

DET KONGELIGE
DANSKE
VIDENSKABERNES
SELSKAB
KØBENHAVN.

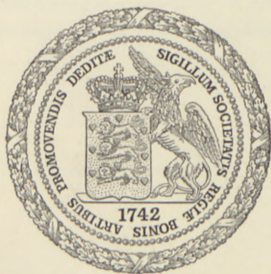
BIOLOGISKE

MEDDELELSER

UDGIVET AF

DET KGL. DANSKE VIDENSKABERNES SELSKAB

BIND XVI



KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

INDHOLD

	Side
1. HEVESY, G. and HAHN, L.: Exchange of Cellular Potassium. 1941	1—27
2. HARTMANN, GRETHE: On the Content of Group Antigen in Human Saliva. 1941	1—33
3. BØRGESEN, F.: Some Marine Algae from Mauritius. II. Phaeophyceae. 1941	1—81
4. NIELSEN, E. STEEMANN: Über das Verhältnis zwischen Verwandtschaft und Verbreitung von Organismen in Beziehung zu ökologischen Studien auf Grundlage der Verbreitung. 1941	1—25
5. ESMARCH, OLE: Studien über die krebserzeugende Wirkung des Methylcholanthrens auf Mäuse. 1941	1—90
6. SCHMIDT-NIELSEN, KNUT: Aktiv ionoptagelse hos flodkrebs og strandkrabbe. Med påvisning av ionoptagende celler. 1941	1—60
7. DAM, H., GLAVIND, J., PRANGE, INGE and OTTESEN, J.: Some Studies on Vitamin E. 1941	1—39
8. HEVESY, G., HAHN, L. and REBBE, O.: Circulation of Phosphorus in the Frog. With a Note on the Circulation of Potassium. 1941	1—33
9. JENSEN, AD. S.: On the Subspecies and Races of the Lesser Sand Eel (<i>Ammodytes Lancea</i> S. Lat.). A Contribution to the Discussion of the Species Problem in Fishes. 1941	1—33

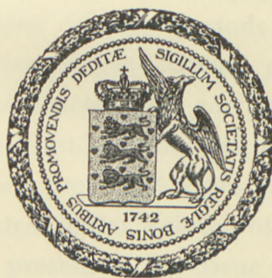
Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser. **XVI**, 1.

EXCHANGE OF CELLULAR POTASSIUM

BY

G. HEVESY AND L. HAHN



KØBENHAVN

EJNAR MUNKSGAARD

1941

Det kgl. Danske Videnskabsnes Selskab

Historiske Meddelelse XVI. 1.

EXCHANGE
OF CELLULAR POTASSIUM

G. HEVESTY and L. HAHN



Printed in Denmark.
Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.

Large amounts of potassium are present in the muscle cells and the cells of many other organs. Rabbit muscles contain about 430 mgm. per cent potassium and similar values are found for the muscles of other mammals. Out of the 430 mgm. per cent potassium of the muscle, about 428 mgm. are to be found in the cells and only 2 mgm. are present in the interspaces. The plasma and the extracellular fluid of the rabbit, on the other hand, contain but about 18 mgm. per cent potassium and similar values are found for the plasma of most of the other mammals. In order to investigate whether an exchange takes place between the cellular and the extracellular potassium ions we administered labelled potassium to rabbits and compared the distribution of the ^{42}K ions between plasma potassium and tissue potassium after varying periods of time. Such an exchange would obviously necessitate a passage through the cell wall. The measurements were carried out by comparing the radioactivity of 1 gm. plasma and 1 gm. muscle tissue. If the ^{42}K ions were prevented from penetrating into the muscle cells the extracellular volume of the muscle would contain all the ^{42}K present in the tissue and, assuming this volume to represent 11 per cent of the muscle weight, 1 gm. muscle would only be $\frac{1}{9}$ as active as 1 gm. plasma. On the other hand, if the ^{42}K ions penetrate rapidly into the muscle cells a proportional partition of ^{42}K between the

potassium of the plasma and the potassium of the muscle would soon take place and we should find 1 gm. muscle to be $\frac{428}{18} = 24$ times as active as 1 gm. plasma.

In previous experiments¹, we found shortly after the administration of ⁴²K the muscle tissue to become much more active than would be expected in case of an impermeability of the cell wall to potassium and, furthermore, the rapid initial influx of some ⁴²K into the muscle cells to be followed by a slow increase only in the later phases of the experiment. Because of the availability of stronger active potassium preparations than previously, we were able to extend the duration of our experiments over several days and to carry out a more detailed study of the rate of penetration of potassium into the tissue cells. The results of these experiments are communicated in the following.

Determination of the exchangeability of cellular potassium.

The partition of ⁴²K between the plasma and the muscle cells can be determined by comparing the activity of 1 gm. plasma with that of 1 gm. muscle. There is, however, also another way of approach which does not involve the investigation of the activity of the muscle tissue. This second method of determination of the extent of cellular exchange is based upon the measurement of loss of ⁴²K from the circulating blood. This loss is mainly due to the penetration of ⁴²K into the tissue cells and, therefore, it is possible to

¹ L. HAHN, G. HEVESY and O. REBBE, *Biochem. J.* **33**, 1540 (1939).
Comp. also M. JOSEPH, E. COHN and D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.* **128**, 673 (1939).

calculate from the decrease of the ^{42}K content of the plasma the extent of ^{42}K penetration into the cells. If the potassium content of plasma and cells is known, we can calculate the percentage replacement of cellular potassium by plasma potassium which takes place in the course of the experiment. In carrying out this calculation due regard must be taken to the potassium content of the plasma as well as to that of the extracellular fluid, since we are faced with the problem of distribution of ^{42}K between cellular and extracellular potassium. The partition of ^{42}K between the plasma and most of the extracellular space was found to be a very fast process¹.

Assuming the extracellular space of the rabbit to amount to 27 per cent of the body weight and the potassium content of the extracellular fluid to be 18 mgm. per cent, the potassium content of the total extracellular space of a rabbit weighing 2.5 kg. is 122 mgm. Taking the muscles to be 40 per cent of the body weight and the muscle tissue to contain 430 mgm. per cent potassium, we arrive at a figure of 4300 mgm. for the total potassium content of the rabbit muscles. This figure refers almost exclusively to cellular potassium, the extracellular potassium present in the muscles making out about 20 mgm. The ^{42}K introduced into the circulation will penetrate besides into the muscle cells also into the cells of other organs. In addition to the 4.3 gm. potassium present in the muscles, about 1.7 gm. potassium are found in the other organs of a rabbit weighing 2.5 kg. The ^{42}K disappearing from the extracellular space will, apart from a small quantity which is excreted, find its way into the red corpuscles and tissue cells containing in all about 6 gm. potassium.

¹ L. HAHN and G. HEVESY, *Acta Physiol. Scand.* 1, in print.

Let us consider an example of the calculation of the extent of cellular potassium replacement from the decrease of the ^{42}K content of the plasma. After the lapse of 210 min., 1 cc. of the plasma of a rabbit weighing 2.4 kg. was found to contain 0.0269 per cent of the ^{42}K administered. From this figure it follows that the total extracellular fluid of the rabbit contains 17.5 per cent of the ^{42}K administered. The amount of ^{42}K excreted was found to be 1.66 per cent. The amount of ^{42}K present in the extracellular space plus that excreted in the course of 210 min. being 19.2 per cent, the amount present in the tissue cells will be 80.8 per cent. The cells contain, thus, 4.2 times more ^{42}K than the total extracellular space of the rabbit.

We shall now calculate the ratio which would be found in case of a proportional partition of ^{42}K between cellular and extracellular potassium. As such we shall take the ratio of the total potassium content of the cells to that of the extracellular fluid, i. e. $\frac{6000}{122} = 49$. We arrive thus at the result that in the course of 210 min. $\frac{1}{12}$ part of the cellular potassium was replaced by extracellular potassium.

Experimental method.

We are much indebted to Dr. J. C. JACOBSEN and Mr. O. N. LASSEN for preparing radio-potassium by bombarding about 200 mgm. potassium chloride with a deuterium beam in the Copenhagen cyclotron. Along the path of the beam the salt becomes intensely coloured; only the strongly coloured part of the salt was used in our experiments. Under the action of the deuterium beam on potassium chloride in addition to ^{42}K also ^{38}Cl is produced. The

activity of the radio-chloride has, however, entirely decayed at the time when the activity of the tissue samples is measured. We administered to rabbits radio-potassium having a β -activity of about 1/500 mgm. radium. The tissue samples were treated with concentrated nitric acid and ashed below 350°. Ash samples having the same weight (100 mgm.) were used in the activity measurements. The activity of the "natural" potassium present in the tissue samples was determined after the decay of their ^{42}K content. The correction due to the "natural" activity of the potassium was always less and, most frequently, much less than 10 per cent of the total activity measured.

Determination of potassium.

We determined the potassium content of the plasma and tissue samples by the method of SHOHL and BENNET¹ modified by NORBERG². The main steps involved in this determination are the following: a) Ashing of the sample in the presence of barium hydroxide, b) removal of the barium excess by adding ammonium carbonate, c) driving-off of the ammonium salts, d) precipitation of the potassium as potassium chloroplatinate, e) washing of the precipitate with alcohol and dissolving it in a buffer solution, f) addition of potassium iodide and titration of the iodoplatinate formed with thiosulphate. We controlled the results of our analyses by using a radioactive indicator. A trace of ^{42}K of known activity was added to the sample to be analyzed and it was investigated whether, after one of the above procedures, the ^{42}K was quantitatively recovered or not.

¹ A. T. SHOHL and H. B. BENNET, *J. Biol. Chem.* **78**, 643 (1928).

² B. NORBERG, *Comptes Rendus Travaux Carlsberg*, **21**, 233 (1938).

We found that the washing of the dry potassium chloroplatinate precipitate with alcohol cannot be carried out without a quite appreciable loss of ^{42}K . The alcohol centrifuged off contained 4 per cent of the 0.2 mgm. potassium present in the precipitate when using the alcohol volume suggested by NORBERG.

Determination of the extent of cellular exchange by following the decrease of the ^{42}K content of the plasma.

We shall now consider an example in which the first plasma volume is obtained from the carotis of the rabbit as early as 0.6 min. after the injection of 15.7 mgm. labelled potassium as potassium chloride into the jugularis. The injection took 2 sec. As seen in Table 1, 0.6 min. does not suffice to obtain a proportional partition of ^{42}K between plasma and extracellular fluid. In case of a proportional partition, 1 cc. plasma would contain 0.149 per cent or less of the ^{42}K injected; in fact, 1 cc. plasma contains 0.19 per cent of the ^{42}K injected. After the lapse of 2 min., we find in 1 cc. plasma only 0.082 per cent of the ^{42}K injected; thus, we have to conclude that an appreciable part of the ^{42}K administered is present in the cells after the lapse of 2 min. We cannot decide whether at that time a proportional partition of ^{42}K between plasma and extracellular fluid is obtained since it is conceivable that before this proportional partition an intrusion of quite appreciable amounts of ^{42}K into the cells had taken place. The amount of ^{42}K present in the cells after 2 min. can, therefore, not be calculated. It can be stated, however, that the amount of ^{42}K present in the cells must be about as large as or larger than that

Table 1.

Rate of disappearance of ^{42}K after intravenous injection from the plasma of a rabbit weighing 2.5 kg. (Rabbit A).

Time in minutes	Per cent of ^{42}K injected present in		Volume of diluting fluid	
	1 gm. plasma	total plasma	in cc.	in per cent of body weight
0 (extrapol.)	1.4	100	—	—
0.6	0.19	13.2	526	21
2	0.082	5.7	1220	49
3	0.068	4.7	1470	59
5	0.058	4.0	1720	69
15	0.035	2.4	2860	115
120	0.0206	1.4	4850	194
∞ (assumed extracellular intrusion, only)	0.149	10.4	674	27
∞ (assumed proportional partition between extracellular potassium and cellular potassium)	0.0029	0.20	33000	1320

present in the interspaces. To dilute the ^{42}K introduced into the circulation to this low level, 1220 cc. of body fluid had to take part in the dilution process. The volume of diluting fluid thus calculated for different times is shown in the fourth column of Tables 1—3, while in column 5 the volume of the diluting fluid is stated, expressed in percentage of the body weight. While, after the lapse of 2 hours, the volume of the diluting fluid is found to be seven times larger than that of the extracellular fluid, showing a very appreciable intrusion of ^{42}K into the cells, it is still only $\frac{1}{7}$ of that which would be expected in case of a proportional partition of ^{42}K between extracellular and cellular potassium.

Table 2.

Rate of disappearance of ^{42}K after intravenous injection from the plasma of a rabbit weighing 2.3 kg. (Rabbit B).

Time in minutes	Per cent of ^{42}K injected present in		Volume of diluting fluid	
	1 gm. plasma	total plasma	in cc.	in per cent of body weight
0 (extrapol.)	1.6	100	—	—
0.26	0.354	22.7	283	12.3
0.50	0.220	14.1	455	19.8
1.05	0.129	8.3	775	33.7
3.05	0.057	3.65	1755	76.4
7.55	0.029	1.85	3450	150
∞ (assumed extracellular intrusion, only)	0.161	10.3	620	27
∞ (assumed porportional partition between extracellular potassium and cellular potassium).....	0.0033	0.21	30500	1320

The figures of Table 3 show a similar trend to those of Table 1, but after the lapse of 210 min. 1 gm. plasma still contains 0.0269 per cent of the ^{42}K injected while, in the first mentioned case, after the lapse of 120 min. only 0.0206 per cent of ^{42}K was present. The cellular uptake in the case of rabbit C was, thus, less than that in the case of rabbit A and also less than in the case of rabbit B. These differences in the cellular uptake cannot be due to analytical errors since the results of duplicate analyses have shown only small variations. To some extent at least they may be explained by a difference in the size of the extracellular space of the rabbits. We assumed the extracellular volume to be 27 per cent of the body weight. This is the average value found for rabbits. The deviation from this average

Table 3.

Rate of disappearance of ^{42}K after intravenous injection from the plasma of a rabbit weighing 2.4 kg. (Rabbit C).

Time in minutes	Per cent of ^{42}K injected present in		Volume of diluting fluid	
	1 gm. plasma	total plasma	in cc.	in per cent of body weight
0 (extrapol.)	1.5	100	—	—
5	0.058	3.9	1730	72
10.5	0.048	3.2	2080	87
20.5	0.038	2.5	2640	110
40.5	0.031	2.1	3230	135
80	0.028	1.9	3580	149
210	0.027	1.8	3710	155
∞ (assumed extracellular intrusion, only)	0.154	10.3	650	27
∞ (assumed proportional partition between extracellular potassium and cellular potassium)	0.0032	0.21	31500	1320

^{42}K content of urine produced between 0 and 80 min. 1.18 per cent.

^{42}K content of urine produced between 81 and 210 min. 0.48 per cent.

value is quite marked, as found by several experimenters. In another paper, the results of experiments on the exchange of cellular potassium in animals kept in intense motion are described¹. Such animals were found to exchange their cellular potassium at an enhanced rate. It is quite possible that several of the rabbits experimented with performed some muscular work which influenced the rate of ^{42}K exchange between the extracellular and the cellular space.

In Tables 4—7 the results of experiments of longer duration are shown.

¹ L. HAHN and G. HEVESY, *Acta Physiol. Scand.*, in print.

Table 4.

Rate of disappearance of ^{42}K after subcutaneous injection from the plasma of a rabbit weighing 2.5 kg. (Rabbit D).

Time in hours	Per cent of ^{42}K injected, present in				Ratio of ^{42}K content of the tissue cells and the extracellular fluid
	1 gm. plasma	total extra-cellular fluid	total extra-cellular fluid + excreta	tissue cells	
0.4	0.0089	6.0	—	—	—
3.5	0.0101	6.9	8.6	91.4	13.2
18.5	0.0064	4.4	10.6	89.4	20.4
24.5	0.0067	4.5	12.5	87.5	19.5
48	0.0057	3.7	18.1	81.9	22.2
	0.0053				
	0.0058				
	0.0052				
∞ (assumed proportional partition of ^{42}K between extracellular potassium and cellular potassium)	59

Calculation of the extent of cellular potassium exchange from the ratio of the activity of plasma and muscle tissue of the same weight.

If all the potassium present in the cells had opportunity freely to exchange with the extracellular potassium, 1 gm. cellular potassium would show the same activity as 1 gm. extracellular potassium. Since the cells of 1 gm. muscle contain 24 times as much potassium as 1 gm. plasma, the activity of 1 gm. muscle will, in this case, be 24 times greater than that of 1 gm. plasma. If, in the course of the experiment, the cellular potassium had opportunity only partly to exchange with the extracellular potassium, 1 gm.

Table 5.

Rate of disappearance of ^{42}K after subcutaneous injection from the plasma of a rabbit weighing 2.4 kg. (Rabbit E).

Time in hours	Per cent of ^{42}K injected, present in				Ratio of ^{42}K content of the tissue cells and the extracellular fluid
	1 gm. plasma	total extra-cellular fluid	total extra-cellular fluid + excreta	tissue cells	
1.8	0.0159	10.4	11.7	88.3	8.5
17.3	0.0106	6.9	12.9	87.1	12.6
24	0.0091	5.9	13.8	86.2	14.6
41.5	0.0080	5.2	17.6	82.4	15.8
49	0.0105	6.8	21.2	78.8	11.6
64	0.0079	5.1	24.5	75.5	14.8
∞ (assumed proportional partition of ^{42}K between extracellular potassium and cellular potassium)	43

muscle would be less than 24 times as active as 1 gm. plasma. If the ratio of the activity of the cells of 1 gm. muscle and of 1 gm. plasma is equal to R , then $\frac{R}{24}$ will measure the extent of exchangeability of the cellular potassium.

The figures given in the 4th column of Table 8 were obtained by comparing the activity of the muscle sample and that of the plasma sample secured at the same time. The ^{42}K content of the muscle sample accumulated continuously in the course of the experiment from plasma the ^{42}K content of which varied. To arrive at a correct measure of the percentage exchange of the muscle potassium we should, therefore, not compare the activity of the muscle sample and the plasma sample secured at the end of the experiment,

Table 6.

Rate of disappearance of ^{42}K after subcutaneous injection from the plasma of a rabbit weighing 2.7 kg. (Rabbit F).

Time in hours	Per cent of ^{42}K injected, present in				Ratio of ^{42}K content of the tissue cells and the extracellular fluid
	1 gm. plasma	total extra-cellular fluid	total extra-cellular fluid + excreta	tissue cells	
16.5	0.0091	6.65	12.2	87.9	13.2
24	0.0091	6.65	14.6	85.5	12.9
26	0.0089	6.50	14.9	85.1	13.1
48	0.00763	5.58	20	80	14.3
	0.00765				
∞ (assumed proportional partition of ^{42}K between extracellular potassium and cellular potassium)	53

Table 7.

Rate of disappearance of ^{42}K after intravenous injection from the plasma of a rabbit weighing 2.1 kg. (Rabbit G).

Time in hours	Per cent of ^{42}K injected, present in				Ratio of ^{42}K content of the tissue cells and the extracellular fluid
	1 gm. plasma	total extra-cellular fluid	total extra-cellular fluid + excreta	tissue cells	
4.6	0.0194	11	13	87	7.9
16.7	0.0081	4.6	10.3	89.7	19.5
24.7	0.0067	3.8	11.8	88.2	23.2
40.7	0.0068	3.8	15.8	84.2	22.2
∞ (assumed proportional partition of ^{42}K between extracellular potassium and cellular potassium)	44

as done in column 4 of Table 8, but we should compare the activity of 1 gm. muscle tissue with that of the average activity of 1 gm. plasma during the experiment. Furthermore, due regard must be taken to the fact that more ^{42}K penetrates into the muscle in the early phases of the experiment than in corresponding later intervals. The figures contained in the last column of Table 8 represent, therefore, the upper limit of exchangeability of the cellular potassium. In experiments taking several hours or more, the activity of the plasma does not much decrease with time and the figures given in column 5, so far as they relate to experiments taking several hours, only slightly overrate the exchangeability of the cellular potassium. The figures in the column "Percentage exchange of cellular potassium" are obtained by dividing the figures quoted in the column "Ratio of ^{42}K content of the cells of 1 gm. muscle and 1 gm. plasma" with the ratio of the potassium content of the cells of 1 gm. muscle and the potassium content of 1 gm. plasma.

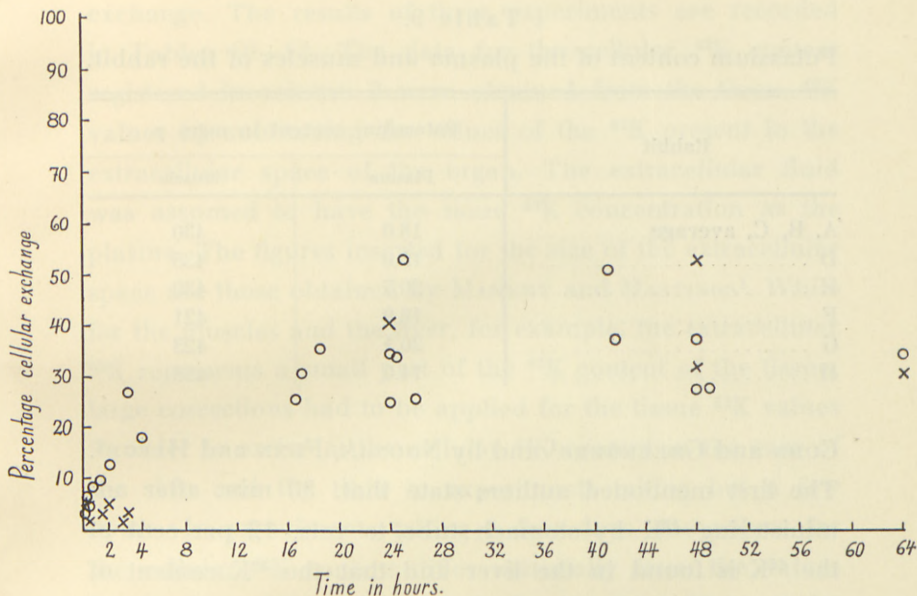
The result of the potassium determinations carried out according to the method of SHOHL and BENNET (comp. p. 7) can be seen in Table 9.

The percentage of cellular potassium which takes part in the exchange process found by both methods is plotted in the figure, where the open circles represent the values obtained by the "disappearance" method described on p. 8 and the crosses indicate the figures calculated from the activity values obtained for plasma and muscle tissue. The experiments lasted from a few minutes up to 64 hours. It is clearly seen that within a few minutes a quite appreciable part of the cellular potassium exchanges with plasma potassium, the amount doing so first increases markedly with increasing time but, after the lapse of a day, the per-

Table 8.
Distribution of ^{42}K between plasma and gastrocnemius
of the rabbit.

Time	Per cent of ^{42}K ad- ministered, present in 1 gm. muscle	Ratio of ^{42}K content of muscle and plasma of equal weight	Ratio of ^{42}K content of the cells of 1 gm. muscle and 1gm. plasma	Percentage exchange of cellular potassium
Rabbit A.				
5 min.	0.027	0.46	0.35	1.46
120 min.	0.026	1.28	1.17	4.85
Rabbit B.				
1.05 min.	0.023	0.177	0.067	0.21
3.05 min.	0.031	0.549	0.44	1.41
Rabbit C.				
10.5 min.	0.0184	0.38	0.27	1.13
20.5 min.	0.0181	0.48	0.37	1.54
40.5 min.	0.0178	0.52	0.41	1.71
210 min.	0.0265	0.99	0.88	3.67
Rabbit D.				
48 hours.	0.0498	9.09	8.98	31.0
Rabbit E.				
64 hours.	0.0488	6.18	6.07	29.2
Rabbit F.				
24 hours.	{ 0.0765	} 8.49	} 8.38	} 39.8
	0.0673			
48 hours.	{ 0.0840	} 11.0	} 10.9	} 51.9
	0.0840			
Rabbit H.				
3.5 hours.	0.0158	0.86	0.75	3.1

centage of cellular potassium taking part in the exchange process increases only slightly. At the stage when no significant further increase takes place, more than half of the cellular potassium has not participated in an exchange process.



Percentage of the potassium content of the muscle cells which got into exchange equilibrium with the potassium present in the extracellular fluid. ○ represent the values obtained by the "disappearance" method, while × indicate the figures calculated from the activity values obtained from plasma and muscle tissue.

The values obtained for the percentage cellular exchange by the indirect "disappearance" method and by a direct comparison of the activity of plasma and muscle tissue show no great difference in experiments taking several hours. In experiments of short duration, the "disappearance" method supplies much larger exchange values. This discrepancy suggests the assumption that, in the early phases of the experiment, one or several organs take up as large or larger amounts of ^{42}K than are taken up by the muscles. That the liver takes up large amounts of ^{42}K in the earliest phases of the experiment was found by JOSEPH,

Table 9.

Potassium content of the plasma and muscles of the rabbit.

Rabbit	Potassium content in mgm. p. c.	
	Plasma	Muscle
A, B, C, average.....	18.0	430
D	15.0	435
E	20.7	430
F	16.9	421
G	20.1	423
H	14.0	438

COHN and GREENBERG¹ and by NOONAN, FENN and HAEGE². The first mentioned authors state that, 30 min. after administering ⁴²K by stomach tube to rats, 12 per cent of the ⁴²K is found in the liver and that the ⁴²K content of the liver diminishes in the course of the next 210 min. to 4 per cent of the amount administered. The last mentioned authors found as much as 30 per cent of the ⁴²K administered in the liver 30 min. after administration of the labelled potassium.

Exchange of cellular potassium of different organs.

In some cases, we investigated not only the uptake of ⁴²K by the muscles but also its uptake by other organs. From the data obtained and from the known potassium content of the organs we calculated the extent of potassium

¹ M. JOSEPH, W. E. COHN and D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.* **128**, 673 (1939).

² T. R. NOONAN, W. O. FENN and L. F. HAEGE, *Amer. J. Physiol.* **129**, 432 (1940).

exchange. The results of these experiments are recorded in Tables 10—13. The data for the cellular ^{42}K content registered in column 3 were obtained from the tissue ^{42}K values by subtracting the values of the ^{42}K present in the extracellular space of the organ. The extracellular fluid was assumed to have the same ^{42}K concentration as the plasma. The figures inserted for the size of the extracellular space are those obtained by MANERY and HASTINGS¹. While for the muscles and the liver, for example, the extracellular ^{42}K represents a small part of the ^{42}K content of the tissue, large corrections had to be applied for the tissue ^{42}K values in order to arrive at the cellular ^{42}K content in the case of the skin and the tibia in experiments taking but a few hours. In experiments taking a few days, the values for the cellular ^{42}K content differ materially from the values for the tissue ^{42}K content only in few cases as, for example, in that of the tendon.

In experiments taking a few hours only, the percentage potassium exchange taking place in the cardiac muscle and the liver was found to be larger than the percentage potassium exchange in the gastrocnemius. In experiments of long duration this was no longer the case². The lowest exchange took place in the brain. The tibia epiphysis and, to a minor extent, the tibia diaphysis contained much more ^{42}K than can be explained by the potassium present in the extracellular fluid of the tibia, which amounts to 26 per cent of the total weight of the tibia. Presumably, some of the ^{42}K ions are incorporated into the surface layer of the bone apatite. This incorporation provides a not negligible

¹ J. F. MANERY and A. B. HASTINGS, *J. Biol. Chem.* **127**, 657 (1939).

² Comp. L. HAHN and G. HEVESY, *Acta Physiol. Scand.* in print, where the problem of the cardiac muscle exchange is discussed.

Table 10.

Exchange of potassium between plasma and different organs
of rabbit C in the course of 210 min.

Labelled potassium administered by intravenous injection.

Organ	⁴² K content per gm. tissue	Cellular ⁴² K content per gm. tissue	Potassium content in mgm. p. c.	Percentage cellular potassium exchange
Plasma	100	—	18	—
Gastrocnemius	99	88	430	3.7
Cardiac muscle	281	250	360	14
Liver	228	206	370	11
Skin	78	20	69	5
Tibia diaphysis	45	19	—	—

additional outlet of ⁴²K from the plasma. Assuming the skeleton to amount to 15 per cent of the rabbit's weight and the non-extracellular ⁴²K of 1 gm. bone tissue to be equal to that of 0.3 cc. extracellular fluid, the ⁴²K of the bone apatite corresponds to 17 per cent of the ⁴²K content of the extracellular space of the rabbit. The diluting volume of the rabbit is, thus, increased from 27 per cent (i. e. the value obtained by the thiocyanate and similar methods) to about 32 per cent of the total weight of the rabbit.

As described on p. 17, the larger part of the potassium present in the muscle cells does not participate in an exchange process and is not, or only at a very slow rate, replaced by plasma (extracellular) potassium. As seen in Tables 10—13, the other organs investigated show a similar behaviour, this fact suggesting that we are faced with a fundamental property of the cellular potassium of all or several organs.

Table 11.

Exchange of potassium between plasma and different organs
of rabbit H in the course of 210 min.

Labelled potassium administered by subcutaneous injection.

Organ	⁴² K content per gm. tissue	Cellular ⁴² K content per gm. tissue	Potassium content in mgm. p. c.	Percentage cellular potassium exchange
Plasma	100	—	14	—
Gastrocnemius	86	75	438	2.4
Cardiac muscle	346	315	360	12
Liver	356	334	370	13
Skin	96	38 ¹	69	8
Brain, grey . . .	48	13
Brain, white . .	27	— 8 ²
Tibia diaphysis	54	28
Tibia epiphysis	99	73

¹ In view of the very large extracellular space and low potassium content of the skin, the value stated is uncertain.

² The minus value indicates that a proportional partition of ⁴²K between the plasma and the extracellular fluid of the white brain tissue was not obtained in the course of 210 min.

Table 12.

Exchange of potassium between plasma and different organs
of rabbit D in the course of 48 hours.

Labelled potassium administered by subcutaneous injection.

Organ	⁴² K content per gm. tissue	Cellular ⁴² K content per gm. tissue	Potassium content in mgm. p. c.	Percentage cellular potassium exchange
Plasma	100	100	15	—
Gastrocnemius	909	898	435	31
Cardiac muscle	641	610	360	26
Liver	783	761	370	31
Brain	429	394	400	15

Table 13.

Exchange of potassium between plasma and different organs
of rabbit E in the course of 64 hours.

Labelled potassium administered by subcutaneous injection.

Organ	⁴² K content per gm. tissue	Cellular ⁴² K content per gm. tissue	Potassium content in mgm. p. c.	Percentage cellular potassium exchange
Plasma	100	—	20.7	—
Gastrocnemius	618	607	430	29.3
Cardiac muscle	486	455	360	26
Tendon	113	52	38	28
Liver	608	586	370	33
Brain	357	322	400	17

Exchange of the potassium content of the red corpuscles.

The red corpuscles of the rabbit contain about 400 mgm. per cent of potassium, thus about 20 times as much as plasma of the same weight. In our previous experiments, we found that some potassium exchange does take place between the corpuscles and the plasma. A more detailed investigation shows that, in experiments lasting a few days, an appreciable part of the corpuscle potassium of the rabbit, thus a much larger part than found by us previously, is replaced by plasma potassium, though the amount replaced was found in all cases investigated to be less than a third of the potassium present in the corpuscles. The results obtained are shown in Tables 14—18.

In a further experiment, in which ⁴²K was administered by subcutaneous injection to a rabbit, 64 hours later 1 gm. corpuscles was found to contain 5.95 times as much ⁴²K as 1 gm. plasma.

Table 14.

Distribution of ^{42}K administered by subcutaneous injection between the plasma and the red corpuscles of rabbit J.

Time	Per cent of ^{42}K administered, present in 1 gm. corpuscles	Ratio of the ^{42}K content of corpuscle and plasma of equal weight	Percentage replacement of corpuscle potassium
20 min.	0.0041	0.16	0.7
50 —	0.0080	0.29	1.2
102 —	0.011	0.39	1.6
214 —	0.014	0.49	2.0
390 —	0.017	0.68	2.8
∞	24	..

Table 15.

Distribution of ^{42}K administered by intravenous injection between the plasma and the red corpuscles of rabbit C.

Time	Per cent of ^{42}K administered, present in 1 gm. corpuscles	Ratio of the ^{42}K content of corpuscle and plasma of equal weight	Percentage replacement of corpuscle potassium
10.5 min.	0.0077	0.16	0.7
20.5 —	0.0096	0.25	1.1
40.5 —	0.0113	0.37	1.5
80 —	0.0119	0.43	1.8
210 —	0.0160	0.60	2.5
∞	24	..

In all the experiments in which the potassium was administered by intravenous injections, a part of the labelled potassium penetrated into the cells in an early stage of the experiment, when the plasma had a high ^{42}K content. The figures contained in the fourth column of Tables 15 and 16 are therefore not quite a correct measure of the

Table 16.

Distribution of ^{42}K administered by intravenous injection between the plasma and the red corpuscles of rabbit G.

Time	Per cent of ^{42}K administered, present in 1 gm. corpuscles	Ratio of the ^{42}K content of corpuscle and plasma of equal weight	Percentage replacement of corpuscle potassium
16.7 hours ...	0.0271	3.36	16
24.7 — ...	0.0270	4.04	19
40.7 — ...	0.0276	4.04	19
∞	21	..

Table 17.

Distribution of ^{42}K administered by subcutaneous injection between the plasma and the red corpuscles of rabbit D.

Time	Per cent of ^{42}K administered, present in 1 gm. corpuscles	Ratio of the ^{42}K content of corpuscle and plasma of equal weight	Percentage replacement of corpuscle potassium
18.5 hours ...	0.0240	3.75	14
39 — ...	0.0307	4.06	15
48 — ...	0.0359	6.55	24
∞	27	..

Table 18.

Distribution of ^{42}K administered by subcutaneous injection between the plasma and the red corpuscles of rabbit F.

Time	Per cent of ^{42}K administered, present in 1 gm. corpuscles	Ratio of the ^{42}K content of corpuscle and plasma of equal weight	Percentage replacement of corpuscle potassium
16.5 hours ...	0.0405	4.45	19
26 — ...	0.0496	5.52	23
48 — ...	0.0580	7.60	32
∞	24	..

extent of replacement of the corpuscle potassium. The figures correctly indicating the extent of replacement are somewhat lower than the figures stated (see p. 15). After subcutaneous injection, the plasma activity increases with time and the potassium exchanged in the earliest phase is but slightly active. The values arrived at by comparing the activity of the plasma and the corpuscles shortly after subcutaneous injection underrates, therefore, the extent of potassium exchange which took place in the corpuscles in the course of the experiment. In experiments taking two days, $\frac{1}{4}$ of the corpuscle potassium was found to be replaced by plasma potassium.

Moreover, ^{42}K ions can get into the corpuscles by incorporation during the formation of the corpuscles. In experiments taking only a few hours, the ^{42}K incorporated during the formation of new corpuscles is insignificant. In the course of 3 hours, for example, about 3 per cent of the corpuscle potassium is found to be replaced by labelled plasma potassium while the labelled potassium incorporated into the corpuscles which were formed during that time amounts to about $\frac{1}{2}$ per cent of the potassium present in the corpuscles. In experiments taking a few days or more, the amount of labelled potassium incorporated into the corpuscles formed during that time is no longer insignificant and may be responsible for as much as half of the ^{42}K found in the corpuscles. We arrive at this result by assuming that somewhat less than 5 per cent of the corpuscles of the rabbit are destroyed and built up daily. If the building-up takes place in an organism containing labelled potassium the corpuscles formed are bound to contain such labelled potassium.

Summary.

Labelled potassium chloride was administered by intravenous or subcutaneous injections to rabbits and the ^{42}K content of plasma, corpuscles, gastrocnemius and other organs was determined at different intervals. The cellular potassium exchange was followed by two different methods.

a) By comparing the ^{42}K content of plasma and gastrocnemius of equal weight it was found that, in the earliest phase of the experiment, significant amounts of cellular potassium are replaced by plasma (extracellular) potassium. The amount of cellular potassium replaced increases at first appreciably with increasing time, but, after the lapse of about a day no perceptible further replacement takes place. In this phase of the experiment, one half or more of the cellular potassium content was not yet replaced.

b) The exchange of potassium between the tissue cells and the plasma (extracellular fluid) was also determined by following the decrease of the labelled potassium content of the plasma after the administration of radioactive potassium ^{42}K to rabbits. The application of this method led also to the result that the cellular potassium exchange ceases almost or completely at a stage when one-half or less of the cellular potassium has interchanged with plasma potassium.

In experiments taking few hours, a larger percentage of the cellular potassium of the liver and the cardiac muscle exchanges with plasma (extracellular) potassium than of the cellular potassium of the gastrocnemius. The lowest exchange is found to take place in the brain tissue.

In experiments taking a few days, the percentage exchange of gastrocnemius, cardiac muscle and liver potass-

ium is about the same. Though half or more of the cellular potassium had not yet exchanged no further potassium replacement of any significance takes place with increasing time.

After the lapse of two days, 1 gm. corpuscle was found to contain in the average six times as much labelled potassium as 1 gm. plasma, which corresponds to a replacement of about $\frac{1}{4}$ of the corpuscle potassium by plasma potassium.

We wish to express our hearty thanks to Professor NIELS BOHR for putting numerous facilities most kindly at our disposal.

Institute of Theoretical Physics, University of Copenhagen.
December 1940.

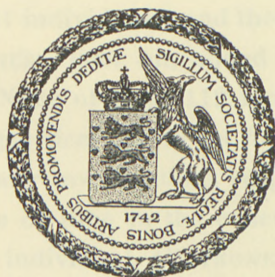
Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser. **XVI**, 2.

ON THE
CONTENT OF GROUP ANTIGEN
IN HUMAN SALIVA

BY

GRETHE HARTMANN



KØBENHAVN
EJNAR MUNKSGAARD

1941

Det Kgl. Danske Videnskabskabes Selskab
Biologiske Meddelelser, XVI, 2

ON THE
CONTENT OF GROUP ANTIGEN
IN HUMAN SALIVA

GRETHE HARTMANN



KØBENHAVN
Printed in Denmark.
Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.

1. Introduction.

It is a wellknown fact that within a group of individuals distinction may be made between the so-called secreters and non-secreters. The former individuals contain, in their various secretions, group antigen according to their respective blood group, the latter have no group antigen in any of their secretions. (PUTKONEN, SCHIFF and SASAKI, LEHRS and others). This phenomenon was thoroughly studied by SCHIFF and collaborators who found that the "secreter non-secreter phenomenon" had a rather simple heredity, the development of group antigens in the secretions depending upon the presence of a single dominant gene. SCHIFF's experimental material comprised 68 families with 215 children, (total, 351 individuals) and the secretion examined was saliva. MORZYCKI, later on, added 44 families, (total, 202 individuals). None of these 112 families exhibited any exceptions to the genetical theory set forth by SCHIFF. Now, both earlier and later investigations suggested great fluctuations in the course of time in the concentration of antigen in saliva from an individual. (PUTKONEN, LEHRS, HOLZER, DAHR, KAUERTZ). The fluctuation would indeed be so large as to render impossible the diagnosis "secreter" or "non-secreter" on the basis of a single sample of saliva. In spite of such difficulties no serious objections could be raised

against SCHIFF's genetical hypothesis. On the other hand, definite limits for the antigen concentrations in the two types would seem most desirable with a view to the application of the phenomenon as an aid in forensic medicine. So the elucidation of this point was chosen as the aim of the present research work. The secretion examined was the same as used by SCHIFF, saliva. The investigations were confined to groups A₁ and B.

