

**ÜBER DIE
ZERSTÖRUNG VON MORPHIN UND
MORPHINDERIVATEN BEI DER ENT-
WICKLUNG VON HÜHNEREMBRYONEN**



VON DER EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH
ZUR ERLANGUNG DER
WÜRDE EINES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
GENEHMIGTE PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

MAX GRÜTER, APOTHEKER
AUS LUZERN

128. Referent: Herr Prof. Dr. C. HARTWICH
 Korreferent: Herr Prof. Dr. E. WINTERSTEIN

LEIPZIG

1915

Vorliegende Arbeit wurde im pharmakologischen Institute der Universität
Zürich ausgeübt.

Ich erlaube mir, an dieser Stelle

Herrn Rektor Prof. Dr. M. Cloetta

für die Anregung zu dieser Arbeit meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

MEINEN LIEBEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Leer - Vide - Empty

Einleitung.

Nicht nur die ersten Bemühungen der Toxikologie zum Nachweis der Pflanzenalkaloide in tierischen Organen, Geweben, Flüssigkeiten usw., sondern auch die ersten Beobachtungen über die Zerstörungen des Morphins im Organismus wurden angeregt durch den Prozeß gegen Dr. Caistaing, der wegen Giftmord mit Morphin angeklagt und trotz Mangels eines chemischen Nachweises des Giftes in der Leiche, verurteilt und 1823 hingerichtet wurde.

Orfila (1) fand zuerst, daß das Morphin gleich anderen von ihm geprüften Giften im Blut und in den Sekretionen nur zu einer bestimmten Zeit der Vergiftung vorhanden sei, während es sich zu anderer Zeit nicht mehr dort vorfinde. Verschiedene Autoren fanden dann im Harn von Morphinisten oder von mit Morphin injizierten Hunden kein oder ganz geringe, nur kolorimetrisch zu bestimmende Mengen Morphin, bis Marmé (2) und Tauber (3) später zeigten, daß ein Teil dieses Alkaloides, das nach der Injektion überraschend schnell in die Magenschleimhaut ausgeschieden wird, von da in den Darm weiterbefördert und dann durch die Fäzes ausgeschieden wird. Neuerdings wurde jedoch von Kaufmann-Asser (4) festgestellt, daß die Nieren doch als Ausscheidungsorgan für Morphin bei Kaninchen und Hunden in höherem Maße in Betracht kommen als bisher angenommen wurde, und daß bei Dauerversuchen mit Morphin bis 39% des Alkaloides im Kaninchenharn ausgeschieden werden.

Faust (5) zeigte dann zuerst, daß beim normalen Tier nur ein kleiner Teil des injizierten Morphins vom Organismus zersetzt werde, daß dagegen bei wiederholten Injektionen die Fähigkeit des Organismus, das Morphin zu zerstören, sich steigert. Er sieht in dieser erhöhten Zersetzungsfähigkeit den Grund für die Angewöhnung und sucht dies besonders aus der Analogie mit dem Verhalten der Oxalsäure im Organismus so zu erklären, daß das Morphin erst eine fermentative Spaltung erfährt und daß dann die Spaltungsprodukte durch Oxydation und Synthese in die Endprodukte des Stoffwechsels umgewandelt werden.

M. Cloetta (6), der sich schon damals mit Untersuchungen über chronische Intoxikationen befaßte, bestätigte die Resultate von Faust und erweiterte diese Experimente nach allen möglichen Gesichtspunkten, um dabei Anhaltspunkte für die Art der Zerstörung und die Ursache der Angewöhnung zu gewinnen. Auf rein experimenteller Basis gelangte er zu dem Resultate, daß bei der Zersetzung die oxydativen Prozesse die Hauptrolle spielen und eine Fermentwirkung ausgeschlossen zu sein scheine. Trotzdem eine weitere Arbeit von B. Frenkel (7) neue Beweise für eine oxydative Zerstörung des Morphins brachte, wird doch die Hypothese von Faust noch mancherorts anerkannt.

Da die Art der Zerstörung voraussichtlich grundlegend ist für die Erklärung des Morphinismus, bemühte ich mich, durch eine neue Versuchsanordnung diese Frage zu lösen. An das Versuchsmaterial war dabei die Anforderung zu stellen, die Sauerstoffzufuhr zum lebenden Protoplasma beliebig variieren zu können; ferner war nötig die Gegenwart von hydrolytischen Fermenten und Oxydasen und endlich die Vermeidung von analytischen Verlusten auch bei längerem Kontakt des Morphins mit dem Protoplasma. Diesen Anforderungen schien mir die Injektion von Morphin und seinen Derivaten in Eier mit nachfolgender Bebrütung derselben zu entsprechen, wobei dann die eingespritzten Eier den verschiedensten Bedingungen ausgesetzt werden konnten. Versuche mit Injektionen körperfremder Substanzen in Eier sind schon von früheren Autoren gemacht worden, allerdings nur zum Zweck teratogenetischer (Mißbildungen erzeugender) Studien und nur mit ganz kurzer Beobachtungsdauer. Bei allen diesen Experimenten mußten parallel mit jeder Versuchsserie auch eine gewisse Anzahl Kontrollen ausgeführt werden, weil die Eier sich je nach Art der Hühner oder der Jahreszeit sehr verschieden verhalten.

Féré (8) fand, daß Athylalkohol eine geringere teratogenetische Wirkung habe als Methylalkohol und dieser noch eine geringere als

Propyl-, Butyl- und Amylalkohol. Die Isoalkohole sind giftiger als die entsprechenden Normalalkohole.

Injektionen von Azeton (9) in Eier gaben 62,88% normale Embryonen gegenüber 80,55% n. E.¹⁾ bei einer Injektion der gleichen Quantität Wasser und 65,47% n. E. bei Anwendung von Äthylalkohol.

Gegenüber den Angaben von Gaspard und Cl. Bernard, daß Quecksilberdämpfe die Embryonen erst töten, wenn die Gefäße und Nerven entstanden sind, fand andererseits Féré (10), daß denselben eine verzögernde und teratogenetische Wirkung auch in den Anfangsstadien zukommt; obwohl viele Embryonen die Periode der Entwicklung der Zirkulation überschritten hatten, fand er doch keinen Tod.

Phosphordämpfe (11), denen Eier 24 Stunden lang unter einer Glasglocke vor der weiteren Bebrütung ausgesetzt waren, drangen durch die Schale und riefen eine allgemeine Entwicklungsverzögerung und teils Mißbildungen hervor.

Angeregt durch eine Beobachtung von Réaumur, daß gewisse »odeurs infectes« die Embryonen im Ei töten können, setzte Féré (12) Eier unter einer Glasglocke einer Moschusatmosphäre aus und fand dabei eine Reduktion der Normalembryonen von 80,95% auf 45,23%.

Atherische Öle (13) wie Oleum Anisi, Ol. Lavandulae und Ol. Caryophylli zeigten nach 24stündigem Einfluß ihrer Dämpfe nur Entwicklungsverzögerungen, während das giftige Ol. Absynthii Monstrositäten bildete. Die während 48 Stunden den Dämpfen nachfolgender Substanzen ausgesetzten und dann bebrüteten Eier ergaben folgende Verhältniszahlen:

Essence de lie de vin zeigte keine n. E. gegenüber	66,6%	n. E. der Kontrollen.
Ol. Thymi	» 10% » » »	70,0% » » » »
Ol. Rosmarini	» 40% » » »	} 80,0% » » » »
Ol. Gaultheriae	» 70% » » »	

Gleichzeitig waren die Embryonen, welche sich noch normal entwickelten, etwas zurückgeblieben.

Der Einfluß von Ammoniak (14) hemmte selbst nach einer Stunde jede normale Entwicklung gegenüber 80% der gleichen Serie ohne Behandlung.

Jan Tur (15) ließ Eier 24—70 Stunden unter dem Einfluß eines radioaktiven Präparates ausbrüten; die dabei entstandenen Mißbildungen sind alle gleich, was ihn auf eine spezifische teratogenetische Wirkung des Radiums schließen läßt. Dabei zeigte sich, daß

1) n. E. = normale Entwicklung.

die mittleren Partien der Embryonen starke Veränderungen aufwiesen, während die peripheren Teile normal waren.

Für uns besonders interessant sind die Einwirkungen von Bakterientoxinen und Alkaloiden:

Pyocyanin erhöhte nach Féré (16) die Mißbildungen von 4,16% (bei nicht injizierten Eiern) auf 58,33% in etwa 48 Stunden.

