steigt, ohne ein Optimum zu erreichen. Mit der Alkoholtitration wurde die relative Zunahme an Peptiden und Aminosäuren kontrolliert.

Die kräftigsten Karbohydrasepräparate erhält man ebenfalls aus Magenwandextrakten. Die Karbohydrasen spalten Amylose, Glykogen, Saccharose und Maltose bis auf Monosen. Weder Laktose noch Raffinose werden verdaut. Auch hier wurde der Temperatureinfluss kontrolliert. Die enzymatische Hydrolyse von Amylose und Saccharoselösungen in Puffergemischen weisen ein deutliches Optimum in der Nähe von  $\text{pH} = 6$  auf. Die Enzymwirkung zeigt dieselbe Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, wie die anderen bisher studierten Amylasen und Saccharasen.

5. Eine Resorption isotonischer Lösungen aus den überlebenden Magen oder Darm konnte nicht nachgewiesen werden. Unter physiologischen Bedingungen zeigt sich ihre Wand impermeabel für Natriumchlorid, Harnstoff, Trypanblau und Methy-



lenblau, höchstwahrscheinlich auch für Glukose. Eine Permeation des Wassers findet jedoch statt. In diesen Fällen erweist sich also das Magenepithel als eine absolut semipermeable Membran.

Bei pathologischen Versuchsverhältnissen (Absterbung, Vergiftung, bei hohen osmotischen Druckunterschieden) benimmt sich dasselbe Epithel als eine physikalische Membran (Dialyserschlauch).

Etwas gelöstes, in den Magen frischer, aktiv resorbierender Tiere gebrachtes Methylenblau, befand sich nach wenigen Stunden fast ausschliesslich noch in den Wanderzellen des Magenepithels, der Magenwandlakunen und der Gefässe. Deshalb vermutet der Autor dass auch in den normalen Tieren andere gelöste, zumal Nahrungsstoffe auf diese Weise aus dem Magenlumen in die Gefässe befördert werden können.

An den Stellen, wo sich Wanderzellen befinden, ist das absolut semipermeable Magenepithel also für bestimmte gelöste Stoffe oder für Amöbocyteniapedese durchgängig.

Bringt man Tiere in Seewasser, dem man gewisse Indikatorstoffe, (Milch, Farbstoffe.) zugesetzt hat, so findet ein Durchtritt durch die Kiemenwand hindurch, und eine Anhäufung in den Wanderzellen der Körperhöhle statt. Es existiert offenbar die prinzipielle Möglichkeit, dass auch in natura die Tiere gelöste Nahrungsstoffe zu sich nehmen. Auch hier wäre die Aufnahme derartiger Stoffe auf Rechnung der in der Kiemenwand befindlichen Wanderzellen zu setzen.

Zum Schlusse danke ich dem Herrn Prof. Dr. R. DOHRN in Neapel für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an der zoologischen Station, wie auch der St. Radboudstiftung in Utrecht, die zum Teil vorliegende Untersuchung durch eine finanzielle Unterstützung ermöglicht hat. Herrn Prof. Dr. H. JORDAN, meinem hochgeschätzten Lehrer, verdanke ich manche Anregungen und Ratschläge.