2. The Method used for the Determination of the Antigen Concentration.

For the examination of the saliva the agglutination-inhibition method was employed in the following form: Two series of small test tubes were used in the determination of the antigen content of each sample. Into the first tube of each series 0.1 cc of the original antigen solution was introduced, (concentration 1), into the second 0.1 cc of a concentration $\frac{1}{2}$, into the third 0.1 cc of a concentration $\frac{1}{4} = \frac{1}{2^2}$, into the fourth 0.1 cc of a concentration $\frac{1}{8} = \frac{1}{2^3}$, etc. Thus into tube no. n 0.1 cc of an antigen solution of concentration $\frac{1}{2^{n-1}}$ was inserted. Hereafter 0.1 cc of a serum anti-A was introduced into all the tubes of one of the two series, while 0.1 cc of a serum anti-B was added to the contents of all the tubes of the other series. Thus, after this operation, the antigen concentrations in the tubes of each of the two series were $\frac{1}{2^1}, \frac{1}{2^2}, \frac{1}{2^3}, \dots, \frac{1}{2^n}$. In the following experiments the same isosera (anti-A = Ulla $\frac{1}{14}$ — $\frac{1}{16}$, anti-B = Claus $\frac{1}{16}$) were employed throughout all the investigations. These two sera proved rather constant as to

strength. After the introduction of serum the test tubes were kept at about 20° C. for an hour when washed blood corpuscles of group A_1 and B were added, the A_1 blood corpuscles to the test tubes with serum iso-anti-A, the B blood corpuscles to the test tubes with serum iso-anti-B. After two hours the tubes were shaken. In one of the two series agglutination was seen to take place in all the tubes, while in the other agglutination only occurred in the tubes following a certain number n (provided that saliva of group A_1 and B only were considered). The number n was taken as a measure of the antigen concentration in the original antigen solution (the saliva) and was termed the titer reading for this solution. It may be noted that n is the power of two in the expression for the antigen concentration in tube no. n after the addition of serum.

If we consider a large number of saliva samples from different subjects and want to know the range within which a certain quality, characteristic of these samples, varies, i. e. what is here termed the indefiniteness of this quality, it is first of all necessary to obtain an idea of the uncertainty of the method used for the measurement of the quality in question. In order to achieve this knowledge 10 titer readings with the same saliva, the same serum and the same test blood corpuscles were made. The observations were further taken on the same day. So the fluctuations in the results must be due solely to the uncertainty of the method. As a measure of this uncertainty the standard deviation μ_u derived from 10 observations was chosen. Below three instances of such a test are given. The standard deviation ranges from about half a titer to one titer. So the method is judged to be fairly satisfactory and suited for the quantitative investigations here dealt with.

Table I.

- 1) Sample ¹⁸/₉ 1939. Saliva A. L. Group A₁. 10 Observations.
 Titers 9 12 11 10 10 9 9 9 9 9. Average 9.7.
 Standard Deviation $\mu = 1.06$ (or 1.1).
- 2) Sample ²⁵/₉ 1939. Saliva A. L. Group A₁. 10 Observations.
 Titers 9 9 9 9 9 10 9 9 9 9. Average 9.1.
 Standard Deviation $\mu = 0.32$ (or 0.3).
- 3) Sample ¹⁴/₆ 1940. Saliva A. L. Group A₁. 10 Observations.
 Titers 12 12 13 13 12 13 13 12 13 13. Average 12.6.
 Standard Deviation $\mu = 0.52$ (or 0.5).

3. Fluctuations in the Course of Time of the Antigen Concentration in Saliva from a Subject of the Secreter Type chosen at Random (Time to Time Indefiniteness).

From the same person (A. L. group A₁) 39 saliva samples were collected in the course of two months in order to find out what fluctuations of the antigen concentration took place during this time. The samples were generally taken between breakfast and lunch. As will be seen from fig. 1, the fluctuations do not suggest any regular variation in the course of time.

Seeing, however, that these samples of saliva were all collected practically at the same time of the day, it was found appropriate also to consider the fluctuations in the course of a single day in a few subjects. Two persons (V. F. and A. S-H.) of group A₁ were chosen. The results are stated in Tab. II a—b. It is seen that the fluctuations in the subject V. F. are as large as those found in the course of 2 months in the subject A. L. In the case of the former subject a tendency to a higher antigen concentration suggests itself during the hours following the meals. In the individual A. S-H., however, no such correlation could be

Table II a—b.

Fluctuations

in the Antigen Concentration of Saliva from
 a) a Male (V. F.) of Group A₁ in the Course of two
 Days, and b) a Female (A. S.-H) of Group A₁ in the
 Course of a Day.

a.

Date	Hour	Titer <i>n</i>	V. F.'s note about his physical condition
Oct. 31 1940	10 a. m.	11	Half an hour after breakfast. Slight depression after a statistical lecture on the previous evening.
	11 a. m.	10	0
	12	11	0
	2 p. m.	12	An hour after lunch.
	3 p. m.	12	10 minutes after eating candy.
	4 p. m.	10	0
	5 p. m.	10	Drinking tea. Just after eating 3 honeycakes.
Nov. 1 1940	12	8	Just after a lecture for the students. Minute secretion of saliva.
	1 p. m.	10	A quarter of an hour after lunch. Drinking coffee.
	3 p. m.	11	10 minutes after having finished a lecture.
	4 p. m.	13	Just after coffee.
	5 ³⁰ p. m.	8	0
	7 ⁴⁵ p. m.	11	A quarter of an hour after dinner.
	9 ⁴⁵ p. m.	13	0
	11 p. m.	13	0

Table II a—b cont.

Date	Hour	Titer <i>n</i>	V. F's note about his physical condition
Nov. 2 1940	8 a. m.	9	Just awoken.
	9 ³⁰ a. m.	10	Immediately after breakfast and after rinsing the mouth.
	11 a. m.	10	Eating liquorice. (The saliva sample of a dark brown colour).
	12	9	0
			All the saliva samples coloured by tobacco.

b.

Date	Hour	Titer <i>n</i>	A. S-H's note about her physical condition
Nov. 6 1940	11 a. m.	8	0
	12	8	0
	1 p. m.	9	Dinner 12 ³⁰ + coffee + a cigarette.
	2 p. m.	8	0
	3 p. m.	9	0
	4 p. m.	8	Drinking coffee.
	5 p. m.	9	Smoking a cigarette.
	6 p. m.	9	0
	7 p. m.	8	A quarter of an hour after evening meal.
	8 p. m.	9	0
	9 ²⁰ p. m.	10	0
	10 ²⁰ p. m.	9	A quarter of an hour after coffee + a cigarette.
11 p. m.	8	0	
12	9	0	

Table II a—b cont.

Date	Hour	Titer <i>n</i>	A. S-H's note about her physical condition
Nov. 7 1940	4 a. m.	8	0
	8 ³⁰ a. m.	10	Drinking coffee.
	9 ³⁰ a. m.	10	0
	11 a. m.	9	0
	12	10	0

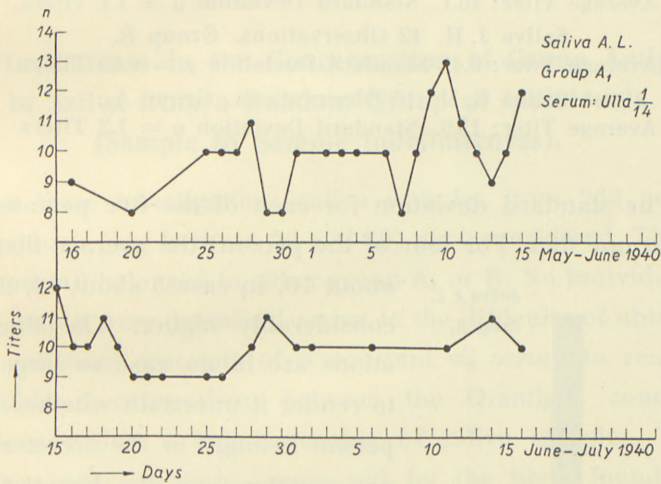


Fig. 1. Fluctuations in the Course of two Months in the Concentration of the Group Antigen in Saliva from a Person of Group A₁.

traced and so the tendency referred to is very likely accidental or, most probably, it is inessential at what hour of the day the samples are collected.

Again, salivas from five persons were examined at different times during a period of one to three years. Fig. 2 represents the distribution of the titer readings for saliva obtained from one of the five individuals in the course of three years.

The distribution curve is rather regular, showing no greater fluctuations than the saliva samples in fig. 1. Tab. III shows the average titers and standard deviations for all five persons

Table III.

1)	Saliva V. F. 25 Observations. Group A ₁ .
	Average Titer: 10.0. Standard Deviation $\mu = 0.89$ Titers.
2)	Saliva A. L. 57 Observations. Group A ₁ .
	Average Titer: 9.9. Standard Deviation $\mu = 0.96$ Titers.
3)	Saliva E. R. 14 Observations. Group B.
	Average Titer: 10.1. Standard Deviation $\mu = 1.1$ Titers.
4)	Saliva J. H. 12 Observations. Group B.
	Average Titer: 9.4. Standard Deviation $\mu = 0.89$ Titers.
5)	Saliva G. M. 16 Observations. Group A ₁ .
	Average Titer: 13.9. Standard Deviation $\mu = 1.2$ Titers.

The standard deviation for each of the five persons is about one titer. For four of the persons the average titer is

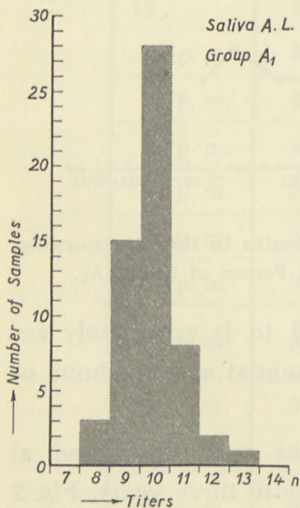


Fig. 2. Distribution of the Antigen Concentrations within 57 Saliva Samples from the same Individual.

about 10, in case 5 about 14, thus considerably higher. The fluctuations are in no case so large as to render it uncertain whether the person belongs to the secreter or non-secreter type, the lowest titer reading being as high as titer 7. Now, the standard deviations μ_A found in the five cases cannot be taken as a true expression of the fluctuations in the course of time (the time to time indefiniteness) of the antigen concentration in saliva from a subject chosen at random, seeing that these determinations also include the indefiniteness due

to the uncertainty of the method, μ_U . This indefiniteness was found to be $\mu_U = 0.63$ (average value, compare Tab. I), while μ_A was found to have an average value of 1.01. From the expression

$$\mu_A^2 = \mu_T^2 + \mu_U^2$$

the actual time to time indefiniteness μ_T is determined:

$$\mu_T = \sqrt{1.01^2 - 0.63^2} = 0.79 \text{ titers.}$$

4. Fluctuations in the Concentration of Group Antigen in Saliva from a Random Group of Individuals (Sample to Sample Indefiniteness).

In these investigations saliva samples from 263 adult individuals (age between 20 and 50) were considered. These persons all belonged to either group A_1 or B. No individuals of group 0 were examined owing to the difficulty of obtaining sufficient amounts of a constant α_2 serum to render possible a comparison between the O-antigen concentrations within a larger number of saliva samples. The antigen concentrations, measured by the titers found in agglutination-inhibition tests, are stated in Tab. IV while in fig. 3 the experimental material is represented in a block diagram.

First of all it will be noted that there is a distinct interval, covering the titers 4, 5, and 6, between the secreter- and non-secreter groups. So the assumption maintained by earlier authors of a continuous transition between the two groups must be discarded. ("Vollausscheider, Teilausscheider, Nichtausscheider"). Again it is seen that the non-secreter salivas are not, all of them, quite devoid of group

Table IV.

Distribution of the Concentrations of the Group Antigen within a Random Group of 263 Adults belonging to Groups A₁ and B.

Titer <i>n</i>	Number of Saliva Samples	Percentage Number of Saliva Samples
0	57	21.7
1	7	2.7
2	3	1.1
3	1	0.4
4	0	..
5	0	..
6	0	..
7	1	0.4
8	4	1.5
9	26	9.8
10	29	11.0
11	30	11.4
12	16	6.1
13	18	6.8
14	23	8.7
15	20	7.6
16	14	5.3
17	7	2.7
18	5	1.9
19	2	0.8

antigen. The latter fact, too, is also at variance with statements by earlier authors. Now, most likely these authors have employed titer scales with a zero-point different from that of our scale, say a zero-point at the titer 8 in this scale.

This would mean 1) that secreters sometimes would be diagnosed as "non-secreters" and 2) that genuine non-secreters never would be found to contain any trace of antigen.—It must of course be realised that the zero-point of our scale is also accidental, seeing that the titer 0 stands for all antigen concentrations below titer 1.

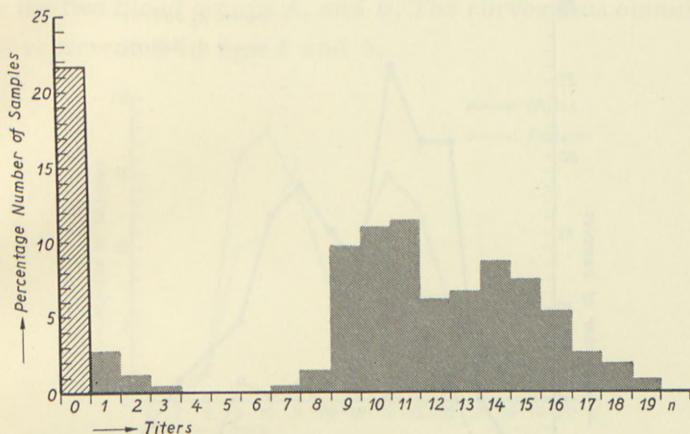


Fig. 3. Distribution Diagram for the Concentrations of Group Antigen in Salivas from 263 Adults of Groups A₁ and B.

From Tab. III and fig. 3 it is further seen that the secreter group comprises 74 % and the non-secreter group 26 %—in good agreement with the figures found by PUTKONEN and by SCHIFF. The standard deviation for the secreter group is $\mu'_A = 2.7$ titers. This, however, is not the actual fluctuation in antigen concentration in saliva from a random group of individuals or what may be termed "the sample to sample indefiniteness" μ_S , seeing that μ'_A also includes the indefinitenesses due to the uncertainty of the method μ_U and the "time to time indefiniteness" μ_T for an individual chosen at random. These two indefinitenesses were 0.63 and 0.79 titers respectively. So the actual sample to sample indefiniteness is determined from

$$\mu_S^2 = \mu_{A'}^2 - \mu_U^2 - \mu_T^2 = 2.7^2 - 0.63^2 - 0.79^2$$

or $\mu_S = 2.5$ titers.

Thus the apparent indefiniteness 2.7 titers is not very far from the actual sample to sample indefiniteness. Another feature of the block diagram fig. 3 is as follows. It would

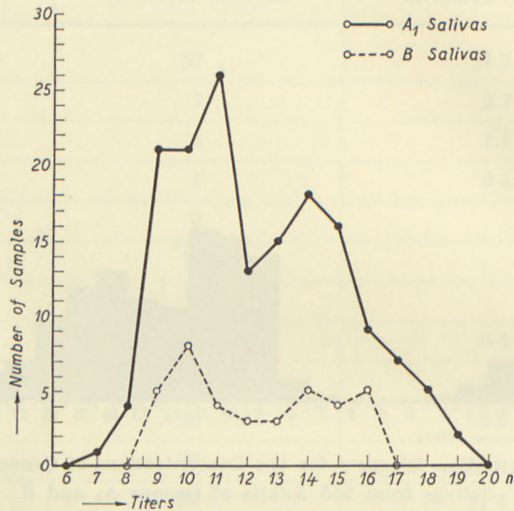


Fig. 4. Distribution Curves for the Concentrations of Group Antigens in Saliva from Secreters of Groups A₁ and B.

seem that two maxima, one at the titers 10 to 11 and the other at titer 14, may be traced within the secreter group of this diagram. As will be remembered from the investigations on the fluctuations in the course of time of the antigen concentration in saliva from a subject chosen at random, four of these showed an average concentration at about titer 10 while one person had the average concentration at titer 14. Thus these two values coincide with the two maxima in the block diagram fig. 3. This, however, may be accidental, and, on the other hand, the two maxima in fig. 3 may reflect the inhomogeneity of the material only.

Here it may be noted that the material comprised saliva both from persons of group A_1 and B and from both men and women.

In order to find out whether the two maxima are due to one of these circumstances, separate curves were drawn on the basis of the secreter material for the two sexes and for the two blood groups A_1 and B. The curves thus obtained are represented in figs. 4 and 5.

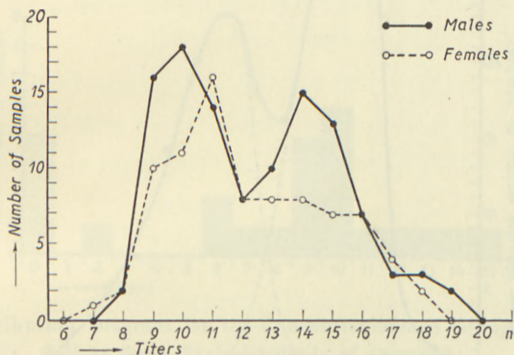


Fig. 5. Distribution Curves for the Concentrations of the Group Antigens A_1 and B in Saliva from Males and Females.

Obviously all four curves exhibit the characteristic division into two groups with different maxima. So it would seem rather safe to state that the secreter curve drawn from the total material is in fact resultant of two overlapping curves. Further the analysis of the material shows that it was quite justifiable not to distinguish between the two blood groups A_1 and B, or between the sexes in our material.

In fig. 6 an attempt is made to separate the two secreter curves. The areas of the two curves are about as 7 to 9, the smallest area being that of the curve covering the higher antigen concentrations. Now, in the explanation of this

twin curve there are two possibilities¹. The gene on which the presence of antigen in the saliva depends may not be absolutely dominant, resulting in a weaker secreter type in the heterozygote individual. This hypothesis would seem the more probable. On the other hand it cannot be al-

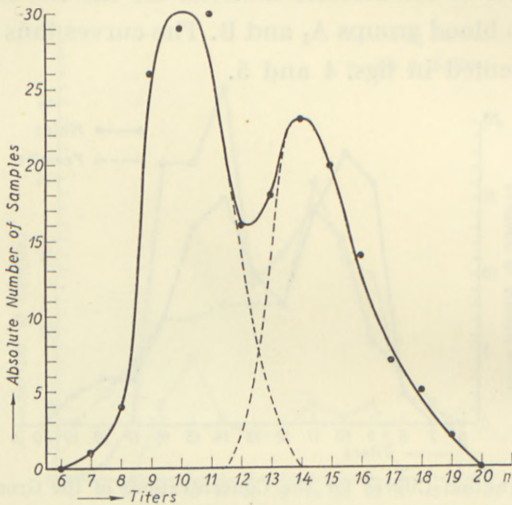


Fig. 6. Distribution Curve for the Antigen Concentrations in Salivas from Secreters of Groups A₁ and B.

together precluded that the twin curve may reflect the presence in the experimental material of two groups of individuals of which one is the heterozygote with regard to the genes determining the blood groups, the other the homozygote. In this connection it should be noted that the material consisted exclusively of persons of the groups A₁ and B. The way to settle this question would be to collect an experimental material either from persons of group 0 or from persons of group A₁ B. The former scheme would

¹ A third possibility, *viz.* the existence of two different secreter genes, could of course be theoretically maintained. This hypothesis is, however, less plausible so it will not be entertained below.

be the more difficult because of the inhomogeneity of the α_2 sera. The latter would of necessity take a rather long time seeing that about 3% only of all individuals belong to that blood group. So neither of the tests indicated have been carried out.

An attempt was made to investigate whether the quantitative distribution of the individuals within the two secreteur groups fits in with the theory of the gene frequencies. The

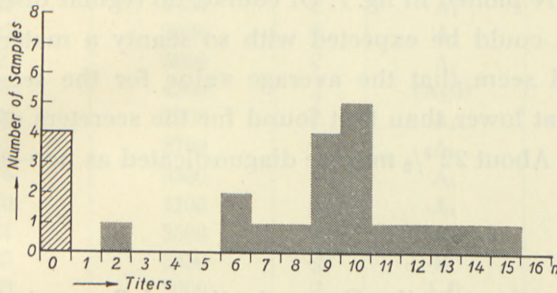


Fig. 7. Distribution Diagram for the Concentrations of Group Antigens in Salivas from 23 Individuals of Group A_2 .

assumption was made that the twin curve reflects the presence of heterozygote and homozygote subjects with regard to the secreteur gene S. Then the relative frequencies of the various types are found to be (compare figs. 3 and 6):

- | | | |
|----------------|---|----------------|
| 1) $SS = 32\%$ | } | Secreters |
| 2) $Ss = 42\%$ | | |
| 3) $ss = 26\%$ | | Non-secreters. |

Denoting the gene frequency of type SS as α^2 , that of type ss as β^2 , the frequency of type Ss is $2\alpha\beta$. Introducing α and β , (the square roots of the percentage frequencies found), into the equation

$$\alpha + \beta = 1$$

we find

$$\sqrt{0.32} + \sqrt{0.26} = 0.57 + 0.51 = 1.08$$

in fairly good agreement with the theoretical value 1.00, the uncertainty of the division of the twin curve into two separate curves being considered.

A few saliva samples from persons of group A_2 were examined in connection with the main investigations. The results are plotted in fig. 7. Of course, no regular distribution diagram could be expected with so scanty a material, but it would seem that the average value for the secreters is somewhat lower than that found for the secreters of groups A_1 or B. About 22 % may be diagnosed as non-secreters.

5. Fluctuations in the Concentration of Group Antigen in Saliva from a Random Group of newborn Infants.

From the Maternity Ward A in the State Hospital of Copenhagen, (Rigshospitalet i København), saliva samples from 120 newborn infants (58 boys and 62 girls) were collected. The blood group characters of the children were in all cases determined from blood obtained from the umbilical cord. All the children were diagnosed as full-grown and the saliva samples were taken within 4 to 6 days after birth. The material comprised mainly children of groups A_1 and B, but a few infants of the groups A_2 and AB were included. Tab. V contains the total material.

From the latter the individuals of group A_1 and B (and A_1B) were selected and the percentage distribution of the antigen concentrations calculated. The results are

Table V.
Distribution of the Concentrations of Group
Antigens in Salivas from 120 newborn Infants.

Number of the Sample	Weight of the Child	Sex	Blood Group	Saliva-Titer <i>n</i>
744	2900 g	♂	A ₁	8
748	3200	♂	B	8
758	3250	♀	A ₁	10
749	2450	♀	A ₁	12
747	2000	♀	A ₂	4
759	3900	♀	A ₁	1
752	4200	♂	(A ₂)B	7
764	2900	♀	A ₁	7
773	2700	♀	A ₁	6
774	3300	♂	A ₁	5
780	4100	♂	A ₁	6
781	3500	♀	A ₁	4
783	3350	♂	B	7
762	3600	♂	A ₂ B	0—2
796	3300	♂	A ₁	4
782	2750	♂	A ₁	1
787	3150	♀	A ₁	6
791	3300	♀	A ₂	6
794	3850	♀	A ₂	6
793	3100	♂	A ₁	7
814	2600	♀	B	4
811	2750	♀	A ₁	7
812	3200	♂	A ₂	7
806	2900	♂	A ₁	6
809	2600	♂	A ₁	6
825	2700	♀	A ₂	6
824	3300	♀	A ₁	8
792	3200	♀	A ₁	6
829	3600	♀	A ₁	2
826	3600	♀	A ₁	7
840	4000	♂	A ₁	6
834	3300	♀	A ₁	7
837	3650	♀	A ₁	6
821	2900	♀	B	6
842	2900	♂	A ₁	6
846	3000	♀	A ₁	7

Table V cont.

Number of the Sample	Weight of the Child	Sex	Blood Group	Saliva-Titer <i>n</i>
820	3400 g	♂	B	5
853	3000	♂	B	11
847	2900	♂	A ₁	11
848	2900	♀	A ₁	6
863	3300	♀	A ₁	10
864	3500	♂	A ₁	7
867	3350	♀	A ₁	9
865	3600	♂	A ₁	8
819	2900	♂	B	8
880	2950	♂	A ₁	5
875	3300	♂	A ₁	7
876	3000	♀	A ₁	5
872	3400	♂	A ₁	6
871	2900	♀	A ₁	2
885	2900	♂	A ₁ B	9—9
888	3600	♂	A ₁	7
890	2450	♀	A ₂	0
906	2500	♀	A ₁	6
910	3150	♀	A ₁	0
893	3850	♀	A ₁	5
922	2750	♀	A ₁	7
920	2950	♀	A ₁	6
921	3500	♂	A ₁	7
919	3750	♀	B	9
934	3400	♀	A ₁	7
939	2800	♀	A ₁	4
936	3300	♀	B	6
935	4050	♂	A ₁	7
947	3300	♀	A ₁	3
904	3800	♂	A ₁	7
957	3500	♂	(A ₃ ?)B	3—10
951	3900	♀	A ₁	7
949	3600	♀	A ₁	5
952	3300	♂	A ₁	7
953	3650	♀	A ₁ B	7—8
956	3200	♀	A ₁	5
961	3100	♀	A ₁	10
958	2500	♂	A ₁	7
987	3400	♂	A ₁	6

Table V cont.

Number of the Sample	Weight of the Child	Sex	Blood Group	Saliva-Titer <i>n</i>
968	3000 g	O ₁ A	A ₁	3
972	3800	O + O	A ₁	7
1002	2800	O + O	A ₁ B	6—8
1000	3450	O ₁ A	A ₁	7
1007	3200	O + O	B	3
1013	3350	O + O	A ₁	7
1022	3850	O + O	A ₁	7
1019	2700	O ₁ A	A ₁	5
1027	3600	O + O	A ₂	1
868	3300	O + O	B	11
1020	..	O + O	A ₁	8
1043	3800	O + O	A ₁	5
1026	2550	O + O	B	3
1041	3000	O + O	B	7
1046	3500	O ₁ A	A ₁	6
1055	3300	O ₁ A	A ₁	6
1060	2950	O + O	A ₁	4
1061	4100	O + O	A ₂	2
1038	3600	O ₁ A	B	11
1049	3000	O ₁ A	A ₁ B	0—2
1045	3300	O ₁ A	A ₁	6
1073	3200	O ₁ A	B	5
1071	4100	O ₁ A	B	6
1070	2300	O ₁ A	B	6
1077	3050	O ₁ A	A ₁ B	7—7
1076	2900	O + O	A ₁	6
1072	2700	O + O	A ₁	1
1082	2800	O ₁ A	A ₁	5
1083	3300	O ₁ A	A ₂	0
1086	3500	O ₁ A	A ₁	6
1089	2650	O + O	A ₁	7
1093	3250	O + O	B	9
1097	3300	O + O	B	1
1094	3100	O + O	A ₁	9
1105	4350	O ₁ A	A ₁	10
1112	3000	O + O	A ₂	6
1114	3100	O ₁ A	A ₁	6
1118	3900	O ₁ A	A ₁	6
1092	3500	O + O	B	8

Table V cont.

Number of the Sample	Weight of the Child	Sex	Blood Group	Saliva Titer <i>n</i>
1127	3600 g	♀	A ₁ B	3—2
1137	3600	♂	A ₂	5
1075	3800	♂	B	7
1136	3150	♂	A ₁	4
1144	2800	♂	A ₁ B	0—0
1151	3700	♂	A ₁	5

Table VI.

Distribution of the Concentrations of Group Antigens in 116 Saliva Samples from a Random Group of newborn Infants of the Groups A₁ and B (and A₁B).

Titer <i>n</i>	Number of Saliva Samples	Percentage Number of Saliva Samples
0	4	3.5
1	4	3.5
2	5	4.3
3	5	4.3
4	6	5.2
5	12	10.3
6	26	22.4
7	29	25.0
8	9	7.8
9	6	5.2
10	5	4.3
11	4	3.5
12	1	0.8
13	0	..

entered in Tab. V from which the block diagram fig. 8 is drawn.

A comparison with the diagram fig. 3 reveals a striking difference between the distribution of the antigen concentration in saliva from adults and from newborns in

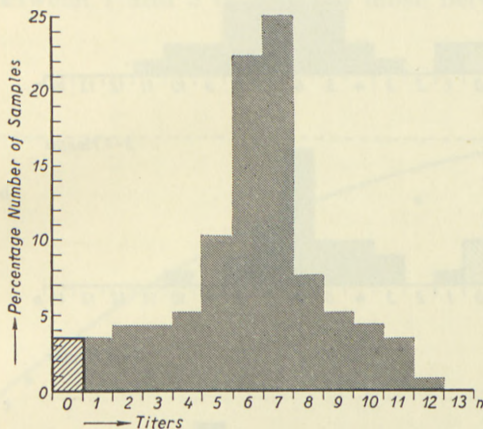
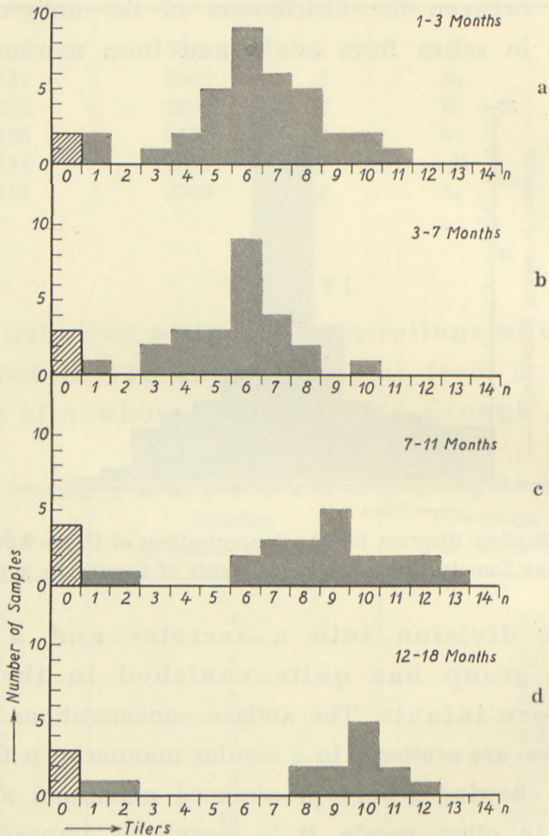


Fig. 8. Distribution Diagram for the Concentrations of Group Antigens in 116 Saliva Samples from Newborn Infants of Groups A₁ and B.

that the division into a secreter and a non-secreter group has quite vanished in the case of newborn infants. The antigen concentrations for all the children are scattered in a regular manner over the first 12 titers, showing a very pronounced maximum at titers 6 to 7¹. In other words, it is completely impossible to distinguish between secreters and non-secreters in persons so young. On the other hand it follows from this experience that most of the non-secreters to be must contain a certain

¹ According to W. JOHANNSEN a distribution curve with a pointed maximum and great lateral extensions is often characteristic of cases where exterior factors may influence the development of the quality in question. Otherwise the same shape of curve may reflect a mixture of two cases with the same average but with different indefinitenesses.

amount of antigen at birth, while the secreters, must as a rule, exhibit a lower concentration of antigen in the saliva than the adults. One might imagine that the lower titers,



Figs. 9 a—d. Distribution Diagrams showing the Concentrations of Group Antigens in Salivas from a Random Group of Children during the first 18 Months of Life.

say up to titer 4 or 5, represent the non-secreters to be, while the remainder cover those individuals which are later on recognized as secreters. The conditions, however, are not so simple, as will be gathered from experiments which will be recorded below.

From various infant homes samples of saliva were collected from children at ages ranging from 1 to 18 months. All the children belonged to group A₁ and B. The concentrations of antigen were determined for the samples and the whole material divided into groups comprising a) the children between 1 and 3 months, b) those between 3 and

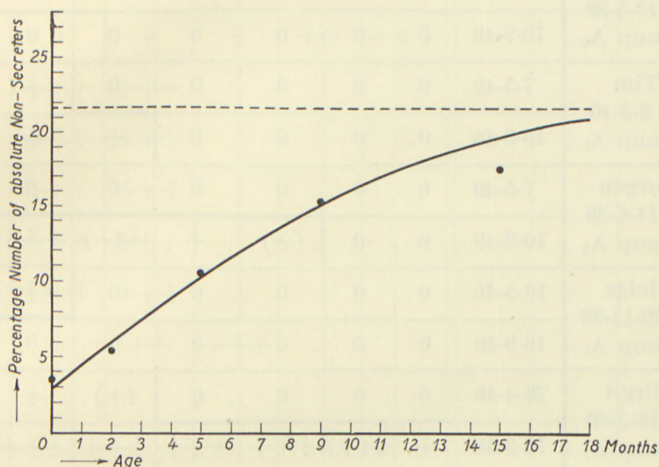


Fig. 10. Graph showing the Percentage Number of Non-Secreters exhibiting the Titer 0, at various Times during the first 18 Months of Life. The dotted Line above represents the average Number of absolute Non-Secreters in Adults.

7 months, c) the children from 7 to 11 months and d) the remainder ranging in age from one year to one year and a half. The concentrations from the four groups were plotted in block diagrams, figs. 9 a—d.

From these diagrams the conclusion may be drawn that within the first half year of life no absolute distinction can be made between secreters and non-secreters, the conditions being chiefly the same as were found for newborn children, (compare fig. 8). After this period a rapid development would seem to take place resulting in a clear cut separation

VII.
Antigen in Saliva from a Number of Individuals.

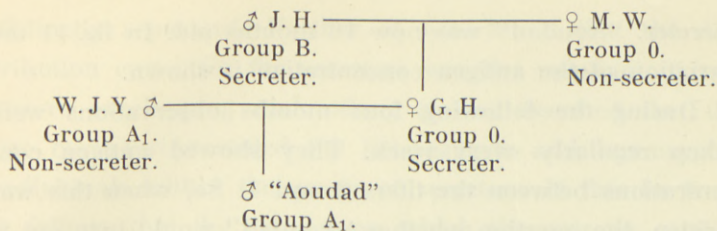
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0	(+)	+	+(+)	+++	+++
0	0	0	+	+	++	+++
+(+)	++	+++	+++
+++	+++	+++	+++
+(+)	++	+++	+++
+++	+++	+++	+++
++	+++	+++	+++
0	(+)	+	++	+++
+++	+++
+++	+++
+(+)	++	+++	+++
+	++	+++	+++
0	0	0	0	0	(+)	+	+(+)	++	+++
0	(+)	+	+	+(+)	++	++	+++
+(+)	++	+++	+++
0	+	+	++	+++
+	+(+)	++	+++
0	0	(+)	+	+(+)	+++
+(+)	++	+++	+++
0	0	+	+(+)	+++	+++

of the two types. Values equal to those found for adults may be reached in the course of the second year. Judging from the rather scanty material of children of the age of 12 to 18 months the titer for non-secreters is perhaps a little higher than in adults, while for the secreters it is perhaps a little lower than in grown-up people. The deviations from the final values are, however, rather small. The results obtained are perhaps represented more clearly by means of a curve, fig. 10.

This curve represents the percentage numbers of absolute non-secreters at various ages; absolute non-secreters meaning subjects who in their saliva show an antigen concentration indicated by the titer 0. The points of the curve are derived from the various distribution diagrams found in this paper. The curve exhibits a regular increase during the first year.

In order to examine more directly the development of the antigen concentration in the saliva two to four observations were taken on a number of the children during the first 18 months of their lives. The examinations, however, failed to give any particularly interesting information. In Tab. VI results from ten children are given.

The case "Jørgen" is a little irregular, showing the titer 6 at an age of 11 months, which titer, judging from the block diagram fig. 9, would indicate that the subject belongs to the secreter group. Four months later titer 2 was found, thus a titer within the non-secreter region. The following report shows that such irregularities are certainly not altogether unique at this early time of life. The author's son "Aoudad", of the group A_1 was regularly examined for the content of group antigen in the saliva during the first 20 months of his life. The pedigree of the child was as follows:



It follows from the scheme that the child has had the same chance of becoming a heterozygote secreter and a

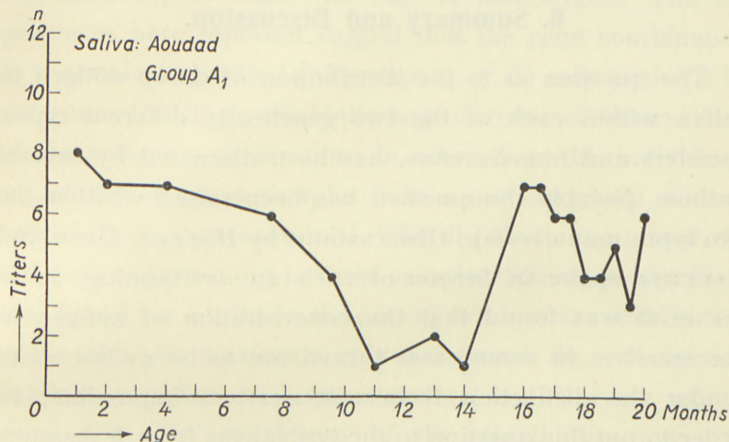


Fig. 11. The Concentration of A-Antigen in the Saliva from a Boy of Group A₁, during the first 20 Months of his Life.

non-secreter. Now, "Aoudad" started at an age of one month, when the observations were initiated, with an antigen concentration of 8 titers. Thus he was deemed to be a secreter. During the next 10 months the antigen concentration, however, smoothly diminished, reaching distinct non-secreter values when the child was 11 months old. These values remained constant for three months. Then after an interruption of the observations during two months of summer holidays a new test disclosed an increased amount of antigen, though not as great as normal in a grown-up

secreter. "Aoudad" was now 16 months old. In fig. 11 the variation of the antigen concentration is shown.

During the following four months observations were taken regularly every week. They showed antigen concentrations between the titers 3 and 7. So, when this was written, the question whether "Aoudad" would turn out to be a secreter or a non-secreter could not be settled.

6. Summary and Discussion.

The question as to the distribution of group antigen in saliva within each of the two genetically different types, secreters and non-secreters, has been discussed by several authors. Notably the question has been raised whether the two types may overlap. Observations by HOLZER, DAHR and KAUERTZ spoke in favour of such an overlapping, in so far as it was found that the concentration of antigen in the secreters in some cases turned out to be so low as to render the distinction from non-secreters impossible. In order to put this question to the test salivas from 5 secreters of group A_1 and B were examined during a period of 3 years. The fluctuations of the antigen concentrations in these 5 individuals were all found to keep within certain rather definite regions clearly separated from the corresponding regions for non-secreters. It should be noted that four of the secreters in question exhibited coinciding distribution curves with an average concentration at about titer 10 while the average for the subject no. 5 was about 14.

Again the antigen concentrations in salivas from 263 adult individuals chosen at random among persons of groups A_1 and B were measured. In this case, too, the distribution curves for the secreters and non-secreters were

distinctly separated. Further, it was found that the distribution curve for the secreters was the resultant of two curves overlapping each other. It was assumed that the two curves represented the heterozygote and homozygote individuals within the group of secreters. If this be true, it follows that the gene upon which the secrete quality depends is not absolutely dominant. Again it may be assumed that four of the five individuals mentioned above are heterozygote while the fifth is homozygote. The experiences here reported suggest that the gene combination in a certain individual (of group A_1 or B) may perhaps be determined from a sufficiently large number of observations of the antigen concentrations in saliva from this individual.

Again 120 saliva samples from a random group of newborn infants were examined. The distribution curve of the antigen concentrations in these samples differed greatly from that found for adults. In the case of newborns, a distribution curve with one maximum only was found. So, a distinction between secreters and non-secreters at this early age is precluded. The maximum of the distribution curve is situated at titer 6 to 7, i. e. in the interspace between the curves for secreters and non-secreters in the case of adults. The differentiation of the two types would seem to take place during the period from 6 months to 18 months judging from observations on a number of children at ages within this interval. It appears, however, that certain rather rare deviations from this rule may occur.

The facts here stated may be thus summarised: It has been established that a hereditary quality, distinctly expressed at birth, may, according to the genotype of the individual, either grow more pronounced or practically disappear in the course of time.—An analogy to this phenom-

enon may perhaps be found in the development of the colour of the iris. As is well known, the colour of the eyes in newborn infants is uniformly of a dark blue shade. During the following months this colour either develops into a decided blue or it loses every trace of blue and assumes various shades of brown depending on the genotype of the individual. Now it should be borne in mind that the group antigens probably have the character of polysaccharides (LANDSTEINER). It may naturally be assumed that these polysaccharides play some necessary part in the organism. If this be true it follows that the non-secreters also must possess these polysaccharides although in a form showing no group specificity. Now, it is known that the manifestation of a certain specificity often depends on relatively minute structural characteristics. So it would not seem precluded that such molecular characteristics might develop even during the growth of the individual. The final development of the non-secreter type might for instance depend on the production of polysaccharides able to give faint cross-reactions with the genuine group specific polysaccharides, or it might reflect the gradual development of two slightly different polysaccharides: a tiny part equal to the genuine group specific polysaccharide and the remainder not exhibiting this specificity.

Acknowledgement.

The expences of the investigations have been defrayed by P. A. BRANDT's fund. I desire to express, in this place, my sincerest thanks to the trustees of the fund.