Syphilitoxin ergab 25% n. E. gegenüber den zu erwartenden 78,5% n. E. Im Anschluß daran untersuchte Féré (17), ob auch syphilitisches Blut eine Wirkung auf die Entwicklung des Embryos zeige, was sich bestätigte. Injektionen von normalem Blut mit etwas Kaliumoxalat (zur Vermeidung der Koagulation des Blutes) gaben 58,33% n. E. gegenüber 83,33%, während syphilitisches Blut nur noch 25% n. E. zuließ. Féré glaubt, daß der Embryo fast als Reagens auf solches toxinhaltiges Blut dienen kann. Das gleiche zeigte sich bei einer Injektion von Blut eines mit Schweinecholera infizierten Kaninchens:

Injektion von normalem Blut ergab 55,0% n. E. }	gegenüber 83,33% der
» » infiziertem » » 15,6% » » }	

Andere Toxine zeigten gegenüber den Embryonen eine vom Menschen mitunter abweichende Giftigkeit. So wird z. B. Tetanustoxin (18), gegen welches das Huhn sehr widerstandsfähig ist, vom Ei in starker Dosis ertragen, wenigstens während den ersten 3 Tagen. Sterile Bouillon hat fast gar keinen Einfluß. Deutlicher als die Einwirkung von Tetanustoxin ist jene von Diphtherietoxin und auffallend stark jene von Tuberkelbazillenextrakt; bei letzterer besteht ein deutlicher Unterschied zwischen Menschen- und Vogeltuberkulose (19). Die folgenden Zahlen belegen das Gesagte:

Injektion von steriler Bouillon zeigte 86,11% n. E. }	anstatt 91,66%
» » Tetanustoxin » 80,55% » » }	
» » steriler Bouillon » 86,11% » » }	anstatt 94,44%
» » Extrakt von Menschen-	
tuberkelbazillen zeigte 44,4% » » }	
» » Extrakt von Vogeltu-	
berkelbazillen zeigte 19,44% » » }	

Im allgemeinen scheinen die Toxine jener Bakterien, für welche das Huhn weniger empfindlich ist, auch weniger teratogenetisch für den Embryo zu sein.

Bei der Prüfung der Alkaloide ergab sich, daß 0,001 Nikotin (20) genügt, um 71,7% n. E. auf 34,7% zu reduzieren. Auffallenderweise waren diejenigen Embryonen, welche die Giftwirkung über-

wunden hatten, im allgemeinen fortgeschrittener als diejenigen der Vergleichseier, was im Sinne einer Art Zuchtwahl zu deuten wäre.

Féré (21) glaubt, daß auch bei den Alkaloiden eine gewisse Gesetzmäßigkeit in der Entwicklungsstörung auf den Embryo zu konstatieren sei. Er faßt dies in folgende Worte zusammen:

»J'ai déjà insisté sur le rapport, qui existe entre la puissance teratogène et la puissance toxique des poisons: les alcools les plus toxiques sont les plus teratogènes, les toxines microbiennes les plus nuisibles pour la poule, sont aussi les plus nuisibles pour l'embryon, et inversement. La morphine, qui est supportée par la poule à très hautes doses, peut aussi être injectée à hautes doses dans l'œuf, sans nuire à l'embryon. L'atropine va nous fournir la confirmation du même fait.«

Bei der Injektion von Atropin sinkt das Verhältnis der normalen Entwicklung entsprechend der zunehmenden Atropinmenge:

0,005 Atrop. sulf. per Ei	gibt	62,5 ⁰ / ₀	n. E.	} Kontrolleier 62,5 bis 77,7 ⁰ / ₀ n. E.
0,01 » » » » »	»	50,0 ⁰ / ₀	» »	
0,02 » » » » »	»	33,9 ⁰ / ₀	» »	
0,03 » » » » »	»	25,0 ⁰ / ₀	» »	
0,04 » » » » »	»	12,5 ⁰ / ₀	» »	
0,05 » » » » »	keine	» »	» »	

Das ausgewachsene Huhn stirbt mit 0,67 g Atrop. sulf. per Kilogramm Körpergewicht und mit 0,04 g der Embryo. Das Huhn stirbt mit 0,8 g MorphinHCl per Kilogramm Körpergewicht und mit 0,06 g per Ei der Embryo. Es besteht somit eine deutliche Beziehung zwischen der Giftigkeit für das ausgewachsene Tier und der teratogenetischen Wirkung auf den Embryo. Alle diese Zahlen beziehen sich aber nur auf eine Brut- und Einwirkungszeit von 72 Stunden = 3 Tage.

Ähnlich verhält sich auch die Widerstandsfähigkeit der Hühnerembryonen gegenüber Kokain (22). 0,005 KokainHCl in 0,5 ccm Wasser ist nicht sichtbar schädlicher als die gleiche Quantität Wasser

0,01 KokainHCl	gibt	66,6 ⁰ / ₀	n. E. anstatt	72,2 ⁰ / ₀
0,02 » » » » »	»	66,6 ⁰ / ₀	» » »	75,0 ⁰ / ₀
(0,02 also fast gleich viel wie 0,01)				
0,03 KokainHCl	gibt	25,00 ⁰ / ₀	n. E. anstatt	66,6 ⁰ / ₀
0,04 » » » » »	»	8,33 ⁰ / ₀	» » »	58,33 ⁰ / ₀
0,05 » » » » »	keine	Entwicklung.		

Bei Strychnin. sulf. (23) ist 0,001 ohne jede Einwirkung; 0,012 Strychnin. sulf. gibt dagegen nur noch 8,33⁰/₀ n. E. anstatt 50⁰/₀.

Coffein (24) hat mit Pepton, Kreatin und Xanthokreatinin die auffallende Eigenschaft gemein, daß geringe Dosen die Entwicklung

eher zu begünstigen scheinen und erst größere entwicklungshemmend wirken:

0,012 Coffein gibt	8,31 ⁰ / ₁₀₀	n. E. anstatt	58,31 ⁰ / ₁₀₀
0,068 » »	62,5 ⁰ / ₁₀₀	» »	76,38 ⁰ / ₁₀₀

(Normale Embryonen haben bei dieser Dosis eine noch verzögerte Entwicklung.)

0,004 Coffein gibt	70,83 ⁰ / ₁₀₀	n. E. gegenüber	72,22 ⁰ / ₁₀₀	der Kontrollen
0,002 » »	66,65 ⁰ / ₁₀₀	» »	68,05 ⁰ / ₁₀₀	» »

Bei 0,002 ist somit kein Unterschied mehr in der Zahl der Normal-embryonen, wohl aber eine deutliche Differenz in der Entwicklung, und zwar zugunsten der Coffeineier.

Injektionen von krystallisiertem Kreatin (25) ergaben 81,38⁰/₁₀₀ n. E. gegenüber nur 69,44⁰/₁₀₀ n. E. bei Eiern mit einer Injektion der gleichen Quantität Wasser, und erstere gleichzeitig eine fortgeschrittenere Entwicklung. Krystallisiertes Xanthokreatinin (26) zeigte 76,66⁰/₁₀₀ n. E. gegenüber 68,66⁰/₁₀₀ mit bedeutend beschleunigter Entwicklung bei den ersteren.

Auch Cantharidin (27) soll in schwachen Dosen eine Entwicklungsbegünstigung hervorrufen, während es in größeren Dosen Mißbildungen gibt.

Die entwicklungsanregende Wirkung ganz kleiner Dosen des Antipyrins (28) ist dagegen weniger auffallend, als die schädliche Wirkung von stärkeren Dosen.

0,0005 Antipyrin gibt	88,88 ⁰ / ₁₀₀	n. E. gegenüber	77,7 ⁰ / ₁₀₀	der Kontrollen
0,001 » »	81,11 ⁰ / ₁₀₀	» »	75,00 ⁰ / ₁₀₀	» »
0,0015 » »	63,88 ⁰ / ₁₀₀	» »	66,66 ⁰ / ₁₀₀	» »
0,002 » »	52,77 ⁰ / ₁₀₀	» »	63,88 ⁰ / ₁₀₀	» »
0,0025 » »	52,61 ⁰ / ₁₀₀	» »	69,41 ⁰ / ₁₀₀	» »

(Diese Versuche dauerten 44—49 Stunden.)

Da man dem Jod und seinen Salzen oft eine Wirkung im Sinne der Sterilität zuschrieb und dasselbe mitunter auch als die Ursache von Aborten betrachtete, wollte Féré untersuchen, wie weit Jod der Entwicklung des Embryos schaden oder ihn töten könne. Zuerst wurden Eier Joddämpfen ausgesetzt; aber selbst nach dreitägiger Einwirkung war nicht eine Spur Jod im Eiweiß nachzuweisen und dementsprechend auch keine Veränderung in der Entwicklung. Daher injizierte er KJ (29). Bis 0,10 g KJ ist die Zahl der Normalembryonen nur wenig tiefer als bei den Kontrolleiern. Bis 0,19 hat man noch 33,3⁰/₁₀₀ n. E. Beim Vergleich von KJ mit NaCl in gleicher Dose und gleich konzentrierter Lösung gab KJ 21 Normalembryonen und NaCl

10 Normalembryonen auf 60 bebrütete Eier. Das bedeutet eine ziemlich starke Widerstandsfähigkeit des Embryo gegen Jod, die eher größer ist als die gegen Cl. Sehr kleine Mengen NaCl haben dagegen einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung. Ähnlich verhält sich KBr (30). 0,1 KBr, entsprechend 1,66 g per Kilogramm Körpergewicht gibt $\frac{2}{3}$ normale Embryonen: selbst 0,2 gibt noch normale Entwicklungen. Strontiumbromid scheint weniger gut ertragen zu werden.

Aus diesem großen Versuchsmaterial von Féré geht hervor, daß wir in den Hühnerembryonen einen Organismus vor uns haben, der unbestreitbare Beziehungen zwischen toxischer und teratogenetischer Beeinflußbarkeit aufweist, und daß ferner die Art und der Grad der Toxizität verschiedener Stoffe mit der an anderen Organismen ermittelten Toxizität übereinstimmt.