---



## Literaturverzeichnis

- Adler, L. — Über den Einfluss der Wasserstoffionen auf die Wirksamkeit der Malzdiastase. *Biochem. Zeitschr. Bd. 77, 1916, S. 146.*
- Baur, A. — Beiträge zur Naturgeschichte der *Synapta digitata*. *Nova Acta Acad. Leop. Carol. Vol. 31. Dresden, 1864.*
- Biedermann, W. — Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. I. Die Verdauung der Larve von *Tenebrio molitor*. *Pflüger's Archiv. Bd. 72, 1898, S. 105.*
- Bohn, G. — Sur les échanges gazeux des étoiles de mer. *Assoc. franc. pour l'avancement de sciences. 40me Session, Dijon, 1911, S. 501.*
- Bottazzi, F. — Contributions à la physiologie comparée de la digestion. I. (Résumé de l'auteur). La fonction digestive de l'« *Aplysia limacina* ». *Arch. ital. Biol., tomo 35, 1901, S. 317.*
- Canegallo, E. — I leucociti, l'intestino e le branchie nell'alimentazione delle *Unio*. *Riv. di Biologia, tomo 6, 1924, S. 614.*
- Churchill, E. P., Jr. — The absorption of nutriment from solution by freshwater mussels. *Journ. exp. Zool., vol. 21, 1916, S. 403.*
- Clerc, A. — Ferments digestifs de quelques Echinodermes. *C. R. de la Soc. de Biol. de Paris, vol. 56, 1904, S. 798.*
- Clark, W. M. — The determination of Hydrogen Ions. *Baltimore, 1920*
- Crozier, W. J. — The amount of bottom material ingested by Holothurians (*Stichopus*). *Journ. exp. Zool., Vol. 26, 1918, S. 379.*
- Cohnheim, O. — Versuche über Resorption, Verdauung und Stoffwechsel von Echinodermen. *Zeitschr. physiol. Chem., Bd. 33. 1901, S. 9.*
- Danielssen, D. C., und J. Koren, — Holothurioidea. (The Norwegian North-Atlantic Expedition 1876-1878. Zoology.). *Christiania, 1882, fol.*
- Enriques, P. — Digestione, circolazione e assorbimento nelle olo-  
turie. *Archivio Zoologico, Vol. 1, 1902, S. 1.*
- von Euler, H., und O. Svanberg. — Ueber die Charakterisierung von Amylaselösungen. *Zeitschr. Physiol. Chem., Bd. 112, 1921, S. 193.*
- Fiessinger, N. — Les ferments des leucocytes en physiologie, pathologie et thérapeutique générales. *Paris, Masson et Cie, 1923, 237 S.*



- Fosse. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, tome 30, 1916, S. 525.
- Frenzel, J. — Beiträge zur vergleichenden Physiologie und Histologie der Verdauung. *Arch. f. Anat. u. Physiol. Bd. 1*, 1892, *Physiol. Abt.*, S. 81.
- de Haan J. Die Speicherung saurer Vitalfarbstoffe in den Zellen mit Beziehung auf die Probleme der Phagocytose und der Zellpermeabilität. *Pflüger's Archiv ges. Physiol. Bd. 201*, 1923, S. 393.
- Hamann, O. — Beiträge zur Histologie der Echinodermen. Heft 1. Die Holothurien. *Jena, Gustav Fischer*, 1884, 100 S.
- Henriques, V., und J. K. Gjaeldbaek. — Ueber hydrolytische Spaltungen von Proteinen. *Zeitschr. physiol. Chem.*, Bd. 54, 1911, S. 363.
- Herouard, E. H. (1.) Recherches sur les Holothuries des cotes de France. *Arch. de Zool. exp. et gén.* (2) vol. 7, 1889, S. 335.
- Herouard, E. H. (2.) De l'excrétion chez les Holothuries. *Bull. de la Soc. Zool. de la France*, tome 20, 1895, S. 161.
- van der Heyde H. C. — On the physiology of digestion, respiration and excretion in Echinoderms. diss. Amsterdam, *Den Helder, C. de Boer Jr.*, 1922, 112 S.
- van der Heyde, H. C., et H. A. P. C. Oomen. — Sur l'existence, chez les étoiles de mer, d'une digestion intracellulaire. *Arch. int. Physiol.*, Vol. 24, 1924, S. 41.
- Hirsch, G. C. — Probleme der intraplasmatischen Verdauung. Ihre Beziehungen zur Resorption, Diffusion, Nahrungsaufnahme, Darmbau und Nahrungswahl bei den Metazoen. *Zeitschr. f. vergl. Physiol.*, Bd. 3, 1925, S. 183.
- Jordan, H. (1.) — Vergleichende Physiologie wirbelloser Tiere 1. Bd. *Die Ernährung. Jena, Gustav Fischer*, 1913, 738 S.
- Jordan, H. (2.) Phagocytose und Resorption bei *Helix pomatia*. *Arch. néerl. Physiol.*, Vol. 2, 1918, p. 471.
- Jordan, H. und H. Begemann. — Über die Bedeutung des Darmes von *Helix pomatia*. *Zool. Jahrb. Bd. 38*, 1921, *Abt. f. allg. Zool. u. Physiol.* S. 565.
- Jourdan, E. — Recherches sur l'histologie des Holothuries. *Ann. du Musée d'hist. nat. de Marseille, Zoologie*, Vol 1, 1883, Mém. 6.
- Kolthoff, I. M. — Der Gebrauch von Farbenindikatoren. 2<sup>e</sup> Aufl. *Berlin, Julius Springer*, 1923, 220 S.
- Krizenecky, J. — Beziehungen der Variabilität der Körpergrösse usw. *Rivista di Biologia*, tomo 6, 1924, S. 601.