(From the Institute of Forensic Medicine,
University of Copenhagen.
Chief: Professor KNUD SAND).

References.

- PETER DAHR (1939). "Untersuchungen über die Ausscheidung der Blutgruppensubstanz A in Speichel". *Zeitschr. f. Rassenphysiologie*, **11**, 1—14.
- GRETHE HARTMANN (1941). "Group Antigens in Human Organs". Copenhagen.
- JUL. HARTMANN (1937). "Maaleteknik I". 3. edition. Copenhagen.
- FRANZ JOSEF HOLZER (1937). "Untersuchungen über die gerichtlich-medizinische Verwertbarkeit der Ausscheidung von Blutgruppensubstanzen". *Deutsche Zeitschr. f. d. gesamte Gerichtl. Med.*, **28**, 234—248.
- W. JOHANNSEN (1909). "Elemente der exakten Erblchkeitslehre". Jena.
- FERDINAND KAUERTZ (1938). "Untersuchungen über die "Ausscheidung" von B-Blutgruppensubstanz im Speichel". *Zeitschr. f. Immun.*, **92**, 460—471.
- KARL LANDSTEINER (1936). "The Specificity of Serological Reactions". Springfield, Illinois.
- HUGO LEHRS (1930). "Über gruppenspezifischer Eigenschaften des menschlichen Speichels". *Zeitschr. f. Immun.*, **66**, 175—192.
- GEORGES MORZYCKI (1934). "L'hérédité des propriétés de la sécrétion des facteurs constituants des groupes O, A, B dans la salive". *Compt. rend. Soc. biol.*, **115**, 658—660.
- TAUNO PUTKONEN (1930). "Über die gruppenspezifischen Eigenschaften verschiedener Körperflüssigkeiten". *Acta Soc. Medic. fenn. "Duodecim"*, Ser. A., **14**, fasc. 2.
- HAKURU SASAKI (1932). "Über das Vorkommen gruppenspezifischer Eigenschaften in Speichel und anderen Körperflüssigkeiten und den Nachweis zweier "Ausscheidungstypen"". *Zeitschr. f. Immun.*, **77**, 101—129.
- F. SCHIFF and H. SASAKI (1932). "Über die Vererbung des serologischen Ausscheidungstypus". *Zeitschr. f. Immun.*, **77**, 129—139.
- F. SCHIFF and H. SASAKI (1932). "Der Ausscheidungstypus, ein auf serologischem Wege nachweisbares Mendelnder Merkmal". *Klin. Wochenschr.*, **11**, 1426—1429.

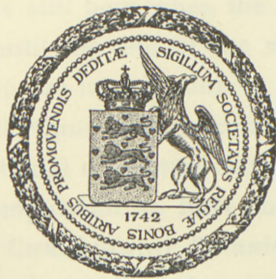
Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.
Biologiske Meddelelser. **XVI**, 3.

SOME MARINE ALGAE FROM MAURITIUS

II. PHAEOPHYCEAE

BY

F. BØRGESEN



KØBENHAVN
EJNAR MUNKSGAARD

1941

Det Kongelige Videnskabskabernes Selskab.
Biologiske Meddelelser. XVI, 3.

SOME MARINE ALGAE
FROM MAURITIUS

II. PHAEOPHYCEAE

J. BORGEN



KØBENHAVN

Printed in Denmark.
Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.

In the introduction to the first part of this paper containing the *Chlorophyceae* I have already given information as to the material and its collectors, so I shall here merely mention that the essential portions of the material upon which the present part is based were collected partly by Dr. TH. MORTENSEN, Copenhagen, and partly by Dr. R. E. VAUGHAN. The latter has continued to send me parcels with algae and he has also taken a collection with him to England, when on leave there, but unfortunately the war has prevented me from getting it.

Thanks to Sir ARTHUR HILL, Director of the Royal Botanic Gardens, Kew, and to the keeper of the herbarium, Dr. A. D. COTTON I borrowed for study in Copenhagen the *Phaeophyceae* from Mauritius kept in the Kew Herbarium. This collection was still here when the war broke out and will remain here until the end of the war.

As mentioned in the introduction to part I, The *Chlorophyceae*, several collections of algae from Mauritius are found in the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, but the war has made it impossible to have them sent.

Professor OTTO CHR. SCHMIDT, Botanisches Museum, Berlin, Dahlem, has most kindly informed me, that a collection of algae from Mauritius, made by the well-known Bohemian physician and traveller, Dr. F. W. SIEBER, is found in the Botanical Museum there, but as this collection has

not been kept separate and no list of the species is available, they were not able at present to send them.

Of former works dealing with the algae of Mauritius the most important have been mentioned in the introduction to the first part.

I am much indebted to Professor W. A. SETCHELL, Berkeley, Cal., who, with his usual kindness, has determined the specimens of *Sargassum* found in Dr. VAUGHAN'S collection. A number of 5 species were present in this collection and Professor SETCHELL has informed me that they were highly interesting, being rare and very little known species.

Otherwise with a few exceptions the war has prevented me from coming in contact with colleagues in foreign countries.

In the following list 38 species of *Phaeophyceae* are mentioned of which 13 are species of *Sargassum*. No doubt later investigations will increase the number a good deal. JADIN mentions 25 species in his list.

To the Trustees of the Carlsberg Foundation I am much indebted for a grant for continued algological researches.

PHAEOPHYCEAE

ISOGENERATAE.

I. Ectocarpales.

Fam. 1. *Ectocarpaceae*.

Ectocarpus Lyngb.

The material from Mauritius contains 6 species of *Ectocarpus*; two of these are described as new species.

According to our present knowledge the remaining 4 species appear to be widely spread in tropical seas. One of these *Ect. breviarticulatus* J. Ag. (= *Ect. spongiosus* Dickie and *Ect. hamatus* Crouan) is a characteristic and easily known species which was first described by J. AGARDH upon material from Mexico but has afterwards been found in many localities in the Indian and Pacific Ocean and the West Indies.

The 3 remaining species: *Ect. indicus* Sonder, *Ect. Mitchellae* Harv. and *Ect. irregularis* Kütz. have in the course of time caused much confusion especially because the description of two at least were at first poor and defective and an identification accordingly difficult. No wonder therefore that, when one of these plants was found far away from the original locality and when examined more carefully did not agree very well with the original description,

it was considered to be a distinct species. And what has added still more to the confusion is the fact that they often occur mingled together in the same tuft, and as their thalli are very alike and of nearly the same ramification they have sometimes been supposed to belong together, sporangia of rather distinct shape being in this way attributed to the plant. This applies especially to *Ect. indicus* Sonder which has long been a bone of contention, owing largely of course to the very defective diagnosis of SONDER. I, too, in earlier publications have felt rather inclined to give up this species, but all the same I have now come to the conclusion that *Ect. Duchassaingianus* Grunow is in reality the same species as that of SONDER; hence, though SONDER's description is bad and his species therefore ought to be rejected, while GRUNOW's is good, according to the rules of nomenclature, SONDER's specific name must replace that of GRUNOW. *Ect. Duchassaingianus* was first described by GRUNOW upon West Indian material but it has gradually become evident that it has a wide distribution in tropical seas.

Besides the above mentioned 4 *Ectocarpus* species *Ectocarpus terminalis* Kütz. or as it is now more correctly called *Hecatonema terminalis* (Kütz.) Kylin seems also to be widely spread in tropical seas.¹

But when compared with the very great number of *Ectocarpus* species found in northern seas the number of species occurring in tropical seas seems to be small, compare for instance: WEBER, A., *Algues Siboga*, 1928, p. 484 and OKAMURA, K., *The distribution of Marine Algae in Pacific Waters*, 1932 and OTTO CHR. SCHMIDT, *Verzeichnis der Meeresalgen von Neu-Guinea und dem westl. Oceanien*. 1928.

¹ This species is also found in India, for the plant I have called *Ectocarpus Enhali* (BØRGESEN, 1937, p. 8) is in reality this species.

1. *Ectocarpus Mitchellae* Harv.

HARVEY, W. H., Nereis Bor.-Am., 1851, p. 142, pl. XII G. BØRGESEN, Mar. Alg. D. W. I., 1914, p. 162, figs. 129—130. SETCHELL and GARDNER, Mar. Alg. Pacif. Coast, Melanophyceae, 1925, p. 428. BØRGESEN, Some Indian green and brown Algae, I, 1930 p. 165, p. 8. FELDMANN, Algues Côte des Albères, I—III, 1937, p. 106. HAMEL, Phéophycées de France, 1931—39, p. XIV. BØRGESEN, Iranian Gulf Algae, 1939, p. 75, figs. 16—17. — *Ectocarpus virescens* Thur. in SAUVAGEAU, Sur l'*Ectocarpus virescens*, 1896, p. 17, figs. 1—7. BØRGESEN, Mar. Alg. Canary Isl., II, 1926, p. 18, figs. 9—10. SVEDELIUS, On the number of Chromosomes etc., 1928, p. 289, figs. 1—4. SAUVAGEAU, Sur quelques Algues Phéosporées, 1933, p. 67, figs. 15—16.

According to HAMEL's division of the genus *Ectocarpus* (HAMEL, 1939, p. 65 and 1939, p. X) this species belongs to the genus *Giffordia* Batters.

Several specimens in Dr. VAUGHAN's collection are referable to this species and as was the case in the Indian and Iranian material examined by me (BØRGESEN, 1930, p. 165; 1939, p. 75), plurilocular as well as unilocular sporangia are found, and I have also succeeded in finding a few antheridia.

SAUVAGEAU, in his valuable paper (1933, p. 65), where the plant is referred to as *Ect. virescens* Thur., mentions that he has found four kinds of sporangia in this species. For many years only mega- and meiosporangia (SAUVAGEAU, 1896, p. 17) were known, and although he continued to search SAUVAGEAU had never met with other kinds of sporangia, the spores of which SAUVAGEAU had found were able to germinate in cultures, spores of meiosporangia producing plants with meiosporangia, spores of megasporangia producing plants with megasporangia. And by cytological investigation of material sent him by SAUVAGEAU SVEDELIUS (1928, p. 296—300) found that the two kinds of plurilocular sporangia of *Ect. virescens* are cytologically similar, being

both haploid with a number of about 10 chromosomes. It was therefore suggested (see SVEDELIUS, p. 300) that *Ect. virescens* had lost its sexuality.

Then on "le 31 mars 1932" SAUVAGEAU was fortunate enough to find at Guéthary upon a fragment of *Codium tomentosum* a small plant which besides meiosporangia had unilocular sporangia; these occurred side by side on the same plant in agreement with those found by me in Indian and Iranian material. With these unilocular sporangia SAUVAGEAU established several cultures and in one of these he obtained plants with megasporangia as well as with antheridia. The antheridia have nearly the same shape as the megasporangia but their colour is paler and the loculi are quite small. SAUVAGEAU did not find out if fertilization took place. But as the spores in the following cultures developed successively some generations with antheridia and megasporangia similar to the first one without any alternation of generations, SAUVAGEAU concludes that the spores must have germinated parthenogenetically.

Since SAUVAGEAU's discovery of unilocular sporangia and antheridia in this plant no cytological examination of it has been made. But even if a fertilization of the spores of the megasporangia and the antheridia, as supposed by SAUVAGEAU, did not take place in the cultures, one is justified in supposing that under normal conditions such a fertilization would occur, and the result of this would be a diploid plant with unilocular sporangia in which the reduction division would take place.

This is briefly, according to SAUVAGEAU, our knowledge of the development of this plant, and SAUVAGEAU therefore suggests that *Ect. virescens*, which, because of the shape of its plurilocular sporangia, belongs to a group of spe-

cies¹ inhabiting warm seas, might be a species that had immigrated to more temperate seas and consequently had partly lost its old characters or partly acquired some new qualities. SAUVAGEAU says (1933, p. 79): "Par suite, on concevrait que ses organes reproducteurs eussent perdu ou eussent acquis, en voyage, certaines propriétés, comme nous voyons l'*Asparagopsis hamifera*, d'importation récente, se multiplier chez nous uniquement par parthénogénèse. Les autres espèces du groupe, qui sont restées cantonnées dans leur pays d'origine, et en particulier l'*Ect. Duchassaingianus* et l'*Ect. indicus* laisseraient probablement préciser la signification des différents reproducteurs, mieux que l'*Ect. virescens*."

After these introductory remarks I shall proceed to give a description of the specimens of this plant from Mauritius and begin with no. 300 in Dr. VAUGHAN'S collection. In the specimens of this number I have found meiosporangia, unilocular sporangia and further more a few antheridial sporangia.

¹ According to SAUVAGEAU (1896, p. 39) this group of species consists of the following 9 species: *Ect. Mitchellae* Harvey, *Ect. indicus* Sonder, *Ect. amicorum* Harv., *Ect. Duchassaingianus* Grunow and 5 species of CROUAN mentioned in MAZÉ et SCHRAMM, "Essai de classification des Algues de la Guadeloupe", 2^e édit., p. 109, but these 5 species are nomina nuda and must therefore be left out of consideration. To one of them *Ectoc. guadeloupensis* Crouan Mlle VICKERS has referred a plant of which she has published a figure in her "Phycologia Barbadosensis", pl. XVIII; but in my opinion this is referable to *Ect. Mitchellae*, being a form with short sporangia. Regarding the four first-mentioned species *Ect. virescens* Thur. is, as already previously pointed out by me, the same species as *Ect. Mitchellae* Harv. and being the oldest name (1851) HARVEY'S name has to be maintained. *Ect. indicus*, according to my interpretation of this species in this paper is like *Ect. Duchassaingianus* and seems to be a well-defined species; compare p. 16 in this paper. And finally *Ect. amicorum* is surely nothing but a form of *Ect. Mitchellae* with short sporangia; compare my remarks p. 15 in this paper.

The meiosporangia were the commonest. Fig. 1 *a* shows some of these sporangia having the common typical shape and size with a length of about 70—110 μ and a breadth of about 24—30 μ and the loculi about 5—7 μ high. The

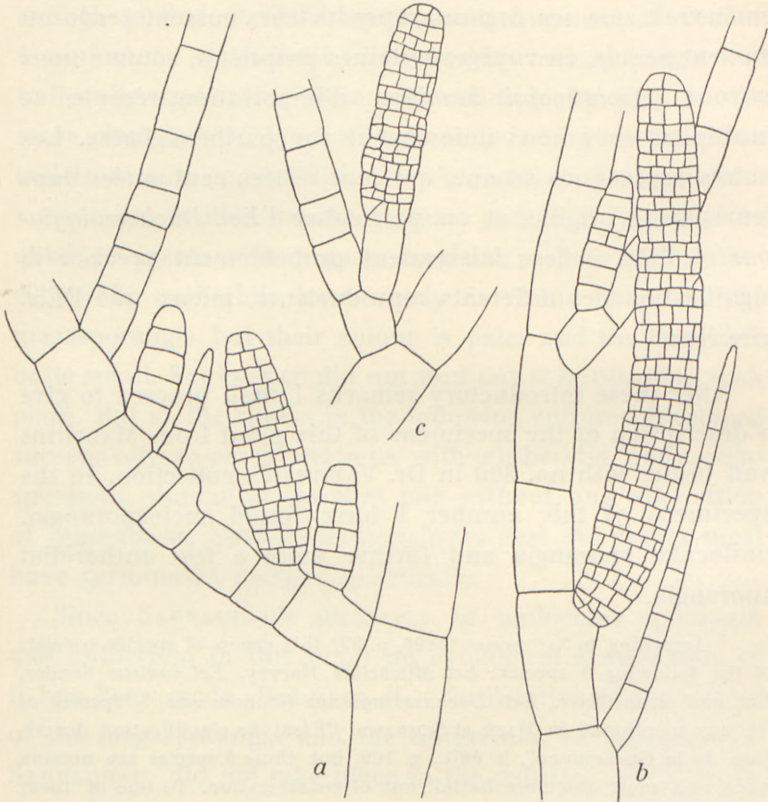


Fig. 1. *Ectoc. Mitchellae* Harv.

a, part of a typical form; *b*, a long sporangium; *c*, a pedicellate sporangium. ($\times 350$).

sporangia are nearly always sessile, SAUVAGEAU in his diagnosis of the species (1896, p. 38) also says "semper sessilibus"; nevertheless it may happen, even though it is rare, that a sporangium is pedicellate as Fig. 1 *c* shows. Sometimes, also, very long sporangia are found in plants in which

the sporangia are otherwise of normal size. Fig. 1 *b* shows such a sporangium the size of which is: length: $217\ \mu$, breadth: $27\ \mu$ and height of loculi: $5-6\ \mu$.

Furthermore, in this collection unilocular sporangia were present in abundance (Fig. 2). They were found in specimens in which meiosporangia also occurred. Both kind

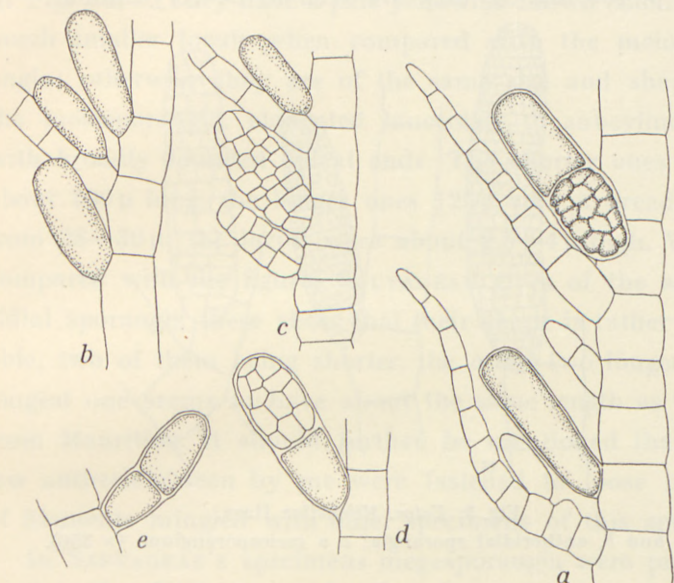


Fig. 2. *Ectoc. Mitchellae* Harv.

a, part of the thallus with unilocular sporangia, the lower part of the uppermost sporangium is plurilocular; *b*, unilocular sporangia, *c*, plurilocular and unilocular sporangia in the same filament; *d*, a sporangium the upper half plurilocular, the lower unilocular; *e*, a unilocular sporangium divided into two parts. ($\times 350$).

of sporangia are found side by side on the same filament (Fig. 2 *c*). In a few cases I have even found sporangia half of which were unilocular and the other half plurilocular (Fig. 2 *a*, *d*). Now and then a unilocular sporangium is also divided by a horizontal wall into two parts (Fig. 2 *e*). The shape and size of the unilocular sporangia agree quite well

with those found by SAUVAGEAU in plants from Guéthary; when compared with his figure the only difference seems to be that the sporangia in the plant from Mauritius are as a rule more cylindrical than the French ones. Their size was: length: 47—56 μ , breadth: 19—28 μ . When compared with my figures of those from Dwarka (BØRGESEN, 1930, p. 165, fig. 8), they are seen to be very similar.

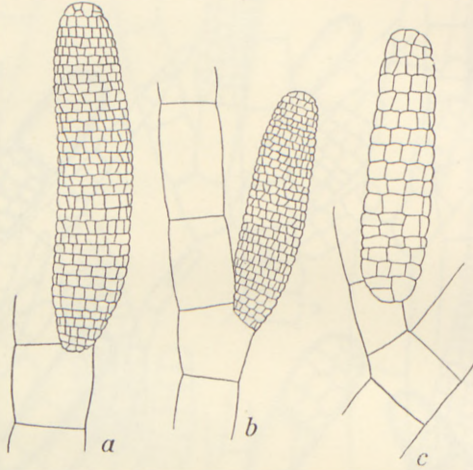


Fig. 3. *Ectoc. Mitchellae* Harv.

a and *b*, antheridial sporangia; *c*, a meiosporangium. ($\times 350$).

The phenomenon of unilocular and plurilocular sporangia occurring together in the same plant seems to be rather peculiar in the light of SVEDELIUS' observation that the meiosporangia are haploid, whereas the unilocular sporangia in conformity to what is otherwise the case must be presumed to be diploid; the plurilocular sporangia are then presumed to be diploid also. And since, as mentioned above, half a sporangium may be unilocular and the other half plurilocular, this interpretation must surely be the right one.

Instances of both kind of sporangia occurring in the same plant are also found in other species; concerning

Pylaiella littoralis see for instance DAMMANN, 1930, pp. 8—9, and MARGERIE KNIGHT, 1923, p. 355, fig. 12, and KYLIN has found that the same applies to *Ectocarpus siliculosus* (1933, p. 19).

Finally I have also succeeded in finding antheridia in this collection. Two of these antheridial sporangia are seen in Fig. 3 a, b. They have a pale yellowish-brown colour and much smaller loculi when compared with the meiosporangia; otherwise they are of the same size and shape as the meiosporangia, elongated lanceolate to subcylindrical with broadly rounded apical ends. The shorter ones were about 100μ long, the longer ones 125μ with a breadth of from $28-30\mu$; the loculi were about $2.5-4\mu$ high. When compared with the figures SAUVAGEAU gives of the antheridial sporangia these show that their shape is rather variable, two of them being shorter, the other two longer, the longest one seems to have about the same length as those from Mauritius. It should further be mentioned that the few antheridia seen by me were fastened to loose pieces of filaments mingled with other specimens of this species.

In SAUVAGEAU'S specimens megasporangia were present together with the antheridia, but in spite of much searching I have not succeeded in finding such in the material from Mauritius. According to SAUVAGEAU plants with megasporangia are upon the whole rare; while those with meiosporangia are common those with megasporangia have only been found in two places at Guéthary. Furthermore specimens with megasporangia have, as mentioned by SAUVAGEAU, been found twice at Las Palmas, Canary Islands, once by Mlle VICKERS and once by myself, and they are most probably rare there.

In another collection of Dr. VAUGHAN'S (no. 208) the specimens have unilocular as well as plurilocular sporangia

in great numbers, both occurring together in the same plant. The shape of the unilocular sporangia (Fig. 4 *a*) was somewhat broader, ovate-lanceolate, agreeing very well with SAUVAGEAU's drawings. The sporangia were 60—80 μ long and about 42 μ broad. But less broad more cylindrical sporangia were also present. Several of the meiosporangia were long.

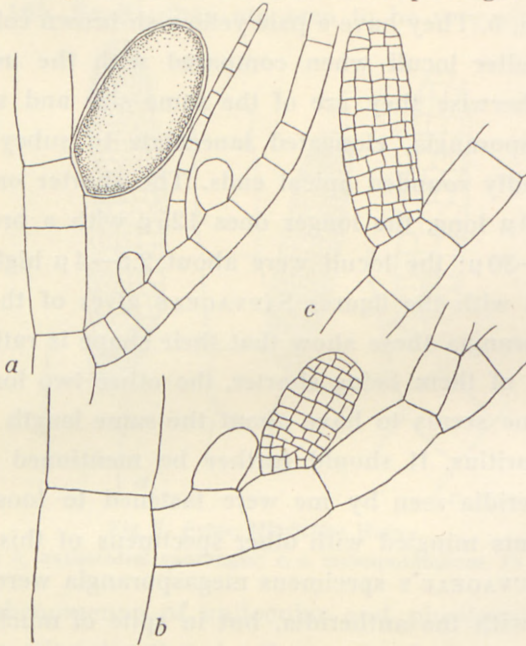


Fig. 4. *Ectocarpus Mitchellae* Harv.

a, piece of the thallus (no. 208) with a unilocular sporangium; *b*, part of a plant (no. 271) with short sporangia; *c*, a plurilocular sporangium of about normal size, from the same plant. ($\times 350$).

In a collection (no. 299) growing upon a piece of *Codium* plurilocular and unilocular sporangia were likewise found together on the same specimens. The plurilocular sporangia (all meiosporangia) had as a rule a length of 80 μ and a breadth of 28 μ but much longer sporangia were often found, for instance about 150 μ long, one being even

190 μ long. The unilocular sporangia were subcylindrical, ca. 70—80 μ long and 23—26 μ broad. In this collection, too, there occurred sporangia half of which were unilocular and the other half plurilocular (Fig. 5 *a*). Another peculiarity was that in several of the plurilocular sporangia the spores had begun to germinate. A specimen in the same collection had quite short plurilocular sporangia (Fig. 5 *b*).

In another collection (R. E. V. no. 271) the sporangia were like the above mentioned specimen, rather short, about 50 μ long only and 27 μ broad (Fig. 4 *b*), thus agreeing with those found by me in the Iranian Gulf which I called forma *brevicarpa* (1939, p. 76, figs.

16 and 17). While the sporangia in the material from Mauritius except for being short had the normal cylindrical form of this species in the Iranian material, some few sporangia of more irregular shape were met with, one even becoming broader upwards (l. c. fig. 16 *c*) and thus reminding one of *Ect. indicus*. As the loculi in some of these sporangia from the Iranian Gulf were rather small they might be antheridia which, according to SAUVAGEAU's figure (1933, Fig. 16), have a rather variable shape. In agreement with the Iranian plant I presume that the plant from Mauritius with short sporangia, too, is like *Ect. amicum* Harv., Friendl. Isl. Alg., no. 8, of which, I must admit, I have not seen any specimen, but about which GRUNOW (1874,

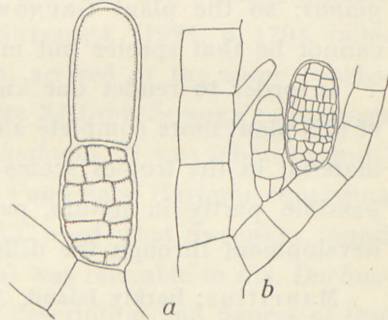


Fig. 5. *Ectoc. Mitchella* Harv.
a, a sporangium plurilocular below, unilocular above. *b*, part of a plant with short plurilocular sporangia.
(*a*, $\times 450$; *b*, $\times 350$).

p. 24) writes: "scheint mir von *Ect. indicus* nur sehr schwach durch etwas kürzere Zoosporangien verschieden zu sein". And the reason why I take it for granted that the plant GRUNOW calls *Ect. indicus* is like *Ect. Mitchellae* and not like *Ect. indicus* SONDER as I interpret this species in this paper, is that GRUNOW himself has created *Ect. Duchassaingianus*; so the plant GRUNOW refers to SONDER'S species cannot be that species but must surely be *Ect. Mitchellae*.

In order to render our knowledge of the development of this plant more complete a detailed examination of living material in the tropics seems necessary; it would then be possible partly in nature, partly in cultures, to study its development through the different seasons of the year.

Mauritius: Barkly Island, Aug. 1839, R. E. V. no. 332. Point aux Roches, "on *Sargassum*", R. E. V. no. 271. Some other specimens of Dr. VAUGHAN, nos. 300, 299 and 208 without localities. Geogr. Distr.: Widely distributed in warm seas.

2. *Ectocarpus indicus* Sonder.

SONDER, in ZOLLINGER, Verz. der im Ind. Arch. ges. Pflanzen, 1854, p. 3, not seen, but SONDER'S diagnosis is reprinted by ASKENASY in "Alg. Gazelle", p. 19¹. WEBER, A., Algues Siboga, 1913, p. 129, fig. 34. — *Ect. Duchassaingianus*, Grunow, Alg. Novara, 1870, p. 45, tab. IV, fig. 1a, b, c. BØRGESEN, Mar. Alg. D. W. I., vol. I, 1914, p. 159, figs. 127—8. SETCHELL, W. A., American Samoa, 1924, p. 170, fig. 35.

Happening to find in a glass from Dr. VAUGHAN'S collection an *Ectocarpus* referable to *Ect. Duchassaingianus* Grun., agreeing with my description and figures of this species in Mar. Alg. D. W. I., vol. I, p. 159, I felt inclined to carry out a comparative investigation of this species and other related forms. Among these I took in consideration also

¹ The plant ASKENASY here refers to *Ect. indicus* is in my opinion not SONDER'S plant, but a form of *Ect. Mitchellae* with short sporangia.

the figure of *Ect. indicus* Sonder which Mme WEBER has drawn after SONDER's original specimen, and suddenly it struck me that this figure was most certainly drawn after a specimen of a plant identical with *Ect. Duchassaingianus*, not only the figure but also her description of it answering very well to this species. Accordingly I went through the literature and discovered that this was my opinion already in 1914 (p. 160) and later SETCHELL (1924, p. 170), independently of my observation, arrived at the same conclusion that Mme WEBER's figure 34 from SONDER's specimen is referable to *Ect. Duchassaingianus*. It was when examining a tuft of *Ectocarpus* from Pago Pago Harbour consisting of 4 different species (nos. 1137 a—d) that SETCHELL found that one of these (no. 1173 b) was referable to *Ect. Duchassaingianus*, agreeing with my description and figures of this species.

But while I quite agree with SETCHELL regarding this determination, I regret that I am not able to join him in his identification of another plant found in the same collection (no. 1173 a) which is referred to *Ect. indicus* Sonder. Because of SETCHELL's description, measures of sporangia and the good figure accompanying the description I feel sure in agreement with what I have previously suggested that this figure originates from a plant referable to *Ectocarpus Mitchellae* Harv. as at any rate now I look upon this species in accordance with my description and figures of it given above.

The arguments upon which SETCHELL bases his point of view concerning Mme WEBER's figure of SONDER's plant are as follows. SETCHELL presumes that SONDER's plant, like the tuft of *Ectocarpus* from Pago Pago Harbour, is composed of several species of *Ectocarpus*, and that SON-

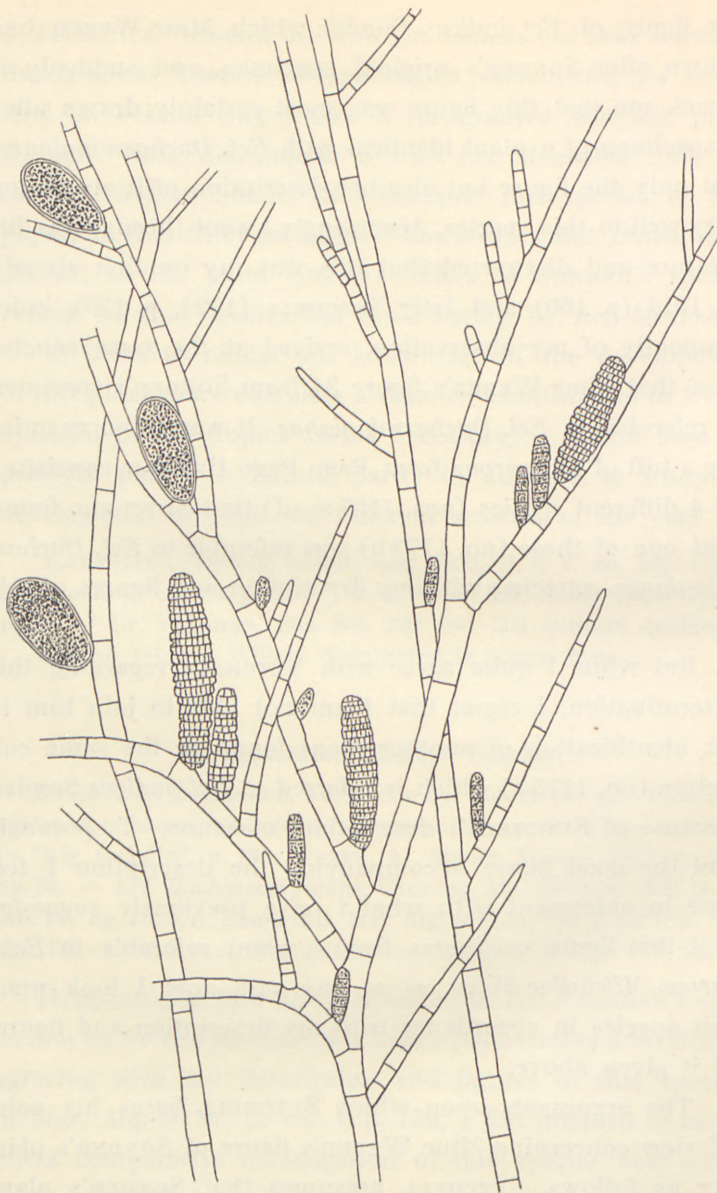


Fig. 6. *Ectocarpus indicus* Sonder.
Fragments of the thallus with plurilocular and unilocular sporangia.
($\times 175$).

DER's description is based upon one species in the tuft and Mme WEBER's figure upon another since SETCHELL does not think that her figure agrees very well with SONDER's description.

SETCHELL writes: "SONDER says, "bipollicaris vel ultra", but Mme WEBER's plant is, judging from her figure, not much over 0.333 to 0.25 of an inch (about 0.5 cm) high. In the second place, SONDER's description reads: "Filis decomposito-ramosissimis, ramis ramulisque alternis subsecundis". Mme WEBER's plant can not be called "decomposito-ramosissimis". It is thus its small size and its ramification which prevent SETCHELL from referring the plant Mme WEBER has drawn to SONDER's species, nevertheless it is referred to *Ect. Duchassaingianus* about which I say in my description of it that in the West Indies it forms tufts up to 4 cm high. And further, as regards its ramification, it is a very variable and often much ramified plant as is also pointed out in the description below of the specimens from Mauritius.

And there is one thing more I should like to point out in favour of my view. Mme WEBER says distinctly (1933, p. 131) that she has examined several authentic specimens of SONDER ("mais l'étude des échantillons authentiques de SONDER"). Would it not be strange that, if SONDER's specimens really consists of several species, she should not have met with some of the others? I therefore do not see any objection to the assumption that Mme WEBER's figure is like *Ect. indicus* Sonder.

And as we have now in Mme WEBER's figure of SONDER's authentic specimens a reliable representation of it, it seems to me most opportune to take this first published figure of SONDER's plant as a representation of his species.

Then we should also in a way be in accordance with Mme WEBER, even though the identity of SONDER's plant with *Ect. Duchassaingianus* did not occur to her.

Consequently GRUNOW's specific name from 1870, since SONDER's dates from 1855, has to be replaced by *Ect. indicus* Sonder. If this be done, this species, questionable for so many years, will no longer cause us trouble.

This species, as interpreted here, was at first described by SONDER upon material from Bima, where it was also later collected by Mme WEBER. GRUNOW described *Ect. Duchassaingianus* (1870, p. 45, pl. IV, fig. 1 a, b, c) upon material from Guadeloupe. Later I have found it in the former Danish West Indies, where it was a very common species.

Referring to my former description and figures (1915, p. 159) where the irregular ramification and the variable shape of the plurilocular sporangia are reported, I may mention here that in the material from Mauritius I have twice met with this species. In these two collections the plant was rather differently developed, most probably due to the external conditions of life. One of them (R. E. V. no. 332) forms a 3—4 cm high tuft composed of long and flabby very little ramified, loosely intermingled filaments with very few sporangia; some of these are drawn in figure 7 a, b, c. This plant has most probably lived in a sheltered locality with stagnant water. In the other collection (R. E. V. no. 287) the thallus of the plant, being an epiphyte upon *Acanthophora*, was small, only $\frac{3}{4}$ cm high; it was densely ramified with numerous dark brown plurilocular sporangia and also some unilocular sporangia (Fig. 6). This plant, I presume, has grown in a strong light and a more exposed locality.

The plurilocular sporangia of this species are rather irregularly shaped, often clavate becoming thicker upwards, or they may be more or less swelled in their middle, and their margin is uneven. They are mostly sessile but now and then stipitate, or they may be terminally placed upon

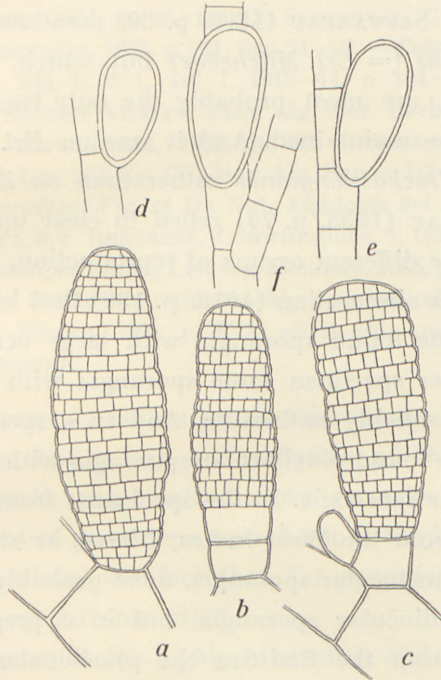


Fig. 7. *Ectocarpus indicus* Sonder.

a, b, c, three plurilocular sporangia, two of which are pedicellate. *d, e, f*, three unilocular sporangia. (*a, b, c*, $\times 450$; *d, e, f*, $\times 350$).

shorter or longer branches; but being a variable plant in some specimens, for instance that of which a part is shown in figure 6, no pedicellate sporangia were present, nor were the sporangia particularly clavate. The loculi in the plurilocular sporangia are about $5-6\mu$ high. The unilocular sporangia occurring together with the plurilocular ones in the same plant (Fig. 6) are obovate-pearshaped with thick

walls and rather large, the three sporangia pictured (Fig. 7 *d, e, f*) having a length of 90 μ , 120 μ and 133 μ respectively, while the breadth varied from 32 μ —57 μ ; their shape and size agree very well with those from the West Indies.

Ectoc. indicus belongs to the group of 9 species of *Ectocarpus* which SAUVAGEAU (1896, p. 39) mentions as related to *Ect. virescens* (= *Ect. Mitchellae*) but which, as said in the note p. 9, are most probably the only two species of the nine to be maintained. And it was on *Ect. indicus* including *Ect. Duchassaingianus* rather than on *Ect. virescens* that SAUVAGEAU (1933, p. 79) relied to clear up the signification of the different organs of reproduction, referring to Mme WEBER's observation (1913, p. 130) that in specimens from Bima she found sporangia with large oculi (7—8 μ) and in another specimen some sporangia with very small loculi most probably antheridia. And in a specimen from Kangeang she found plurilocular sporangia with large loculi and unilocular sporangia. In the specimens from Mauritius, as in those from the West Indies, I have, as stated above, found only plurilocular sporangia, most probably meiosporangia, and unilocular sporangia, but in a preparation of this species from the Red Sea the plurilocular sporangia had very small loculi about 3—4 μ high and therefore are surely antheridia. Megasporangia, on the other hand, I have looked for in vain in the material I have examined.

But, as already stated about *Ect. Mitchellae*, the examination of living material in connection with cultures is necessary to be able to clear up the life-history of these species.

Mauritius: Flic-en-Flacq, 31. Dec. 1938, R. E. V. no. 287. Barkly Island, R. E. V. no. 332.

Geogr. Distr.: West Indies, Red Sea, Malay Archipelago, American Samoa etc.

3. *Ectocarpus irregularis* Kütz.

KÜTZING, *Phycologia germanica*, 1845, p. 234; *Spec. Alg.* p. 454; *Tabul. Phycol.*, vol. V, 621. HAUCK, *Meeresalgen*, 1885, p. 328. BORNET, *Algues* SCHOUSBOE, 1892, p. 245. KUCKUCK in OLTMANN'S, *Morphologie*, 1922, vol. II, p. 9, fig. 294. BØRGESEN, *Mar. Alg. Canar. Isl.*, II, *Phaeophyceae*, 1926, p. 25, figs. 12—14. HAMEL, G., *Phéophycées de France*, *Ectocarpaceae*, 1931, p. 45, fig. 13. SAUVAGEAU, C., *Sur quelques Algues Phéosporées*, 1933, p. 101, figs. 24—26. — *Ectocarpus coniferus* Børgs., *Mar. Alg. D. W. I.*, vol. I, 1913—14, p. 164—9, figs. 131—32. *Ectocarpus Rallsiae* Vickers, *Liste Alg. mar. Barbade*, 1905, p. 59; *Phycologia Barbadosensis*, 1908, pl. 32. BØRGESEN, F., *Mar. Alg. D. W. I.*, vol. I, p. 169, fig. 133; *Mar. Alg. Canar. Isl.*, II, p. 23, fig. 11. *Ectocarpus arabicus* Fig. et De Not., *Algologia del Mar Rosso*, 1853, p. 169, fig. Va, b, c. BØRGESEN, *Contributions*, I, 1937, p. 5—8, fig. 1. *Ectocarpus coniger* Børgs., *List Alg. Bombay*, 1935, p. 31, figs. 14—16.

HAMEL in the introduction to his very valuable work: *Phéophycées de France*, 1939, p. XVII refers this species to his new genus *Feldmannia*.