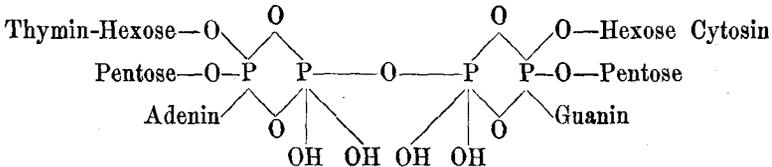
Während nun aber Féré bei allen seinen Experimenten festzustellen versuchte, inwiefern die Gifte Mißbildungen hervorriefen, bin ich den umgekehrten Weg gegangen. Ich prüfte den Einfluß der Entwicklung des Embryos auf die Zerstörung der eingespritzten Alkaloide. Auch in der zeitlichen Ausdehnung differieren unsere Versuche sehr. Féré begnügte sich mit einer Beobachtungsdauer von 72—96 Stunden; ich habe die Eier weit länger bebrütet, um größere und auch unter sich schon weiter differenzierte Zellmengen auf die Alkaloide einwirken zu lassen. Es schien mir so nach der ganzen Versuchsanordnung am ehesten möglich, genau quantitativen Aufschluß über die Größe der Zerstörung und die Bedingungen, die dazu führen, zu erhalten. Um diesen Weg mit Erfolg beschreiten zu können, müssen wir zuerst versuchen, uns über die chemischen Vorgänge zu orientieren, die sich bei der Bebrütung im Ei abspielen.

Jacques Loeb (31) hat zuerst eine rein chemische Erklärung der Befruchtung und Entwicklung des tierischen Eies gegeben, indem er sich von dem bis damals geltenden Begriff der Reizung emanzipierte. Auf Grund der Beobachtung, daß bei frisch befruchteten Eiern durch Sauerstoffentzug eine Kern- und Zellteilung verunmöglicht wird, kommt Loeb zu dem Schluß, daß eine wesentliche Wirkung des Eindringens des Spermatozoons ins Ei in der Anregung oder Beschleunigung von Oxydationsvorgängen bestehe.

Auch O. Warburg (32) hat gezeigt, daß mit der Befruchtung der Sauerstoffverbrauch des Eies plötzlich auf das Sechs- bis Siebenfache erhöht wird. Allerdings gehen im reifen, unbefruchteten Ei auch Oxydationsvorgänge vor sich, analog wie Ostwald (33) nachgewiesen hat, daß sowohl Froscheier als auch Spermatozoen schon fertige Oxydasen

enthalten; sie erschöpfen sich aber rascher. Die Oxydationsvorgänge im befruchteten Ei sind aber nicht nur die Vorbedingung der mechanischen Entwicklung der Kernzellteilung, sondern auch der chemischen Prozesse, wie z. B. der Nukleinsynthese. Die Tatsache, daß einerseits die Nukleinsynthese aller Entwicklung und jedem Wachstum bei Tieren und Pflanzen zugrunde liegt, und daß andererseits dieser Vorgang sowie die Kernteilung nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff möglich ist, ergibt eine breitere Grundlage für das Verständnis der Bedeutung des Sauerstoffs für die Lebenserscheinungen als die bloße Berücksichtigung der durch ihn bedingten Wärmebildung. Warum ohne freien Sauerstoff die Vorgänge der Kernteilung und der Nukleinsynthese im befruchteten Ei unmöglich sind, kann man mit dem heutigen Stand unseres Wissens nicht bestimmt angeben. Selbstverständlich sind die Oxydationsprozesse nicht die einzigen Vorgänge, die der Kernsynthese zugrunde liegen, bzw. sie begünstigen. Im Ei müssen vielmehr durch die Befruchtung noch andere Prozesse angeregt, bzw. beschleunigt werden, die auch bei Sauerstoffmangel vor sich gehen. Aber auch solche Vorgänge, wie z. B. die Spaltungen, erfordern für eine rationelle Entwicklung doch auch Oxydationen nebenher, damit die dabei entstandenen allfälligen schädlichen Produkte durch Oxydation entgiftet werden können, und nicht durch ihre Anhäufung zum Tode der Zellen führen.

Nimmt man an, daß im Ei durch die Befruchtung derartige Spaltungen angeregt werden, so können wir verstehen, warum das befruchtete Ei rascher bei Sauerstoffmangel oder Unterdrückung der Oxydationen leidet, als das unbefruchtete, da in letzterem keine oder nur relativ geringe Hydrolysen stattfinden. Das Skelett der Nukleinsäure scheint eine Phosphorsäure zu sein, an die sich wenigstens zwei weitere chemische Gruppen anschließen: die eine Gruppe sind Purinbasen, wie Adenin und Guanin oder möglicherweise andere Repräsentanten dieser Gruppe; die zweite Gruppe sind Kohlehydrate, eine Pentose und eine Hexose.



(Schematische Darstellung der Konstitution nach Burian (34).)

Die Zellkerne bestehen fast ausschließlich aus einem Salze der Nukleinsäure, wobei gewisse Eiweißstoffe, Protamine, Histone oder

ähnliche Körper den basischen Bestandteil bilden. Gestützt auf die Tatsachen, daß alle jungen, rasch wachsenden Zellen relativ viel Lezithin enthalten, worauf z. B. Hoppe-Seyler aufmerksam gemacht hat, ferner, daß das Eidotter, wie Kossel gezeigt hat, keine Nukleinsäure vorgebildet enthält, daß aber beim Ei nach der Befruchtung eine rasche Synthese von Kernmaterial auf Kosten des an Lezithin sehr reichen Nahrungsdotters entsteht, darf man wohl annehmen, daß das Lezithin das Material für einen Teil der Nukleinsäure liefert. Um diesen Aufbau zu ermöglichen, ist es aber nötig, daß das Lezithinmolekül erst eine Spaltung erleidet. Zweifelsohne gehen also neben Oxydationen auch Spaltungen bei der Entwicklung des Embryos im Ei vor sich, und diese Vorgänge erfordern die Gegenwart von Enzymen, die wir aber noch nicht genügend kennen. Daß solche Prozesse der Spaltungen, z. B. des Lezithins, und Oxydationen wirklich vorkommen, ist analytisch nachgewiesen. So konnten R. H. Anders Plimmer und F. H. Scott (35), welche die verschiedenen Phosphorsäurekombinationen des Eies während der Brutzeit untersuchten, folgende Zahlen für die ätherlösliche Phosphorsäureverbindung finden, berechnet auf den Gesamtphosphorsäuregehalt des Eies.

Vor der Bebrütung	64,8 %
Am 7. Tage der Brutzeit . . .	64,1 %
Am 13. Tage der Brutzeit . . .	66,0 %
Am 16. Tage der Brutzeit . . .	62,3 %
Am 19. Tage der Brutzeit . . .	51,0 %
Am 20. Tage der Brutzeit . . .	36,0 %
Beim ausgeschlüpften Hühnchen	19,3 %

In bezug auf die Oxydationsvorgänge fanden Cl. Bohr und K. A. Hasselbach (36), daß die Kohlensäureproduktion des Hühnerembryos relativ gleich groß ist, wie die des erwachsenen Huhnes, wodurch es wahrscheinlich gemacht wird, daß im Embryonalleben potenzielle Energie ebenso großen Umfanges wie im erwachsenen Organismus entwickelt wird.

Um weiteres Material für die chemischen Vorgänge bei der Bebrütung beizubringen, hat man versucht, den respiratorischen Stoffwechsel festzustellen. Schon längst war bekannt, daß das Gewicht des Eies während der Bebrütung abnimmt. Vergleiche in dieser Beziehung zwischen befruchteten und unbefruchteten Eiern während der Bebrütung hatten aber ergeben, daß der Gewichtsverlust bei beiden Arten fast gleich groß war und somit nur auf einem Wasserverlust beruhte.

Sehr wichtig ist dagegen die durch Bohr und Hasselbach festgestellte Tatsache, daß die CO₂-Produktion von der Entwicklung

des Embryos, speziell von dessen Gewicht, abhängt, und zwar in so enger Beziehung, daß man aus der Größe der CO_2 -Abgabe mit ziemlicher Genauigkeit das Gewicht des Embryos auszurechnen vermag.

Genauere chemische Analysen, die von Bohr und Hasselbach ausgeführt wurden, ergaben das eigentümliche Resultat, daß die Kohlensäureproduktion bei toten Embryonen während der Bebrütung unverändert bleibt, der Sauerstoffverbrauch hingegen abnimmt. Das gleiche gilt für die unbefruchteten Eier. Bei lebenden Embryonen sinkt anfänglich die Kohlensäureproduktion, um nach dem dritten Tage stark anzusteigen und dann bis zum letzten Tage konstant zu bleiben. Die Kohlensäureproduktion und Sauerstoffaufnahme sind sozusagen gleich groß. Der niedrige Respirationsquotient läßt vermuten, daß der Stoffwechsel des Embryos hauptsächlich in einer Verbrennung von Fett besteht, was gemeinsam mit dem Resultat von Plimmer und Scott, jedoch von einem anderen Standpunkte aus, gewonnen, für eine Umwandlung von Lecithin in Nukleinsäure sprechen kann. Bei Respirationsversuchen mit erhöhter Sauerstoffzufuhr beobachteten Bohr und Hasselbach, daß der Effekt nicht immer ein einheitlicher ist. Das eine Mal nimmt die Kohlensäureausscheidung entsprechend zu, das andere Mal bleibt sie gleich. Es scheinen dafür individuelle Verhältnisse maßgebend zu sein. Bei kräftigen Individuen scheint die sauerstoffreiche Luft als Stimulans auf die Oxydationsvorgänge des Protoplasmas zu wirken.