- Loeper, M., et G. Marchal. (1.) Action de certaines substances irritantes sur la leucopédèse gastrique. *C. R. des S. de la Soc. de Biologie*, tome 87, no 34, 1922, S. 1083.
- Loeper, M., et G. Marchal. (2.) La rôle de la leucopédèse intragastrique dans la digestion des albumines. *C. R. des S. de la Soc. de Biologie*, tome 87, no 39, 1922, S. 1350.
- Ludwig, H. in Bronn's Klassen und Ordnungen des Thierreichs. II. Bd. 3<sup>e</sup> Abt., 1 Buch. Die Seewalzen. Leipzig, 1889-1892, 460 S.
- Michaelis, L., und H. Davidsson (1.) Die Wirkung der Wasserstoffionen auf das Invertin. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 35, 1911, S. 386.
- Michaelis, L., und H. Davidsson. (2.) Die Abhängigkeit der Trypsinwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration. *Biochem. Zeitschr.* Bd. 36, 1911. S. 280.
- Michaelis, L., und P. Rona. — Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. I. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 57, 1913, S. 70.
- von Möllendorff, W. — Beiträge zur Kenntnis der Stoffwanderungen in wachsenden Organismen. IV. Die Einschaltung des Farbstofftransportes in die Resorption bei Tieren verschiedenen Lebensalters. *Histophysiologische Beiträge zum Resorptionsproblem. Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anat.*, Bd. 2, 1925, S. 130.
- Müller, J. — Über *Synapta digitata* und über die Erzeugung von Schnecken in Holothurien. Berlin, 1852, fol.
- Northrop, J. H. — The mechanism of the influence of acids and alkalies on the digestion of proteins by pepsin and trypsin. *Journ. of gen. Physiology*, vol. 5, 1922, S. 263.
- Oomen, H. A: P. C., s. H. C. van der Heyde.
- Palitzsch, S., und L. E. Walbum. — Über die optimale Wasserstoffionenkonzentration bei der tryptischen Gelatineverflüssigung. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 47, 1912, S. 1.
- Pearse, A. S. — Observations on *Thyone briareus* *Biol. Bull. Woods Hole*, Vol. 15, 1908 S. 259.
- Pütter, A. (1.) — Die Ernährung der Fische *Zeitschr. f. allg. Physiol.*, Bd. 9, 1909, S. 147.
- Pütter, A. (2.) — Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels *Abhandl. d. königl. Gesellsch. der Wiss. zu Göttingen*, N. F. Bd. 6, 1910, S. 1.
- Ringer, W. E. (1.) Einfluss der Reaktion auf die Wirkung des Trypsins. I Mitteilung. *Zeitschr. physiol. Chem.*, Bd. 16, 1921, S. 107.