Dr. VAUGHAN'S collection contains several specimens of this species but before a description of them is given I wish to make some introductory remarks in connection with the list of synonyms named above the length of which list is caused by the fact that *Ect. irregularis* has proved to be a very variable plant.

SAUVAGEAU in his highly interesting and valuable paper (1933, p. 101) has given a detailed description with instructive figures of various forms of *Ectocarpus irregularis* Kütz. based upon material from Biarritz and Guéthary. Of the specimens examined by SAUVAGEAU one plant, growing upon *Lithothamnion*, had the sporangia produced in short rows at the base of the branches, very like the West Indian *Ect. coniferus* described by me in 1913; and another form, the basal creeping filaments of which were immersed in *Codium adhaerens* had very large sporangia narrowed at their upper ends, completely like those found in *Ect. Rallsiae* Vickers

likewise from the West Indies. Because of his discovery of these forms SAUVAGEAU also makes comparisons with the West Indian species and as a result of his examination he concludes: "Ainsi, ces trois espèces . . . n'offrent entre elles que des différences légères. Ne connaissant les *Ect. Rallsiae* et *Ect. coniferus* que par les descriptions d'A. VICKERS et de BØRGESEN, je n'ai pas à prendre parti dans la question de leur indépendance spécifique". To this I wish to say that SAUVAGEAU's discoveries must be said to eliminate altogether all doubt as to the specific connection of these three species. When in 1913 I described *Ect. coniferus* the European *Ect. irregularis* was poorly known as KÜTZING's figure (l. c., tab. 62 I) is rather misleading and his description not much better. The most complete description from that time was BORNET's (1892, p. 245) but it is without figures and as said by himself to be based on badly preserved material. When I discovered the West Indian plant I therefore asked my regretted friend KUCKUCK for information about *Ect. irregularis*, knowing that at that time he was working at a monographic treatment of the genus *Ectocarpus*. KUCKUCK sent me for comparison a splendid drawing of this species, as far as I remember the original drawing of the figure later published in OLTMANN'S, "Morphologie", 1922, p. 9, fig. 294. On comparing this figure with the West Indian plant the near relationship of both plants was clear to me, but some differences were present. First of all, as shown in my figure 131 (BØRGESEN, 1914, p. 165), must be mentioned the characteristic unilateral arrangement of the sporangia in shorter or longer, often interrupted rows upon the upper side of the branches at their basal parts, whereas in KUCKUCK's figure the sporangia were placed solitarily and scattered up along the fila-

ment. But after SAUVAGEAU has succeeded in finding the same arrangement of the sporangia in the European plant this difference has been eliminated.

Regarding its geographical distribution *Ect. irregularis* was at this time known only from the Atlantic shores of Europe, from South England to the Golf de Gascogne and the Mediterranean Sea, a fact that also seemed rather important to me when creating the species, but later it has been found that *Ect. irregularis* has a very large area of distribution in warmer seas, in this and other respects forming a parallel to *Ect. Mitchellae* with which it often occurs intermingled. As it seems of interest in this connection to give some information about the distribution of this species I will briefly mention some dates here.

SAUVAGEAU (1933, p. 104) remarks: "L'*Ectocarpus irregularis* (ou une espèce affine) habite aussi l'Océanie." He refers to the plant from the Malayan Archipelago which Mme WEBER in "Liste", p. 131, figs. 35—36 mentions as *Ectocarpus spec.*, but which no doubt is *Ect. irregularis*.

And the plant from the island Vavau which ASKENASY in "Alg. Gazelle", 1888, p. 20, tab. V, figs. 1, 11, 14 calls *Ect. simpliciusculus* Ag. is most certainly a mixture of *Ect. irregularis* (Fig. 14), *Ect. Mitchellae* (Fig. 11) and *Ect. indicus* (Fig. 1) as I take these species. Likewise the plant from Deception Bay called by ASKENASY (1894, p. 8, pl. I, fig. 6 and pl. II, figs. 7 and 8) *Ect. indicus* is sure to be a mixture of *Ect. irregularis* and *Ect. Mitchellae*, the plant pictured in figs. 6 and 7 being referable to *Ect. Mitchellae*, whereas fig. 8 and most probably also fig. 9 on the same plate (determined as *Ect. simpliciusculus* var. *vitiensis*) are *Ect. irregularis*. It is more difficult to interpret what *Ect. indicus*, ASKENASY (1888, p. 19, pl. V, figs. 2, 10) is; but as ASKENASY says

about it that the sporangia are present in few numbers, and judging also from the figures, it seem likely that the material ASKENASY examined must have been young specimens of *Ect. Mitchellae*, the lowermost sporangium in fig. 10 being drawn with too pointed a summit.

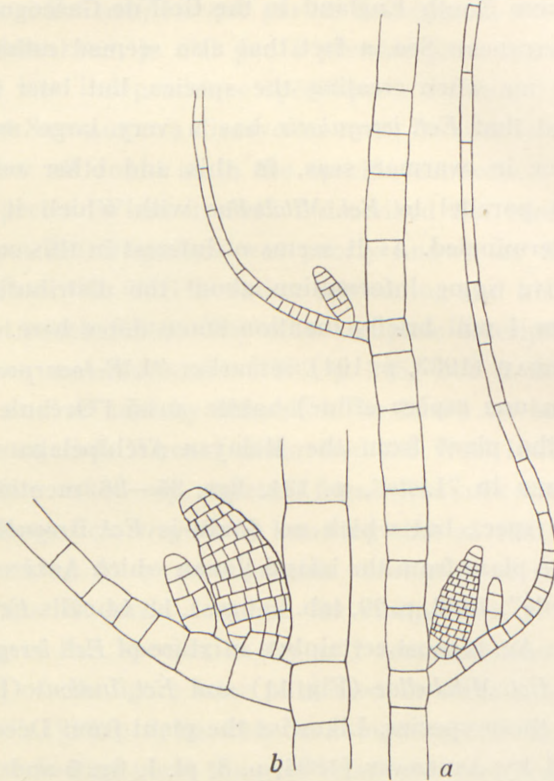


Fig. 8. *Ectocarpus irregularis* Kütz.
Parts of the thallus. (a, $\times 220$; b, $\times 350$).

Besides in the West Indies I have found *Ect. irregularis* at the Canary Islands; in my treatise (1926, p. 23 and p. 25) on these islands I called it *Ect. irregularis* and partly also *Ect. Rallsiae* because of the size of the sporangia which were often pedicellate, too.

Hence I do not hesitate to refer to this species the *Ectocarpus spec.* from Easter Island mentioned in my paper 1920, p. 257, fig. 8; the shape and size of the sporangium drawn in my figure agree very well with *Ect. irregularis*.

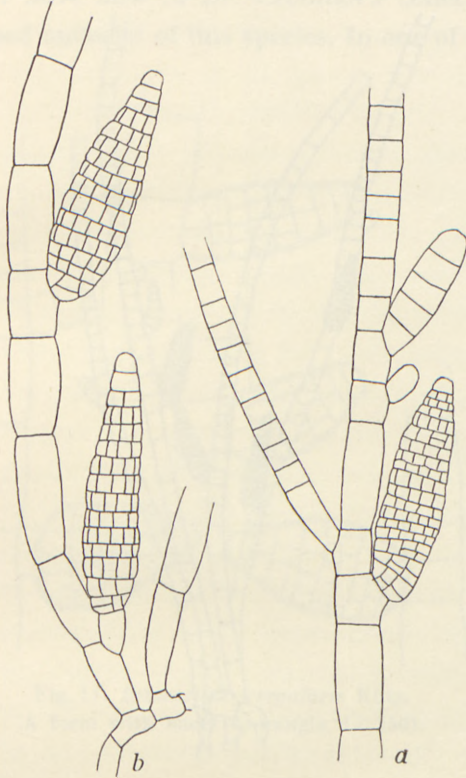


Fig. 9. *Ectocarpus irregularis* Kütz.

a, part of a filament higher up in the thallus; *b*, plurilocular sporangia from near the base of a plant. ($\times 350$).

Further it occurs in South India, where at first I referred it to *Ect. coniferus* (Contributions, I, 1937, p. 5) but later in a postscript in the same paper p. 7 to *Ect. arabicus* Figari et De Notaris. The authors described their species upon material from the Red Sea from where, thanks to

Dr. NASR (the University of Cairo), I have had the opportunity to examine well developed material and to ascertain that the plant from the Red Sea is in very good accordance with the West Indian plant, having often rather long rows

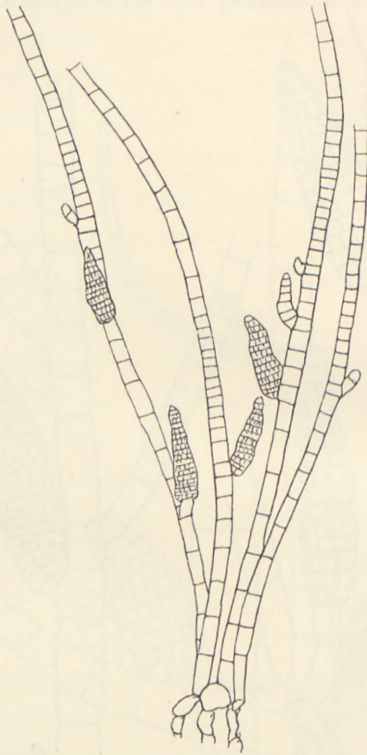


Fig. 10. *Ectocarpus irregularis* Kütz.
A young specimen. ($\times 80$).

of sporangia upon the up-turned sides of the branches. Unfortunately I had not yet at that time arrived at the conclusion that the West Indian and the European plants were the same, otherwise I should already then have referred the Indian plant and that from the Red Sea to *Ect. irregularis*. And according to my present conception of *Ect. irregu-*

laris, *Ect. coniger* which I described in 1935, p. 31 upon material from Bombay should rather be referred to *Ect. irregularis* as the characters upon which I based this species occur also in *Ect. irregularis*.

Finally I have now in Dr. VAUGHAN'S collection found well developed material of this species. In one of his gather-

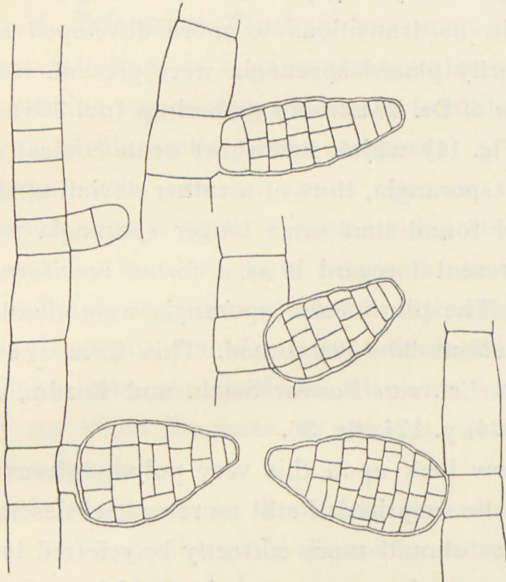


Fig. 11. *Ectocarpus irregularis* Kütz.
A form with short sporangia. ($\times 350$).

ings (no. 293) it was growing upon *Chnoospora implexa*. Fig. 8 shows parts of the plant with axillarily placed sporangia like SAUVAGEAU'S fig. 24; now and then the sporangia also occur scattered upon the main filaments (Fig. 9a). Some of the specimens upon *Chnoospora* were young (Fig. 10), agreeing well with SAUVAGEAU'S figures 25—26 of young plants found by him upon *Codium adhaerens*. From the basal filaments immersed in the cryptostomes of the host

plant erect, still unbranched, filaments protrude which, according to their age, have a zone of division lower or higher up in the filaments, and below this zone, often from near the base, several large elongated conical sporangia issue, reminding one of those of *Ectocarpus Rallsiae* (Fig. 9b). That these specimens, in spite of their deviating appearance, really were young plants of *Ect. irregularis* was easy to ascertain as transitions to more developed specimens with axillarily placed sporangia were present, too.

Another of Dr. VAUGHAN'S gatherings (no. 306) contained a plant (Fig. 11) which had short ovate-conical and often pedicellate sporangia, thus of a rather deviating shape; but after I had found that some longer sporangia were occasionally present I regard it as a forma *brevicarpa* of *Ect. irregularis*. The plurilocular sporangia were about 60—70 μ long and about 30—40 μ broad. This form shows much likeness to *Ect. van Bosseae* Setch. and Gardn., American Samoa, 1924, p. 171, fig. 36.

As I now look upon this very polymorphous species I should not be surprised if still more species described from tropical seas should more correctly be referred to this species. Of some of my own species which perhaps might come into consideration I may mention *Ect. filifer* and *Ect. thyrsoides* (BØRGESEN, Contributions, I, p. 10 and p. 12), both perhaps being only young specimens of *Ect. irregularis*. As both plants were growing upon *Liagora erecta* found in a very restricted locality it will surely be an easy matter to find more and better developed material upon which the question can be decided. And *Ect. cryptophilus* (BØRGESEN, 1931, p. 78) also may very well be a young stage of *Ect. irregularis*.

Mauritius: Tamarin Bay, "upon *Chnoospora implexa* in deep pools behind reef", R. E.V. no. 293; Savinia, Aug. 39, R. E.V. no. 306; Barkly Island, "on *Acanthophora*", R. E.V. no. 338.

Geogr. Distr.: From the English coast southwards to the Canary Islands, Northamerican coast, West Indies, Mediterranean Sea, Red Sea, Arabian Sea, Indian Ocean, Malayan Archipelago, Australia, Easter Island, Pacific Ocean.

4. *Ectocarpus Vaughani* nov. spec.

Frons caespitulosa, ca. 1—2 cm alta, ex filamentis repentibus, irregulariter ramosis, plus minus in frondibus hospitis nidulantibus, et filamentis erectis composita.

Filamenta erecta, ramosa, ramos alternos, sparsos vel oppositos, sub angulis acutis exeuntes, suberectos gerentia.

Filamenta in inferiori parte ad septa constricta, ca. $30\ \mu$ lata, ad apicem versus gradatim attenuata, ca. $15\ \mu$ lata et in pseudopila transformata. Articuli filamentorum per divisionem intercalarem divisi, diametro fere aequales vel duplo aut triplo longiores, in summis ramorum 5—6 plo vel ultra longiores.

Sporangia plurilocularia sessilia aut interdum pedicellata, sparsa aut opposita, ovato-ellipsoidea aut plus minus conico-elongata, apicibus plus minus rotundatis, $70\text{--}76\ \mu$ interdum ad $87\ \mu$ longa et $28\text{--}35\ \mu$ lata. Megasporangia vel meiosporangia vel antheridia praesentia sunt.

Mauritius: Flic-en-Flacq, on *Nemacystus decipiens*, "in shallow water near shore", 31 Dec. 1938, R. E.V. no. 252. Tamarin Bay, on *Chnoospora implexa*, "in pools behind reef". R. E.V., no. 293.

This fine little plant (Fig. 12) grows upon *Nemacystus decipiens* in the tissue of which its decumbent creeping basal filaments are more or less imbedded, and upon *Chnoospora implexa*.

It forms small tufts up to a height of about 1500 μ . The filaments of which the tuft is composed are ramified up

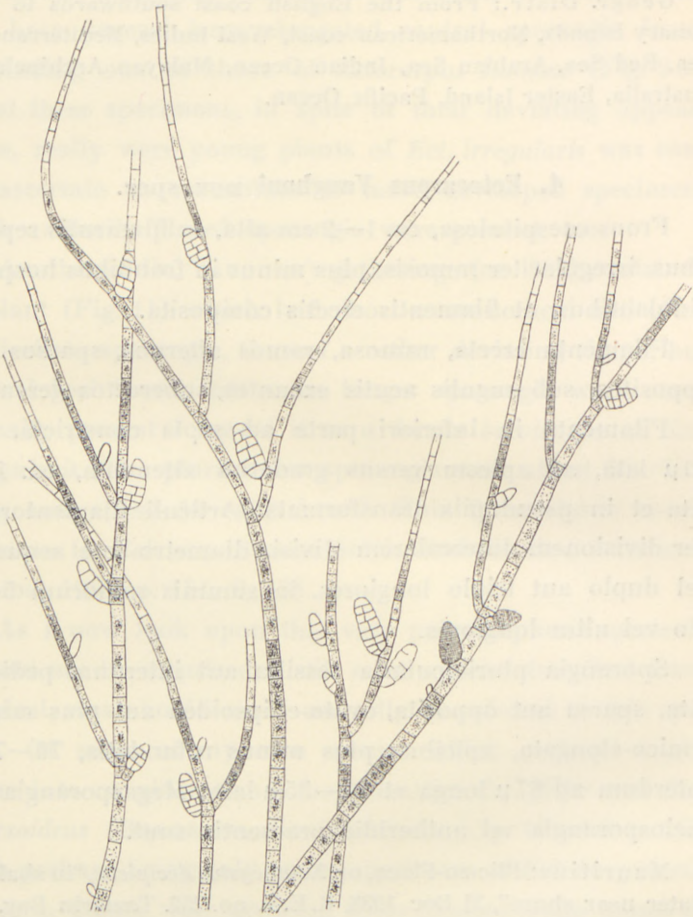


Fig. 12. *Ectocarpus Vaughani* nov. spec.

Some filaments of a tuft with megasporangia and antheridia. (\times ca. 100).

to $\frac{2}{3}$ of their height and carry sporangia; then follows a zone of division above which the filaments run out into long hair-like ends. Below the zone of division the cells in the filaments are divided intercalarily here and there,

and some short zones of division may be found, too. Because of this mode of division the length of the cells vary much.

The decumbent filaments (Fig. 13 *a*) are about 14—20 μ thick and composed of cells $1\frac{1}{2}$ —3 times as long. From these filaments the erect ones arise. These are slender at

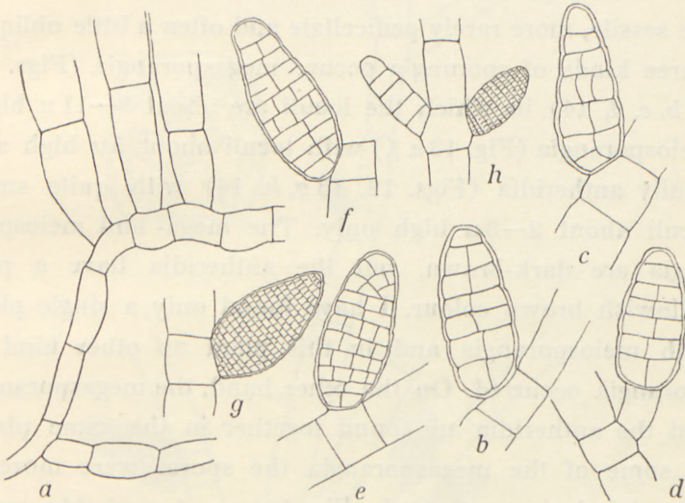


Fig. 13. *Ectocarpus Vaughani* nov. spec.

a, part of the base of a plant; *b, c, d*, megasporangia; *e, f*, meiosporangia; *g, h*, antheridia. ($\times 350$).

their bases, about 15—20 μ , but become quickly broader, the thicker part of the filaments reaching a diameter of about 30 μ , whereupon they taper slowly upwards, the hairlike ends being only about 15 μ broad. In the lower parts of the filaments these are a little narrowed at the transverse walls.

The ramification is irregular, the branches issuing either scattered or more or less unilaterally, now and then also two opposite branches are found; the sporangia likewise are given out scattered, oppositely, or a sporangium and a branch may be oppositely placed (Figs. 12, 13, 14).

The cells from which the branches and the sporangia issue are short. The chromatophores are roundish or more irregularly shaped discs (Fig. 14 b).

The plurilocular sporangia are ovate-conical to subcylindrical bodies about 70—76 μ long, the longest one observed was 87 μ long; their breadth lies between 28—35 μ . They are sessile, more rarely pedicellate and often a little oblique. Three kinds of sporangia occur: megasporangia (Figs. 12, 13 b, c, d, 14) in which the loculi are about 9—11 μ high, meiosporangia (Fig. 13 e, f,) with loculi about 5 μ high and finally antheridia (Figs. 12, 13 g, h, 14) with quite small loculi about 2—3 μ high only. The mega- and meiosporangia are dark-brown, but the antheridia have a pale yellowish brown colour. I have found only a single plant with meiosporangia and in this plant no other kind of sporangia occurred. On the other hand, the megasporangia and the antheridia are found together in the same plant. In some of the megasporangia the spores were more or less globularly contracted (Fig. 14) most probably ready for liberation. They remind one very much of those found in *Ect. Mitchellae* as described and figured by SAUVAGEAU 1896, p. 32—33, fig. 7 A.

Unilocular sporangia were looked for in vain.

The above description is based upon the specimens growing upon *Nemacystus decipiens*; those found upon *Chnoospora implexa* agree perfectly with those of *Nemacystus* with the exception that in these specimens only megasporangia occurred; this may be due to the plant having been gathered at another time of the year, but as the date is not mentioned this cannot be said with certainty.

This species comes near to *Ect. Padinae* (Buffh.) Sauvag. and related species, in which megasporangia, meiospor-

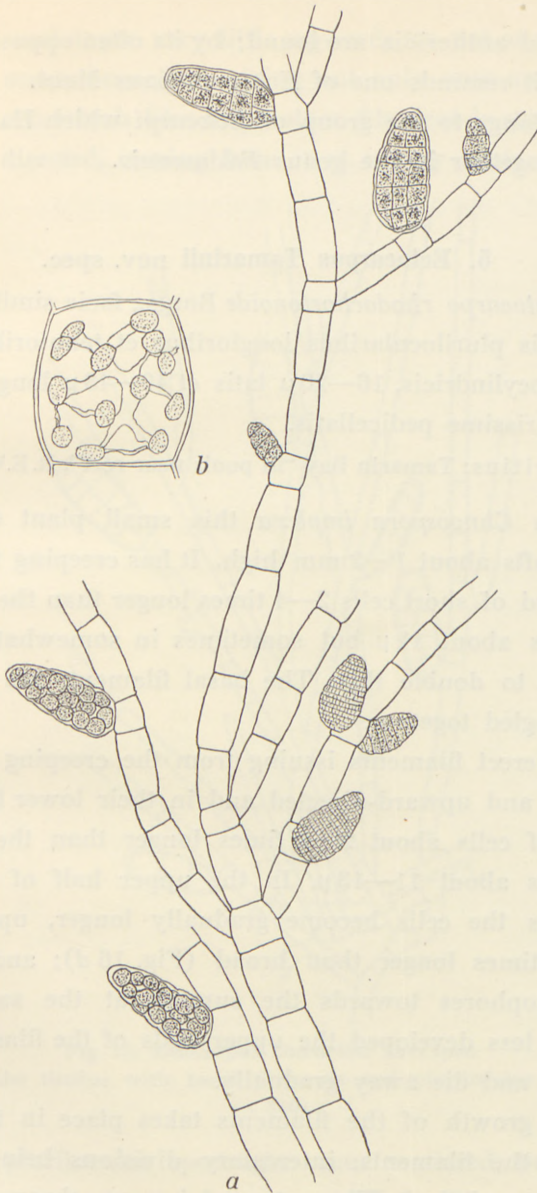


Fig. 14. *Ectocarpus Vaughani* nov. spec.

a, fragments of the thallus with antheridia and megasporangia, in some of these the spores have become roundish, probably ready for liberation;
b, a cell with chromatophores. (*a*, $\times 350$; *b*, \times ca. 800).

angia and antheridia are found; by its often opposite ramification it reminds one of *Ect. paradoxus* Mont.

It belongs to the group of *Ectocarpus* which HAMEL has placed together in the genus *Feldmannia*.

5. *Ectocarpus Tamarinii* nov. spec.

A *Ectocarpus rhodochortonoides* Børgs., facie simile, differt sporangiis plurilocularibus longioribus et tenuioribus, ovalibus-subcylindricis, 16—20 μ latis et 40—48 μ longis, sessilibus, rarissime pedicellatis.

Mauritius: Tamarin Bay "in pools near reef", R.E.V. no. 293.

Upon *Chnoospora implexa* this small plant (Fig. 15) forms tufts about 1—2 mm high. It has creeping filaments composed of short cells 2—4 times longer than the breadth which is about 12 μ but sometimes in somewhat inflated cells up to double this. The basal filaments are more or less mingled together.

The erect filaments issuing from the creeping ones are straight and upward-directed and in their lower half composed of cells about 2—4 times longer than the breadth which is about 11—13 μ . In the upper half of the erect filaments the cells become gradually longer, upmost up to ten times longer than broad (Fig. 16 *d*); and as the chromatophores towards the summit at the same time become less developed the upper ends of the filaments are hairlike and die away gradually.

The growth of the filaments takes place in the lower part of the filaments, intercalary divisions being carried out here and there. The not very vigorous chromatophores (Fig. 16 *e*) are irregularly ribbonlike or form shorter or longer plates with large openings. The filaments are cy-

lindrical and taper very little upwards or not at all. They are not much branched, giving out only now and then a side branch which like the mother filament is straight and upward-directed, issuing from it at a very acute angle.

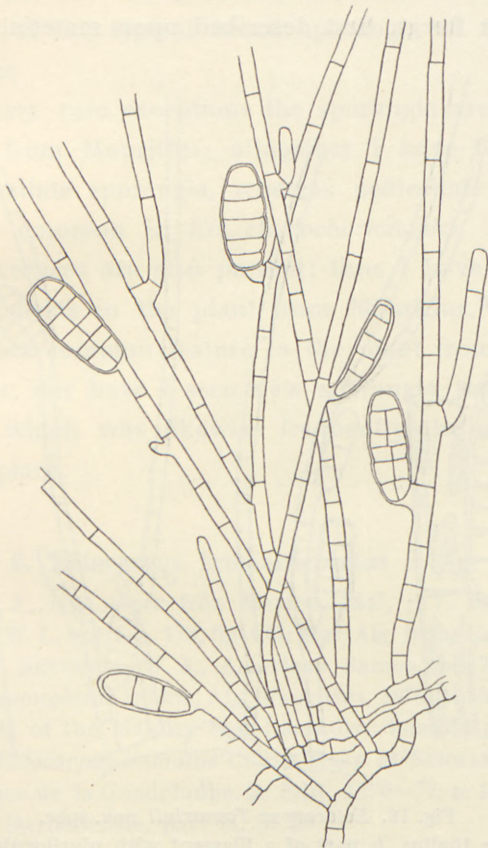


Fig. 15. *Ectocarpus Tamarinii* nov. spec.

Parts of the thallus with basal filaments and plurilocular sporangia.
($\times 350$).

The plurilocular sporangia occur scattered, but not in great numbers, in the lower part of the filaments. They are nearly always sessile, only a few times have I seen pedicellate sporangia (Fig. 16 *a, c*).

The sporangia are oval-subcylindrical in shape with broadly rounded bases and apices, about 16—20 μ broad and 40—48 μ long.

This small *Ectocarpus* is closely related to *Ect. rhodochortonoides* Børgs. first described upon material from the

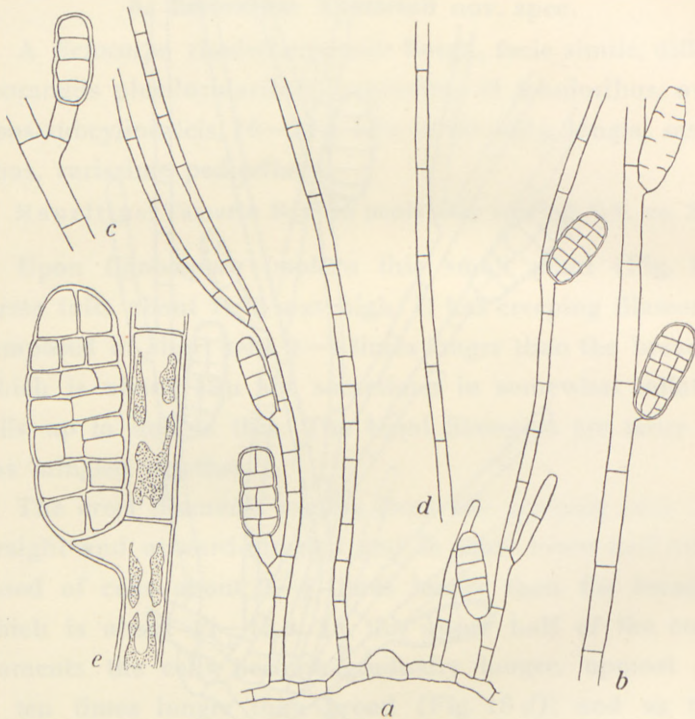


Fig. 16. *Ectocarpus Tamarinii* nov. spec.

a, part of the thallus, *b*, part of a filament with plurilocular sporangia, the uppermost emptied; *c*, a pedicellate sporangium; *d*, the uppermost nearly colourless hairlike ends of the filaments. *e*, a plurilocular sporangium. (*a* and *d*, \times ca. 250; *b* and *c*, \times 350; *e*, \times ca. 800).

West Indies (1914, p. 170), but later found also by me at the Canary Islands (1926, p. 9). The plant from the last-mentioned locality has, besides the typical short and broad plurilocular sporangia, also some more slender, ellipsoidal-

cylindrical sporangia (compare Fig. 6, l. c.). But even if some of these slender sporangia may resemble in shape the sporangia found in the plant from Mauritius I have, on the other hand, never in the last-mentioned plant found any of the typical broad sporangia of *Ect. rhodochortonoides*.

With very rare exceptions the sporangia are sessile in the plant from Mauritius; altogether I have found only 3—4 pedicellate sporangia, whereas pedicellate sporangia are rather common in *Ect. rhodochortonoides*. And some minor differences are also present; thus I have never met with any sheets in the plant from Mauritius, while this was a rather common feature in the plant from the Canary Islands, nor have I seen new sporangia replacing the old ones, which was likewise frequently the case in the Canarian plant.

6. *Ectocarpus breviarticulatus* J. Ag.

AGARDH, J., *Nya alger från Mexico*, 1847, p. 7. BØRGESSEN, F., *Mar. Alg. D. W. I.*, vol. I, p. 173, fig. 136; *Mar. Alg. from Easter Island*, p. 256, fig. 7. SETCHELL, W. A., *American Samoa*, p. 171, fig. 37. — *Ectocarpus spongiosus* Dickie, *Alg. Mauritius*, 1875, p. 191. E. S. BARTON, *Mar. Alg. of the Maldive and Laccadive Islands*, p. 479, pl. 13, figs. 9—13. *Ectocarpus hamatus* Cr. in MAZÉ et SCHRAMM, *Essai de classif. Algues de la Guadeloupe*, 2e Édit., 1870—77, p. 111. VICKERS, *Phycologia Barbadosensis*, part II, pl. 29.

The plant from Mauritius agrees quite well with the West Indian one. The filaments have a breadth of up to about 35μ and the sporangia a length of 50 — 55μ and a breadth of about 45μ .

The plant has decumbent creeping filaments (Fig. 17) by which it is fastened to the substratum, most frequently rocks, but once it was also found as an epiphyte upon

Chnoospora fastigiata. According to Dr. VAUGHAN the plant forms light brown much entangled tufts about 3—5 cm high and occurs in exposed places dashed by the waves.

It is well known that KUCKUCK until his sudden death in the spring of 1918 was at work on the monograph on the *Phaeophyceae*, some parts of which W. NIENBURG has edited in "Fragmente einer Monographie der *Phaeosporeen*"; of the *Ectocarpaceae* KUCKUCK had made a series of splendid

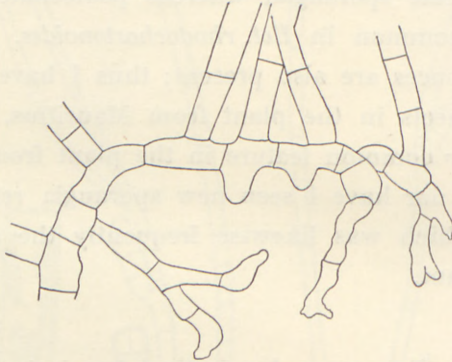


Fig. 17. *Ectocarpus breviararticulatus* J. Ag.
Basal part of a tuft. ($\times 250$).

drawings but the text was too fragmentary to be published in the "Fragmente". Accidentally among some old letters from KUCKUCK I have come across one, dated "Lichterfelde, Berlin 15. Dec. 1914". In this letter KUCKUCK writes: "Es wird Sie interessieren, dass ich jetzt bei *Ectocarpus breviararticulatus* auch unilok. Sporangien und Antheridien gefunden habe. Die bisher bekannten plurilokul. Sporangien können nur Oogonien sein."—As I have received well preserved material of this species from Dr. VAUGHAN I tried to find other sporangia than the well known megasporangia but without result.

Because of KUCKUCK's above-mentioned discovery this

species must, I think, be referable to HAMEL'S genus *Feldmannia*, although its habit should place it in the genus *Spongonema*.

Mauritius: Ilôt Brocus, "attached to rocks in flowing water R.E.V., no. 215, Aug. 1938. Pointe aux Roches, "Light brown tufts about 3.5 cm high, usually in rock crevices dashed by waves", R.E.V. no. 283, 11 Aug. 1939. Savinia, R.E.V., no. 306, Aug. 1939.

Geogr. Distr.: West Indies, Mexico, Easter Island, American Samoa, Madras, Japan, Mauritius, Laccadive Islands, Burmah, Seychelles; seems to be widely spread in warm seas.

II. Sphacelariales.

Fam. 1. *Sphacelariaceae*.

Sphacelaria Lyngb.

1. *Sphacelaria tribuloides* Menegh.

MENEGHINI, G., Lett. al Dott. CORINALDI, p. 2, no. 6; *Alge Italiane e Dalmatiche*, Fasc. IV, Padova 1843, p. 336. SAUVAGEAU, C., *Remarques sur les Sphacélariacées*, p. 123.

SAUVAGEAU, l. c. p. 131 mentions this species from Mauritius and in specimens gathered by Dr. VAUGHAN I have found propagula answering fairly well to those of *Sph. tribuloides*. SAUVAGEAU points out as a peculiarity of the plant from Mauritius that the propagula are sometimes opposite or, more rarely, placed opposite to a branch, and he has also found opposite branches. In one of Dr. VAUGHAN'S collection (no. 250) opposite branches occurred rather often. Fig. 18 c shows the bases of such a pair and a propagulum (Fig. 18 b) of the same plant. And Fig. 18 a

exhibits a pair of opposite propagula from another collection; as the shape of these propagula shows, these have somewhat longer corners, thus approaching *Sphacelaria rigida*.

Mauritius: Flic-en-Flacq growing upon *Turbinaria ornata*, R.E.V. no. 250; no. 297 (without locality).

Geogr. Distr.: Widely distributed in warm seas.

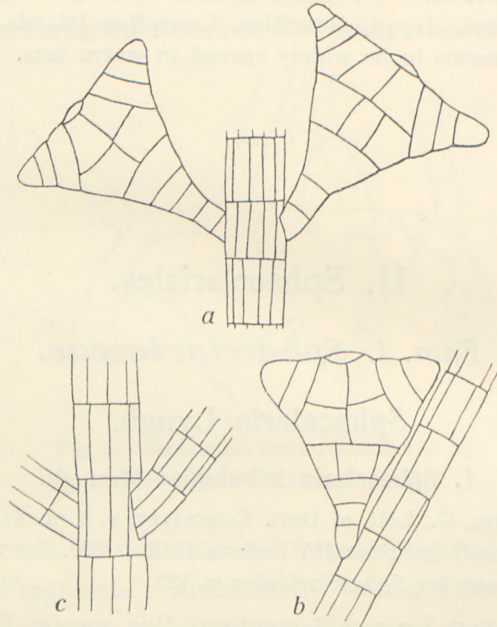


Fig. 18. *Sphacelaria tribuloides* Menegh.

a, two oppositely placed propagula; b, a propagulum; c, bases of two opposite branches. ($\times 220$).

2. *Sphacelaria rigida* Hering.

HERING in Flora, 1846, p. 213. KÜTZING, Spec. Alg., p. 465; Tab. Phycolog., vol. V, p. 26, tab. 90I.

The reason why I refer some few specimens found in the collections I have had for examination to this species and not to *Sphacelaria cornuta* Sauv. (1901, p. 132) is not only

because HERING described his species upon specimens from Port Natal but mostly because KÜTZING's figure quoted above (erroneously? the locality is stated to be "Roths Meer", whereas KÜTZING in Spec. Alg. gives "Natalbai" as the locality) must be said to give a good picture of the plant from Mauritius, while HERING's description on the other hand is not very instructive.

It seems rather strange that SAUVAGEAU when describing

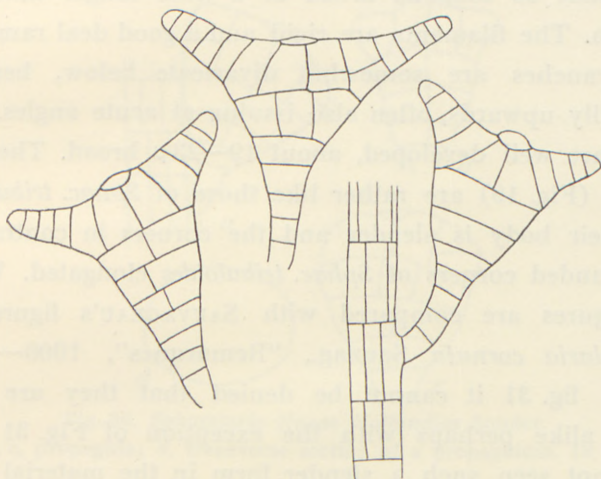


Fig. 19. *Sphacelaria rigida* Hering.
Three propagula. ($\times 220$).

Sphacelaria cornuta neither mentions HERING's species¹ nor KÜTZING's figure of it, and all the more so since SAUVAGEAU's species seems to come very near to *Sphacelaria rigida*, so near indeed that I am very much inclined to consider *Sphacelaria cornuta* Sauv. as identical with *Sphac. rigida* Her. But in order to obtain a final result it is of

¹ In the index to this work on the *Sphacelariaceae* SAUVAGEAU has a *Sphac. rigida* Grunow. It is mentioned on p. 124 and is included in the list of specimens examined by SAUVAGEAU and referred to *Sphac. tribuloides*.

course first of all necessary to examine authentic material of HERING's as well as of KÜTZING's plants, and furthermore to have more material than I have had.

The tufts of the plant from Mauritius are about $1\frac{1}{2}$ cm high. The bases are wanting and it cannot therefore be stated whether the plant is parasitic or not. The erect filaments in the plant from Mauritius are about $40-50\mu$ thick and taper upwards to about $23-35\mu$; the segments are about as long as broad or a little longer than the breadth. The filaments are rigid and a good deal ramified; the branches are somewhat divaricate below, bending gradually upwards, often also issuing at acute angles. The hairs are well developed, about $19-23\mu$ broad. The propagula (Fig. 19) are rather like those of *Sphac. tribuloides* but their body is slender and the corners in contrast to the rounded corners of *Sphac. tribuloides* elongated. When my figures are compared with SAUVAGEAU's figures of *Sphacelaria cornuta* Sauvag., "Remarques", 1900—1914, p. 133, fig. 31 it cannot be denied that they are very much alike perhaps with the exception of Fig. 31 F; I have not seen such a slender form in the material from Mauritius.

Sphac. taitensis Setch. (1926, p. 86, pl. 13, figs. 1—3) seems to be closely related to this species.

Further I should like to point out that REINKE in Beiträge, 1891, p. 8 refers *Sphac. rigida* HERING together with KÜTZING's figure in "Tabulae Phycol." to *Sphac. tribuloides*.

Mauritius: Port Louis Harbour, Col. PIKE, Dec. 69 (specimen in Hb. Kew.). R.E.V. no. 297 with no locality and dates.
Geogr. Distr.: Port Natal.

3. *Sphacelaria Novae Hollandiae* Sonder.

SONDER, G., *Nova Alg. gen. et spec.*, quas in itinere ad oras occid. Novae Hollandiae, collegit L. PREISS, 1845, p.50. SAUVAGEAU, C., *Remarques*, p. 137, fig. 33 and fig. 34A.