Im Anschluß an die Versuche von Bohr und Hasselbach glaubt Heinr. H. Escher (37), daß der Farbstoff des Hühnereidotter, Lutein, ein Isomeres des Xanthophylls, das sich sehr leicht autoxydiert und den Sauerstoff wieder abgibt, vor der Entstehung des Hämoglobins im Embryo die vorläufige Rolle einer Oxydase analog einem atavistischen Pflanzenatmungspigmente spielen könnte.

Ich habe im vorausgehenden etwas ausführlicher die ziemlich zerstreute Literatur über die chemischen Verhältnisse bei der Entwicklung der Hühnerembryonen mitgeteilt, weil auf diesen Feststellungen die Grundlage meiner Untersuchung beruht. Wir haben gesehen, daß die Embryonen durch Gifte in ähnlicher Weise in ihrer Entwicklung gestört werden, wie erwachsene Organismen. Durch zahlreiche Untersuchungen ist festgestellt, daß sowohl oxydative als fermentative chemische Prozesse sich im bebrüteten Ei abspielen, und zwar in ähnlichen Proportionen wie beim ausgewachsenen Individuum.

Nach alledem hielt ich mich für berechtigt, die Frage nach der Art der Zerstörung des Morphins und seiner Derivate im tierischen Organismus dadurch zu lösen, daß ich diese Substanzen in Eier einspritzte und diese unter verschiedenen Umständen der Bebrütung aussetzte.

Experimenteller Teil.

I. Methodik.

Da die Arbeiten von Féré keine Angaben über die Art der Injektion enthielten, war ich gezwungen, selbst eine Methode auszuarbeiten. Es kam dabei namentlich darauf an, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Injektion gemacht werden sollte. Bei der ersten Serie von 36 Eiern, für die ich eine Garantie von 75% Befruchtung hatte, wurden die Alkaloide am ersten Tage der Bebrütung injiziert. Als Brutapparate benützte ich die von Sartorius in Göttingen hergestellten. Die Brutdauer der Hühner beträgt 19—24 Tage, in der Regel 21 Tage. Als ich diese Eier am 24. Tage öffnete, fand ich bei keinem derselben eine Entwicklung. Bei den folgenden Versuchen wurden daher die Eier erst am sechsten Tage der Brutperiode mit einem sog. Eierprüfer durchleuchtet, um festzustellen, ob überhaupt eine Befruchtung und Entwicklung vorhanden war. Bei dieser Durchleuchtung war es auch möglich, bei den befruchteten Eiern die Stelle zu erkennen, wo das Eiweiß noch nicht organisiert war. Hier wurde in die Schale ein möglichst kleines Loch gebohrt, so daß man gerade die Pravaznadel einführen konnte. Die Injektion wurde mit einer auf 38° C erwärmten Lösung und unter allen antiseptischen Vorsichtsmaßregeln ausgeführt. Die Öffnung wurde dann mit Leukoplast, Gips oder einer konzentrierten alkoholischen Kolophoniumlösung verschlossen. Am besten bewährte sich Leukoplast. Die Lösungen wurden, um osmotische Störungen zu vermeiden, möglichst konzentriert angewandt, und zwar: Morphin HCl 5%, Codeinum phosphoricum 10%, Heroinum HCl 2,5%. Es hat dies auch den Vorteil, daß man mit ganz geringen Flüssigkeitsmengen auskommt; denn mehr als 0,5 ccm sollten nie eingespritzt werden. Infektionen sind nicht vorgekommen. Ausgeschlüpfte Hühnchen wurden sofort mit Chloroform getötet und bis zur Analyse im Kühlraum aufbewahrt.

Wie frühere Autoren, so machte auch ich die Erfahrung, daß bei der künstlichen Bebrütung viele Hühnchen nicht ausgeschlüpft sind, obwohl sie vollständig entwickelt waren. Um zu beweisen, daß dieses Verhalten nicht etwa eine Folge der Injektion war, hatte ich zum

Vergleich jeder Serie nicht injizierte, befruchtete Eier beigelegt, die sich in dieser Beziehung prozentual gleich verhielten wie die injizierten. Das mag in erster Linie darauf beruhen, daß die künstliche Inkubation nicht gleich gute Resultate liefert, wie die natürliche und zweitens, daß meine Brutapparate an einem betreffend Feuchtigkeit nicht sehr günstigen Platze aufgestellt waren.

Zur Isolierung der Alkaloide hielt ich mich im Prinzip an die Taubersche Methode (3), die besonders wegen des großen Fettgehaltes des Analysenmaterials entsprechend modifiziert werden mußte. Nach längeren Voruntersuchungen schien mir das folgende Verfahren das beste:

Die zerkleinerten Hühnchen, inklusive Schale, bzw. die Eier wurden in einem Mörser mit Quarzsand fein zerrieben. Dieser Brei wurde dann in einer Porzellanschale mit etwa 2 l destilliertem Wasser verdünnt und unter Zusatz von Ammonsulfat und Essigsäure bis zur Koagulation des Eiweißes erhitzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, nachgewaschen und diese Operation zweimal, bzw. so oft wiederholt, bis die Fröhdesche Reaktion auf Morphin usw. negativ ausfiel. Die vereinigten Filtrate wurden hierauf auf dem Wasserbade auf etwa 500 ccm eingeeengt, mit Ammoniak neutralisiert und dann mit basischem Bleiazetat gefällt, bis sich auf der Oberfläche eben eine Schicht von Bleikarbonat zu bilden begann; dabei setzte sich natürlich auch das Ammonsulfat um. Der gelbliche Bleiniederschlag wurde nach dem Abfiltrieren mit heißem Alkohol ausgewaschen, bis kein Alkaloid im Filtrat mehr nachweisbar war und dann das überschüssige Blei mit H_2S gefällt und, nachdem der überschüssige H_2S mittelst Durchleitung von Luft vertrieben war, der abfiltrierte Bleisulfidniederschlag ebenfalls mit heißem Alkohol ausgewaschen. Mitunter kam es dabei vor, daß das Bleisulfid sich nicht ausschied, sondern in einer offenbar kolloidalen Form suspendiert blieb und die Flüssigkeit schwarzbraun färbte. In diesen Fällen wurde die Lösung mit Essigsäure angesäuert und auf dem Wasserbade erwärmt, bis der Niederschlag flockig wurde. Das Filtrat wurde wiederum auf dem Wasserbade zur Sirupkonsistenz eingedampft und dann mit dem etwa fünffachen Volumen Alkohol versetzt, um die Salze auszufällen. Diese Mischung ließ ich 3 Tage im Kühlraum stehen und wusch den Niederschlag, der zuerst in einem Porzellanmörser gut pulverisiert wurde, wieder mit Alkohol aus, um das eingeschlossene bzw. absorbierte Alkaloid abzutrennen. Von dem Filtrat wurde dann der Alkohol abdestilliert, was unter Anwendung von Vakuum und Kappillarrohr bei ziemlich niedriger Temperatur geschah. Überhaupt wurde bei allen den verschiedenen Prozeduren darauf geachtet, daß die Temperatur nicht zu hoch stieg. Der saure wässrige Rückstand wurde dann auf dem Wasserbade noch weiter bis auf etwa 30 ccm eingeeengt, wobei sich teilweise flockige braune Extraktstoffe ausschieden, die in Äther und Petroläther leicht löslich waren.