- Ringer, W. E. (2.) Einfluss der Reaktion auf die Wirkung des Trypsins. II Mitteilung. *Zeitschr. physiol. Chem.*, Bd. 124, 1923, S. 171.
- Rona, P., und L. Michaelis. (1.) — Über Ester- und Fettspaltung im Blute und im Serum. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 31, 1911, S. 345.
- Rona, P., und L. Michaelis. (2.) Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. II. Die Wirkung der Maltase auf  $\alpha$ -Methylglucosid und die Affinitätsgrösse des Ferments. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 58, 1913, S. 118.
- Schoorl, N. (1.) Quantitatieve bepaling van suikers. *Chemisch Jaarboek*, 1915-1916, S. 125.
- Schoorl, N. (1.) (en A. Regenbogen). Maatanalytische suikerbepaling. *Chem. Weeklad*, 14<sup>e</sup> jaargang, S. 221.
- Semper, C. — Reisen im Archipel der Philippinen. Teil II. Bd. 1. *Holothurien*. Leipzig, 1867, 40.
- Sörensen, S. P. L. (1.) Enzymstudien. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 7, 1907 S. 43.
- Sörensen, S. P. L. (2.) — Enzymstudien. II. Mitt. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 21, 1909, S. 131.
- Sörensen, S. P. L. (3.) Bemerkungen über die Formoltitrirung, insbesondere über die Anwendung von Natronlauge oder Barytlauge bei derselben. *Biochem. Zeitschr.* Bd. 25, 1910, S. 1.
- Tiedemann, F. — Anatomie der Röhrenholothurie (*Holothuria tubulosa*), des pomeranzfarbigen Seesterns (*Astropecten aurantiacus*) und des Steinseeigels (*Echinus saxatilis*), Landshut 1816. *Preisschrift der Pariser Akademie von 1812*.
- Vogt, C., und E. Yung. — Lehrbuch der praktischen vergleichenden Anatomie. (Deutsche Übersetzung). Braunschweig, 1887, 8<sup>o</sup>.
- Vonk, H. J., Jr. — Verdauungsphagocytose bei den Austern *Zeitschr. f. vergl. Physiol.*, Bd. 1, 1924, S. 607.
- Waldschmidt-Leitz, E. — Über Enterokinase und die tryptische Wirkung der Pankreasdrüse. (Fünfte Abhandlung über Pankreasenzyme von R. Willstätter und Mitarbeitern.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, Bd. 132, 1924, S.
- Wassiljeff, A. — Zur Resorption einiger Vitalfarbstoffe durch den Froschdarm. *Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anat.*, Bd. 2, 1925, S. 257.



- Willstätter, K., und E. Waldschmidt-Leitz.— Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden. *Ber. deut. chem. Ges., Bd. 54, 1921, Teil 2, S. 2988.*
- Winterstein, H. — Handbuch der vergleichenden Physiologie. Bd. 11., 1<sup>re</sup> Hälfte: W. Biedermann. — Physiologie des Stoffwechsels. *Jena, Gustav Fischer, 1911.*
- Yonge, C. M. — Studies on the comparative physiology of digestion. II. The mechanism of feeding, digestion and assimilation in *Nephrops norvegicus*. *British Journ. of exp. Biol. Vol. 1, 1924, S. 343.*
-















# STELLINGEN.

## I.

Een enzyme is niet noodzakelijkerwijze aangepast aan de omstandigheden waaronder het in een levend organisme werkt.

## II.

De zijdelingsche gang der krabben wordt beïnvloed door hun wijze van chemoperceptie.

## III.

Het begrip phagocytose verdient splitsing in eenige onderbegrippen die beantwoorden aan onze empirische kennis. Daarom heeft een te theoretische verdeeling zooals HIRSCH ze voorstelt, weinig practische waarde. (Zeitschr. f. vgl. Physiol. 3. Bd., 2. Hft.)

## IV.

Tryptische proteasen bezitten geen pH-optimum.

## V.

Een hongertoestand komt bij normale zeekomkommers niet voor.

## VI.

De pogingen om een genetisch verband te zoeken tusschen de Nematoden en andere diergroepen moeten als vruchteloos beschouwd worden.

## VII.

Het begrip homologie of morphologische gelijkwaardigheid bezit geen verklarende beteekenis voor den bouw der dieren.

## VIII.

De volgorde van reductiedeeling en aequatiedeeling bij de vorming van basidiosporen is niet dezelfde bij alle Basidiomyceten.

## IX.

De embryo's van *Zea mays* zijn in staat amylase af te scheiden.

## X.

Het vak „natuurlijke historie” dient geschrapt te worden uit het gymnasiale leerprogramma. De vervanging daarvan door de „biologie”, die verplichtend gesteld worde op de A-, zoowel als op de B-afdeeling, lijkt mij een dringende eisch des tijds.

## XI.

De gymnasiale opleiding is de eenig geschikte voorbereiding voor universitaire studie.







# DRUCKFEHLERBERICHTIGUNG

---

Die Unterschriften der Abb. 9 und 10 sind verwechselt.











U  
1  
C