Dr. MORTENSEN has gathered a *Sphacelaria* which agrees very well with SAUVAGEAU's description of this species. The most characteristic feature of this species is that the corner cells in the propagula (Fig. 20) become divided by

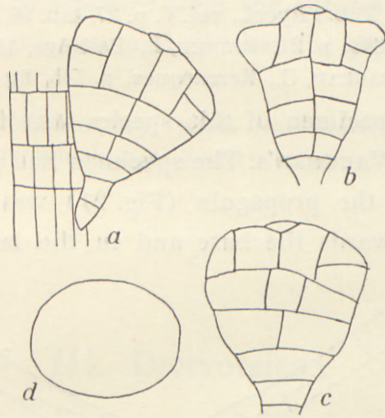


Fig. 20. *Sphacelaria Novae Hollandiae* Sonder.
a, b, c, propagula; d, transverse section of a propagulum. ($\times 220$).

a transverse wall into two cells placed one above the other; furthermore the propagula are more squarely formed and a transverse section of them roundish-oval (Fig. 20 d). Measured from the upper end of the stalk the body of the propagula is about 100μ long and about $80-85\mu$ broad and 68μ thick.

The specimens are about 1 cm high and the filaments near the base have a diameter of about 70μ , near the apical end it is about 50μ . The segments are generally shorter than the breadth and almost square, more rarely a little longer. The ramification is rather irregular and the branches

are often narrowed at their bases. The hairs are well-developed and about 15μ broad. The base was missing and no information as to the substratum can therefore be given.

Mauritius: Cannoniers Point, Th. M., Oct. 1929.

Geogr. Distr.: Australia, West Indies.

4. *Sphacelaria furcigera* Kütz.

KÜTZING, F., Tab. Phycol., vol. V, p. 27, tab. 90, fig. II, ASKENASY, E., "Gazelle", 1888, p. 21. REINKE, J., Beiträge, 1891, p. 14, pl. IV, figs. 5—13. SAUVAGEAU, C., Remarques, p. 145, fig. 35.

A single specimen of this species was found in a collection of Dr. VAUGHAN's. The specimen had propagula only. The stalk of the propagula (Fig. 21) was more or less attenuated towards the base and in the broader parts of

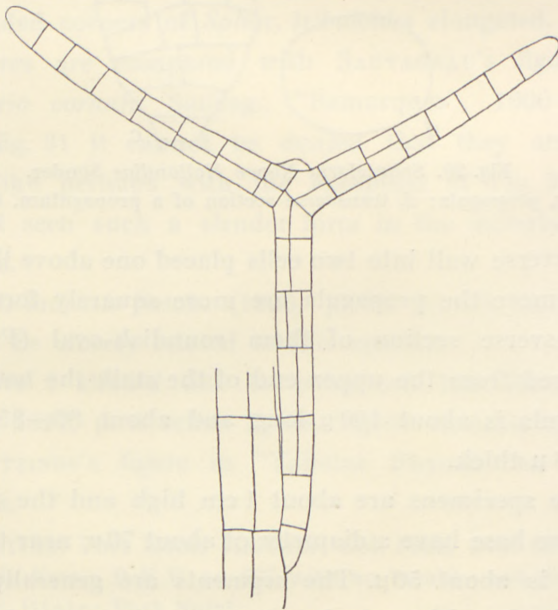


Fig. 21. *Sphacelaria furcigera* Kütz.
A propagulum. ($\times 220$).

the stalk and horns the segments are divided by a longitudinal wall, more rarely by two.

The erect filaments were about 40 μ broad at their bases and 30 μ near the apical ends, thus agreeing well with the size given by SAUVAGEAU for this species. The base in the specimen consists of decumbent filaments densely intermingled. It is strengthened by means of numerous rhizoids issuing from the lowermost part of the erect filaments. As the specimen was loosened from the substratum it cannot be stated what this was and whether the plant was partly endophytic.

Mauritius: Tamarin Bay, "pools near shore", R.E.V. no. 316.
Geogr. Distr.: Widely distributed in temperate and warm seas.

III. Dictyotales.

Fam. 1. *Dictyotaceae*.

Zonaria Draparn.

1. *Zonaria variegata* (Lamour.) Ag.

AGARDH, C., Synopsis Alg., 1817, p. XX. HOWE, M. A., Alg. Bahama, 1920, p. 594. BØRGESEN, Alg. Easter Isl., 1920, p. 266, fig. 14. SAUVAGEAU, Observations sur quelq. Dictyotacées, 1905, Extrait, p. 7. — *Dictyota variegata* Lamx., Nouv. Bull. Sci. Philom., 1, p. 331, 1809. *Gymnosorus variegatus* (Lamx.) J. Ag., Analecta algol., Contin. I, p. 11, 1894.

There are several specimens in the collections I have examined. According to Dr. VAUGHAN it forms "flat brown discs on shells and coral debris". Dr. MORTENSEN collected a specimen of it at a depth of 25 fathoms.

Mauritius: Between Gunner's Quoin and Flat Island, TH. M., 15 Oct. 29. Grand River and Ambre Island, Col. PIKE, 26 July 69 according to specimens in the Kew Herbarium. Tamarin Bay, R. E. V. no. 313. Aug. 1939.

Geogr. Distr.: Most warm seas.

Spathoglossum (Kütz.) J. Ag.

1. Spathoglossum asperum J. Ag.

AGARDH, J., *Analecta Algol.*, Cont. I, 1894, p. 36. BØRGESEN, F., *Alg. Bombay*, 1935, p. 35, pl. V; *Contrib. South Ind. Alg. Fl.*, II, 1937, p. 313.

Two specimens, the largest one about 20 cm high, are found in Dr. MORTENSEN's collection. Pl. I shows a photo of this specimen. The plant consists of several irregularly shaped and divided lobes from the margins of which proliferations (most common in the small specimen) are given off. Along the margins teethlike emergences, ca. 1—2 mm with irregular outlines are present; the cell walls in these are thicker and the cell-content a darker brown when compared with the lighter colour of the cells in the thallus itself. Seen from above the cells in the thallus are arranged in more or less regular rows; they are about rectangular or more irregularly polygonal. The diameter of the cells is about 45—60 μ long and their walls are rather thick. I have not been able to get any reliable transverse section of the thallus. Sporangia are present in great number, scattered over both sides of the thallus. Their diameter was about 100 μ long. The colour of the plant was dark brown.

When compared with the specimen figured in my paper (1935, p. 35, pl. V) the lobes of the thallus in the plant from MAURITIUS are proportionally broader more markedly

cuneate and the teeth along the margins are more developed. The specimens agree fairly well with some gathered by myself in South India (1937, p. 313) which I have been able to compare with specimens in the Herbarium of the British Museum, London.

The specimens were dredged by Dr. TH. MORTENSEN at a depth of 25 fathoms.

Mauritius: Between Gunners Quoin and Flat Island, 16 Oct. 1929. TH. M.

Geogr. Distr.: Ceylon, India.

Padina Adans.

1. *Padina gymnospora* (Kütz.) Vickers.

VICKERS, A., *Algues de la Barbade*, 1905, p. 58; *Phycologia Barbadosensis*, pl. VII. BØRGESEN, F., *Mar. Alg. D.W.I.*, vol. I, p. 202, figs. 155—6. — *Zonaria gymnospora* Kütz., *Tab. Phycol.*, vol. IX, tab. 71. *Padina australis* Hauck, *Alg. Hildebrandt*, 1887, p. 44. WEBER VAN BOSSE, A., *Liste des Algues Siboga*, I, p. 180, fig. 52.

Well prepared fruiting specimens of this species are found in the Kew Herbarium. The succession of the rows of hairs and sporangia is in agreement with what I have found in West Indian and Indian plants; compare my remarks 1930, p. 171 and my figure 155 a in the West Indian algal flora, p. 203.

Mauritius: Cannoniers Point, May 1858, DR. AYRES.

Geogr. Distr.: Malayan Archipelago, South India, Australia, West Indies etc.

2. *Padina Commersonii* Bory.

BORY, *Voyage de la Coquille*, 1828, p. 144, tab. 21, fig. 2. J. AGARDH, *Spec. Alg.*, vol. 1, p. 113. HAUCK in "*Hedwigia*", 1887, p. 42 and p. 44. WEBER VAN BOSSE, *Algues Siboga*, part 1, p. 178, fig. 51. BØRGESEN, *Some Indian Green and Brown Algae*, I, p. 170.

The few specimens found in the collections from Mauritius are not quite typical, a row of fructiferous organs being generally developed above every second row of hairs only. In this respect the specimens agree with HAUCK's description. The arrangement of hairs and fructiferous organs reminds one of that found in *Padina Sanctæ Crucis*, (BØRGESEN, 1914, p. 201, fig. 153) but in this species a well developed indusium is present.

In the lower part of the thallus in *Padina Commersonii* this is composed of three layers of cells, as mentioned in my paper quoted above.

HARVEY in "Algæ of Mauritius", p. 149 mentions *Padina Durvillæi* Bory from the island but the specimen of Mrs. TELFAIR found in the Kew Herbarium is *Padina Commersonii* and not *Padina Durvillæi*, which species according to Mme WEBER, ("Liste", 1913, p. 179), who has examined the original specimen of BORY in Muséum d'histoire naturelle, Paris, has concentric rows of sporangia but no hairs. JADIN in his list, p. 160, mentions *Padina Pavonia* as common at the island, but this determination is surely wrong; his plant might perhaps be *Padina tetrastratica* Hauck.

Mauritius: Black River Bay, leg. R. E. VAUGHAN no. 292. Without locality, leg. TELFAIR (Hb. Kew.).

Geogr. Distr.: Mauritius, Ceylon, Tonga Islands, Malayan Archipelago, Australia etc.

Dictyota Lamour.

1. *Dictyota divaricata* Lamour.

LAMOUREUX, Dictyonaire, p. 14. J. AGARDH, Till Alg. System., V, p. 101; *Analecta Algologica*, Continuatio I, p. 78. — *Dictyota Bartayresiana* var. *divaricata* J. Ag., Spec. Alg., I, p. 94. *Dictyota acutiloba* Kütz., Tab. Phycol., IX, pl. 29.

Some specimens are present in the Kew Herbarium which quite agree with KÜTZING'S figure cited above. J. AGARDH also mentions Mauritius as a locality of this species and points out that the tips of the thallus are more obtuse in the specimens from Mauritius; this is in agreement with the specimens examined by me.

Mauritius: Grand River, Jan. 2, 1870, Colonel PIKE. Cannonier's Point. Oct. 29, TH. M. DR. VAUGHAN says about it that it is "very common"; specimens from Îlot Brocus (no. 216) and Cannonier's Point (no. 2) are found in his collection.

Geogr. Distr.: Warm Atlantic Ocean, Red Sea, Indian Ocean, Japan etc.

2. *Dictyota Bartayresiana* Lamour.

LAMOUREUX, Dictyonaire, n. 17. J. AGARDH, Spec. I, p. 94. KÜTZING, Tab. Phycol., vol. IX, tab. 16.

A specimen of this species is found in the Kew Herbarium. The species is mentioned both in DICKIE'S and JADIN'S lists.

Mauritius: Port Louis Harbour, 12. Dec. 1869, Colonel PIKE.

Geogr. Distr.: West Indies, Indian Ocean, Tropical Australia etc.

HETEROGENERATAE

A. HAPLOSTICHINEAE

I. Chordariales.

Fam. 1. Corynophloeaceae.

Myriactula O. Kuntze.

1. *Myriactula arabica* (Kütz.) Feldm.

FELDMANN, J., Algues mar. de la Côte des Albères, p. 136. BØRGESEN, Iranian Gulf Algae, p. 83, figs. 19—20. — *Phycophila arabica* Kütz., Tab. Phycol., vol. VIII, tab. 1, fig. 2. *Gonodia arabica* (Kütz.) Boergs., Mar. Alg. Arabian Sea, p. 22, fig. 4. HAMEL, G. Phéophycées de France, p. 136.

In the cryptostomes of *Chnoospora implexa* specimens of this species occurred mingled with the bases of *Ectocarpus irregularis*.

Mauritius: Tamarin Bay, R.E.V. no. 293, "in pools behind reef".
Geogr. Distr.: Arabian Sea, Iranian Gulf, Tanger, Guéthary.

Fam. 2. Chordariaceae.

Cladosiphon Kütz.

In his paper: "Sur le Castagnea Zosteræ Thur." SAUVAGEAU (1927, p. 369) has given an exhaustive account of the very intricate question as to the correct naming of this genus. For more detail I refer the reader to SAUVAGEAU's paper and here I shall confine myself to pointing out only that SAUVAGEAU was for the maintaining the hitherto most

commonly used generic name *Castagnea* Derb. et Sol. (1852, p. 56), in the diagnosis of which accompanied by figures these authors described and pictured the plurilocular sporangia of this genus. The generic name *Castagnea* has also as a rule been used in later years.

As KYLIN now in his very valuable monographic treatment of the *Chordariales* (1940, p. 26) has found it necessary to reject the generic name *Castagnea* and instead take up KÜTZING's somewhat older generic name *Cladosiphon* (1843, p. 329) I follow him in this though the diagnosis of KÜTZING is very poor and the plurilocular sporangia are not mentioned at all, the different shape of these organs, as first pointed out by THURET (in LE JOLIS, 1864, p. 84), being the essential characters to base the genera upon in this group.

In North America the genus *Aegira* Fries (1825, p. 342) based upon *Linkia Zosteræ* Lyngbye (1819, p. 194, pl. 66) = *Eudesme virescens* (Carm.) J. Ag. has recently been taken up. *Eudesme* and *Castagnea* have earlier often been looked upon as congeneric but as KYLIN considers *Eudesme* a genus by itself the generic name of FRIES can only replace *Eudesme*.

MISS PARKE (1933, p. 21), (and KYLIN (1940, p. 25) agrees with her), protests against the taking up of *Aegira* because only two of three specimens in LYNGBYE's herbarium are *Castagnea virescens*, but I cannot agree with her in this. For in most herbaria besides the typical specimens several more or less dubious specimens are nearly always found in the same cover. And furthermore the locality: "Kalvesund, Norvegiæ", of the undeterminable specimen not being mentioned among the localities of *Linkia Zosteræ* enumerated in the "Tentamen", it seems clear that LYNGBYE has attached no importance to this specimen.

1. *Cladosiphon Mauritianum* nov. spec.

Frons caespitosa, filiformis, tubulosa, permagna, ca. 30 cm alta et ultra(?) et $\frac{1}{4}$ — $1\frac{1}{2}$ mm crassa, fuscoflavescens, lubrica, irregulariter sinuosa et ramosissima, ramis sparsis elongatis ad basin et apicem attenuatis instructa. Rami iterum ramulosi, ramuli angulis plus minus rectis oriuntur, apicem versus ramella brevia, saepe curvata, gerentes.

Sporangia plurilocularia et unilocularia in eadem planta praesentia.

Sporangia plurilocularia in summis turgidis florum assimilationis periphericorum et unde clavatis formata aut in ramellis brevioribus subsecundis ibidem praesentia. (Pl. II).

Mauritius: Cannonier's Point, TH. M., 26. Oct. 1929.

In Dr. MORTENSEN'S collection some dried specimens of a brown alga (Pl. II) are present, the anatomical structure of which shows that they are referable to this genus.

From a small hold fast the very irregular and much ramified thallus grows up to a height of about 30 cm and probably more. The main filaments reach a diameter of about 2 mm, and from these branches are given off very irregularly, sometimes unilaterally, sometimes scattered at shorter or longer intervals, and these branches also carry short or long branchlets which at their upper ends are provided with 2—3 divaricate and curved ramuli. The thallus is upon the whole much curved and sinuate. At their basal ends the branches and branchlets are attenuated, quickly attaining their normal size upwards. The colour of the dried plant is reddish brown. As to the anatomical

structure of the plant from Mauritius this in most respects agrees quite well with Mme WEBER's description (1913, p. 139) of the plant called by her *Bactrophora nigrescens* = *Cladosiphon Sibogae* Kylin and with my description of the West Indian plant I called *Castagnea Zosteræ* = *Cladosiphon*

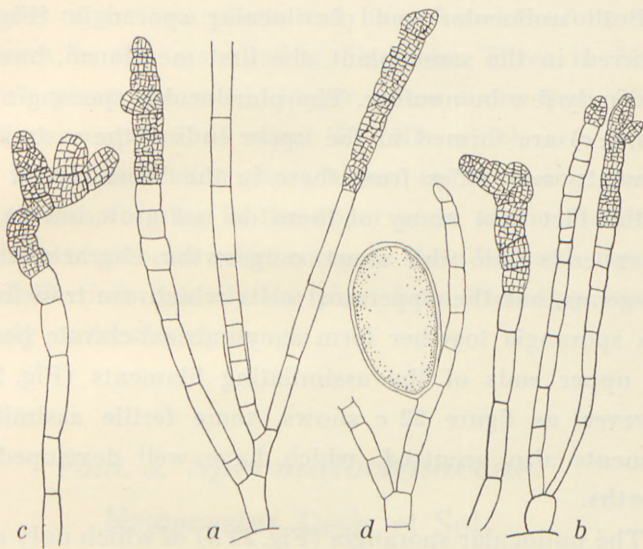


Fig. 22. *Cladosiphon Mauritianum* nov. spec.

a, b, c filaments with plurilocular sporangia; d, unilocular sporangium.
(\times ca. 350).

occidentalis Kylin, with the exception that Mme WEBER and I supposed each sympodium of the central filaments to be terminated by a hair, while as pointed out later by KUCKUCK (1929, p. 46 and 48) and now by KYLIN, in reality it ends in an assimilating filament, the hair, as KUCKUCK says, being "scheinbar terminal".

In its young parts the thallus of the plant from Mauritius is massive, when older it becomes hollow. The material was not fit for anatomical examination and it was out of the question to examine the summits of the filaments.

The assimilating filaments had a length of about 200 μ , consisting in their lower parts of long cylindrical cells about 8 μ thick, higher up the cells were shorter and broader, about 12 μ thick. The filaments are composed of about 13—15 cells.

Both unilocular and plurilocular sporangia (Fig. 22) occurred in the same plant, the first mentioned, however, were only few in number. The plurilocular sporangia (Fig. 22 *a, b, c*) are formed in the upper ends of the assimilating filaments and differ from these in the West Indian plant by the fact that many of them do not grow out at their upper ends into the short outgrowths characteristic of this genus, but the uppermost cells which are transformed into sporangia together form a cylindrical-clavate body at the upper ends of the assimilating filaments (Fig. 22 *a*); however, as figure 22 *c* shows, some fertile assimilating filaments also occurred, which have well developed outgrowths.

The unilocular sporangia (Fig. 22 *d*) of which only rather few are seen, are oblong obovate of shape, about 35—40 μ broad and 60—65 μ long.

When compared with the West Indian plant collected at St. Croix 1892 and referred by me (1914, p. 184, figs. 144—5) with reservation to *Castagnea Zosteræ* (Mohr) Thur. the habits of the two plants agree fairly well, but the plant from Mauritius is much larger with somewhat more marked main filaments, and the colour is darker brown.

As mentioned above, the anatomical structure also is rather like that of the West Indian plant but besides the somewhat different appearance of the plurilocular sporangia, the assimilating filaments are a little shorter in the West Indian plant, in most cases reaching only 160 μ .

As regards *Cladosiphon Sibogae* Kylin neither a description of its habit nor a photograph of the plant is found. But by means of a slide of a fragment of the plant from Thursday Island most kindly sent me in 1913 by Mme WEBER I have been able to compare the anatomical structures of the two plants and have found the following differences in the assimilating filaments. These in Mme WEBER'S plant are much longer, often more than 300 μ long, and composed of about 20 cells which are ca. 7 μ broad below and rather short, higher up becoming gradually roundish, forming in the upper parts of the filaments a long row of globular cells; compare Mme WEBER'S figures 42 and 43. Unfortunately the plant from Thursday Island had only unilocular sporangia.

Fam. 3. Spermatochnaceae.

Nemacystus Derb. et Sol.

1. *Nemacystus decipiens* (Sur.) Kuck.

KUCKUCK, P., Monographie, 1929, p. 68, figs. 92—3. BØRGESEN, Indian Green and Brown Algae, II, 1932, p. 65, fig. 7; Iranian Gulf Algae, 1939, p. 85. KYLIN, Chordariales, 1940, p. 46. — *Mesogloia decipiens* Suringar, Alg. jap., 1872, p. 75, pl. IV. *Cladosiphon decipiens* (Suring.) Okamura, Alg. Jap. Exsicc., no. 87; Icones Jap. Alg., vol. II, pl. 89.

Of this species two dried specimens and some filaments preserved in formol are present in Dr. MORTENSEN'S and Dr. VAUGHAN'S collections respectively. The dried specimens are fixed to a small piece of a seagrass, while no base is found in the plant in formol. The colour of the dried plant is yellowish brown, it is about 18 cm high and an irregularly and much ramified plant. In the specimens

preserved in formol hairs were scarce and found only in the young parts of the thallus, whereas they were more common in the dried specimens.

The assimilating filaments (Fig. 23) of the specimen in formol are rather short, up to about 150μ long or some-

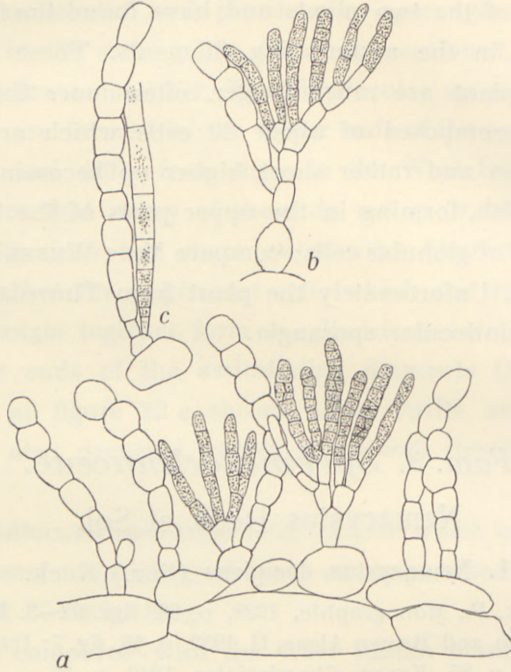


Fig. 23. *Nematicystus decipiens* (Sur.) Kuck.
Assimilating filaments; in *a* and *b* also plurilocular sporangia; in *c* a hair.
($\times 350$).

what longer; they are composed of about 10, rarely up to 15 cells, cylindrical below, more ellipsoidal upwards, the uppermost being subglobular with a diameter of about 16μ , rarely more. When young the thallus is massive, becoming hollow when older like OKAMURA's fig. 2. In the material in formol plurilocular sporangia are found. They form small dense branch-systems (Fig. 23 *a, b*) about 10μ

high with or without assimilating filaments at their bases. The sporangia are more or less unilaterally placed (Fig. 23 c). They are 7—8—9 μ thick and in most cases divided by horizontal walls into a single row of cells, but rather often, too, more or less vertical walls are present in the middle of the sporangium. Unilocular sporangia were not found in the plant in formol but in one of the dried specimens. They were oblong-obovate of shape, about 60 μ long and 40 μ broad.

When compared with the Japanese plant which, according to KUCKUCK's description and to his and OKAMURA's fine figures, must be said to be the best known species of *Nemacystus*, the habit of the plant from Mauritius agrees very well with OKAMURA's figure. In the anatomical structure some differences are present. Thus the Japanese plant has numerous hairs, and the assimilating filaments are longer in the Japanese plant and composed of more cells, about 20, and these are more elongated. KUCKUCK mentions the thallus in *N. decipiens* as being solid, but OKAMURA's drawing shows it to be hollow as in the plant from Mauritius. In the Japanese plant both unilocular and plurilocular sporangia occur in the same plant, whereas in the plant from Mauritius these organs were not found together in the specimens examined. The plurilocular sporangia of the Japanese plant agree with those in the plant from Mauritius, having now and then vertical or oblique walls, as shown in KUCKUCK's figure 93. Vertical walls are also present in *N. flexuosus*, according to KUCKUCK's figure 95; and KYLIN found them in *N. erythraeus*.

At Dwarka in the Arabian Sea, some years ago, I gathered a *Nemacystus* which I (1932, p. 65, fig. 7) referred to *N. decipiens*, pointing out that in some respects it differs from

the Japanese plant. Thus its thallus (Plate III) is thinner, only about $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ mm, and its colour is dark olive brown. And the plant form Dwarka occurred upon rocks and was laid dry several hours during low-tide, whereas OKAMURA describes it as an epiphyte upon *Sargassum* in Japan. The

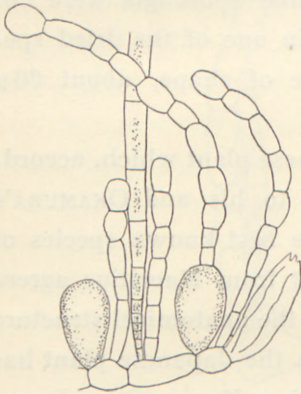


Fig. 24. *Nemacystus decipiens* (Sur.) Kuck.

Assimilating filaments, unilocular sporangia (one emptied) and a hair. — From a specimen from the Iranian Gulf.

($\times 350$).

assimilating filaments of the plant from Dwarka when compared with those of the plant from Mauritius have nearly the same length and number of cells, but these are still more globose in the plant from Dwarka (compare my figure 7, 1932, p. 66) and the apical cells are larger, having often a diameter of 22μ . Hairs were abundant in the plant from Dwarka and only unilocular sporangia occurred, they were oblong-ovate like those found by OKAMURA, while KUCKUCK found them teat-formed in a specimen

from Japan. As to the shape and size of the assimilating filaments the plant from Mauritius is so to speak, placed intermediately between the Japanese and the Indian plant.

I have also examined material of this species from the Bahrain Islands in the Iranian Gulf (Fig. 24). Here the plant was an epiphyte upon *Sargassum*. Its colour was yellowish brown and hairs were present in great numbers. The assimilating filaments resembled those in the Japanese plant with elongated but somewhat shorter cells. Only unilocular sporangia occurred; they were of the same shape and size as those in the Indian plant and that from Mauritius.

I have undertaken this comparison of the specimens in question because I have my doubts as to whether or not the plants from the various localities ought to be considered as independent species. This applies especially to the plant from Dwarka as the most deviating. In order to find out whether, for instance, the occurrence of both kinds of sporangia in the same plant or in separate individuals, or the substratum or other of the variations mentioned are of more constant value or not the examination of more material and observations in nature are necessary. Until details about these questions are obtained it seems more appropriate to consider the plants as variations of the same species: *Nemacystus decipiens*.

From South Africa KYLIN (1940, p. 48) has described *Nemacystus subsimplex* but this is a small plant, only a few cm high, simple or very little ramified, with a solid thallus and plurilocular sporangia, having a single row of loculi only.

Mauritius: Cannonier's Point, TH. M., 26. Oct. 1929. Flic-en-Flacq, R. E. V. no. 252.

Geogr. Distr.: Japan, Arabian Sea, Iranian Gulf.

B. POLYSTICHINEAE

I. Punctariales.

Fam. 1. *Encoeliaceae*.

Colpomenia Derb. et Sol.

1. *Colpomenia sinuosa* (Roth) Derb. et Sol.

DERBÈS, A. et A. SOLIER, Mém. sur... Physiologie des Algues, p. 11, pl. XXII, figs. 18-20. SAUNDERS, De Alton, Phycological Memoirs, 1898, p. 163-4. SETCHELL, W. A. and N. L. GARDNER, *Mela-*

nophyceae, 1925, p. 540—2. SAUVAGEAU, C., Sur le *Colpomenia sinuosa* Derb. et Sol., 1927, p. 309. BØRGESEN, F., Alg. Iranian Gulf, 1939, p. 89. — *Ulva sinuosa* Roth, Catal. bot., III, 1806, p. 326, pl. 12. *Stylophora vesicata* Harv., M. S., Algae of Mauritius, 1834, p. 149. For more literature compare DE-Toni, Syll. Alg., III, p. 489.

Several specimens, or perhaps more correctly pieces of specimens, are found in the Kew Herbarium. HARVEY, l. c., p. 149, when describing Mrs. TELFAIR'S specimens of this species, adds: "but it is much to be wished that more perfect specimens than those that have fallen under my observation, could be procured, that we might be enabled fully to describe it". The specimens seem to agree fairly well with forma *expansa* Saunders, l. c., p. 164, pl. 32, figs. 4—6.

And a single specimen in the Kew Herbarium gathered by Dr. AYRES agrees quite well with *Colpomenia tuberculata* Saunders, l. c., p. 164, pl. 32, figs. 1—3. SETCHELL and GARDNER have referred this plant as a forma *tuberculata* to *Colpomenia sinuosa*.

Mauritius: Cannonier's Point, Apr. 1858, Dr. AYRES. The specimens of Mrs. TELFAIR are without locality.

Geogr. Distr.: Widely distributed in warm seas.

Hydroclathrus Bory.

1. *Hydroclathrus clathratus* (Bory) Howe.

HOWE, Algae, in BRITTON & MILLSPAUGH. The Bahama Flora, 1920, p. 590. For more literature compare DE-TONI, Sylloge Algarum, III, p. 490.

According to JADIN l. c., p. 159, this plant is very common at the island.

Mauritius: Cannonier's Point, Oct. 1929, TH. M. Same locality, April 1858, Dr. AYRES in Hb. Kew.

Geogr. Distr.: Most tropical seas.

Chnoospora J. Ag.

1. *Chnoospora fastigiata* J. Ag.

J. AGARDH, Spec. Alg., vol. 1, p. 171. BARTON, E. S., On the fruit of *Chnoospora fastigiata* J. Ag. in Journ. Linn. Soc., 33, 1897—8, p. 50, pl. 28. BØRGESSEN, F., Mar. Algae from Easter Island, 1920, p. 263, figs. 11, 12.

Some specimens of this species referable to the var. *pacifica* J. Ag., KÜTZING, Tab. Phyc. vol. IX. pl. 86, fig. 1 are found in the Kew Herbarium.

Mauritius: Soufflem, July 31, 1869. Col. PIKE. In Dr. VAUGHAN's collection some fine specimens of the same variety (no. 266) but without locality are present; about its appearance and occurrence at the island Dr. VAUGHAN writes: "Thallus light brown, common in rock crevices in exposed situations constantly washed by waves".

Geogr. Distr.: Pacific Ocean, Japan, Australia etc.

2. *Chnoospora implexa* (Her.) J. Ag.

AGARDH, J., Spec. Alg., vol. 1, p. 172. KÜTZING, Tab. Phyc., vol. IX, tab. 87. fig. 2. GRUNOW, A., Alg. Fidschi-, etc., 1874, p. 25. WEBER VAN BOSSE, A., Alg. Siboga, p. 137. — *Chnoospora pannosa* J. Ag., l. c., p. 172, GRUNOW, l. c., p. 25. KÜTZING, l. c., fig. 1. *Diclyota obtusangula* Harv., Friendl. Isl. Alg., no. 40. KÜTZING, Tab. Phycol., vol. IX, tab. 28, fig. 2.

In J. AGARDH's Spec. Alg., vol. I, p. 172 *Chnoospora implexa* (Hering) J. Ag. is referred to as "Species inquirendae" and all the same in DE-TONI, Syll. Alg., vol. III, *Fucoideae*, 1895, p. 466 a? is placed after the generic name. As late as 1925 SETCHELL and GARDNER in "*Melanophyceae*", p. 553 say that *Chn. implexa* Hering "is doubtful and may very possibly prove to be of quite a different genus". I have not been able to examine authentic material of HERING, but I have had well preserved material collected by Dr. VAUGHAN of a plant agreeing with KÜTZING's figures, and

an examination of it has shown that the building up of the thallus agrees well with that of *Chn. fastigiata*, cryptostomes being spread all over the thallus. The material was sterile. The colour of the plant when alive was pale yellow.

In the Kew Herbarium several specimens of *Chnoospora* are found; some of these collected by Colonel PIKE are called *Chn. implexa*; some other specimens are determined as *Dictyota obtusangula* Harv. = *Chnoospora obtusangula* (Harv.) Sonder which with GRUNOW (l. c.) and Mme WEBER, "Algues Siboga", p. 137 I consider as a form of *Chnoospora implexa*.

Further, some fragmentary specimens collected by Dr. AYRES are found in the Kew Herbarium where they are referred to *Chn. pannosa* J. Ag. But in my opinion these specimens are nothing but small and badly developed specimens of *Chn. implexa*. In this connection I wish to point out that I have examined a specimen that seems to be a cotype specimen of *Chnoospora pannosa* found in the Botanical Museum, Copenhagen. On the label of the specimen is written: "ins. Sandwich, Hb. BINDER", thus it is from the same locality as the specimen upon which J. AGARDH based *Chn. pannosa*. This specimen is determined as *Chn. implexa* J. Ag., it consists of intricate filaments of different algae, most of them being *Dictyota divaricata*, some *Chnoospora implexa* and some filaments of *Hypnea* and *Chondria*.

In continuation of this I further wish to mention what SETCHELL and GARDNER write about *Chn. pannosa* in Mar. alg. of the pacif. coast of North America, III. *Melanophyceae*, p. 553: "It seems likely that *C. pannosa* J. AGARDH, from Hawaii, is simply a pannose growth form of *C. pacifica*".

Mauritius: Tamarin Bay, R.E.V. no. 293. Cannonier's Point, May 1858, Dr. AYRES. Barkley Isl., Jan. 1870, Colonel PIKE. Rochetois, July 22, 1870, Colonel PIKE.

Geogr. Distr.: Red Sea, Malayan Archipelago, Japan etc.

Rosenvingea Boergs.

1. *Rosenvingea intricata* (J. Ag.) Boergs.

BØRGESEN, Mar. Alg. D.W.I., vol. I, p. 182. — *Asperococcus intricatus* J. Ag., Nya alger från Mexico, 1847, p. 137; Spec. Alg., vol. 1, 1848, p. 77. *Encoelium intricatum* Kütz., Spec. Alg., p. 551; Tab. Phycol., vol. 9, tab. 5.

A small specimen is found in the collection of the Kew Herbarium.

Mauritius: Cassis, Colonel PIKE, 1869 in Herb. Kew.

Geogr. Distr.: Vera Cruz, Samoa, Australia, India, etc.

CYCLOSPOREAE

I. Fucales.

Fam. 1. *Sargassaceae*.

Turbinaria Lamour.

1. *Turbinaria ornata* J. Ag.

J. AGARDH, Spec. Alg., I, p. 266. BARTON, E. S., Syst. Struct. Account of *Turbinaria*, p. 219. — *Fucus turbinatus*, var. *ornatus* Turner, Fuci, vol. I, p. 50, tab. 24, figs. c, d.

Several specimens are found in the collections examined by me.

Mauritius: Cannonier's Point, R.E.V. no. 186, August 5th 1933: "In shallow water behind reef, common in many localities". From the same locality there are specimens in the Kew Herbarium

collected by Dr. AYRES as well as some specimens without locality gathered by Mrs. TELFAIR and Colonel PIKE.

Geogr. Distr.: Widely distributed in the Indian Ocean and the adjacent parts of the Pacific Ocean.

Sargassum C. Ag.

The following list comprises 13 species of *Sargassum*, 6 of these have been collected by Dr. VAUGHAN and as stated in the introduction, the well known specialist of *Sargassum* Professor W. A. SETCHELL, Berkeley, Cal. has most kindly determined these species. He has informed me that they are all rare species and of great interest. In the list these species are marked by an asterisk.

The remaining species are found in the Kew Herbarium and are determined partly by HARVEY, partly by DICKIE. I have revised HARVEY'S and DICKIE'S determinations after GRUNOW'S "Additamenta ad cognitionem *Sargassorum*" and the species in the list are likewise arranged according to GRUNOW'S treatise.

1. *Sargassum heterophyllum* (Turn.) Ag.

AGARDH, C., Spec. Alg., vol. 1, p. 21. AGARDH, J., Spec. Alg., vol. 1, p. 296; Spec. Sarg. Austral., p. 66. GRUNOW, Additamenta, no. 40, p. 354. — *Fucus heterophyllus* Turn., Hist. Fuc., II, p. 62, t. 92. *Blossevillea heterophylla* Kütz., Spec. Alg., p. 630; Tab. Phyc., vol. X, tab. 86.

To this species DICKIE has referred two small specimens from Mauritius. I have been able to compare them with a specimen from South Africa collected by ECKLON ("ad oras Kafrorum") found in the Botanical Museum, Copenhagen. Their aspect shows some likeness to ECKLON'S specimen but considered in more detail some differences are

present; thus the leaves in the Mauritius plant have well developed cryptostomes in two rows along the midrib, whereas there are not very many in ECKLON'S specimen in which the leaves had also a much darker colour and the teeth were less developed. Nor does KÜTZING, in his figure quoted above, draw any cryptostomes. No vesicles are present either in ECKLON'S specimen or in the specimens from Mauritius.

Mauritius: Without locality, Colonel PIKE. Flacq, F. JADIN. Geogr. Distr.: South Africa.

2. **Sargassum obovatum* Harv. var. *Robillardii* Grunow.

GRUNOW, A. Additamenta, no. 92, p. 392.

SETCHELL writes about the specimen: "This is one of the species or forms which occur on the east coast of Africa and in the Red Sea, which make for trouble. Its prominent cryptostomata are characteristic. The receptacles are very slightly developed in yours, but on the whole I think that the species and variety are better referred as I am doing for the present, since the leaves are altogether too thin and the whole habit is too slender for *S. crassifolium* J. Ag."

I have not seen any specimens of the species itself. This species is described by HARVEY, l. c., p. 148 upon specimens collected by Mrs. TELFAIR at Mauritius. In the collection of the Kew Herbarium no specimen of this species was found. It is also mentioned in JADIN'S list, p. 159.

Mauritius: Cap Malheureux, Mrs. TELFAIR. Point aux Roches, "on the reef and in pools behind the reef", R. E. V. no. 291.

Geogr. Distr.: Mascarene Islands.

3. *Sargassum duplicatum* J. Ag.

AGARDH, J., Spec. Sarg. Austr., p. 90. GRUNOW, Additamenta, no. 93, p. 392. — *Sargassum ilicifolium* var. *duplicatum* J. Ag., Spec. Alg., p. 318. *S. cristaeforme* Harvey, Alg. TELFAIR, 1834, p. 147.

A fine specimen of Mrs. TELFAIR'S upon which HARVEY described the species is found in the Kew Herbarium.

Mauritius: Cap Malheureux, Mrs. TELFAIR.

Geogr. Distr.: Mascarene Islands, Indian and Pacific Oceans.

4. *Sargassum myriocystum* J. Ag.

AGARDH, J., Spec. Alg., vol. I, p. 314; Spec. Sarg. Austr., p. 99. GRUNOW, Additamenta, no. 134, p. 440.

DICKIE refers a specimen in Herb. Kew to this species. I have not had any material with which to compare it.

Mauritius: Without locality, Colon. PIKE.

Geogr. Distr.: Indian Ocean.

5. *Sargassum polycystum* C. Ag. var. *onusta* J. Ag.

AGARDH, J., Spec. Alg., vol. I, p. 311. GRUNOW, Additamenta, no. 138, p. 445. — *Sargassum onustum* Harv., Alg. TELFAIR, p. 147.

Several specimens gathered by Mrs. TELFAIR at Mauritius are found in the Kew Herb. This species is also mentioned from Mauritius in JADIN'S list, p. 160.

Mauritius: Cap Malheureux, Mrs. TELFAIR. Flacq, Sept. 1890, F. JADIN.

Geogr. Distr.: Indian Ocean.

6. **Sargassum granuliferum* C. Ag.

AGARDH, C., Spec. alg., p. 31; Icon. alg. ined., pl. XI. AGARDH, J., Spec. alg., p. 309; Spec. Sargass. Austr., p. 118. Kützing, Tab. Phyc., XI, tab. 16, I. GRUNOW, Additamenta, no. 142, p. 447. Setchell, Hong Kong Seaweeds, V, p. 7, 1936.

SETCHELL writes about it (Pl. IV): "Your specimens have very little fruit and would perhaps be referred by some to another species of the general graniferous group. The

leaves, however, seem to be without costa. I think that *S. spinifex* is only a denser form of the present species and this name is the older. You will note that in my paper on "Hong Kong Seaweeds", Part V, I have discussed the situation. The species of these granuliferous *Sargassa* are very difficult to determine, since from such experience as I have had, leaves, receptacles, etc., as well as the amount of papillae on the axes, vary very much and often in the same specimen".

Mauritius: Cannonier's Point, "in shallow water behind reef", R. E. V. no. 187.

Geogr. Distr.: Indian and Pacific Oceans.

7. **Sargassum densifolium* Zan.