Die filtrierte und gut nachgewaschene Flüssigkeit wird dann bei saurer Reaktion zwei- bis dreimal mit Petroläther gut ausgeschüttelt, um alle noch in Lösung vorhandenen Verunreinigungen zu entfernen, hierauf ammoniak-

lich gemacht und so lange mit einer Mischung von 2 Teilen Isobutylalkohol und 3 Teilen Chloroform ausgeschüttelt, bis Fröhdes Reaktion negativ ausfiel. Wie für Morphin, so bewährte sich auch für Heroin diese Chloroform-Isobutylalkoholmischung als besseres Lösungsmittel als Chloroform allein, während Kodein leicht in Äther übergeht. Die Alkaloide wurden dann aus dieser Lösung in mit HCl bzw. H_3PO_4 angesäuertes Wasser zurückgeschüttelt und diese Lösung noch zwei- bis dreimal mit Äther oder Petroläther gereinigt. Ich erhielt so schließlich ganz farblose, wässrige Lösungen der betreffenden Alkaloidsalze, deren Gehalt nun bestimmt werden mußte. Da es sich in meinen Versuchen immer um kleine Quantitäten handelte, so konnte eine gewichtsanalytische Methode nicht in Frage kommen. Ich bediente mich daher einer kolorimetrischen Bestimmungsart. Zu diesem Zwecke wurden bestimmte Mengen der zur Analyse bereiten Lösung in kleinen Glasschälchen von genau gleicher Weite und gleicher Rundung eingedunstet, eine stets gleich bleibende Menge des Reagens zugesetzt und die Reaktion auf weißem Untergrund beobachtet. Auf diese Weise ist es möglich, auch Mengen von 1 mg Morphin oder Heroin usw. an abwärts noch ziemlich genau quantitativ zu bestimmen. Wenn diese Methode auch anfangs etwas subjektiv erscheint, so gelangt man nach längerer Übung doch zu befriedigenden Resultaten. Die Empfindlichkeiten für die Reaktion sind die folgenden: Marquis Reagens (Formalinschwefelsäure) gibt mit $\frac{1}{100}$ mg Kodein noch eine deutliche Blau-Violett-färbung: Fröhdes Reagens (0,5 Molybdänsäure: 100 konz. H_2SO_4) gibt auch mit $\frac{1}{100}$ mg Morphin oder Heroin eine deutliche Violett-färbung, während $\frac{1}{200}$ mg nur noch eine eben wahrnehmbare Farbentönung gibt. Zur genauen Bestimmung wurde die wässrige alkaloidhaltige Lösung so lange verdünnt, bis 1 ccm davon gerade $\frac{1}{100}$ mg entsprach, was durch Vergleich mit bekannten Morphinlösungen festgestellt wurde. Da die meisten Versuche mit Heroin und Morphin zugleich ausgeführt wurden, so konnte man zur weiteren Kontrolle noch eine Eigentümlichkeit des Heroins benützen. Die Fröhdesche Reaktion dieser beiden Alkaloide unterscheidet sich nämlich dadurch, daß die des Morphins bald verschwindet, während diejenige des Heroins selbst in sehr verdünnter Lösung nach einigen Stunden in eine konstante, längere Zeit anhaltende Grünfärbung übergeht, die man leicht mit einer eingestellten Lösung kolorimetrisch vergleichen kann.

Aus der ganzen hier beschriebenen Methodik geht hervor, daß es sich um eine sehr mühselige und zeitraubende Operation handelt. Eine Analyse nimmt zu ihrer Durchführung jedenfalls 3 Wochen in Anspruch. Es ist daher in Anbetracht der vielen Experimente, die ich ausführte, nicht verwunderlich, wenn $1\frac{1}{4}$ Jahre zu deren Erledigung nötig waren. Alle Versuche, das Verfahren abzukürzen oder zu vereinfachen, erwiesen sich stets als schädlich für die Genauigkeit. Dafür hat man aber auch die Gewißheit, daß bei dieser Methode auch Bruchteile von 1 mg Morphin, die man in ein Hühnerei einspritzte, bei der Analyse wieder gefunden wurden.

II. Ergebnisse.

a) Bei normaler Sauerstoffzufuhr.

Ich gehe nun über zu den nach dem beschriebenen Verfahren erhaltenen Resultaten. Zur besseren Orientierung nummeriere ich die Versuche fortlaufend, ohne Rücksicht auf die eigentliche Protokollnummer, die in Klammern beigelegt ist.

Versuch 1 (Nr. 2). Am 6. Tage der Inkubationszeit wird in das Eiweiß eine Injektion von 0,1 ccm einer 5%igen Lösung = 0,005 Morphin hydrochloric. gemacht; am 21. Tage ist das Hühnchen normal ausgeschlüpft; in demselben sowie in den Eierschalen ist kein Morphin nachweisbar = vollkommene Zerstörung.

Versuch 2 (Nr. 7). Am 6. Tage der Bebrütung Injektion von 0,2 ccm einer 5%igen Lösung = 0,01 MorphinHCl in das Eiweiß; als am 24. Tage das Hühnchen nicht ausgeschlüpft war, wurde das Ei sorgfältig geöffnet. Der Embryo war vollständig entwickelt, aber abgestorben. Die Analyse ergab 0,002 Morphin HCl = 80% Zerstörung.

Versuch 3 (Nr. 7). Am 6. Tage der Bebrütung Injektion von 0,2 ccm einer 5%igen Lösung von MorphinHCl = 0,01. Am 21. Tage ist das Hühnchen normal ausgeschlüpft. Gefunden Morphin: 2 mg = 80% Zerstörung.

Versuch 4 (Nr. 60). Am 6. Tage Injektion von 0,4 ccm obiger Lösung = 0,02 MorphinHCl. Hühnchen am 21. Tage ausgeschlüpft und sofort getötet; Analyse ergab 0,011 = 50% Zerstörung.

Diese Ergebnisse beweisen, daß bei der normalen und vollständigen Entwicklung des Embryos sicher ein Teil, manchmal alles eingespritzte Morphin zerstört wird. Entsprechend meiner Fragestellung war somit zu hoffen, durch Variationen der Versuchsbedingungen Näheres über die Art der Zerstörung zu erfahren. Ich schließe nun gleich an die Versuche mit Heroin, ebenfalls unter normalen Bedingungen, an:

Versuch 5 (Nr. 26). Am 6. Tage Injektion von 0,0025 HeroinHCl. Der Embryo ist vollständig entwickelt, aber nicht ausgeschlüpft. Das Ei wird am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt und analysiert. Heroin ist nicht nachweisbar = vollständige Zerstörung.

Versuch 6 (Nr. 29). Injektion am 6. Tage von 0,005 Heroin; am 21. Tage ist das Tier normal entwickelt und ausgeschlüpft. Es wird sofort getötet und samt den Eierschalen analysiert. Heroin nicht nachweisbar = völlige Zerstörung.

Versuch 7 (Nr. 33). Injektion am 6. Tage von 0,01 Heroin HCl. Embryo vollständig entwickelt, aber nicht ausgeschlüpft. Heroin nicht nachweisbar = völlige Zerstörung.

Versuch 8 (Nr. 50). Analog dem Versuch 7; Heroin ebenfalls nicht nachweisbar = 100% Zerstörung.

Diese Versuche zeigen, daß Heroin bei der normalen Entwicklung des Hühnerembryo eher noch vollständiger abgebaut wird, als das Morphin. Diese Tatsache, welche Bedeutung hat für die Frage der Angewöhnung an Heroin, konnte nur bei dieser Versuchsanordnung festgestellt werden, weil die Giftigkeit des Heroins es verunmöglicht, an erwachsene Tiere so große Dosen zu geben, daß genaue vergleichende Analysen aus den Ausscheidungen erhalten werden. Aus den nun folgenden Versuchen geht sehr deutlich hervor, wie der völlige Abbau der eingespritzten Alkaloidmengen abhängig ist von der bis zur gänzlichen Reife durchgeführten Entwicklung des Embryos.

Versuch 9 (Nr. 15). Am 6. Tage Injektion von 0,2 ccm = 0,01 MorphinHCl. Hühnchen nicht ausgeschlüpft; bei der Eröffnung nur halbe Entwicklung; Analyse ergab 0,01 MorphinHCl = keine Zerstörung.

Versuch 10 (Nr. 30). Am 6. Tage Injektion von 0,005 HeroinHCl; der Embryo bleibt in der Mitte der Brutzeit in der Entwicklung stehen und stirbt ab; das Ei wird am 24. Tage dem Brutapparat entnommen und analysiert. Gefunden 0,005 Heroin = gar keine Zerstörung.

Versuch 11 (Nr. 31). Am 6. Tage Injektion von 0,01 HeroinHCl. Der Versuch verlief in gleicher Weise wie Versuch 10. Am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt; die Analyse ergab 0,01 HeroinHCl = keine Zerstörung.

Im Anschluß an diese Versuche, bei denen der Bebrütungsvorgang seinem normalen Verlauf überlassen war, habe ich noch solche mit vorzeitiger willkürlicher Unterbrechung der Bebrütung ausgeführt, und zwar sowohl mit Morphin als Heroin. Es zeigt sich auch hier, entsprechend den Fällen mit spontanem Absterben des Embryos, daß die vorzeitige Unterbrechung der Entwicklung normaler Embryonen ebenfalls die Zerstörung des Alkaloids vollständig aufhebt. Auf welche Weise die Unterbrechung zustande kommt, erscheint gleichgültig. Diese Kontrolle war deswegen nötig, weil die Frage naheliegend war, ob bei den spontan absterbenden Embryonen die Nichtzerstörung der Alkaloide vielleicht auf eine abnorme Veranlagung zurückzuführen sei.

Versuch 12 (Nr. 37). Am 6. Tage 0,2 ccm = 0,01 MorphinHCl injiziert. Unbefruchtet. Am 5. Tage nach der Injektion aus dem Brutapparat entfernt. Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 13 (Nr. 38). Befruchtet und entwickelt. Am 6. Tage Injektion von 0,2 ccm = 0,01 MorphinHCl. Am 5. Tage nach der Injektion aus dem Brutapparate entfernt; Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 14 (Nr. 51). Befruchtet und entwickelt. Am 6. Tage Injektion von 0,01 HeroinHCl. Gleichzeitig wurde der Embryo mit der Nadel durchstoßen, um die Entwicklung einzustellen. Am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt. Analyse ergab 0,01 HeroinHCl.

Versuch 15 (Nr. 52). Analog dem Versuch 14, aber mit 0,01 MorphinHCl. Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Es erscheint nach dem Vorausgehenden eigentlich selbstverständlich, daß unbefruchtete Eier auch bei noch so langer Bebrütung gar keine Zerstörung hervorbringen können, immerhin habe ich in dieser Richtung auch noch einige Versuche ausgeführt:

Versuch 16 (Nr. 47). Unbefruchtet. Am 6. Tage Injektion von 0,01 Heroin. Am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt. Analyse ergab 0,01 Heroin.

Versuch 17 (Nr. 48). Unbefruchtet. Am 6. Tage Injektion von 0,01 MorphinHCl. Am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt. Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Da nach dem Ergebnis von Bouma (38) das Kodein beim Hunde ein anderes Verhalten zeigt als Morphin, indem es auch bei längerer Anwendung nicht zerstört wird, so habe ich auch mit dieser Substanz meine Bebrütungsversuche ausgeführt:

Versuch 18 (Nr. 17). Injektion am 6. Tage von 0,1 ccm einer 10⁰/₀igen Lösung von Cod. phosphor. = 0,01 Cod. phosphor. Der Embryo ist vollständig entwickelt, aber nicht ausgeschlüpft. Das Ei wird am 24. Tage dem Brutapparat entnommen und in toto analysiert. Gefunden 0,01 Cod. phosphor. = gar keine Zerstörung.

Versuch 19 (Nr. 18). Genau der gleiche Verlauf wie im vorhergehenden Versuche. Analyse ergab 0,01 Cod. phosphor.

Versuch 20 (Nr. 19). Am 6. Tage Injektion von 0,2 ccm obiger Lösung = 0,02 Cod. phosphor.; halbe Entwicklung; Embryo behaart. Am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt; Analyse ergab 0,02 Cod. phosphor.

Versuch 21 (Nr. 62). Analog Versuch 20. Analyse ergab 0,02 Cod. phosphor.

Versuch 22 (Nr. 23). Am 6. Tage Injektion von 0,3 ccm obiger Lösung = 0,03 Cod. phosphor.; halbe Entwicklung. Am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt. Analyse ergab 0,03 Cod. phosphor.

Diese Versuche 18 bis 23 bilden somit eine Bestätigung der Resultate von Bouma. Sie sind auch zugleich ein Beleg dafür, daß die chemischen Verhältnisse in bezug auf die Zerstörung der Alkaloide bei der Entwicklung des Hühnerembryo offenbar parallel liegen denjenigen im erwachsenen Körper, wie sich dies ja schon aus der Einleitung als wahrscheinlich ergeben hatte.

Aus dem Umstand, daß die Embryonen bei der Anwendung von Kodein sich weniger gut entwickelten und oft frühzeitiger abstarben als beim Morphin, zusammengehalten mit der nachgewiesenen Unzerstörbarkeit des Alkaloides, darf man wohl mit Bouma den Schluß ziehen, daß eine Angewöhnung an dieses Morphinderivat sehr schwer eintritt.

b) Versuche mit reduzierter Sauerstoffzufuhr.

Zur Entscheidung, ob die im vorhergehenden festgestellte Zerstörung von Morphin und Heroin in den späteren Stadien der Entwicklung mehr bedingt sei durch Oxydationen oder durch Spaltungen, habe ich versucht, die Sauerstoffzufuhr während der Bebrütung verschieden zu gestalten. Zunächst wurden Versuche mit reduzierter Sauerstoffzufuhr gemacht. Zu diesem Zwecke wurden die Eier am 6. Tage der Brutperiode teils ganz, teils halb im Längsschnitt mit Asphaltlack bedeckt und unter Normalbedingungen bis zum 24. Tage weiterbebrütet. Eine teilweise Reduktion des Sauerstoffes ist natürlich identisch mit einer Entwicklungsverzögerung, ein Totalabschluß der Luft mit einer Entwicklungseinstellung. Somit standen die Alkaloide während der zweiten Hälfte der Brutzeit in der Hauptsache unter dem Einfluß verschiedener Fermente, von denen wir wissen, daß sie in den ersten 6 Tagen der Bebrütung jedenfalls schon aktiviert waren. Dieselben konnten somit längere Zeit bei einem Optimum der Temperatur auf die Alkaloide einwirken. Nachdem die Lackierung am 6. Tage der Bebrütung vollzogen worden war, wurden die Injektionen erst am 8. Tage vorgenommen, in der Meinung, daß der eventuell im Ei noch vorhandene Sauerstoff seit der Lackierung chemisch gebunden werde. Versuche mit Lackierung zur teilweisen Reduktion der Sauerstoffaufnahme wurden schon vor mir von Paul Mitrophanow (39) ebenfalls zu teratogenetischen Studien gemacht.

Versuch 23 (Nr. 78). Injektion ins Eiweiß von 0,01 MorphinHCl. Befruchtet, halb lackiert, gut halbe Entwicklung, Embryo behaart. Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 24 (Nr. 80). Befruchtet, halb lackiert. Injektion von 0,01 HeroinHCl, Entwicklung sofort nach der Injektion eingestellt. Analyse ergab 0,01 HeroinHCl.

Versuch 25 (Nr. 83). Injektion von 0,01 MorphinHCl. Unbefruchtet, halb lackiert, Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 26 (Nr. 84). Injektion von 0,01 HeroinHCl. Unbefruchtet, halb lackiert, Analyse ergab 0,01 HeroinHCl.

Versuch 27 (Nr. 86). Injektion von 0,01 MorphinHCl, befruchtet, ganz lackiert, Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 28 (Nr. 88). Injektion von 0,01 HeroinHCl, befruchtet, ganz lackiert, Analyse ergab 0,01 HeroinHCl.

Versuch 29 (Nr. 92). Injektion von 0,01 MorphinHCl, unbefruchtet, ganz lackiert, Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 30 (Nr. 95). Injektion von 0,01 HeroinHCl, unbefruchtet, ganz lackiert, Analyse ergab 0,01 HeroinHCl.

Aus diesen Versuchen geht übereinstimmend hervor, daß unter keinen Umständen eine Zerstörung von Morphin oder Heroin statt-

gefunden hat bei teilweisem oder ganzem Sauerstoffentzug. Jedenfalls bildet also der Sauerstoff kein Hindernis für die Fermentvorgänge zur Spaltung des Morphins; denn sonst hätte sich hier im Vergleich z. B. mit den Versuchen spontaner oder willkürlicher Unterbrechung der Entwicklung irgendein Zeichen des Abbaues einstellen müssen. Somit können wir wohl annehmen, daß eine rein fermentative Spaltung des Morphins oder Heroins ausgeschlossen ist.

c) Versuche mit erhöhter Sauerstoffzufuhr.

Bei diesen Versuchen wurde die Bebrütung genau in der gleichen Weise durchgeführt wie bei den anderen. An Stelle der gewöhnlichen Luftzufuhr wurde ein bestimmtes Quantum Sauerstoff in sehr langsamem Strom durch den Brutraum geleitet, so daß in 30 Stunden 15 Liter Sauerstoff verbraucht wurden. Von 32 Eiern entwickelten sich dabei nur zwei vollkommen, die Tiere sind aber nicht spontan ausgeschlüpft.

Versuch 31 (Nr. 100). Befruchtet. Am 6. Tage Injektion von 0,01 MorphinHCl. Entwicklung gleich nach der Injektion eingestellt. Am 24. Tage aus dem Brutapparat entfernt. Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 32 (Nr. 114). Unbefruchtet. Injektion am 6. Tage von 0,01 MorphinHCl in das Eiweiß. Bis zum 24. Tage bebrütet. Analyse ergab 0,01 MorphinHCl.

Versuch 33 (Nr. 108). Befruchtet. Injektion am 6. Tage von 0,01 HeroinHCl. Bald nach Injektion Entwicklung eingestellt; bis zum 24. Tage weitergebrütet. Analyse ergab 0,01 HeroinHCl.

Versuch 34 (Nr. 116). Unbefruchtet. Injektion am 6. Tage von 0,01 HeroinHCl. Bis zum 24. Tage weitergebrütet. Analyse ergab 0,01 HeroinHCl.

Versuch 35 (Nr. 106). Befruchtet. Injektion am 6. Tage von 0,02 MorphinHCl. Entwicklung bald nach Injektion eingestellt. Bis zum 24. Tage weitergebrütet. Analyse ergab 0,02 MorphinHCl.

Versuch 36 (Nr. 111). Befruchtet. Injektion am 6. Tage von 0,02 HeroinHCl. Entwicklung bald nach der Injektion eingestellt. Bis zum 24. Tage weitergebrütet. Analyse ergab 0,02 Heroin.

Versuch 37 (Nr. 115). Unbefruchtet. Injektion am 6. Tage von 0,02 HeroinHCl; bis zum 24. Tage weitergebrütet. Analyse ergab 0,02 HeroinHCl.

Versuch 38 (Nr. 117). Befruchtet. Injektion am 6. Tage von 0,02 HeroinHCl; Entwicklung noch etwa 5 Tage fortgesetzt, dann eingestellt. Bis zum 24. Tage weitergebrütet. Analyse ergab 0,02 HeroinHCl.

Versuch 39 (Nr. 124). Befruchtet. Injektion in das Eiweiß. 0,01 MorphinHCl am 6. Tage. Embryo vollständig entwickelt, aber nicht ausgeschlüpft. Morphin nicht nachweisbar.