ZANARDINI, Pl. mar. rubr., 1858, p. 32, no. 24. GRUNOW, Addita-
menta, no. 166, p. 24.

Two specimens, no. 188 and no. 190, are found in Dr. VAUGHAN'S collections.

About no. 188 (Pl. V.) SETCHELL remarks: "This, I think, is only a denser form of *S. latifolium* (Turn.) C. Ag., or it may be a form of *S. aquifolium* (Turn.) C. Ag. It is unfortunately sterile but it seems to differ from both the TURNER plants as well as from *S. ilicifolium* (Turn.) C. Ag. by more finely dentate leaves. This, however, varies in your specimens, and this number might be placed under any of these names, since there is no fruit. I have seen no specimens of ZANARDINI'S species."

And about no. 190 SETCHELL says: "This is a more densely leaved specimen and one which comes nearer to ZANARDINI'S description than your no. 188. It also is sterile".

Mauritius: Cannonier's Point, "in shallow water behind reef", R. E. V., nos. 188 and 190.

Geogr. Distr.: Red Sea, Indian Ocean, Iranian Gulf etc.

8. *Sargassum bacciferum* (Turn.) C. Ag.

Forma *capillifolia* Kütz., Tab. Phycolog., vol. XI, p. 4, tab. 12, fig. II. GRUNOW, A., Additamenta, no. 183, p. 36.

Two specimens are found in the Kew Herbarium, referred by DICKIE to this form. The leaves are very long, up to 7 cm, very narrow and with very few teeth along the margins. I have not seen apiculate vesicles, as GRUNOW says it sometimes has.

Mauritius: Without locality, Colonel PIKE.

Geogr. Distr.: Indian and Pacific Oceans.

9. **Sargassum Portierianum* Zan.

ZANARDINI, Pl. mar. rubr., 1858, p. 24, no. 10. GRUNOW, Additamenta, p. 145, no. 193.

About a specimen in Dr. VAUGHAN's collection no. 148 (Pl. VI) Professor SETCHELL writes as follows: "Your specimen has no vesicles but clearly belongs to the *S. cymosum* group. It might be mistaken for *S. lendigerum*, but is not the plant of LINNAEUS. You will find notes on the latter species in my "Report on the *Sargassums* of the Templeton Crocker Expedition of the California Academy of Sciences", 1932 (1937, p. 133). Your plant is a very interesting one but has been identified mostly through the description of ZANARDINI and the relationships which I have been trying to work out between the *cymosum-lendigerum* groups."

And about another specimen in the collection, no. 267, Professor SETCHELL remarks: "No. 267 seems to me to be referable to *Sargassum Portierianum* Zan. f. *lendigerioides*. The form name is of my own coining, since your specimens look so much like *S. lendigerum* (L.) Ag., but do not agree sufficiently with that species to be referred to it. I

have this form from so far south as Natal and can confess to you that I do not know exactly what to do with it. It is clearly of the *S. cymosum* Ag. group but is very different from the typical Brazilian forms of that species. It is also very much like *S. lendigerum*, but the cryptostomata are almost absent and the basal portions have the primary axes very short, instead of long as in that species. I may be entirely wrong in referring it as a form to the species of ZANARDINI but in some ways it seems to resemble the descriptions of the forms of that species, and GRUNOW has placed the species in his rather extensive and somewhat variegated list of the cymosum forms, species, etc. You marked this specimen a duplicate, so I am sending you half of it to compare with no. 148, which I think is the same but of which I have no specimen here to make comparison, It may possibly rank as a distinct and unnamed species."

Mauritius: Point au Roches, 7. Febr. 39, R. E. V. no 267; same locality, 3. Apr. 31, R. E. V. no. 148.

Geogr. Distr.: Red Sea, Mombassa.

10. *Sargassum Scopula* Grun.

GRUNOW, *Additamenta*, no. 205, p. 158.

This species has been described by GRUNOW upon specimens from Mauritius collected by ROBILLARD. No specimens have been present in the collections I have seen from the island. It is mentioned in JADIN's list p. 160.

Mauritius: Flacq, June 1890, F. JADIN.

Geogr. Distr.: Mauritius.

11. **Sargassum Merrifieldii* J. Ag.

AGARDH, J., *Sargass. Austr.*, 1889, p. 115, pl. XXX, fig. IV. GRUNOW, A., *Additamenta*, no. 209, p. 159.

About no. 191 a (Pl. VII) in Dr. VAUGHAN'S collection Professor SETCHELL says as follows: "A very interesting plant, agreeing fairly well with a fragment named by GRUNOW which is in our collection. It is closely related to *S. polyporum* Mont. Probably also to *S. leptopodium* J. Ag., and in the group with *S. polyphyllum* J. Ag. and *S. torvum* J. Ag. All of these have the leaves occasionally furcate. Some of them have more or less granuliferous axes. The receptacles are at the bases of your specimens. You will find further notes in my "Hong Kong Seaweeds", no. V, under *S. polyporum*." About another specimen of Dr. VAUGHAN'S collection. no. 132, Prof. SETCHELL writes: "A less representative specimen than any of those under 191a".

Mauritius: Cannonier's Point, 5. Aug. 33, "in shallow water behind reef", R. E. V. no. 191. Port Louis Harbour, leg. G. ANTELME, 10 feet, 15. Jan. 31, R. E. V. no. 132.

Geogr. Distr.: Australia, Adelaide, Melbourne.

12. *Sargassum subrepandum* (Forssk.) Ag.

AGARDH, C., Spec. Alg., vol. 1, p. 8. AGARDH, J., Spec. Alg., vol. 1, p. 319; Spec. Sarg. Austr., p. 95. GRUNOW, A., Additamenta, no. 121, p. 422. — *Fucus subrepandus* Forssk., Fl. Aegyp.-Arab., p. 192.

The Kew Herbarium contains some specimens collected by Colonel PIKE which DICKIE has referred to this species, The specimens seem to agree rather well with KÜTZING'S figure in Tabulae Phycologicae, vol. XI, pl. 11, I, at any rate the leaves have nearly the same shape and dentation and the numerous cryptostomes are arranged in the same way. But compared with a specimen of FORSSKÅL'S the likeness is not so great, the leaves in FORSSKÅL'S plant being smaller, the number of cryptostomes likewise, and the leaves are sinuated and nearly entire. But according to GRUNOW there are many varieties of this polymorphous

species, and the plant from Mauritius might very well be one of these.

Mauritius: Colonel PIKE. Flacq, Sept. 1890, F. JADIN.
Geogr. Distr.: Red Sea.

13. **Sargassum paniculatum* J. Ag.

AGARDH, J., Spec. Alg., p. 315; Spec. Sargass. Austr., p. 122, tab. XII, figs. 1—3. GRUNOW, A., Additamenta, p. 177, no. 228.

About the specimens (a part of one of these is found on Pl. VIII) of Dr. VAUGHAN Professor SETCHELL writes as follows: "Seemingly very excellent specimens of this, of which I have only a scrap named by GRUNOW. I would like very much to get a specimen of this."

Three fine specimens are found in Dr. VAUGHAN'S collection.

Mauritius: Cannonier's Point, 5. Aug. 88, "in shallow water behind reef", R. E. V. no. 189.

Geogr. Distr.: Indian Ocean.

List of Literature.

- AGARDH, C., Synopsis Algarum Scandinaviae. Lundae 1817.
— Species Algarum rite cognitae. Vol. I. 1823. Vol. II. 1828. Gryphiswaldiae.
- AGARDH, J., Nya algar från Mexico. Öfversigt af Kongl. Vetensk.-Akademiens Förhandl. 1847.
— Spec. Algarum. Vol. I. Lundae 1848.
— Till Algernes Systematik. I—VIII. Lunds Universitets Årsskrift. Lundæ 1872—1886.
— Species Sargassorum Australiae descriptae et dispositae. Kongl. Sv. Vetensk.-Akadem. Handl. Bd. 23, no. 3. Stockholm 1889.
— Analecta Algologica. Continuatio I. Act. Soc. Physiograph. Lundensis. T. 29. 1894.
- ASKENASY, E., Algen. Forschungsreise S. M. S. "Gazelle", IV Theil, Botanik (Algen). Berlin 1888.
— Ueber einige australische Meeresalgen. Flora. Bd. 78. 1894.
- BARTON, E. S., A systematic and structural Account of the Genus Turbinaria Lamx. Trans. Linn. Soc. of London, Vol. III. Botany. 1888—94.
— On the fruit of Chnoospora fastigiata. Journ. Linn. Soc. Botany. Vol. 33, London 1897—8.
— List of Marine Algae collected at the Maldive and Laccadive Islands by J. S. Gardiner. Journal of the Linnean Society, Bot. vol. 35. London 1901—4.
- BORNET, Ed., Les Algues de P.-K.-A. SCHOUSBOE récoltées au Maroc et dans la Méditerranée de 1815 à 1829. Mém. de la Soc. nation. des Sciences naturelles et mathématiques de Cherbourg. t. 28. 1892.
- BORY DE ST. VINCENT, Cryptogamie in Duperry, L., Voyage autour du Monde. Botanique par D'Urville, Bory de St. Vincent et A. Brongniart. Paris 1928.
- BØRGESEN, F., The marine Algae of the Danish West Indies. Vol. I. Chlorophyceae and Phæophyceae. Copenhagen 1913—14.

- BØRGESEN, F., Marine Algae from Easter Island. The Natural History of Juan Fernandez and Easter Island. Edit. by Carl Skottsberg, Vol. II. Uppsala 1920.
- Marine Algae from the Canary Islands, especially from Tenerife and Gran Canaria. II. Phaeophyceae. D. Kgl. Danske Vidensk. Selskab, Biol. Medd. VI, 2. København 1926.
 - Some Indian green and brown Algae especially from the shores of the Presidency of Bombay. I. Journal of the Indian Botanical Society. vol. IX. 1930.
 - Some marine Algae from the Northern Part of the Arabian Sea with remarks on their geographical Distribution. D. Kgl. Danske Vidensk. Selskab, Biol. Medd. XI, 6. København 1934.
 - A list of marine Algae from Bombay. D. Kgl. Danske Vidensk. Selskab, Biol. Medd. XII, 2. København 1935.
 - Contributions to a South Indian Marine Algal Flora. I—III. Journal of the Indian Bot. Soc. Vol. 16—7. 1937—8. Madras.
 - Marine Algae from the Iranian Gulf especially from the innermost part near Bushire and the island Kharg. Danish Scientific Investigations in Iran, Part 1. Copenhagen 1939.
- COLLINS, FR. S. and A. B. HERVEY, The Algae of Bermuda. Proc. of the Amer. Academy of Arts and Sciences. Vol. 53. Boston 1917.
- DAMMANN, HILDEGARD, Entwicklungsgeschichtliche und zytologische Untersuchungen an Helgoländer Meeresalgen. Wiss. Meeresuntersuchungen. N. F. Abt. Helgoland. 18. Bd. 1930. Oldenburg.
- DERBÈS, A. et A. SOLIER, Sur les organes reproducteurs des algues. Ann. sciences naturelles. Trois. Série, Botanique. T. 14. Paris 1850. p. 261.
- Mémoire sur quelques Points de la Physiologie des Algues. Supplém. aux Comptes Rendus des Séances de l'Acad. des Sciences. t. 1. Paris 1852—6.
- DE-TONI, J. BAPT., Sylloge Algarum omnium hucusque cognitarum. Vol. III. Fucoideae. Patavii 1895.
- DICKIE, G., On the Algae of Mauritius. Journal of the Linnean Society. Botany. Vol. XIV. London 1875.
- FELDMANN, J., Les Algues marines de la Côte des Albères. I-III. Cyanophycées, Chlorophycées, Phéophycées. Revue Algologique, tome IX, 1937.
- FIGARI, A. e G. DE NOTARIS, Nuovi Materiali per L'Algologia del Mar Rosso. Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino. Ser. II. Tomo XIII. 1853.
- FRIES, ELIAS, Systema orbis vegetabilis. Lundae 1825.

- GEPP, A. and E. S., Marine Algae (Chlorophyceae and Phaeophyceae) and marine Phanerogams of the "Sealark" Expedition, collected by J. STANLEY GARDINER. Transact. Linnean Soc., Ser. 2, Bot., vol. VII, London 1908, pp. 163—188.
- GRUNOW, A., Algae. Reise der österreichischen Fregatte Novara um die Erde in den Jahr. 1857, 1858, 1859. Botanisch. Theil. 1ster Bd. Wien 1870.
- Algen der Fidschi-, Tonga- und Samoa-Inseln. Journ. d. Mus. Godefr., Bd. 3. 1873—4.
- HAMEL, G. Phéophycées de France. Paris 1931—39.
- Sur la classification des Ectocarpales. Botaniska Notiser, 1939. Lund 1939.
- HARVEY, W. H., Notice of a collection of algae, communicated to Dr. HOOKER by the late Mrs. CHARLES TELFAIR, from "Cap Malheureux", in the Mauritius. Journal of Botany edited by W. J. HOOKER. Vol. I. London 1834.
- Nereis Boreali-Americana. Part I, Melanospermeae. Washington 1851.
- HAUCK, F., Die Meeresalgen Deutschlands und Oesterreichs. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz. Zweite Auflage. Zweiter Band. Leipzig 1885.
- Ueber einige von J. M. HILDEBRANDT im Rothen Meere und Indischen Ocean gesammelte Algen. Hedwigia 1887.
- HERING in KRAUSS, F., Pflanzen des Cap- und Natal-Landes, gesammelt und zusammengestellt von . . . Flora. 1846.
- HOWE, M. A., Algae in N. L. BRITTON, Flora of Bermuda. New York 1918.
- Algae in BRITTON and MILLSPAUGH, The Bahama Flora. New York. 1920.
- JADIN, F., Algues des Iles de la Réunion et de Maurice. Annales de Cryptogamie exotique. Tome VII. Paris 1934.
- KNIEP, HANS, Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena 1928.
- KNIGHT, MARGERY, Studies in the Ectocarpaceae I. The Life-History and Cytology of Pylayella littoralis. Transact. R. Soc. Edinburgh. vol. 53. 1923.
- Nuclear Phases and Alternation in Algae. Phaeophyceae. Beihefte zum Bot. Centralblatt. Bd. 48. 1ste Abt. 1931, p. 19.
- KUCKUCK, P., Fragmente einer Monographie der Phaeosporeen. Nach dem Tode des Verfassers herausg. von W. NIENBURG. Wissensch. Meeresunters., N. F. Bd. 17. Abt. Helgoland. Oldenburg 1929.
- KÜTZING, FR., Phycologia Generalis. Leipzig 1843.

- KÜTZING, FR., Ueber die systematische Eintheilung der Algen. *Linnaea*. Bd. 17. 1843.
- *Phycologia germanica*. Nordhausen 1845.
 - *Tabulae Phycologicae*. Bd. 1—19. Nordhausen 1845—69.
 - *Species Algarum*. Lipsiae 1849.
- KYLIN, H., Studien über die Algenflora der schwedischen Westküste. *Akadem. Abhandl. Upsala* 1907.
- Über die Entwicklungsgeschichte der Phaeophyceen. *Lunds Universitets Årsskrift. N. F.*, Avd. 2, Bd. 29. Nr. 7. 1933.
 - Bemerkungen über die Entwicklungsgeschichte einiger Phaeophyceen. *Lunds Univers. Årsskr. N. F.* Avd. 3, Bd. 33, Nr. 1. 1937.
 - Die Phaeophyceenordnung Chordariales. *Lunds Universitets Årsskrift. N. F.* Avd. 2, Bd. 36, Nr. 9. 1940.
- LAMOUREUX, J. V., *Essai sur les genres de la famille des Thalassiophytes non articulées*. Paris 1813.
- LE JOLIS, A., *Liste des Algues marines de Cherbourg*. Paris 1863.
- LYNGBYE, H. C., *Tentamen Hydrophytologiae Danicae. Hafniae* 1919.
- MARTIUS, C., *Icones Plantarum Cryptogamicarum Brasiliensium. Monachii* 1828—1834.
- MAZÉ et SCHRAMM, *Essai de classification des Algues de la Guadeloupe*. 2^e Edit. Basse-Terre 1870—1877.
- MENEGHINI, G., *Alge Italiane e Dalmatiche*. Padova 1842.
- OKAMURA, K., *Icones of Japanese Algae*. Tokyo 1907—1934.
- The distribution of marine Algae in Pacific Waters. *Records of Oceanographic Works in Japan*. Vol. IV, no. 1. 1932, Tokyo.
- OLTMANN, FR., *Morphologie und Biologie der Algen*. Ilte umgearb. Aufl. Iiter Bd. Phaeophyceae—Rhodophyceae. Jena 1922.
- PARKE, MARY, A contribution to the knowledge of the Mesogloioceae and associated families. *Publications of the Hartley botanical Laboratories*. No. 9. Liverpool 1933.
- REINBOLD, TH., *Die Meeresalgen der deutschen Tiefsee-Expedition 1898—1899*. Chun, C., *Wissensch. Ergebn. d. deutsch. Tiefsee-Exp.* Iiter Bd. 2 Teil. Jena 1907.
- REINKE, J., *Beiträge zur vergleichenden Anatomie und Morphologie der Sphaecelariaceen*. *Biblioth. Botanica*. Heft. 33. Cassel 1891.
- ROTH, A. G., *Catalecta Botanica quibus Plantae novae et minus cognitae describuntur atque illustrantur*. Fasc. I—III. Lipsiae 1797, 1800, 1806.
- SAUNDERS, DE ALTON, *Phycological Memoirs*. *Proceed. of the California Acad. of Sciences*. 3rd Ser. Botany. Vol. 1, no. 4. San Francisco 1898.

- SAUVAGEAU, C., Sur l'Ectocarpus virescens Thuret et ses deux sortes de sporanges pluriloculaires. Journal de Botanique, 1896.
- Remarques sur les Sphacéliariacées. Bordeaux 1900—1914.
- Observations sur quelques Dictyotacées et sur un Aglaozonia nouveau. Soc. Scientif. d'Arcachon. Travaux des Laboratoires. 8. Ann. (1904—05). Paris 1905.
- Sur le Colpomenia sinuosa Derb. et Sol. Bull. de la Station Biologique d'Arcachon. T. 24. Bordeaux 1927.
- Sur le Castagnea Zosteræ Thur. Bull. de la Station Biolog. d'Arcachon. t. 24. 1927, p. 369. Bordeaux.
- Sur quelques Algues Phéosporées de Guéthary (Basses-Pyrénées). Bullet. de la Station Biologique d'Arcachon. Tome 30, 1933. Bordeaux.
- Second Mémoire sur les Algues Phéosporées de Villefranche-sur-Mer. Bullet. de la Stat. Biolog. d'Arcachon. T. 33, 1936. Bordeaux.
- SCHMIDT, OTTO CHR., Verzeichnis der Meeresalgen von Neu-Guinea und dem westlichen Oceanien. "Hedwigia", Bd. 68, 1928. Dresden.
- SETCHELL, W. A., American Samoa. Departm. of Marine Biology of the Carnegie Institution of Washington. Vol. XX. 1924.
- and N. L. GARDNER, The marine algae of the Pacific Coast of North America. Part III. Melanophyceae. University of California Publications in Botany. Vol. 8. Part III. Berkeley 1925.
- Tahitian Algae and Tahitian Spermatophytes collect. by W. A. SETCHELL, C. B. SETCHELL and H. C. PARKS. Univers. of California Publications in Botany. Vol. 12. Berkeley 1926.
- Hong Kong Seaweeds. I—V. The Hong Kong Naturalist. Supplement 1931—1936. Hong Kong.
- Report on the Sargassums. The Templeton Crocker Expedition of the California Academy of Sciences. 1932. No. 34. Proceed. of the Calif. Acad. of Sc. 4th Ser., vol. 22, 1937.
- SONDER, G., Nova Algarum genera et species, quas in itinere ad oras occidentales Novæ Hollandiæ, collegit L. PREISS. Botanische Zeitung 1845, p. 49.
- SURINGAR, W., Algues du Japon. Leide 1872.
- SVEDELIUS, N., On the number of chromosomes in the two different kinds of plurilocular sporangia of Ectocarpus virescens Thuret. Svensk Botanisk Tidsskrift. Bd. 22. 1928. Stockholm.
- On the number of chromosomes in the two different forms of Ectocarpus virescens Thuret. Proceed. of the International Congress of Plant Sciences I. 1929. New York.

- TAYLOR, W. R., Marine Algae of the Northeastern Coast of North-America. Ann Arbor. 1937.
- TURNER, DAWSON, Fuci sive Plantarum Fucorum Generi. Vol. I—IV. London 1808—1819.
- VICKERS, A., Liste des Algues marines de la Barbade. Ann. Sciences Natur. 9^{ième} Sér., t. 1, 1905.
- Phycologia Barbadiensis. Iconographie des Algues Marines récoltées à l'Île Barbade (Antilles). (Chlorophycées et Phéophycées). Avec texte explicatif par M. A. SHAW. Paris 1908.
- WEBER-VAN BOSSE, A., Liste des Algues du Siboga. Siboga-Expeditie, LIX a, b, c. d. Leide 1913—1928.
-

INDEX OF SPECIES

together with some important synonyms, the latter printed in italics.

	Page
<i>Aegira</i> Fries.....	53
<i>Chnoospora fastigiata</i> J. Ag.....	63
— <i>implexa</i> (Her.) J. Ag.....	63
— <i>pannosa</i> J. Ag.....	64
<i>Cladosiphon Mauritianum</i> Børgs.....	54
<i>Cladosiphon occidentalis</i> Kylin.....	55
— <i>Sibogae</i> Kylin.....	55
<i>Colpomenia sinuosa</i> (Roth) Derb. et Sol.....	61
<i>Dictyota Bartayresiana</i> Lamour.....	51
— <i>divaricata</i> Lamour.....	50
— <i>obtusangula</i> Harv.....	63
<i>Ectocarpus amicornum</i> Harv.....	9, 15
— <i>arabicus</i> Fig. et De Not.....	23
— <i>breviarticulatus</i> J. Ag.....	39
— <i>coniferus</i> Børgs.....	23, 24
— <i>coniger</i> Børgs.....	23, 29
— <i>Duchassaingianus</i> Grunow.....	16
— <i>Enhali</i> Børgs.....	6
— <i>guadeloupensis</i> Crouan.....	9
— <i>hamatus</i> Crouan.....	39
— <i>indicus</i> Sonder.....	16
— <i>irregularis</i> Kütz.....	23
— <i>Mitchellae</i> Harv.....	7
— <i>Rallsiae</i> Vickers.....	23
— <i>rhodochortonoides</i> Børgs.....	36
— <i>simpliciusculus</i> C. Ag.....	25
— <i>spongiosus</i> Dickie.....	39
— <i>Tamarinii</i> Børgs.....	36
— <i>Van Bosseae</i> Setch. et Gardn.....	30
— <i>Vaughani</i> Børgs.....	31
— <i>virescens</i> Thur.....	7
<i>Gonodia arabica</i> (Kütz.) Børgs.....	52
<i>Hydroclathrus clathratus</i> (Bory) Howe.....	62
<i>Mesogloia decipiens</i> Suringar.....	57
<i>Myriactula arabica</i> (Kütz.) Feldm.....	52

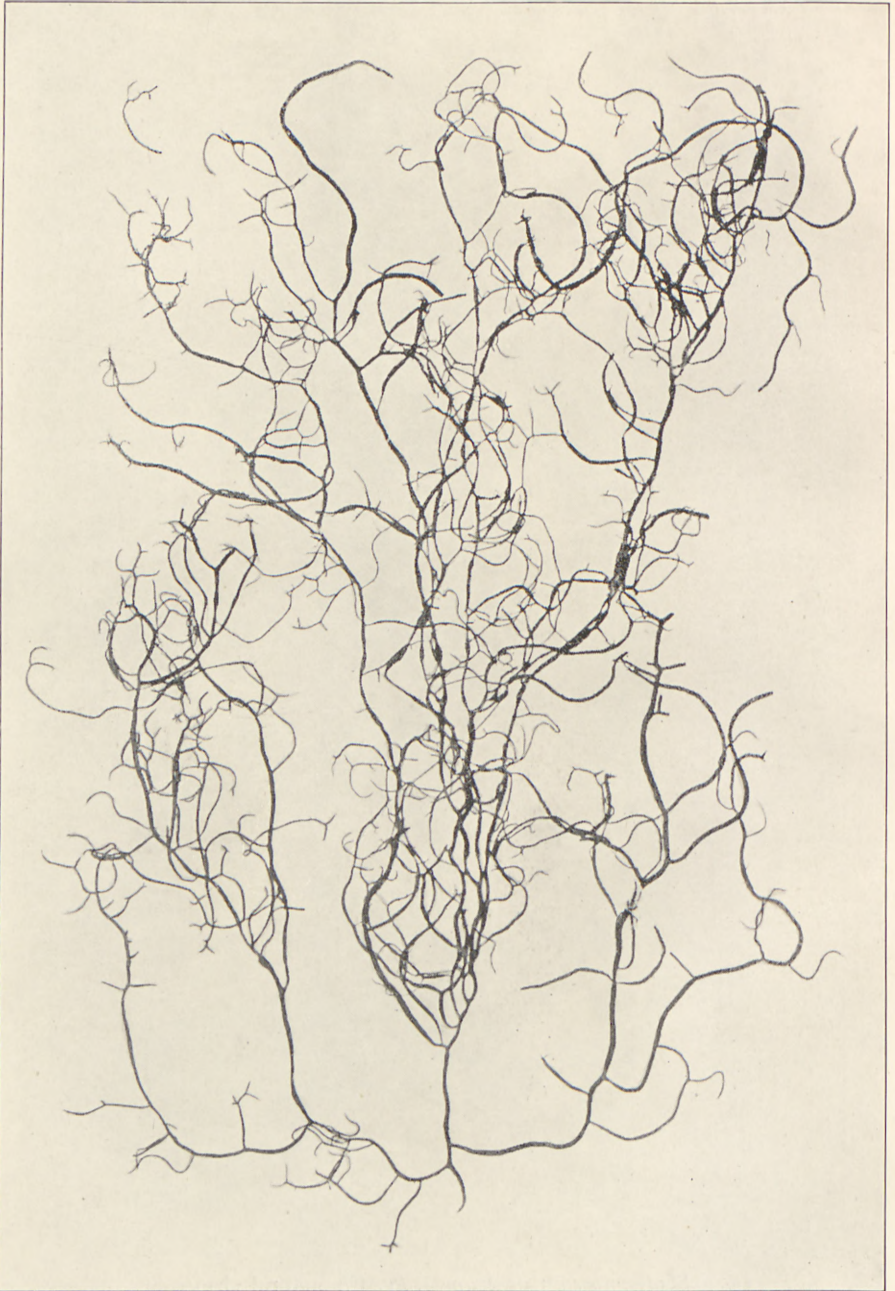
	Page
<i>Nemacystus decipiens</i> (Sur.) Kuck.....	57
<i>Padina Commersonii</i> Bory.....	49
— <i>gymnospora</i> (Kütz.) Vickers.....	49
<i>Phycophila arabica</i> Kütz.....	52
<i>Rosenvingea intricata</i> (J. Ag.) Børgs.....	65
<i>Sargassum baceiferum</i> (Turn.) C. Ag. forma <i>capillifolia</i> Kütz.....	70
— <i>densiflorum</i> Zan.....	69
— <i>duplicatum</i> J. Ag.....	68
— <i>granuliferum</i> C. Ag.....	68
— <i>heterophyllum</i> (Turn.) C. Ag.....	66
— <i>Merrifieldii</i> J. Ag.....	71
— <i>myriocystum</i> J. Ag.....	68
— <i>obovatum</i> (Harv.) var. <i>Robillardii</i> Grun.....	67
— <i>paniculatum</i> J. Ag.....	73
— <i>polycystum</i> var. <i>onustum</i> J. Ag.....	68
— <i>Portierianum</i> Zan.....	70
— <i>Scopula</i> Grun.....	71
— <i>subrepandum</i> (Forssk.) C. Ag.....	72
<i>Spathoglossum asperum</i> J. Ag.....	48
<i>Sphacelaria furcigera</i> Kütz.....	46
— <i>Novae Hollandiae</i> Sonder.....	45
— <i>rigida</i> Hering.....	42
— <i>tribuloides</i> Menegh.....	41
<i>Turbinaria ornata</i> J. Ag.....	65
<i>Zonaria variegata</i> (Lamour.) C. Ag.....	47

Indleveret til Selskabet den 19. Februar 1941.
Færdig fra Trykkeriet den 26. Maj 1941.

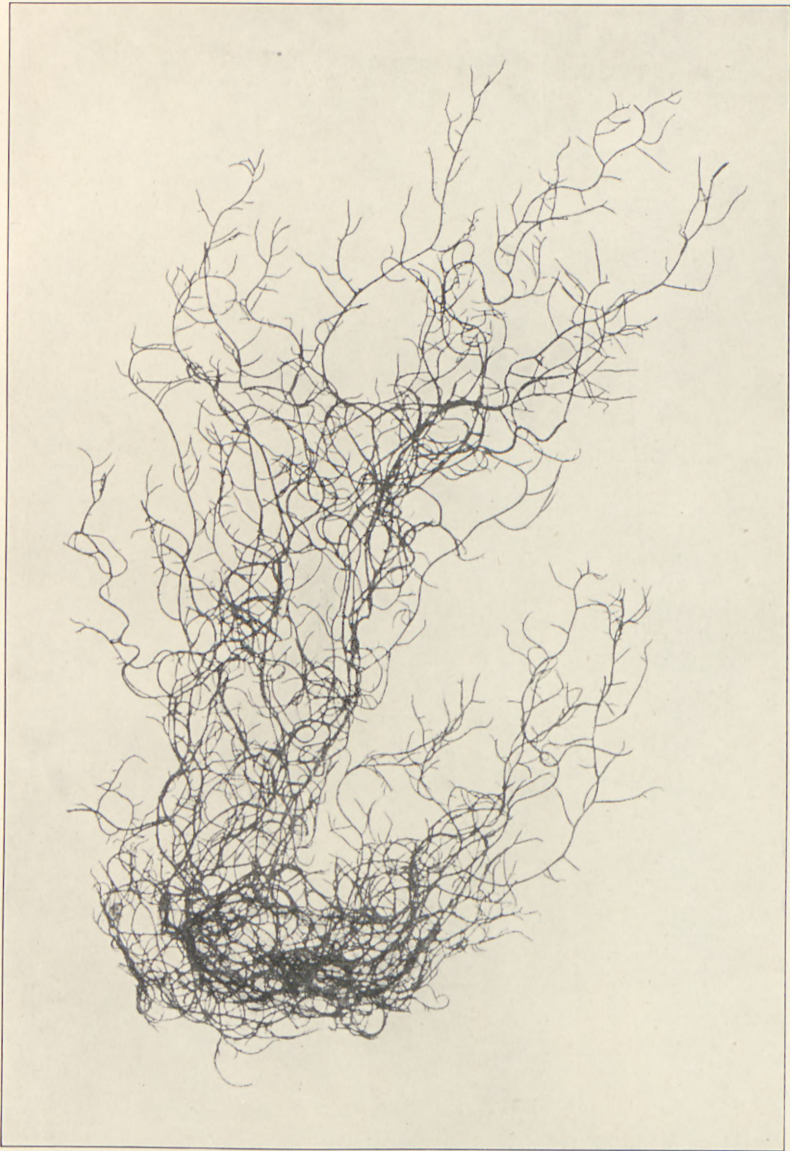
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	38
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	46
47	47
48	48
49	49
50	50
51	51
52	52
53	53
54	54
55	55
56	56
57	57
58	58
59	59
60	60
61	61
62	62
63	63
64	64
65	65
66	66
67	67
68	68
69	69
70	70
71	71
72	72
73	73
74	74
75	75
76	76
77	77
78	78
79	79
80	80
81	81
82	82
83	83
84	84
85	85
86	86
87	87
88	88
89	89
90	90
91	91
92	92
93	93
94	94
95	95
96	96
97	97
98	98
99	99
100	100



Spathoglossum asperum J. Ag. ($\frac{2}{3}$ natural size).



Cladosiphon Mauritianum Børgs. (About $\frac{1}{2}$ natural size).



Nemacystus decipiens (Sur.) Kuck. From Dwarka (India). (Natural size).



Sargassum granuliferum C. Ag. (About $\frac{2}{3}$ natural size).



Sargassum densifolium Zan. Above a specimen with large vesicles (no. 188).
Below a specimen with small vesicles (no. 190). ($\frac{1}{2}$ natural size).



Sargassum Portierianum Zan. ($\frac{3}{5}$ natural size).



Sargassum Merrifieldii J. Ag. ($\frac{1}{2}$ natural size).



Sargassum paniculatum J. Ag. (About $\frac{1}{2}$ natural size).

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser **XVI**, 4.

ÜBER DAS VERHÄLTNIS ZWISCHEN
VERWANDTSCHAFT UND VERBREITUNG
VON ORGANISMEN IN BEZIEHUNG ZU
ÖKOLOGISCHEN STUDIEN AUF GRUND-
LAGE DER VERBREITUNG

VON

E. STEEMANN NIELSEN



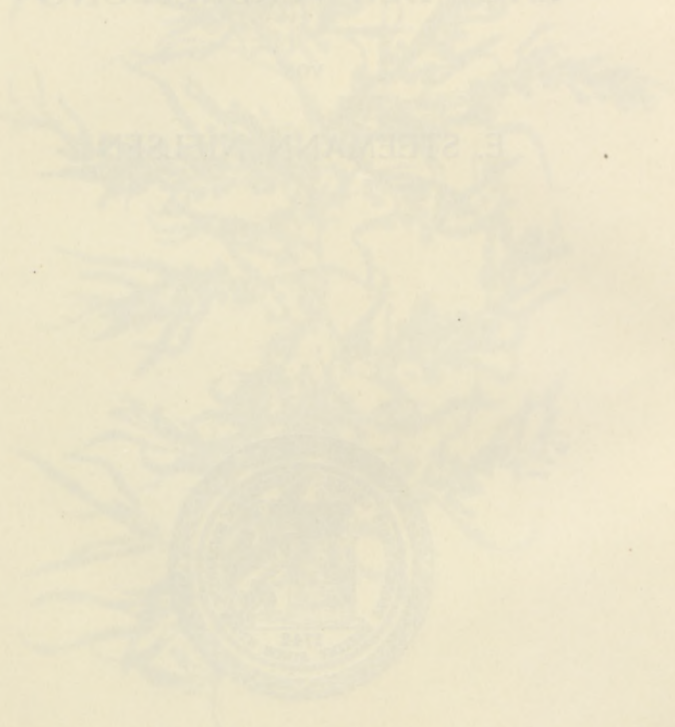
KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

ÖBER DAS VERHÄLTNIß ZWISCHEN
VERWANDTSCHAFT UND VERBREITUNG
VON ORGANISMEN IN BEZIEHUNG ZU
ÖKOLOGISCHEN STUDIEN AUF GRUND-
LAGE DER VERBREITUNG

E. STEINHAUS



KÖBENHAVN

1 KOMMISSION FOR BOKSALG

Printed in Denmark.

Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.

Untersuchungen über die Verbreitung der verschiedenen Organismen sind ein Zweig der biologischen Wissenschaft, der durchaus nicht entbehrt werden kann, wenn man eingehendere Aufschlüsse über die Ökologie der Organismen zu gewinnen sucht.

Dass Verbreitung und Verwandtschaft der Arten in Beziehung zu einander stehen, wurde bereits in der letzten Hälfte des vorigen Jahrhunderts von verschiedenen Botanikern erkannt. Als Pionier auf diesem Gebiete ist D. STURS (1860), zu nennen. R. v. WETTSTEIN hat in seiner Arbeit »Grundzüge der geographisch-morphologischen Methode der Pflanzensystematik« (1898) eine klare Darstellung des Problems gegeben. Als spezielle Grundlage für seine Abhandlung benutzte er vor allem die Verbreitungsverhältnisse bei Arten der Gattungen *Gentiana* und *Euphrasia*. WETTSTEIN und seine Vorgänger waren zu der Anschauung gelangt, dass die Verbreitungsbezirke von zwei sehr nahe verwandten Arten dicht aneinander grenzen, ohne sich jedoch zu decken. Im Übergangsbereich, wenn sich ein solcher findet, kann man auf Hybridisierung zwischen den beiden Arten stossen. Entfernter verwandte Arten dagegen haben meist weit voneinander gelegene Verbreitungsbezirke, oder ihre Verbreitungsbezirke decken sich mehr oder weniger, und die Arten bastardieren nicht miteinander.

Später gelangten die Zoologen, unabhängig von den Botanikern, zu der Erkenntnis der Gültigkeit dieser Regel,

die nach ihrem »Entdecker« oft die JORDANSche Regel genannt wird; so z. B. bei HESSE (1924).

Die biologische Grundlage dieser Regel ist einfach. Denken wir uns, dass eine ursprüngliche Art ein bestimmtes Areal deckt. Entsteht hier nun, z. B. durch Mutationen, eine abweichende Form, wird dieser im allgemeinen die Möglichkeit zum selbständigen Bestehen fehlen, da der Befruchtungsfaktor einen Ausgleich bewirken wird. Nur wenn ein Teil der Population örtlich oder ausnahmsweise zeitlich isoliert wird, kann er sich selbständig weiter entwickeln und eine selbständige Rasse oder Art, wie man es nennen will, bilden.

Die oben angeführte Regel über das Verhältnis zwischen Verwandtschaft und Verbreitung der Arten gilt jedoch keineswegs für alle Organismen. Bei Organismen ohne jegliche geschlechtliche Verpflanzung gilt in grossen Zügen die entgegengesetzte Regel, da hier die Verbreitungsbezirke durchschnittlich umso näher zusammenfallen je enger die Arten verwandt sind. Ferner ist auch bei einer grossen Reihe von Organismen mit geschlechtlicher Verpflanzung die Anwendung der Regel ausgeschlossen. Man findet hier alle möglichen Zwischenstadien zwischen den beiden Regeln.

Der Grund dafür, dass sehr nahe verwandte, ungeschlechtliche Organismen oft den gleichen Verbreitungsbezirk haben, liegt darin, dass infolge der fehlenden Sexualität keinerlei Ausgleich in einem Bestande erfolgt. Auf Grund von Mutation entstandene, abweichende Formen können sich unabhängig von der Hauptpopulation selbständig weiter entwickeln, sofern sie nur lebensfähig sind und sich in der Konkurrenz zu behaupten vermögen.

Wenn nicht alle geschlechtlichen Organismen der Regel

folgen, dass sich sehr nahe verwandte nicht in demselben Verbreitungsbezirk befinden, so hat diese Erscheinung verschiedene Ursachen.

Es erscheint deshalb zweckmässig, diese ganze Frage einmal genauer zu beleuchten und anhand verschiedener Beispiele zu untersuchen, inwieweit die Verbreitungsverhältnisse ökologisch ausgewertet werden können.

In erster Linie sollen hier die Verhältnisse bei den ozeanischen und semiozeanischen Organismen berücksichtigt werden, und zwar hauptsächlich deshalb, weil hier die Verhältnisse aus verschiedenen Gründen bedeutend klarer liegen als irgendwo sonst. Vor allem spielt hier das Isolationsproblem nur eine verhältnismässig geringe Rolle, und die Isolationsverhältnisse sind ziemlich klar zu übersehen. Auch sind die Verbreitungsverhältnisse hier eingehender untersucht als in manchen anderen Gegenden, da der Lebensraum über grosse Gebiete hin so gleichartig ist. Selbst wenn die Untersuchungen z. B. auf dem Lande durchgehend viel intensiver durchgeführt wurden, so ist das Resultat der bedeutend sparsameren Untersuchungen im Ozean doch oft zufriedenstellender, da die Untersuchungen an einem einzelnen Punkt des Ozeans in ganz anderem Grade für einen grossen Bezirk repräsentativ sind, als es auf dem Lande der Fall sein kann. Ferner ist die individuelle Aktionsweite bei allen ozeanischen Organismen — auch bei solchen, deren Selbstbeweglichkeit keine Rolle spielt — infolge der Wirkung der Strömungen ausserordentlich gross. Die Verbreitung im Ozean ist schliesslich auch für ökologische Studien viel leichter zu verwerten, da die meisten ökologischen Faktoren im Meere und besonders in den Ozeanen leicht zu übersehen und zu registrieren sind.