Versuch 40 (Nr. 126). Befruchtet. Am 6. Tage Injektion ins Eiweiß von 0,02 MorphinHCl; Embryo vollständig entwickelt, aber nicht ausgeschlüpft. Morphin nicht nachweisbar.

Aus all diesen Versuchen ergibt sich, daß kein wesentlicher Unterschied besteht in bezug auf die Alkaloidzerstörung bei vermehrter Sauerstoffzufuhr gegenüber der Bebrütung bei gewöhnlichen Verhältnissen. Das aktive Prinzip scheint nicht der verfügbare Sauerstoff an sich zu sein; auch die präformiert vorhandenen Fermente üben unter der stärkeren O_2 -Zufuhr keinen zerstörenden Einfluß aus. Das Maßgebende ist die Entwicklung des Protoplasmas, und zwar genügt offenbar nicht nur überhaupt eine gewisse Organisation des Eiweißes, sondern es braucht schon eine ziemlich weitgehende Differenzierung in der Zellbildung und dem Gewebeaufbau, damit eine Zerstörung der Alkaloide eintritt. Ist diese Bedingung erfüllt, so können auch die gewöhnlichen Sauerstoffmengen der atmosphärischen Luft zur Zerstörung vollkommen genügen; allerdings scheint diese letztere bei vollentwickeltem Embryo und reichlicherer Sauerstoffzufuhr eher eine vollständigere zu sein, wie ein Vergleich der Versuche 2, 3 und 4 mit Versuch 39 und 40 ergibt. Da wir einerseits die in der beschriebenen Weise in das bebrütete Ei angeführten Injektionen gleichsam als eine chronische Intoxikation mit Morphin usw. betrachten können, andererseits die chemischen Einflüsse die gleichen zu sein scheinen wie bei erwachsenen Tieren, so gestatten uns die erhaltenen Resultate auch gewisse Schlußfolgerungen auf die Ursache der Morphinzerstörung beim Morphinismus. Es ist, wie wir gesehen haben, nicht ein beliebig organisiertes Protoplasma, das dieselbe übernimmt, sondern wahrscheinlich ein erst am Ende der Entwicklung des Embryo vollständig ausgebildetes Zellsystem. Diese kann dafür sprechen, daß die Zerstörung durch eine unter dem Einflusse der Angewöhnung erworbene Fähigkeit des Nervensystems zustande kommt. Würden durch die chronische Anwesenheit des Morphins Fermente gebildet, welche die Aufgabe hätten, dasselbe zu zerstören, so sollte man erwarten, daß solche Vorgänge auch schon in den früheren Stadien der Bebrütung zustande kommen. Das ist aber sicher nicht der Fall. Das Problem der Morphinzerstörung scheint somit eine ausgesprochene morphologische Basis zu besitzen, wobei offenbar eine Oxydation die Hauptrolle spielt. Im Zusammenhang mit den klinischen Ergebnissen der Morphinabstinenz spricht dieser Umstand dafür, daß die Ursache der Morphinzerstörung beim Morphinismus auf eine erworbene Zellfunktion des Zentralnervensystems zurückzuführen ist. Damit schließe ich mich der von Cloetta gegebenen Auffassung des Morphinismus bzw. der Erklärung für die bei demselben beobachtete vermehrte Zerstörung des Morphins an. Mit dieser Auffassung läßt sich die pharmakologische

Tatsache in Beziehung bringen, daß die Empfindlichkeit gegen die lähmenden Wirkungen des Morphins in der Wirbeltierreihe mit der höheren Entwicklung des Nervensystems zunimmt und daß bei diesen höher entwickelten Individuen auch leichter die Angewöhnung eintritt.

Im ferneren geht aus meinen Versuchen hervor, daß Morphin und Heroin puncto Zerstörung sich prinzipiell gleich verhalten. Damit steht im Einklang, daß bei Heroin ebenfalls Angewöhnung beobachtet wurde. Das Fröhdesche Reagens trennt die Morphinderivate in bemerkenswerter Weise in zwei Gruppen: das einer eventuellen Zerstörung anheimfallende Morphin und Heroin reagieren direkt damit, Kodein und sein nächst höheres Homologon Dionin, bei denen keine Zerstörung im Tierkörper bekannt ist, geben direkt damit nicht die charakteristische Färbung, sondern erst bei Zusatz von Formalin. Babel(40) glaubt, daß in beiden Fällen, d. h. sowohl bei der Zerstörung im Organismus als auch bei der Fröhdeschen Reaktion dieses Verhalten durch die festere Bindung der Ester zu erklären sei. Heroin, ebenfalls ein Ester, zeigt aber wie unsere Versuche beweisen, gegen die Zerstörung durch den wachsenden Organismus eine geringere Widerstandskraft als Morphin. Vielleicht spielen bei diesem quantitativen Unterschied zwischen den beiden Alkaloiden physikalische Eigenschaften eine Rolle. Schon Babel hat die höhere Fettlöslichkeit des Heroins gegenüber Morphin nachgewiesen. Zum Vergleiche bestimmte ich die Wasserlöslichkeit, und zwar folgendermaßen:

Feines Pulver von Heroinum basicum wurde in einem Zylinder mit destilliertem Wasser übergossen und unter öfterem minutenlangen Schütteln 36 Stunden lang stehen gelassen. Die Lösung wurde dann abfiltriert und 100 ccm davon in einer tarierten Glasschale eingedunstet und bei 102° C getrocknet und gewogen, wobei sich ergeben hat, daß:

100 ccm destilliertes Wasser bei 20° C lösen:	0,0922	Heroin. basicum
100 » » » » 20° » » :	0,0923	» » »

Winterstein(41) erhielt nach der gleichen Bestimmungsmethode folgende Zahlen für die Morphinbase:

100 ccm destilliertes Wasser lösen bei 20° C:	0,0264	Morphin. basicum
100 » » » » » 20° » :	0,0250	» » »
100 » » » » » 18° » :	0,0248	» » »

Diese wesentlich erhöhte Löslichkeit des Heroins gegenüber Morphin in beiden Medien, Wasser und Fett, erklärt uns einerseits,

daß dieses Alkaloid rascher in die Zelle eindringt, somit schneller und intensiver die spezifische Vergiftung hervorruft, als Morphin, andererseits spielen diese physikalischen Verhältnisse wohl auch eine begünstigende Rolle bei der vollständigen Zerstörung des Heroins durch das Protoplasma. Daneben kommt aber für diese letztere noch etwas Weiteres in Betracht. Wir wissen, daß die höheren Individuen, speziell der Mensch, für Kodein und Dionin viel weniger empfindlich sind, als für Morphin und Heroin. An die beiden ersten Stoffe gewöhnt sich der Körper nur sehr schwer. Es scheint somit eine bestimmte Beziehung zu bestehen zwischen der Art der Veresterung einerseits und der Wirkung und Angewöhnung andererseits. Der Alkylverschluß des Phenolhydroxyls ist offenbar ein sehr fester. Es sitzt somit in dieser Gruppe die Ursache für die verminderte Angewöhnung oder Zerstörungsfähigkeit, während bei Heroin die erhöhte Giftwirkung und leichtere Angewöhnung unter gleichzeitiger leichterer Zerstörung sich auch dadurch erklärt, daß im Organismus relativ leicht die beiden Azetylgruppen abgespalten werden, wodurch die beiden Hydroxylgruppen frei und besonders reaktionsfähig werden. Diesen Unterschied zwischen Azetyl und Alkylrest in bezug auf die Abspaltbarkeit im Körper konnte ja kürzlich von Cloetta und Waser(42) in typischer Weise an derselben Substanz, dem Tetrahydro- β -Naphthylamin, nachgewiesen werden. Allerdings handelte es sich dabei um die Substitution eines Wasserstoffs einer NH_2 -Gruppe.

Es wäre noch zu erörtern, was aus dem Morphin und Heroin bei deren Zerstörung im Organismus wird.

Das bekannteste Oxydationsprodukt des Morphins ist das Oxydimorphin, das sich leicht bei alkalischer Reaktion durch atmosphärischen Sauerstoff und jedenfalls bei Gegenwart einer Oxydase bildet. Es ist aber sehr wenig wahrscheinlich, daß die Oxydation des Morphins im tierischen Organismus diesen Weg einschlagen sollte. Zudem würde sich dieses Produkt dem Nachweis mit Fröhdes Reagens nicht entziehen, da dessen Reaktion mit derjenigen des Morphins ja identisch ist. Je nach dem Grade der Oxydation entstehen aber verschiedene Zersetzungsprodukte, die chemisch weniger genau bekannt sind. Bei allen meinen Versuchen, bei denen eine Zerstörung des Morphins durch den Embryo erfolgt war, beobachtete ich eine abweichende Fröhde-Reaktion, die darin bestand, daß das Reagens eine lange Zeit anhaltende Rosafärbung zeigte. Das brachte mich auf den Gedanken, daß es sich dabei um ein Zersetzungsprodukt des Morphins bzw. Heroins handeln kann; denn bei allen

anderen Untersuchungen fand ich diese Reaktion nicht. Leider sind die verwendeten Substanzmengen viel zu gering gewesen, um irgendwelchen Aufschluß über die Natur dieses Abbauproduktes zu erhalten.

Bisweilen fand Marmé in Darmdejektionen und in Extrakten der Lunge und Leber morphinisierten Hunde, wenn dieselben längere Zeit größere, aber nicht tödliche Dosen von Morphin subkutan erhalten hatten, eine Substanz, die mit Fröhdes Reagens nicht violett, sondern rein blau und dann grün wurde. Bei akuter, tödlicher Vergiftung durch Morphin fand er diesen Körper nicht. Er glaubte, daß es sich um Oxydimorphin handle, dessen Reaktion von Polstorff so angegeben wurde. Donath (43) zeigte dann, daß die Fröhde-Reaktion für Morphin und Oxydimorphin die gleiche ist; somit konnte es sich bei der von Marmé beschriebenen Substanz nicht um Oxydimorphin handeln. Ich habe diese blaue Farbe mit Fröhdes Reagens auch zweimal beobachtet: einmal bei einem während des Aufbewahrens schimmelig gewordenen Ei, das natürlich nicht in die Untersuchungen einbezogen wurde, das andere Mal, als ich reines Morphin mit PbS und H₂S-haltigem Wasser etwa 2 Monate lang mazerierte, um zu sehen, ob bei einer eventuell kolloidalen Lösung des PbS dieses einen Einfluß auf das Morphin haben könnte. Im letzteren Falle handelt es sich sicher, im ersteren sehr wahrscheinlich um Reduktionsprozesse; denn wir kennen eine Reihe solcher Vorgänge, die durch Pilze an anorganischen und organischen Substanzen ausgelöst werden können (44). Vielleicht handelt es sich bei den Befunden von Marmé um ähnliche Vorgänge.

Zusammenfassung.

In befruchtete und bebrütete Hühnereier lassen sich Lösungen von Morphin, Heroin und Kodein einspritzen, ohne daß notwendig dadurch die Entwicklung des Embryo gehindert wird, wenn die Dosis von etwa 2 cg nicht überschritten wird.

Die nach einer besonders minutiösen Technik ausgeführten Alkaloidbestimmungen solcher eingespritzter Eier ergibt folgendes:

Ist der Embryo völlig entwickelt, so ist Heroin immer völlig zerstört, Morphin zwischen 50—100%, Kodein bleibt quantitativ erhalten. Vermehrte O₂-Zufuhr während der Bebrütung bringt auch eine völlige Zerstörung des Morphins.

Ist die Entwicklung nur etwa bis zur Hälfte gelangt und dann der Tod eingetreten, so finden sich sämtliche Alkaloide quantitativ wieder. Daraus folgt, daß es einer gewissen morphologi-

sehen Entwicklungsstufe bedarf, um die beiden Alkaloide zu zerstören.

Der eingespritzte Embryo ist als ein chronisch vergiftetes Individuum zu betrachten. In Analogie mit schon vorhandenen Tatsachen bei chronischer Vergiftung erwachsener Tiere tritt auch hier nur die Zerstörung bei Morphin und Heroin auf, Kodein bleibt unbeeinflusst.

Die Versuche mit vermehrter und verminderter Sauerstoffzufuhr während der Bebrütung, sowie die anderen Ergebnisse sprechen dafür, daß die beschriebene Zerstörung der Alkaloide durch den völlig entwickelten Embryo auf oxydativem Wege erfolgt.

Die Ursache, warum Morphin und Heroin zur Angewöhnung führen, und dabei zerstört werden, Codein und Dionin dagegen nicht, liegt in der Art der Veresterung des Phenolhydroxyls. Daß Heroin am leichtesten zerstört wird, hängt, abgesehen von der größeren Löslichkeit in Wasser und Öl, offenbar damit zusammen, daß die beiden Azetylgruppen im Körper leicht abgespalten werden.

Literatur.

1. Orfila, zitiert bei Tauber. — 2. Marmé, Deutsche mediz. Wochenschrift Bd. 14, 1883. — 3. Tauber, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 27, 1890, S. 336. — 4. Kaufmann-Asser, Biochemische Zeitschr. Bd. 54, S. 161. — 5. Faust, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 44, 1900, S. 217. — 6. M. Cloetta, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 50, 1903, S. 451. — 7. B. Frenkel, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 63, 1910, S. 331. — 8. Ch. Féré, Comptes rendus hebdomadaires des Séances et mémoires de la Société de Biologie, Paris 1894, S. 221. — 9. Derselbe, a. a. O., Paris 1896, S. 239. — 10. Derselbe, a. a. O., Paris 1894, S. 282. — 11. Derselbe, a. a. O., Paris 1895, S. 677. — 12. Derselbe, a. a. O., Paris 1895, S. 271. — 13. Derselbe, a. a. O., Paris 1896, S. 343. — 14. Derselbe, a. a. O., Paris 1899, S. 806. — 15. Jan Tur, a. a. O., Paris 1904, S. 236. — 16. Féré, a. a. O., Paris 1894, S. 346. — 17. Derselbe, a. a. O., Paris 1894, S. 429. — 18. Derselbe, a. a. O., Paris 1894, S. 369. — 19. Derselbe, a. a. O., Paris 1894, S. 490. — 20. Derselbe, a. a. O., Paris 1895, Bd. 47, S. 11. — 21. Derselbe, a. a. O., Paris 1897, S. 512. — 22. Derselbe, a. a. O., Paris 1897, S. 597. — 23. Derselbe, a. a. O., Paris 1897, S. 856. — 24. Derselbe, a. a. O., Paris 1900, S. 471. — 25. Derselbe, a. a. O., Paris 1898, S. 499. — 26. Derselbe, a. a. O., Paris 1898, S. 611. — 27. Derselbe, a. a. O., Paris 1900, S. 681. — 28. Derselbe, a. a. O., Paris 1901, S. 755. — 29. Derselbe, a. a. O., Paris 1899, S. 454. — 30. Derselbe, a. a. O., Paris 1899, S. 713. — 31. Jacques Loeb, Die chemische Entwicklungsirregung des tierischen Eies (Berlin, J. Springer 1909). — 32. O. Warburg, Zeitschrift für physiologische Chemie 1908. — 33. W. Ostwald, zitiert bei Loeb. — 34. Burian, Ergebnisse der Physiologie, 5. Jahrgang, 1906, zit. bei Loeb. — 35. R. H. Aders Plimmer und F. H. Scott, The Journal of Physiology, edited by Langley, Vol. 38, 1909, S. 247. — 36. Cl. Bohr und K. A. Hasselbach,

Skandinavisches Archiv für Physiologie Bd. 10, S. 149 und 353. — 37. Heinr. H. Escher, Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. 83, 1913, S. 211. — 38. Bouma, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 50, Jahrgang 1909, S. 353. — 39. Paul Mitrophanow, Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen Bd. 6, 1898. — 40. Babel, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 52, 1905, S. 262. — 41. Winterstein, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 62, S. 140. — 42. M. Cloetta und E. Waser, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 73, 1913, S. 398. — 43. Donath, Pflügers Archiv Bd. 38, 1886, S. 528. — 44. Vgl. Grundriß der Bakteriologie von Lehmann und Neumann, S. 78—81; Autenrieth, Auffindung der Gifte, S. 209.

ABRISS DES LEBENS- UND BILDUNGSGANGES.

Ich MAX GRÜTER wurde am 3. Dezember 1886 in Luzern geboren und besuchte dasselbst von 1893—1899 die Primarschule. Das Gymnasium absolvierte ich teils in Luzern, teils in Feldkirch. Nach Ablegung der Maturitätsprüfung in Luzern im Sommer 1907 begann ich im Herbste des gleichen Jahres das pharmaceutische Praktikum bei Herrn Apotheker J. FORSTER in Luzern, das bis Oktober 1909 dauerte und durch das Gehilfenexamen in Basel abgeschlossen wurde. Das darauffolgende Konditionsjahr brachte ich als Assistent in den Pharmacies internationales A. G. St. Moritz-Engadin zu.

Im ersten Studiensemester 1910/11 war ich an der Universität Berlin immatrikuliert, wo ich Vorlesungen bei den Herren Prof. Dr. DIELS, Prof. Dr. FRANZ FISCHER, Prof. Dr. VAN'T HOFF, Priv.-Dozent Dr. HOLTERMANN, Prof. Dr. KIRCHNER, Prof. Dr. LIEBISCH, Prof. Dr. MARKWALD, Prof. Dr. NERNST, Prof. Dr. ROST und Prof. Dr. RUBENS besuchte. In den drei folgenden Semestern hörte ich an der eidgenössischen techn. Hochschule in Zürich Vorlesungen bei den Herren Prof. Dr. HARTWICH, Prof. Dr. JACCARD, Prof. Dr. KELLER, Prof. Dr. ROTH, Prof. Dr. SCHRÖTER, Prof. Dr. TREADWELL, Prof. Dr. WEISS und Prof. Dr. WILLSTÄTTER.

Im November 1912 bestand ich in Zürich das pharmaceutische Staatsexamen.

Nach einem zweimonatlichen Aufenthalt in Paris begann ich Mitte März 1913 im pharmakologischen Institut der Universität Zürich die Promotionsarbeit, die mich bis Ende Juni 1914 beschäftigte.

Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig.