Die grossen dänischen ozeanographischen Expeditionen, die auf Veranlassung von J. SCHMIDT während vieler Jahre ausgeführt wurden, — es seien z. B. die Dana-Expeditionen 1921—1922 und 1928—1930 erwähnt —, haben darum ausgezeichnetes Material zum Studium gerade der hier zu behandelnden Probleme beigebracht.

Als Type von Organismen mit geschlechtlicher Verpflanzung wird die Gattung *Stomias* benutzt; Systematik und Verbreitung sind in einer Arbeit von VILH. EGE (1934) behandelt.

Als Musterbeispiel für Organismen ohne sexuelle Verpflanzung soll die Peridineen Gattung *Ceratium* angeführt werden; ihre Verbreitung in den Ozeanen ist vom Verfasser bereits früher behandelt worden (STEEMANN NIELSEN, 1939).

Die Gattung *Stomias*, die zu den primitiven Beifischen gehört, findet sich im tropischen, subtropischen und temperierten Wasser aller Weltmeere. Bekannt sind sechs Arten. Fünf Arten bilden eine mehr oder weniger nahe verwandte Gruppe, während eine einzelne Art, *S. nebulosus*, isoliert dasteht. Zwei Arten der ersten Gruppe sind besonders nahe verwandt, und zwar *S. affinis* und *S. boas*, von denen die letztere verschiedene Rassen oder Unterarten bildet. Der Unterschied zwischen den beiden Arten ist etwas grösser als zwischen den Unterarten der *S. boas*. *S. colubrinus*, *S. brevibarbatus* und *S. danae* sind auch mit den früher erwähnten Arten verwandt, jedoch nach EGE in etwas geringerem Grade.

Bei einer Untersuchung der Verbreitung der nahe verwandten Formen der Gruppe *S. affinis-boas*¹⁾ fällt so-

¹⁾ Siehe Fig. 1. Hier sind nur die Verbreitungsverhältnisse im nördlichen Atlantischen Ozean angegeben. Eine Übersichtskarte der totalen Verbreitung sämtlicher Arten und Rassen der Gattung *Stomias* ist bei EGE, 1934, Tafel 1 zu finden.

gleich auf — worauf auch EGE hinweist —, dass die einzelnen Formen horizontal einander ausschliessen. *S. affinis* ist eine äquatoriale Art, die nur im wärmsten Wasser in der Nähe des Äquators und in den von hier ausgehenden warmen Strömen — dem südlichsten Teil des Golfstromes im Atlantischen Ozean und dem südlichsten Teil des Kuro Shiva im Stillen Ozean — gefunden wird. *S. boa boa* hingegen ist eine subtropische Form; sie findet sich auf beiden Hemisphären im Atlantischen Ozean und ist somit eine bi-subtropische Form. Im Indischen und im Stillen Ozean ist sie aber bisher nur auf der südlichen Hemisphäre gefunden worden. Im Indischen Ozean sind auf der nördlichen Hemisphäre keine Lebensmöglichkeiten für eine solche Form vorhanden; im Stillen Ozean dagegen ist auf der nördlichen Halbkugel *S. boa boa* durch die ihr sehr ähnliche *S. boa atriventer* vertreten.

Im temperierten Wasser kommt im nördlichen Atlantischen Ozean *S. boa ferox* vor. Auf der südlichen Halbkugel dagegen findet sich *S. boa gracilis*, die vorläufig nur im Indischen und im Stillen Ozean beobachtet wurde, aber, wie anzunehmen, sicher auch im südlichen Atlantischen Ozean heimisch ist.

Alle diese *Stomias*-Formen sind in den Wasserschichten der Oberfläche zu finden. Die drei Arten *S. colubrinus*, *S. brevibarbatus* und *S. danae*¹⁾, die, wie bereits erwähnt, nach EGE den vorher genannten Formen nahe stehen, sind dagegen Bewohner der etwas tieferen Wasserschichten — von etwa 150 m Tiefe nach unten: *S. brevibarbatus*, die bisher nur im Atlantischen Ozean nachgewiesen werden konnte, kommt dort vor, wo die Temperatur in einer Tiefe

¹⁾ Die Verbreitung von *S. colubrinus* und *S. brevibarbatus* im Atlantischen Ozean ist in Fig. 2 angegeben.

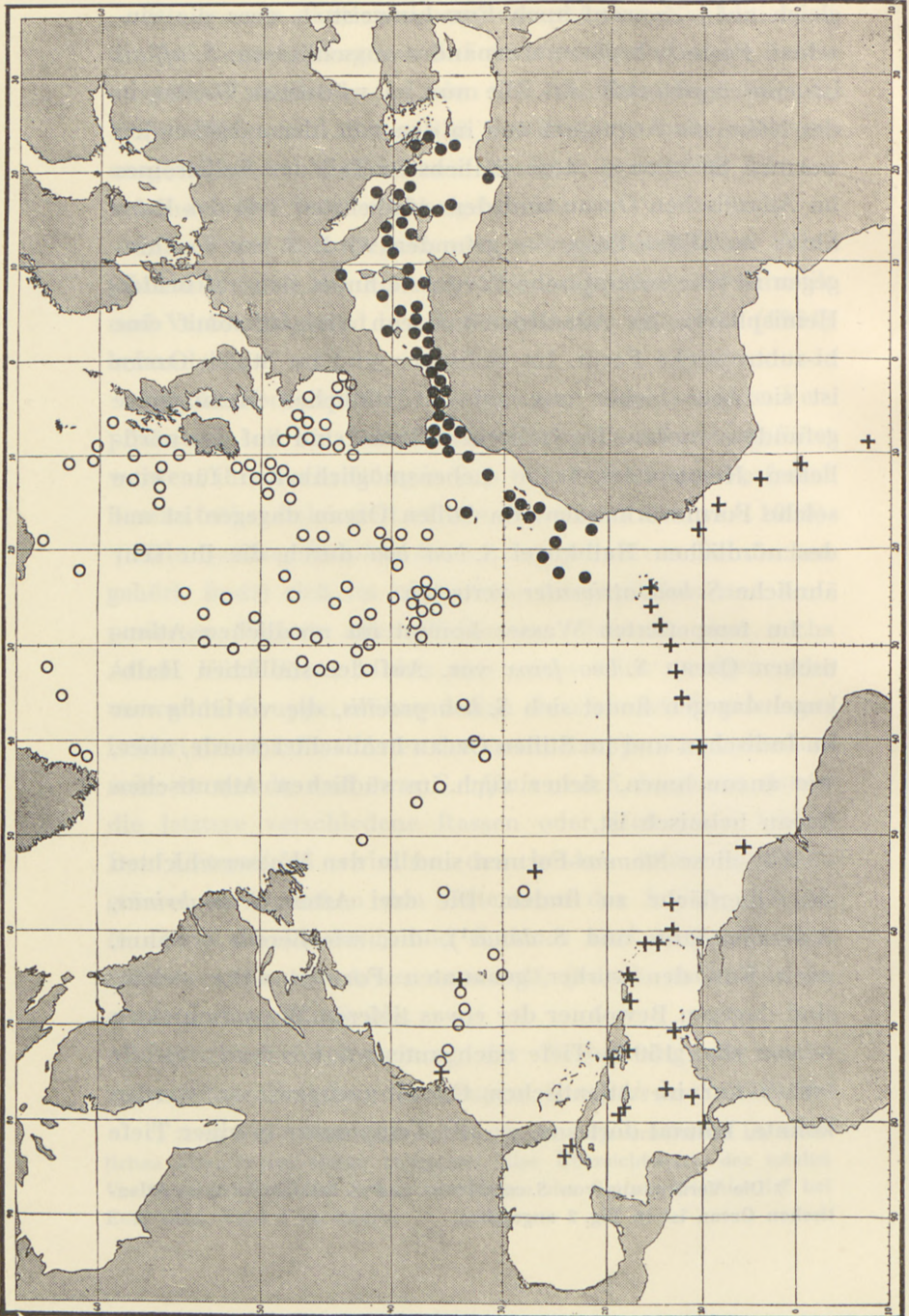


Fig. 1. Verbreitung von *Stomias boa boa*, *Stomias boa ferax* und *Stomias affinis*, nahe verwandten Oberflächenformen (nach EGE).

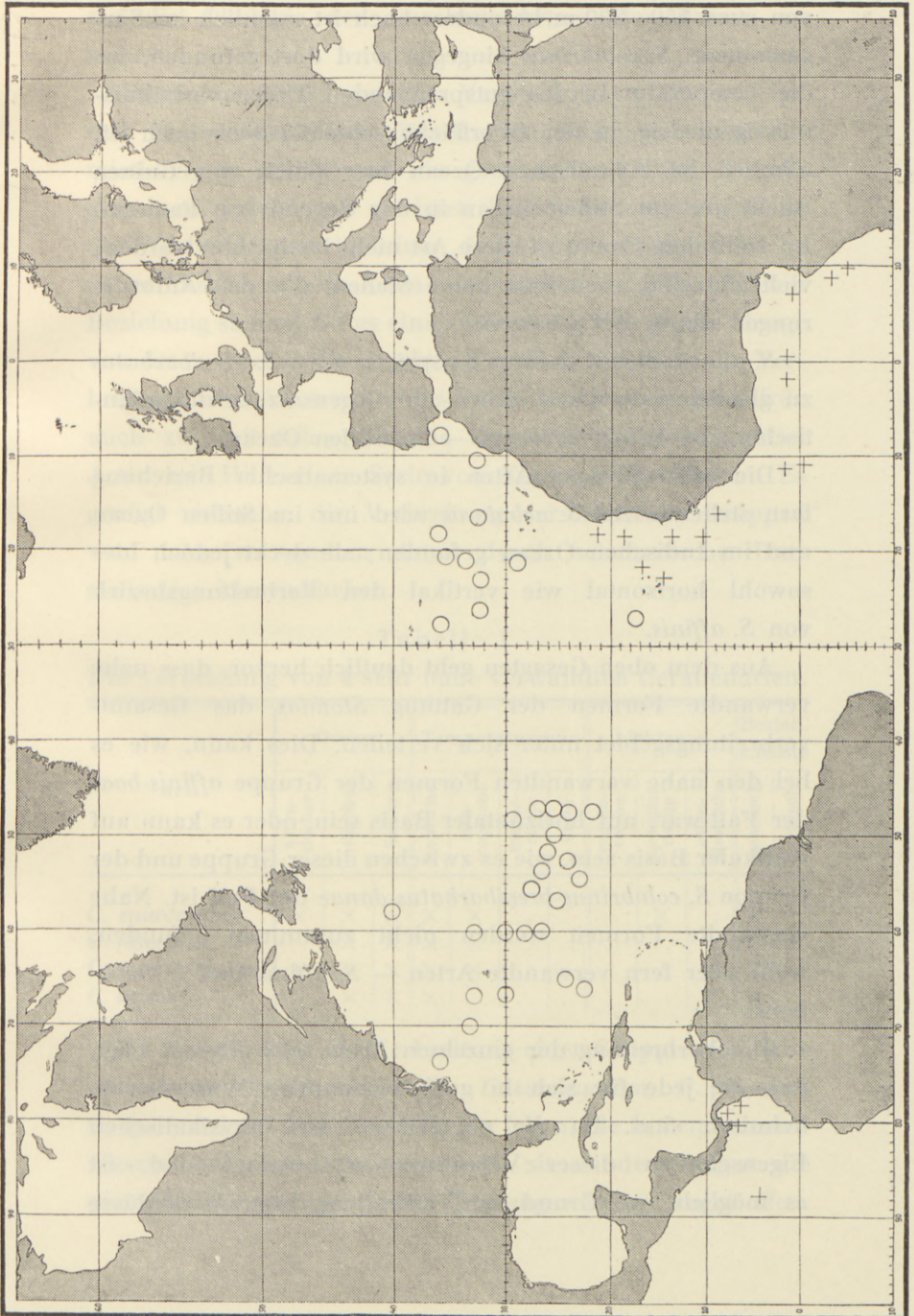


Fig. 2. Verbreitung von + *Stomias colubrinus* und O *Stomias brevibarbadus*, nahe verwandten Tiefenformen (nach EGE).

von etwa 150—200 m besonders hoch ist, nämlich im Sargassomeer. *S. colubrinus* hingegen wird dort gefunden, wo die Temperatur in den entsprechenden Tiefen verhältnismässig niedrig, in der Oberflächenschicht jedoch hoch ist, nämlich im Atlantischen Ozean im Gebiete der Guinea Bucht und im Stillen Ozean in der Gegend von Panama. Im Indischen Ozean ist diese Art nicht beobachtet worden; vielleicht sind auch hier keine Stellen, die den Anforderungen dieser Art genügen.

S. danae scheint in ihren Ansprüchen der *S. brevibarbatus* zu gleichen; sie findet sich — im Gegensatz zu der atlantischen Art *S. brevibarbatus* — im Stillen Ozean.

Die allen übrigen Arten in systematischer Beziehung fern stehende Art *S. nebulosus* wird nur im Stillen Ozean und im Indischen Ozean gefunden; sie deckt jedoch hier sowohl horizontal wie vertikal den Verbreitungsbezirk von *S. affinis*.

Aus dem oben Gesagten geht deutlich hervor, dass nahe verwandte Formen der Gattung *Stomias* das Gesamtverbreitungsgebiet unter sich verteilen. Dies kann, wie es bei den nahe verwandten Formen der Gruppe *affinis-boas* der Fall war, auf horizontaler Basis sein, oder es kann auf vertikaler Basis sein, wie es zwischen dieser Gruppe und der Gruppe *S. colubrinus-brevibarbatus-danae* der Fall ist. Nahe verwandte Formen werden nicht zusammen gefunden, wohl aber fern verwandte Arten — *S. affinis* und *S. nebulosus*.

Die Verbreitung der einzelnen Arten oder Rassen zeigt, dass sie jede für sich in ganz bestimmten Wassersorten heimisch sind. Da die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Wassermassen bekannt sind, ist es möglich, auf Grund der Verbreitung bündige Schlüsse

auf die Ökologie der einzelnen Arten oder Rassen zu ziehen.

Betrachtet man nun die Verbreitungsverhältnisse bei den ungeschlechtlichen Ceratien verglichen mit den Stomatiden, so erhält man ein ganz anderes Bild. Im allgemeinen, jedoch mit gewissen Einschränkungen, werden die Verbreitungsverhältnisse desto gleichartiger sein, je näher die einzelnen Arten zueinander in systematischer Beziehung stehen. Da es eine ausserordentlich grosse Menge von Arten — etwa 70 — gibt, ist es nicht möglich, die Verbreitung aller Arten auf einer Karte darzustellen. Es würde auch zu weit führen, wollte man die Verbreitung aller Arten mit Hilfe einer Serie von Karten verdeutlichen. Es genügt vielmehr, die Verbreitung verschiedener Gruppen von nahe verwandten Arten durch schematische Darstellungen klarzumachen.

Tabelle 1.

Die Verbreitung von 4 sehr nahe verwandten Ceratienarten.

Art	Ozean			Temperaturzone				Lichtzone			Bezieh. z. Küste	
	Atlantischer	Indischer	Stiller	tropische	sub-tropische	temperierte	kalte	euphotische	mesophotische	oligophotische	ozeanisch	neritisch
<i>C. euarquatum</i> ..	×	×	×	×	×	×	..	×	..
<i>C. filicorne</i>	×	×	×	×	×	..
<i>C. symmetricum</i> ..	×	×	×	×	×	×	×	..
<i>C. axiale</i>	×	×	×	×	×	×	..

In Tabelle 1 ist die Verbreitung einer Gruppe sehr nahe verwandter Arten dargestellt: *C. euarquatum*, *C. filicorne*, *C. symmetricum* und *C. axiale*. Sie leben alle in den warmen Meeren und sind rein ozeanisch; sie werden so gut wie niemals in den eigentlichen Küstengewässern angetroffen.

Alle Arten sind Bewohner der etwas tieferen Wasserschichten, durchgehend in 50—100 m Tiefe. Sie sind sogenannte oligophotische und mesophotische Arten. *C. euarquatam*, *C. symmetricum* und *C. axiale* werden im Atlantischen Ozean, im Indischen und im Stillen Ozean gefunden, während *C. filicorne* nur in den beiden letztgenannten vorkommen. Wir sehen indessen, dass das hauptsächliche Verbreitungsgebiet der vier nahe verwandten Arten das gleiche ist. Wir haben hier keinen Befruchtungsfaktor, der die Population innerhalb eines einzelnen Bezirks zu homogenisieren sucht. Entsteht durch Mutation aus einer Form eine neue, so kann sich diese unabhängig von der Hauptpopulation weiter entwickeln. Da in den morphologischen Charakteren nahe Verwandte natürlich in erster Linie auch in bezug auf die physiologischen Charaktere nahe verwandt sein müssen, so ist es selbstverständlich, dass nahe verwandte, ungeschlechtliche Organismen in der Regel in ökologischer Beziehung ungefähr dieselbe Verbreitung haben. Nahe Verwandte werden oft — doch nicht immer — dieselbe Verbreitung in Hinsicht auf Licht, Temperatur und den ozeanisch-neritischen Faktor haben. Bei der geographischen Verbreitung sind noch andere Umstände von Bedeutung, so im besonderen die Isolationsfrage, die in der Regel durch geomorphologische Ursachen bestimmt wird. Ist ein ozeanisches Warmwasserceratium im Stillen Ozean entstanden, wird es auch bis zum Indischen Ozean Verbreitung finden; diese beiden Ozeane sind durch warme Wassermassen miteinander verbunden. Sofern die Art sowohl in dem sehr warmen, äquatorialen Wasser als auch in dem weniger warmen, subtropischen Wasser leben kann, ist es sehr wohl möglich, dass eine Verbreitung vom Atlantischen zum Indischen Ozean oder umgekehrt

stattfindet. Alle ozeanischen Ceratienarten, die sich im subtropischen Wasser finden, kommen gleichermassen in allen drei Ozeanen vor. Dies gilt jedoch nicht immer für jene Arten, die ausschliesslich in dem ausgeprägt warmen, äquatorialen Wasser heimisch sind. Einige dieser Arten, jedoch nicht der grössere Teil, finden sich entweder im Atlantischen oder im Indischen und im Stillen Ozean. Dies ist z. B. der Fall bei der bereits erwähnten Art *C. filicorne*, die nicht im Atlantischen Ozean gefunden wird.

Wie wir im vorstehenden gesehen haben, sind die ökologischen Forderungen aller Arten der obenerwähnten Ceratien-Gruppe einigermassen gleichartig, wonach auch ihr Hauptverbreitungsgebiet zusammenfällt. Betrachten wir die Verbreitung der Arten im einzelnen, sehen wir jedoch, dass Gradverschiedenheiten in den ökologischen Ansprüchen der einzelnen Arten vorliegen. *C. symmetricum* hat seine Verbreitung sowohl in den ausgeprägt warmen wie weniger warmen, subtropischen Wassermassen. Ähnlich verhält sich *C. euarquatam*. *C. filicorne* und *C. axiale* sind dagegen reine Warmwasserarten; sie werden weder im Mittelmeer noch bei Neu-Seeland gefunden.

Alle vier Arten sind Schwachlicht-Organismen, wenn auch in verschiedener Abstufung (s. STEEMANN NIELSEN, 1939, Tab. 4—6). Drei sind oligophotische Arten; sie kommen sowohl auf planktonarmen wie planktonreichen Stationen durchweg in einer Tiefe von mehr als 50 m vor. Dies trifft vor allem auf *C. filicorne* und *C. axiale* zu. *C. euarquatam* muss als eine mesophotische Art bezeichnet werden. Auf den planktonarmen Stationen fand sie sich nur etwas häufiger unterhalb 50 m Tiefe, auf den planktonreichen Stationen am häufigsten oberhalb 50 m. Man sieht somit bei einer genaueren Untersuchung dieser nahe ver-

wandten Arten, die in den Hauptzügen sowohl die horizontale wie die vertikale Verbreitung gemeinsam haben, dass sich doch geringfügige Verschiedenheiten hinsichtlich der ökologischen Ansprüche bemerkbar machen. Dies ist auch der Fall bei den Arten der meisten anderen Gruppen von nahe verwandten Ceratien. Nur verhältnismässig selten hat

Tabelle 2.

Die Verbreitung von 4 sehr nahe verwandten Ceratienarten.

Art	Ozean			Temperaturzone				Lichtzone			Bezieh. z. Küste	
	Atlantischer	Indischer	Stiller	tropische	sub-tropische	temperier-te	kalte	euphotische	mesophotische	oligophotische	ozeanisch	neritisch
<i>C. inflatum</i>	×	×	×	×	×	×	..	×	..
<i>C. longirostrum</i>	×	×	×	×	×	×	×	..
<i>C. falcatum</i>	×	×	×	×	×	×	×	..
<i>C. falcatiforme</i>	×	×	×	×	×	×	×	..

eine Gruppe von sehr nahe verwandten Arten eine fast absolut identische Verbreitung. Dies ist z. B. der Fall bei den Arten *C. inflatum*, *C. longirostrum*, *C. falcatum* und *C. falcatiforme* (Tabelle 2). Näheres über die Verbreitung der Ceratien findet man bei STEEMANN NIELSEN 1939.

Hieraus wird ersichtlich, dass, obgleich bei nahestehenden Arten die Verbreitungsverhältnisse im grossen und ganzen die gleichen sind, dies keineswegs in allen Einzelheiten gilt; man findet sogar sehr nahe verwandte Arten mit völlig verschiedener Verbreitung. *C. tripos* ist eine Art der temperierten Zonen, die vor allem in neritischen Gebieten häufig auftritt. Die ihr sehr ähnliche Art *C. tripodoides* dagegen ist eine ozeanische Warmwasserart. Wie bei allen Untersuchungen über die Verbreitung der Orga-

nismen, muss man auch da, wo es sich um ungeschlechtliche Organismen handelt, mit der systematischen Behandlung sehr gründlich verfahren. Untersuchungen über die Verbreitung, bei denen nicht absolut systematisch zu Werke gegangen wird, sind verwerflich. Auf alle Fälle muss vermieden werden, solche Ergebnisse ökologisch zu verwerten. Auch darf man sich nicht dazu verleiten lassen, auf Grund scheinbar übereinstimmender Verbreitung von Naheverwandten bei ungeschlechtlichen Organismen Sammelarten zu bilden, wenngleich eine Systematik bei ungeschlechtlichen Organismen oft ganz besonders schwierig ist, da nahe verwandte Arten natürlich nur mit grossen Schwierigkeiten voneinander zu unterscheiden sind. Man muss oft die Statistik zu Hilfe nehmen, und, wenn dies infolge der Spärlichkeit einzelner im Material vorhandener Arten unmöglich ist, sollte man am besten ganz darauf verzichten, die Verbreitungsverhältnisse ökologisch zu verwerten. Dies ist auch der Fall bei Ceratien mehrerer Gruppen. Es ist mir z. B. nicht geglückt, die Verbreitungsverhältnisse bei der *Depressum*-Gruppe klar zu legen, da nur in vereinzelt Fällen hinreichendes Material zur Verfügung stand, um die einzelnen Arten dieser Gruppe statistisch zu trennen; vorläufig ist es nicht möglich, diese Arten auf andere Weise zu trennen. Anders gestaltet sich die Sache, wenn man die Reaktion der einzelnen Arten gegenüber den verschiedenen Faktoren kennt. So kann man, selbst wenn das Material einer einzelnen Art in einer Probe sehr dürftig ist, durch Analogieschluss die Variationstendenz bei der seltenen Art bestimmen und so eine systematische Bestimmung ausführen.

Vergleicht man nun die Verbreitungsverhältnisse der geschlechtlichen Stomatiden mit denen der ungeschlecht-

lichen Ceratien, so sieht man deutlich, dass beide Gruppen sich völlig verschieden verhalten; bei der ersten Gruppe haben nahe verwandte Formen nicht dasselbe Verbreitungsgebiet, während dies gerade bei der anderen Gruppe ganz allgemein der Fall ist.

Zur Verdeutlichung des Zusammenhanges zwischen Verbreitung und Verwandtschaft bei geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Organismen wurde sowohl ein ozeanisches Fischgeschlecht wie ein ozeanisches Geschlecht von Einzellern benutzt, und es konnte gezeigt werden, dass sich diese beiden Gruppen ganz und gar verschieden verhalten. Es erhebt sich also die Frage, ob alle übrigen Organismen das gleiche Verhältnis von Verbreitung zu Verwandtschaft aufweisen, d. h., ob sie sich entweder wie die Fischgattung *Stomias* oder wie die Algengattung *Ceratium* verhalten.

Bei vielen Organismen machen zahlreiche Faktoren die Frage recht verwickelt, sodass nicht immer gleich zu sehen ist, ob die Regeln zutreffen. Für die ungeschlechtlichen Arten liegen die Verhältnisse im Prinzip immer so wie bei den Ceratien: nahe verwandte Arten werden in allen Gruppen mit fehlender Sexualität nebeneinander leben können, und die Verbreitung wird in der Hauptsache desto ähnlicher sein, je näher verwandt die Arten sind, obgleich es natürlich auch hier wie bei den Ceratien nahe verwandte Arten mit verschiedener geographischer und ökologischer Verbreitung gibt. Ich will nicht näher hierauf eingehen, sondern nur auf die zahlreichen, namentlich skandinavischen Arbeiten über Verbreitung von apogamen Samenpflanzen, z. B. *Taraxacum*, *Hieracium*, *Alchimilla* u. a., hinweisen.

Bei den echten ozeanischen, sexuellen Organismen kommt die Regel, dass nahe verwandte Arten einander

ausschliessen, immer klar zum Ausdruck. Jedenfalls ist dies bei allen jenen Gruppen, die auf dieses Problem hin behandelt worden sind, der Fall; es können hier z. B. die fliegenden Fische erwähnt werden, die von BRUUN (1935) untersucht worden sind. Aber auch auf ozeanische Organismen, bei denen die Eigenbewegung keine Bedeutung für die Verbreitung hat — wie z. B. die Copepoden — trifft die Regel absolut zu (vergl. DAHL 1921).

Im Ozean bewirken die Meeresströmungen, dass die Organismen eine fast maximale individuelle Aktionsweite haben. Demnach können eigentliche Lokalrassen bei diesen Organismen nicht entwickelt werden, und die Verhältnisse sind dadurch leichter zu übersehen. Bei jenen Organismen dagegen, bei denen die individuelle Aktionsweite sehr klein ist, können erstens Lokalrassen entstehen, zweitens kann sich eine Art ohne scharfe Grenzen allmählich von einer Gegend zur andern ändern, und die Regel über das Verhältnis zwischen Verbreitung und Verwandschaft tritt folglich nicht immer so augenfällig wie bei den ozeanischen Organismen hervor. Auch sind die ökologischen Faktoren über grosse Strecken sonst meist nicht so einheitlich wie im Ozean.

Noch einige Beispiele mögen hier angeführt werden. Die zwei dänischen *Geum*-Arten, *G. urbanum* und *G. rivale*, die miteinander sehr nahe verwandt sind, da sie unter Kulturbedingungen leicht bastardieren, können in der Natur dicht nebeneinander wachsen. Sie sind indessen ganz verschiedene ökologische Typen; Bastarde findet man in der Natur ausserordentlich selten, wahrscheinlich weil diese weder mit der einen noch der andern Art konkurrieren können.

Bei Organismen, die in irgendeiner Weise an andere

Organismen gebunden sind (parasitische Würmer z. B.), können sehr nahe verwandte Formen geographisch nebeneinander leben, wenn die beiden nahe verwandten Arten an verschiedene Wirtsorganismen gebunden sind; sie haben ja eine verschiedene Ökologie. Selbst dann, wenn die Möglichkeit vorhanden ist, dass sich die nahe verwandten Arten kreuzen, braucht dies nicht dazu zu führen, dass sie ineinander aufgehen, da die Bastarde wohl entweder überhaupt bei keinem der Wirtsorganismen leben können oder sich nur nicht in der Konkurrenz behaupten können.

Die angeführten Beispiele stehen daher nicht in Widerspruch zu der Regel über das Verhältnis zwischen Verwandtschaft und Verbreitung bei den sexuellen Organismen; die Regel kommt nur nicht unmittelbar deutlich zum Vorschein. Bei anderen sexuellen Organismen ist es dagegen überhaupt nicht möglich, die Regel anzuwenden.

Z. B. liegt eine Gruppe von Naheverwandten ganz ausserhalb dieser Regel. Das ist diejenige, bei der der Unterschied zwischen zwei Naheverwandten nur in einem einzelnen Gen besteht, wo dieser jedoch so gross ist, dass die Systematik diese beiden Organismen als verschiedene Varietäten bezeichnen muss. So findet man nach WINGE (1928) ausser der gewöhnlichen Form der Mohnpflanze *Papaver rhoeas* mit abstehender Behaarung am Blütenstengel zuweilen eine Varietät mit anliegenden Haaren, var. *strigosa*. Es besteht nur ein einziger Genunterschied zwischen diesen beiden. Das Gen für anliegende Behaarung ist dominierend. Diese beiden Arten können an ihrem natürlichen Standort nebeneinander wachsen, da bei einer Kreuzung in der F_2 -Generation eine gewöhnliche Mendelsche Spaltung eintreten wird. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Gartenschnecke *Helix hortensis* mit

einer gestreiften und einer ungestreiften Varietät, bei der die ungestreifte dominierend ist.

Die zytologische Forschung der letzten Jahre hat erwiesen, dass bei einander nahestehenden Pflanzenrassen die eine in manchen Fällen aus der anderen durch Chromosomenverdoppelung entstanden ist. Ein typisches Beispiel findet man z. B. bei *Oxycoccus* (HAGERUP, 1940). Solche nahestehenden Formen können naturgemäss nebeneinander wachsen, da sie sehr schwer miteinander bastardieren können. Dagegen hat bei der Entwicklungsgeschichte der Tiere allem Anschein nach Chromosomenverdoppelung keine Bedeutung gespielt.

Bei den Fischen ist die Beobachtung gemacht worden, dass einander sehr nahe verwandte Arten oder Rassen nebeneinander leben können, wenn sie verschiedene Laichzeiten haben. Als typisches Beispiel mag die Gattung *Ammodytes* erwähnt werden, von der in den dänischen Gewässern zwei sehr nahe verwandte Arten gefunden werden, nämlich *A. marinus* und *A. Tobianus*. Morphologisch unterscheiden sich die beiden Arten nur durch die verschiedene Anzahl der Wirbel; sie können jedoch nicht in der Natur bastardieren und dadurch ineinander aufgehen, da die erste im Winter laicht, die andere im Frühling und im Sommer (KÄNDLER, 1937). Die beiden miteinander sehr nahe verwandten Arten können demnach nebeneinander leben.

Auch bei sexuellen Pflanzen können zwei sehr nahe verwandte Arten nebeneinander wachsen, ohne dass die Bestände homogenisiert werden, wenn ihre Blütezeit verschieden ist.

Die beiden häufig vorkommenden dänischen *Rhinantus* Arten — *R. major* und *R. cristagalli* —, die im Mai-Juni

blühen, haben Varietäten, die neben den Hauptformen wachsen, aber erst im Spätsommer blühen. Bastardierung zwischen den Hauptformen und den Varietäten ist demnach unmöglich. Ein ganz ähnliches Verhältnis findet man bei *Odontites rubra*, die bei uns in zwei Formen vorkommt: var. *verna*, die im Hochsommer blüht, und var. *serotina*, die im Spätsommer blüht. Endlich soll noch *Galium verum* erwähnt werden; neben der Hauptform wird die Varietät *Wergeni* gefunden, die früher als die Hauptform blüht.

Bei anderen Organismen (Tieren) kann die Ursache des Nebeneinandervorkommens der sehr nahe verwandter Arten daran liegen, dass eine einzelne Art während der Eiszeit in verschiedene Bestände getrennt wurde, und jede sich dann für sich weiter entwickelt hat, jedoch in etwas auseinandergender Richtung. Nach dem Rückgang des Eises haben sie sich wieder über dasselbe Gebiet verbreitet, waren aber nicht mehr imstande, mit einander zu kopulieren, weil sich z. B. die Genitalwerkzeuge in verschiedener Richtung entwickelt hatten. Unter den Feldheuschrecken findet man nach HESSE, 1924, Seite 71 ein typisches Beispiel. Die drei Arten der Gattung *Stenobothrus*, *S. stigmaticus*, *micromaculatus* und *lineatus* bildeten wahrscheinlich vor der Eiszeit eine Art mit derselben Verbreitung; während der Eiszeit wurde diese in verschiedene Bestände, die sich verschiedenartig weiter entwickelten, isoliert, und zwar eine nach Südwesten, eine nach Südosten und eine nach Nordosten. Nun kommen sie in fast ganz Europa nebeneinander vor, ohne dass die Arten bastardieren.

Die Regel über das Verhältnis zwischen Verwandtschaft und Verbreitung bei den sexuellen Organismen ist natürlich nur unter stabilen natürlichen Verhältnissen anzuwenden, wenn es auch eine bekannte Tatsache ist, dass

es sogar in Botanischen Gärten sehr oft unmöglich ist, nahe verwandte sexuelle Pflanzen zusammen anzubauen. Nach wenigen Jahren sind die verschiedenen Arten durch Bastardierung mehr oder weniger verändert. Auf Kulturland (Grasfeldern z. B.) wird bei der Aussaat auch eine Menge von Unkräutern verbreitet. Da das Samenmaterial oft von weit entlegenen Gegenden stammt, können nahe verwandte Unkräuter (verschiedene Rassen z. B.) auf diese Weise nebeneinander zum Wachsen kommen. Dies ist jedoch kein stabiler Zustand. Würde das Kulturland sich selbst überlassen und könnten solche nahe verwandten Unkräuter unter diesen Bedingungen überhaupt ihren Platz behaupten, würden die Bestände im Laufe kürzerer oder längerer Zeit durch Bastardierung ineinander aufgehen. Ein sehr interessantes Beispiel wird von TURESSON (1925) angeführt. Von *Plantago major* gibt es in Skandinavien zwei Typen, eine ursprüngliche Küstenform und eine Inlandsform, die erst mit dem Ackerbau nach Skandinavien gekommen ist. Nur in Gegenden, in denen der Ackerbau die Küste noch nicht erreicht hat, wird die ursprüngliche Form gefunden. Wo der Ackerbau die Küste erreicht hat, ist die ursprüngliche Küstenform durch Bastardierung in der neuen Form aufgegangen. Es wird natürlich einige Zeit vergehen, bevor zwei nahe verwandten Formen, die durch Wandern der einen oder beider schliesslich zusammentreffen, ganz und gar ineinander aufgehen. Die Zeitdauer wird unter anderem davon abhängen, wie lange die einzelnen Generationen dauern. Unter sonst gleichen Verhältnissen muss dieser Prozess z. B. bei einjährigen Pflanzen bedeutend schneller verlaufen als bei Bäumen.

In der vorliegenden Abhandlung wurden zwei typische, leicht übersehbare Beispiele für das Verhältnis zwischen

Verwandtschaft und Verbreitung ausführlich behandelt, denn solche Beispiele haben immer dann besondere Bedeutung, wenn über ein Problem Klarheit geschaffen werden soll. Durch verschiedene Beispiele aus dem Tier- und Pflanzenreich wurde weiter gezeigt, dass man zwischen den Grenzfällen des Verhältnisses zwischen Verwandtschaft und Verbreitung Übergänge findet. Die angeführten Regeln gelten nicht absolut, sondern bilden nur Richtlinien, denen bei der Behandlung aller hierher gehörenden Fragen zu folgen ist. Als am Ende des vorigen Jahrhunderts WETTSTEIN und seine Vorgänger das Verhältnis zwischen Verwandtschaft und Verbreitung bei den sexuellen Pflanzen entdeckten, wurde das Problem gewissermassen umgekehrt und die Verbreitung als Mittel zur Bestimmung der Verwandtschaft benutzt (WETTSTEIN). Hierdurch ist das eigentliche Fundament dieser Forschungsmethode bei vielen Botanikern verständlicherweise etwas in Misskredit gekommen. Es ist sehr gewagt, von der Verbreitung von Arten auf deren Verwandtschaft zu schliessen, da ja auch viele andere Faktoren bestimmend sind. Es ist sehr oft recht schwierig oder gar unmöglich, den Verwandtschaftsgrad zwischen verschiedenen Organismen zu bestimmen. Man darf auch nur mit den allerkleinsten systematischen Einheiten arbeiten.

Die moderne Fischereibiologie, vor allem der dänische Fischereibiologe JOHNS. SCHMIDT, der Leiter der Dana-Expeditionen, hat ausserordentlich viel zum Verständnis der Verwandtschafts- und Verbreitungsverhältnisse beigetragen. Es wurden vor allem eine Reihe von Merkmalen bei den Fischen statistisch erfasst, z. B. die Anzahl von Wirbeln und Finnenstrahlen. Die *Stomias*-Arten wurden auch gerade als Typenexempel für die Verbreitung der sexuellen Orga-

nismen benutzt, da die Unterschiede zwischen den systematischen Einheiten statistisch erfasst werden können.

Für Untersuchungen über die Verbreitung, die ökologische Schlüsse zum Ziel haben, eignen sich die Organismengruppen mit grosser individueller Aktionsweite, wie z. B. die ozeanischen Stomatiden und Ceratien, am besten, da man es bei diesen mit gleichartigen Arten oder Rassen zu tun hat. Hier kann man tatsächlich aus den Verbreitungsverhältnissen ökologische Schlüsse ziehen.

Für derartige Untersuchungen sollte man deshalb besonders solche Organismen wählen, die sich den oben genannten Typen anschliessen. Bei sexuellen Organismen, die einen geringen individuellen Aktionsradius haben, sodass die Bestände innerhalb des Gesamtareals der Grossart oder des Rassenkreises sehr ungleichartig sind, machen sich mancherlei Erscheinungen geltend, die die ökologischen Schlussfolgerungen erschweren. Geht man von einem Gebiet zu einem anderen über, hat man keinerlei Sicherheit dafür, dass man noch mit denselben Organismen zu tun hat, selbst wenn sie sich anscheinend genau gleichen. In ökologischer Beziehung sind es unter Umständen doch verschiedene Typen. Übergänge von einer Type zur anderen sind oft so unmerklich, dass man unmöglich bestimmte Grenzen ziehen kann. Aus dem Pflanzenreich können leicht Beispiele herangezogen werden, die beweisen, dass eine »Art« ein recht unbestimmter Begriff sein kann. Bei solchen Organismen empfiehlt es sich demnach, die Verbreitungsverhältnisse nicht ohne weiteres als Grundlage für ökologische Schlüsse zu verwenden.

Untersuchungen über die Verbreitung der Arten sind nur eine Form von ökologischen Studien. Von nicht geringerer Bedeutung sind die experimentellen Untersuchungen. Beide

Forschungswege müssen Hand in Hand gehen. Die meisten ozeanischen Organismen (z. B. die Ceratien) sind vorläufig ungeeignet für experimentelle ökologische Untersuchungen, da diese Organismen nicht gezüchtet werden können. Hier muss die ökologische Forschung sich vorläufig mit den Resultaten begnügen, die durch die Verbreitungsuntersuchungen geschaffen werden. Es ist daher ein glücklicher Zufall, dass die Untersuchungen über die Verbreitungsverhältnisse gerade bei den ozeanischen Organismen infolge der grossen individuellen Aktionsweite sehr geeignet für ökologische Schlüsse sind.

STUDIEN ÖBER
Literatur.

- BRUUN, A. F., 1935: Flying-Fishes (Exocoetidae) of the Atlantic, systematic and biological studies. Dana-Report 6.
- DAHL, F., 1921: Grundlagen einer ökologischen Tiergeographie. Jena.
- EGE, V., 1934: The Genus *Stomias* Cuv., taxonomy and bio-geography. Dana-Report 5.
- HAGERUP, O., 1940: Studies on the significance of Polyploidy IV. *Oxycoccus*. *Hereditas* XXVI.
- HESSE, R., 1924: Tiergeographie auf ökologischer Grundlage. Jena.
- KÄNDLER, R., 1937: Beobachtungen über die Laichzeiten der *Ammodytes*-Arten in Nord- und Ostsee. *Zoolog. Anz.* Bd. 118.
- STEEMANN NIELSEN, E., 1939: Die Ceratien des Indischen Ozeans und der Ostasiatischen Gewässer. Dana-Report 17.
- STURS, D., 1860: Beiträge zu einer Monographie des Genus *Astrantia*. Sitzber. d. Math. naturw. Klasse der Akademie der Wissensch. in Wien. XL. Bd.
- TURESSON, G., 1925: The plant species in relation to habitat and climate. *Hereditas* VI.
- v. WETTSTEIN, R., 1898: Grundzüge der geographisch-morphologischen Methode der Pflanzensystematik. Jena.
- WINGE, Ø., 1928: Arvelighedslære paa eksperimentelt og cytologisk Grundlag. København.

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser. **XVI**, 5.

STUDIEN ÜBER
DIE KREBSERZEUGENDE WIRKUNG
DES METHYLCHOLANTHRENS
AUF MÄUSE

VON

OLE ESMARCH



KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

Det Kongelige Videnskabskabernes Selskab.
Biologiske Meddelelser, XVI, 2.

STUDIEN ÖBER
DIE KREBSERZUCHE WIRKUNG
DES METHYLCHOLANTHRENS
AUF MÄUSE
VON
OLE ESMARCH



KÖBENHAVN
I KOMMISSION HOS EINHORN BUNDEGAARD

Printed in Denmark.
Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.

I. Versuche, mit Methylcholanthren Geschwülste hervorzurufen, wenn der Stoff in direkten Kontakt mit verschiedenem Gewebe gebracht wird.¹

Bei den Versuchen, mit Teer oder krebserzeugenden Kohlenwasserstoffen Tumoren an Mäusen hervorzurufen, wurde fast immer die Haut oder das subkutane Gewebe als Versuchsobjekt benutzt. Dagegen wurden Untersuchungen, bei denen diese Stoffe in direkten Kontakt mit anderem Gewebe oder anderen Organen gebracht wurden, bisher nur in geringerem Umfange vorgenommen.

Bei meinen Versuchen wurde Methylcholanthren² jedesmal auf die gleiche Weise im Mammagewebe, in der querstreiften Muskulatur, in Organen wie Niere, Leber und Lunge sowie im Peritoneum deponiert. Um eine sichere Grundlage für Vergleiche zu schaffen, war es notwendig auch solche Untersuchungen vorzunehmen, bei denen der krebserzeugende Kohlenwasserstoff subkutan deponiert wird. Zuverlässige Auswertungen können nur vorgenommen werden, wenn man mit der gleichen Technik und unter denselben Versuchsbedingungen arbeitet. Um ein Bild von der histologischen Struktur der epithelialen Geschwülste und ihrer Fähigkeit zur Metastasenbildung zu bekommen wurde ausserdem ein Pinselungsversuch ausgeführt.

¹ Ausgeführt mit freundlicher Unterstützung des Landesvereins zur Krebsbekämpfung.

² Der Stoff wurde freundlicherweise von der Firma »Bayer« nach der Methode von FIESER & SELIGMAN (1936) hergestellt.

A. Frühere Versuche.

Es ist überraschend, dass bisher fast keine Versuche gemacht wurden, bei denen krebserzeugende Stoffe mit dem Mammagewebe von Mäusen in Berührung gebracht wurden, da dieses Organ für Untersuchungen ebenso leicht zugänglich ist wie subkutanes Gewebe in jeder anderen Region. SEEDORF (1922) hat einige wenige mm Teer in Mammagewebe von 7 Mäuseweibchen injiziert. Die Tiere bekamen in unregelmässigen Zeitabständen im ganzen 7 Teereinspritzungen. Bei einer Maus entstand im Laufe eines halben Jahres ein subkutaner Knoten, der sich bei mikroskopischer Untersuchung 11 Monate nach Beginn des Versuches als Adenokarzinom der Mamma erwies. Dieser Versuch schliesst jedoch die Möglichkeit eines spontanen Tumors nicht aus. Bei Injektion von 8 mg Methylcholanthren, dem eine geringe Menge Fett zugesetzt war, ist es mir nicht gelungen (1940 a), am Mammagewebe von 10 Mäuseweibchen des Baggschen Stammes Geschwülste hervorzurufen. Der Stoff wurde den Tieren unter einer Papille in der linken Inguinalregion deponiert. Als die erste Geschwulst konstatiert wurde, waren noch alle Mäuse am Leben. Im ganzen entstanden an der Injektionsstelle 4 Geschwülste, von denen zwei benigne, fibröse Tumoren waren, eine ein Spindelzellensarkom und schliesslich eine ein Spindelzellensarkom, das von einem kleinen, in einem dislozierten Hautstückchen entstandenen Plattenepithelzellenkarzinom begleitet war.

In früheren Jahren sind einige Untersuchungen vorgenommen worden, bei denen cancrogene Kohlenwasserstoffe in die quergestreifte Muskulatur eingeführt wurden. KEIJSIR (1937) hat 24 Sarkome an 30 Mäusen

hervorgerufen, die im Abstand von 14 Tagen 5 intramuskuläre Injektionen von 0,5 ccm in Fett gelöstem 1:2:5:6-Dibenzanthracen bekamen. Unter 25 anderen Mäusen, denen ausschliesslich der Kohlenwasserstoff selbst eingeführt wurde, entwickelten sich nur 2 Geschwülste, ein Sarkom und ein Karzinom. Bei einem Material von 249 Zuchtmäusen erzeugte KLINKE (1938) 79 maligne Tumoren durch intramuskuläre Injektion von 3:4-Benzpyren, das in einer Mischung von Olivenöl und Schweinefett in einer Konzentration von 1 % aufgelöst war. Einspritzungen von 0,1 ccm wurden einmal wöchentlich in der Weise vorgenommen, dass die gesamte Dosis des Kohlenwasserstoffs pro Tier zwischen 7 und 15 mg betrug. Mäuse mit Geschwülsten gingen im 4.—5. Versuchsmonat ein. Metastasen waren nicht zu sehen, und die Geschwülste wurden als überwiegend dem Spindelzellentypus angehörende, polymorphzellige Sarkome beschrieben; man hatte den Eindruck, dass sie vom Muskelparenchym ausgingen. NICOD & REGAMEY (1938) haben Methylcholanthren in die Muskulatur von 30 Mäusen injiziert. Jedem Tier wurde 1 mg des Stoffes, in 0,1 ccm Olivenöl aufgelöst, zugeführt. Nur bei 4 Mäusen entstanden Tumoren, von denen drei Sarkome waren und einer möglicherweise ein Karzinom.

Untersuchungen, bei denen Teer ins Peritoneum injiziert wurde, sind nicht von Tumorbildung in der Bauchhöhle begleitet gewesen (MERCIER, 1929 und 1930). Der erste Versuch, Mäusen krebserzeugende Kohlenwasserstoffe intraperitonäal zu applizieren, wurde von BOYLAND & BURROWS (1936) vorgenommen. Zweimal wöchentlich wurden 0,4 ccm einer wässrigen, kolloidalen Lösung injiziert, die 1:2:5:6-Dibenzanthracen in einer Konzentration von 0,05 % enthielt. Um zu untersuchen, ob der Stoff abseits der

Einspritzungsstelle Geschwülste hervorrufen kann, deponierte man gleichzeitig fein pulverisierte Kieselerde im subkutanen Gewebe der Nackenregion der Tiere. Die Behandlung führte nur zu Sarkomen in der Peritonäalhöhle der Tiere. Unter 20 Mäusen wurden bei 5 Tumoren hervorgerufen. Aus der Tabelle geht hervor, dass geschwulstragende Tiere ca. 30 bis 50 Wochen nach Beginn des Versuches verendeten, und dass zur Zeit der Sektion der ersten Maus mit Sarkom nur noch 6 Mäuse am Leben waren. NAKAHARA & FUJIWARA (1937 a) haben alle 2 Wochen 0,2 ccm einer 0,5 %igen Lösung von 3:4-Benzpyren in Olivenöl ins Peritoneum von 40 gewöhnlichen Mäuseweibchen injiziert. Zwischen dem 103. und dem 157. Versuchstage wurden in der Peritonäalhöhle solitäre oder multiple Sarkome von spindeligem oder mehr polymorphem Typus konstatiert. Von 27 Mäusen, die so lange lebten, dass die Möglichkeit bestand, dass sie mit Tumoren verenden würden, bekamen 19 eine Geschwulst, und bei allen Tieren bestand Ascites. Der Häufigkeit nach geordnet, waren die Sarkome lokalisiert in: Diaphragma, Peritoneum parietale, Leber, Pelvisregion, Regio gastropancreatica und den Därmen oder ihrem Gekröse. Im ganzen ist jeder Maus zwischen 7 und 11 mg 3:4-Benzpyren zugeführt worden. Dieselben Forscher (1937 b) haben eine entsprechende Untersuchung mit Methylcholanthren vorgenommen. Der Stoff wurde in der gleichen Weise aufgelöst; hier wurden aber Injektionen von 0,1 ccm einmal wöchentlich vorgenommen. Zwischen dem 77. und dem 117. Tage verendeten die Mäuse mit solitären oder multiplen Sarkomen ähnlicher Lokalisationen wie im vorigen Versuch. Von 17 Mäusen, die innerhalb dieses Zeitraums am Leben waren, bekamen 9 Geschwülste, nachdem sie Methylcholanthren in Gesamtdosen von 5,5

bis 8,5 mg bekommen hatten. Wie bei der Untersuchung mit 3:4-Benzpyren ist Ascites auch hier ein konstantes Symptom. NICOD & REGAMEY (1938) haben 1 mg Methylcholanthren in die Peritonäalhöhle von 30 Mäusen eingeführt. Der Stoff war mit Dextrin präpariert, wodurch er als eine zusammenhängende Masse eingeführt werden konnte. Zwischen dem 105. und dem 260. Tage verendeten 14 Mäuse mit Sarkomen, die sich an verschiedenen Stellen der Bauchhöhle fanden.

ILFELD (1936) ist der einzige, der versucht hat, krebserzeugende Kohlenwasserstoffe in direkten Kontakt mit dem Nierengewebe von Mäusen zu bringen. An einem Material von 51 Mäusen der Stämme A, C₃H und M wurden in der einen Niere kleine Stäbchen aus Cholesterol angebracht, in denen 1:2:5:6-Dibenzanthracen in einer Konzentration von 5 % aufgelöst war. Der Stoff wurde auf diese Weise in Dosen zugeführt, die zwischen 0,12 und 0,6 mg lagen. Bei Veröffentlichung des Versuches waren noch 13 Tiere am Leben; 15 Tiere sind an interkurrenten Krankheiten im Laufe des Versuches eingegangen. Im ganzen wurden 10 Nierentumoren gefunden, die alle Epidermoidkarzinome mit Zellen waren, die an die des Nierenbeckens erinnerten. Die Geschwülste liessen sich nach einer Versuchsdauer von 6 bis 10¹/₂ Monaten palpieren. Die Tumoren traten am schnellsten auf, wenn man grössere Dosen des krebserzeugenden Stoffes gab. Es wurden Transplantationen von 4 Karzinomen auf Mäuse desselben Inzuchtstammes vorgenommen, in dem auch die Geschwülste entstanden waren. Die Geschwülste wurden alle mit unveränderter histologischer Struktur übertragen, und eine Geschwulst wurde in 4 Generationen transplantiert. Es wird ferner erwähnt, dass bei einer gewöhnlichen Zuchtmaus in gleicher Weise Me-

thylcholanthren in der Niere angebracht wurde, ohne dass man im Laufe von 6 Monaten irgend einen Tumor fühlen konnte.

Ein Versuch, krebserzeugende Kohlenwasserstoffe in direkten Kontakt mit dem Lebergewebe von Mäusen zu bringen, wurde von ILFELD (1936) angestellt. In 56 Mäuse der Stämme A, C₃H und M wurden Cholesterolstäbchen eingeführt, die 5 %iges 1:2:5:6-Dibenzanthracen enthielten. Nur bei zwei C₃H Mäusen gelang es, Lebertumoren hervorzurufen. Die eine Geschwulst war zur mikroskopischen Untersuchung zu faulig, die andere erinnerte etwas an ein primäres Leberzellenkarzinom, ohne dass sich aber die Diagnose mit Sicherheit stellen liess. Die Mäuse hatten beide eine Dosis von 0,16 mg des cancrogenen Stoffes bekommen, und die Tiere verendeten 9 und 10 Monate nach Beginn des Versuches. Ein entsprechender Versuch mit Methylcholanthren an einer anderen Maus fiel negativ aus.

Man konnte mit Teer und krebserzeugenden Stoffen auf verschiedene Weise Lungengeschwülste an Mäusen hervorrufen; es wurden aber nur wenige Versuche gemacht, einen cancrogenen Stoff in der Weise in der Lunge anzubringen, dass nur eine begrenzte Partie dem Reiz ausgesetzt wird. ANDERVONT (1937) hat 1:2:5:6-Dibenzanthracen mit Hilfe von Seidenfäden in das Lungengewebe eingeführt; diese Seidenfäden waren mit Kohlenwasserstoff imprägniert, so dass jede Maus eine Dosis von ca. 1 mg bekam. Zu diesem Versuch wurden im ganzen 35 Mäuse verwendet. Die Tiere wurden 10 bis 15 Wochen nach Beginn des Versuches getötet, wobei sie höchstens 6¹/₂ Monate alt wurden. Bei der Sektion zeigte es sich, dass bei 14 Mäusen der Faden ausserhalb der Lunge lag. Bei 8 der übrigen 21 Mäuse wurden Adenome gefunden,

bei 2 Adenokarzinome und bei 5 Plattenepithelzellenkarzinome. Der Versuch wurde mit 3 verschiedenen Arten von Mäusen aus reinen Stämmen, die verschiedene Neigung zu spontanen Lungengeschwülsten hatten, vorgenommen. Die erbliche Belastung scheint bei solchen Versuchen, bei denen das Lungengewebe mit dem cancrogenen Stoff in direkte Berührung kommt, keine Bedeutung zu haben. In den Karzinomen aus den Lungen hat man oft ein Gewebe gesehen, das an ein Sarkom erinnerte. Eine Geschwulst, die als Plattenepithelzellenkarzinom und Adenom aufgefasst wurde, ist durch 6 Passagen transplantiert worden. Bereits nach der ersten Transplantation bestand ein Tumor von Plattenzellen und ein Stroma, das an ein Sarkom erinnerte. Von der vierten Passage an wuchs die Geschwulst als reines Sarkom. Ein anderer Versuch wurde von ESMARCH (1940 a) ausgeführt. Zusammen mit einer geringen Menge Fett wurden 8 mg Methylcholanthren in die eine Lunge von 10 Bagg-Mäusen injiziert. Die Tiere waren zu Beginn des Versuches $2\frac{1}{2}$ Monate alt, und man liess sie alle spontan eingehen. 7 Mäuse verendeten ohne Geschwülste; aber nur noch 2 von ihnen waren am Leben, als der erste Tumor nachgewiesen werden konnte. Die 3 anderen Mäuse verendeten mit Geschwülsten in der behandelten Lunge. Der erste Tumor wurde am 93. Versuchstage entdeckt und erwies sich als ein polymorphzelliges Sarkom, das sichtbare Reste von Methylcholanthren enthielt. Eine Maus hatte am 129. Tage multiple Adenome in der Lunge an der Stelle, wo die Injektion vorgenommen worden war, und ein Tier hatte in der behandelten Lunge ein Plasmozytom. Von den hervorgerufenen Tumoren waren Lungenadenome die einzigen, die bei den Tieren spontan vorkamen; sie entstanden aber selten in jungem

Alter, und bei 75 Kontrolltieren aus dem gesamten Versuch hat sich das Leiden nicht ein einziges Mal gezeigt.

B. Technik und Material.

Will man die krebserzeugende Fähigkeit des Methylcholanthrens und seine Wirkung auf verschiedene Gewebe der Maus untersuchen, so ist es am zweckmässigsten, bei allen Versuchen nach der gleichen Technik zu verfahren.

Soll der Stoff in Organe wie Leber oder Niere eingeführt werden, muss dies durch eine einzige Injektion geschehen, da die Versuche sonst wegen der Sterblichkeit infolge wiederholter Operationen schwer durchzuführen wären. Ausserdem ist das Methylcholanthren so zu deponieren, dass es nur geringe Läsion und Spannung in dem Organ verursacht. Hierzu kommt, dass es am korrektesten ist, mit krebserzeugenden Kohlenwasserstoffen in Mengen zu arbeiten, die ebenso gross oder grösser sind als die geringste Dosis, die am schnellsten und sichersten Geschwülste hervorruft (FIESER, 1938, und ESMARCH, 1940 b).

Ich habe mich dahin entschieden, die Versuche nach der von SHEAR (1936) angegebenen Methode auszuführen. Unter sterilen Vorsichtsmassnahmen wurden die feinen, nadelförmigen Kristalle mit Glycerin angefeuchtet, bis sich eine dicke, teigige Masse bildete, die mit Hilfe eines dichtschiessenden Stiletts in eine altmodische Lumbalkanüle aufgesaugt wurde.

Vor den Injektionen oder Operationen wurde die Haut an der betreffenden Stelle epiliert und mit 70% igem Alkohol behandelt.

Die Deponierung des Methylcholanthrens im subkutanen Gewebe und in der Mammaregion geschah ohne Betäubung. Operative Eingriffe erforderten eine Narkose, die mit Aether gemacht wurde. Zur Vermeidung von Infektion oder Wundbildung an der Versuchsstelle selbst wurde der Einstich der Kanüle etwa zwei Zentimeter von der Stelle, wo man den krebserzeugenden Kohlenwasserstoff anzubringen beabsichtigte, vorgenommen.

Eine intramuskuläre Injektion wurde in den Oberschenkel vorgenommen, nachdem man die Faszie durch einen kleinen Schnitt in die Haut und das subkutane Gewebe freigelegt hatte. Die Wunde wurde mit einer einfachen Katgutsuture vernäht und mit Kollodium gepinselt. Diese Technik sichert die intramuskuläre

läre Anbringung des Methylcholanthrens, da das Risiko einer subkutanen Anbringung vermieden wird.

Bei intraperitonäaler Injektion wurde der Einstich mitten auf dem Abdomen vorgenommen. Die Tiere waren während des Eingriffs betäubt, damit sie entspannt und ruhig blieben; hierdurch wurde die Gefahr einer Läsion der inneren Organe mit der Kanüle vermindert.

Die Deponierung des Stoffes in der Niere und der Leber erfolgte nach vorangegangener Laparotomie. Der Nierenversuch war mit einer sehr grossen Sterblichkeit verbunden, die als Folge von Blutungen, postoperativem Ileus, Adhäsionsbildung in den Organen oder Pneumonie eintrat; deshalb wurde der Versuch wiederholt, und die Niere in diesem Fall durch einen Lumbalschnitt zugänglich gemacht.

Wenn der Kohlenwasserstoff in der Lunge angebracht werden sollte, wurde ein unbedeutender Schnitt in Haut und Muskeln unmittelbar lateral der unteren Hälfte des Sternum vorgenommen. Hierdurch wurde die Brustwand freigelegt, und die Lumbalkanüle wurde durch einen Interkostalraum in der Medioklavikularlinie eingeführt. Man führte die Kanüle schräg aufwärts nach hinten und suchte den Stoff im Apex zu deponieren.

Der Pinselungsversuch wurde mit einer 0,3 %igen Lösung von Methylcholanthren in chemisch reinem Benzol angestellt. Die Behandlungen wurden mit einem Haarpinsel Nr. 4 (der Marke "Reeves") vorgenommen. Ohne vorhergehende Epilation wurde zweimal wöchentlich an derselben Stelle in der Interskapularregion gepinselt, und die Behandlung wurde fortgesetzt bis die Tiere eingingen.

Die Mäuse, die zum Versuch verwendet wurden, waren $2\frac{1}{2}$ —3 Monate alt und hatten ein Gewicht von 15—20 g. Zu jeder Untersuchung wurden 100 Tiere verwendet, von denen die Hälfte Kontrollversuchen diente. Die Kontrollmäuse haben kein Methylcholanthren bekommen, sind aber im übrigen in der gleichen Weise behandelt worden. Die Lösungsmittel oder das Glycerin wurden ihnen in genau derselben Weise und der gleichen Menge zugeführt. Die Mäuse sind nach bestem Ermessen so verteilt worden, dass kein Unterschied bestanden haben dürfte zwischen den Versuchs- und den Kontrollgruppen, die je die gleiche Anzahl Männchen und Weibchen enthielten. Bei der Aufstellung des Versuchsmaterials wurden im allgemeinen keine Unterschiede in den Reaktionen der beiden Geschlechter gefunden. Männchen

und Weibchen sollen daher nur dann gesondert besprochen werden, wenn die Verhältnisse es erfordern.

Die Tiere wurden einmal wöchentlich untersucht, und eventuelle Tumoren wurden im Protokoll skizziert. In allen Fällen habe ich die Tiere spontan eingehen lassen.

Zur Vornahme von Weitertransplantationen und sorgfältigen histologischen Untersuchungen wurden einige Versuchsmäuse getötet; dieses Verfahren wurde aber nur an Tieren vorgenommen, die ohnedies spontan im Laufeganz weniger Stunden verendet wären.

Bei dem ersten Versuch war das Methylcholanthren intramuskulär deponiert worden. Hier verendeten sämtliche Versuchstiere spätestens 40 Wochen nach Beginn des Versuches, worauf die Kontrollmäuse getötet wurden. In den übrigen Untersuchungsgruppen waren die Versuchstiere oft zu einem früheren Zeitpunkt schon ausgestorben; die Kontrolltiere wurden dann an dem wöchentlichen Untersuchungstage getötet, der dem Tode der letzten Versuchsmäus folgte. In einzelnen Serien waren noch in der 40. Woche einige Versuchstiere am Leben. Die geschwulstbehafteten liessen wir spontan verenden, während die dazugehörigen Kontrolltiere getötet wurden. In ganz vereinzelt Fällen haben Mäuse, die mit Methylcholanthren behandelt waren, nach dieser Versuchsperiode keine Geschwülste gehabt. Diese wenigen Tiere sind zusammen mit den Kontrollmäusen getötet worden.

Als Versuchstiere habe ich Mäuse des Baggischen Albino-Stammes verwendet, der seit 1912 in Inzucht gehalten worden ist (STRONG, 1922). BAGG (1925) gibt an, dass Mäuse dieses Stammes nur selten spontanen Brustkrebs bekommen. Von normalen, stillenden Zuchtweibchen in einem Alter zwischen $1\frac{1}{2}$ und 2 Jahren sollen weniger als 5% einen Cancer mammae bekommen; LYNCH (1926) hat etwas höhere Werte gefunden.

Im Vergleich zu anderen Mäusestämmen sind die Bagg-Mäuse nur in geringem Grade mit spontanen Mammageschwülsten belastet; dagegen bekommen die Tiere oft Lungentumoren. Bei einem Material von 262 Tieren gibt LYNCH (1926 und 1937) an, dass 39,3% aller Mäuse, die zwischen 13 und 36 Monate alt waren, diese Geschwülste bekamen. In der Häufigkeit, Geschwülste zu entwickeln, lässt sich kein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen nachweisen. Die Geschwülste sind oft multipel, und es wird mitgeteilt, dass es sich in der Hauptsache um Adenome handelt, dass man dagegen in seltenen Fällen auf Lungenadenome bei Tieren, die noch nicht ein Jahr alt sind, treffen kann.

In meinen eigenen Versuchsserien wurden insgesamt 650 Kontrolltiere seziert, und bei 500 wurden die Lungen mikroskopisch untersucht. Bei 441 Mäusen, die bis zum 202. Versuchstage eingingen oder getötet wurden, konnten keine Lungentumoren gefunden werden. Zwischen dem 203. und dem 279. Versuchstage schieden 76 Kontrolltiere aus, und bei einer Maus, die am 203. Tage getötet wurde, wurde ein Lungenadenom konstatiert. Die letzten 133 Mäuse wurden 280 Tage nach Beginn des Versuches getötet, und bei 12 fand man multiple oder solitäre Lungenadenome. Die Geschwülste kamen in gleicher Häufigkeit bei Männchen und Weibchen vor, und das Material wies keine Unterschiede auf, die auf verschiedene Behandlungen wie Benzolpinselungen, Glycerininjektionen, Narkosen u. ä. zurückgeführt werden könnten. Tabelle 1 zeigt entsprechende Ergebnisse wie die von Lynch, trotzdem die Kontrolltiere, die 280 Tage nach Beginn des Versuches getötet wurden, nur ca. 1 Jahr alt waren.

In dem gesamten Kontrollmaterial, von dem die Hälfte Weibchen waren, wurde nur ein einziger Fall von Brustkrebs gefunden. Der Tumor liess sich von der 37. Versuchswoche an palpieren, zu welchem Zeitpunkt die Maus ein Alter von ca. 11 Monaten hatte. Erfahrungen mit Zuchttieren deuten ebenfalls nicht darauf hin, dass der verwendete Mäusestamm etwa eine grössere erbliche Belastung mit Brustkrebs hätte. Baggs ursprüngliche Angaben scheinen am besten meinen eigenen Befunden zu entsprechen.

C. Die speziellen Versuchsreihen.

1) Versuch, durch Pinselung der Haut Geschwülste hervorzurufen.

Die Untersuchung wurde vorgenommen, um ein Bild von der histologischen Struktur der produzierten Geschwülste, ihrer Transplantierbarkeit und ihrer Fähigkeit zur Metastasenbildung zu bekommen.

Das erste Symptom, das der cancrogene Kohlenwasserstoff auf der Haut der Mäuse hervorrief, war ein Haarverlust an der Pinselungsstelle. Bei einzelnen Tieren konnte man ihn bereits nach zwei Pinselungen, d. h. eine Woche

nach Beginn des Versuches, bemerken. Mit der Zeit wurde die Depilation immer ausgeprägter, und im Laufe eines knappen Monats hatten alle Versuchstiere eine vollständig nackte Partie an der Pinselungsstelle. Der Haarverlust war eine konstante Erscheinung, und im weiteren Verlauf der Untersuchung trat keine Regeneration ein. Das Symptom war einer Wirkung des Methylcholanthrens zuzuschreiben; denn bei Mäusen, die mit reinem Benzol gepinselt wurden, konnte man nur gelegentlich ein Dünnerwerden der Haare bemerken. Bei den Kontrolltieren stellte man diese Erscheinung frühestens nach 3 monatiger Behandlung fest; sie trat nicht regelmässig bei allen Tieren auf, und eine Regeneration wurde auch durch anhaltende Benzolpinselung nicht verhindert.

Während der fortgesetzten Pinselung mit Methylcholanthren entstanden zwischen der 8. und der 15. Woche warzenartige Bildungen an der Pinselungsstelle. Die Entscheidung, ob solche Warzen aufgetreten waren, hat bei der wöchentlichen Untersuchung keine Schwierigkeiten gemacht.

Zwischen der 14. und der 20. Woche verloren die Geschwülste ihr benignes Aussehen; ein infiltratives Wachstum in die Umgebung und in die Tiefe hinein wurde zu dieser Zeit festgestellt. Diese Kriterien habe ich der Bezeichnung: »klinische Malignität« zugrunde gelegt, da man hier nach bestem Ermessen einem kanzerösen Prozess gegenüber stehen wird. Die wöchentlichen Aufzeichnungen zeigten, dass die Tumoren im allgemeinen gleichzeitig schnell und progressiv zu wachsen begannen. Bei einigen ganz wenigen Geschwülsten trat dieses Symptom erst im Laufe von 1—2 Wochen, in einem einzelnen Falle erst nach 4 Wochen, nachdem ich mit klinischer Malignität gerechnet hatte, auf.

Der Grund, weshalb ich auf die Wachstumsgeschwindigkeit weniger Rücksicht genommen habe, ist der, dass gleichzeitig mit den ersten Zeichen von Malignität oft Ulzerationsprozesse in den Tumoren auftraten. Bei Infektion mit Abszessbildung kann es zu einem Verfall kommen, der das wirkliche Wachstum der Geschwulst verschleiern wird. Die Feststellung des Zeitpunktes der klinischen Malignität wird aus diesem Grunde immer das Gepräge der Ungenauigkeit infolge subjektiven Ermessens tragen.

Im Laufe der weiteren Entwicklung konnten die Tumoren sehr gross werden. Geschwülste von einer Grösse von mehr als 3×4 cm mit einer Dicke von ca. 2 cm waren keine Seltenheit. Die Randpartien bestanden aus ziemlich weichen, rötlichen Tumormassen, die von ihrer Umgebung nur schwer abzugrenzen waren. In den zentralen Partien fand man immer ausgedehnte Zerfallsprozesse mit Ulzerations-, Nekrose- und Abszessbildung. Die Mäuse mit malignen Geschwülsten sind zwischen dem 117. und dem 201. Tage nach Beginn des Versuches eingegangen. Ein Kriterium wie der Tag des Todes ist natürlich immer mit Vorbehalt aufzufassen; aber in Verbindung mit anderen Versuchsdaten kann es doch gewisse Aufschlüsse geben.

Bei mikroskopischen Untersuchungen erwiesen sich die meisten Tumoren als Plattenepithelzellenkarzinome (Tafel I, Fig. 1). Die Geschwulstzellen lagen in gröberen oder feineren, unregelmässigen Bündeln und Strängen, die an vielen Stellen von einem spärlichen Bindegewebsstroma unscharf abgegrenzt waren. Der Tumor wuchs invasiv und infiltrativ tief in die darunterliegenden Muskeln. Im zentralen Teil der Stränge konnte man Verhornungen in Form von Zwiebelbildungen oder solideren Balken finden. Vom Zen-

trum aus nach dem Stroma zu fand man die Elemente der Epidermis in atypischer Form und Lagerung wieder. In der Regel enthielten die Zellen nur einen mittelchromatinreichen Kern. In den peripherischen Partien der Epithelstränge fanden sich viele Mitosen.

In 2 Geschwülsten fanden sich Partien, die von den beschriebenen Karzinomen grundsätzlich abwichen. Es handelte sich um sehr zellreiche Stränge aus atypischen Spindelzellen, die invasiv in die Umgebung hinauswuchsen. Morphologisch ähneln sie völlig den Spindelzellensarkomen, die entstehen, wenn man Methylcholanthren im subkutanen Gewebe anbringt. In den beiden Tumoren waren sowohl karzinomatöse wie sarkomatöse Elemente vorhanden, die in geschlossenen Massen gesammelt waren (vgl. Tafel III, Fig. 5). Nur an den Berührungsstellen mischten sich die Geschwulstzellen verschiedenen Ursprungs, weshalb ich mich auf die Bezeichnung Plattenepithelzellenkarzinom + Spindelzellensarkom beschränkt habe.

Geschwülste, die durch Pinselung mit Methylcholanthren hervorgerufen waren, hatten also ein histologisches Bild, das den Beschreibungen experimenteller Tumoren entspricht, die durch Pinselung mit Teer (TSUTSUI, 1918; DEELMAN, 1922; BANG, 1924, u. a.), mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen (COOK, HIEGER, KENNAWAY & MAYNEORD, 1932, u. a.) oder mit 3:4-Benzpyren (DOMAGK, 1936, u. a.) hervorgerufen wurden.

Es erscheint zweckmässig, im folgenden den Begriff »reelle Versuchstiere« einzuführen, worunter die Anzahl der Tiere verstanden werden soll, die von den Mäusen der ganzen Versuchsgruppe noch am Leben ist, nachdem sich die erste Geschwulst an der Applikationsstelle entwickelt hat. Die Bezeichnung »absolute Versuchstiere«

bezieht sich auf sämtliche 50 Mäuse, die bei der ganzen Untersuchung zur Verwendung kamen.

Die Untersuchung umfasste 33 reelle Versuchstiere, die alle an der Behandlungsstelle Geschwülste bekommen hatten. Hiervon waren 29 Plattenepithelzellenkarzinome, 2 Papillome und 2 Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome. Man darf mit Sicherheit annehmen, dass, wenn die beiden papillombefallenen Tiere nicht zu so früher Zeit während des Versuches verendet wären, ihre Tumoren später histologisch einen malignen Charakter angenommen hätten.

Die Mittelwerte der Versuchskriterien sind in Tabelle 1 aufgeführt; es wurden hier jedoch nur rein epitheliale Geschwülste mitgerechnet. In Anbetracht dessen, dass alle Data, die auf den wöchentlichen Untersuchungen basiert sind, in Wochen angegeben werden müssen, habe ich auch die mittleren Todestage mit Wochen als Einheit angegeben. Ausserdem habe ich angeführt, wann die Tumoren schätzungsweise Haselnussgrösse erreicht hatten. Dieses Kriterium ist bei allen Versuchen mit herangezogen worden, und es ist nicht so ungenau, wie man bei oberflächlicher Betrachtung vermuten könnte. Durch die wöchentlichen Aufzeichnungen ist man jederzeit imstande ungefähr festzustellen, an welchem Wochentage die Geschwulst annähernd diese Grösse erreicht hat. Gegenüber der Tabelle der mittleren Todestage hat man hier den Vorteil, mit lebendigen Tieren zu arbeiten, sodass die Zahlen nicht von einer zufälligen Sterblichkeit während der Untersuchung beeinflusst werden. Man darf annehmen, dass die mittleren Zeiten der klinischen Malignität, die mittleren Zeiten des Erscheinens haselnussgrosser Geschwülste und die mittleren Todestage bei diesem Versuch gleich zuverlässige Kriterien sind, was auch aus der relativen Übereinstimmung dieser

Zahlen hervorgeht. Die mittlere Latenzzeit für das Erscheinen der Papillome muss jederzeit als die zuverlässigste Angabe bei Untersuchungen mit Methylcholanthrenpinselungen angesehen werden. Obwohl das Material nicht gross ist, wurden die Berechnungen mit einer Genauigkeit von einer Dezimalstelle angestellt, da frühere Versuche von geringerem oder ähnlichem Umfange meist in der gleichen Weise ausgeführt wurden. Die Berechnungen der mittleren Zeiten sind für die verschiedenen Versuchs-kriterien auf einer verschiedenen Anzahl von Tieren basiert, da 2 Mäuse mit Papillomen verendet sind und 1 Maus an einem Karzinom eingegangen ist, das keine klinischen Zeichen von Malignität gezeigt hat.

Tabelle 1.

Untersuchung, bei der in Benzol aufgelöstes Methylcholanthren auf die Haut gepinselt wurde.

Mittlere Zeit in Wochen vom Beginn des Versuches bis	
zum Erscheinen der Papillome	11,9 (31) ¹
zur klinischen Malignität.....	15,9 (28)
zu haselnussgrossen Geschwülsten	19,1 (28)
zum Tode der karzinombehafteten Maus.....	24,1 (29)

¹ Die Zahlen in Klammern geben an, wie viele Tiere in den einzelnen Berechnungen enthalten sind.

Bei Bagg-Mäusen, die zweimal wöchentlich mit einer 0,3 %igen Lösung von Methylcholanthren in Benzol gepinselt wurden, erschienen die Geschwülste zwischen der 8. und der 12. Woche, durchschnittlich nach 11,9 Wochen. Im Vergleich zu früheren Pinselungsversuchen mit Kohlenwasserstoff (BARRY, COOK, HASLEWOOD, HEWETT, HIEGER & KENNAWAY, 1935, und BACHMANN, COOK, DANSI, DE

WORMS, HASLEWOOD, HEWETT & ROBINSON, 1937) muss angenommen werden, dass die Haut der Bagg-Mäuse empfindlicher ist als die der verwendeten gewöhnlichen Zuchtmäuse und der CBA-Mäuse.

Bei 7 von 29 Mäusen, bei denen Plattenepithelzellenkarzinome hervorgerufen wurden, konnten insgesamt 10 Metastasen in verschiedenen Organen konstatiert werden. Hiervon waren 5 in den Lungen, 3 in regionären Lymphdrüsen, 1 in der Niere und 1 in der quergestreiften Muskulatur des Oberschenkels lokalisiert. Bei karzinombehafteten Tieren, die man spontan an der Krankheit zugrundegehen liess, bildeten die Geschwülste also im vorliegenden Material bei ca. $\frac{1}{4}$ der Tiere Metastasen. Alle Mäuse, die mit Metastasen behaftet waren, haben mindestens noch 10 Wochen nach dem Nachweis der klinischen Malignität gelebt.

In der Literatur habe ich keine Beschreibung von geglückten Homotransplantationsversuchen mit epithelialen Geschwülsten finden können, die durch Pinselungsversuche mit cancrogenen Kohlenwasserstoffen erzeugt worden sind. Die stark nekrotischen und infizierten Karzinome wirken von vornherein nicht gerade einladend zu solchen Untersuchungen, obwohl nachgewiesen worden ist, dass sich entsprechende Teerpinselungsgeschwülste transplantieren lassen (FIBIGER & BANG, 1920 und 1921 u. a.). Um einen experimentellen Beweis für die Malignität zu erbringen, habe ich versucht, Plattenepithelzellenkarzinome von 3 moribunden Mäusen weiterzuführen. Die gesündesten Randpartien der Geschwülste wurden auf 6 oder 10 Mäuse übertragen, je nach der Ergiebigkeit des Materials. Die geimpften Tiere wurden bis zu 3 Monate beobachtet. Nach einer längeren Observationszeit entstandene Tumoren wären schwer zu beurteilen gewesen, da man damit rechnen

musste, dass sie möglicherweise durch minimale Mengen Methylcholanthrens von der Muttergeschwulst hervorgerufen waren. Bei 2 Karzinomen trat an der Impfstelle eine Infektion ein ohne Zeichen fortgesetzten Wachstums. Die dritte Geschwulst gab keinen Anlass zu Abszessbildung, und nach einer Observationszeit von $1\frac{1}{2}$ Monaten ging die Überimpfung bei 2 von 8 überlebenden Mäusen an. Die Tumoren hatten dasselbe morphologische Aussehen wie die Muttergeschwulst und gingen in den folgenden $1\frac{1}{2}$ Monaten nicht zurück.

Im Interesse der Vollständigkeit des Berichtes will ich noch die primären Tumoren erwähnen, die während des Versuches abseits der Applikationsstelle entstanden sind. Sie sollen in einer späteren Arbeit im Zusammenhang mit ähnlichen Geschwülsten aus den übrigen Untersuchungen erörtert werden.

Lungenadenome sind bei 3 Mäusen aufgetreten (2 ♂ und 1 ♀), die alle Plattenepithelzellenkarzinome an der Pinselungsstelle hatten. Zwei der Tiere hatten ferner an einer Lymphdrüse oder an der Lunge Metastasen von Geschwülsten, die an der Behandlungsstelle entstanden waren. Die Tiere sind zwischen dem 170. und dem 193. Tage nach Beginn des Versuches eingegangen. Diese Geschwülste liegen in der Regel dicht unter der Pleura und bestehen aus dünnen Bindegewebsschichten, die mit zylindrischen oder kubischen, an verdickte Alveolarepithelien erinnernde Zellen bekleidet sind. Durch eine besondere Lagerung der Zellen bekommen die Tumoren ein mehr oder weniger adenomatöses Gepräge.

Ein Mäuseweibchen, das am 138. Tage seziiert wurde, hatte in der Gegend des Thymus einen haselnussgrossen Tumor. Vorn nach dem Sternum zu war er deutlich abgegrenzt, als wäre er von einer Kapsel umgeben. Dagegen

wuchs er diffus nach innen durch den ganzen übrigen Teil des Mediastinum, und er infiltrierte auch die Muskulatur an der Apertura thoracis sup. Lunge und Herz wurden dadurch nach unten und hinten disloziert, und die grossen Gefässe waren vollständig von Tumormassen umgeben. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte es sich, dass die Geschwulst fast ausschliesslich aus Rundzellen bestand, die als kleine oder auch grosse Lymphozyten aufgefasst werden müssen (Tafel I, Fig. 2). Die Zellen waren ganz unregelmässig gelagert, ohne das geringste Zeichen einer Follikelbildung. Im Tumor waren einzelne Mitosen anzutreffen, und er wuchs infiltrativ in die angrenzende Muskulatur hinein. Im Gewebe fanden sich einzelne Retikulumzellen ohne proliferative Tendenz, während ich keine Reste von Hassall'schen Körperchen habe finden können. Die Geschwulst war reichlich mit Gefässen versehen. Bei Imprägnierung a. m. Foot fand man einzelne Fibrillen, die sich jedoch bei einer Färbung nach van Gieson-Hansen oder Mallory nicht nachweisen liessen. Bei einer mikroskopischen Untersuchung der Lungen sah man, dass sich die Rundzellen wie dicke Mäntel an den Gefässen und Bronchien entlang ausbreiteten, wo sie unmittelbar unter der Bronchialschleimhaut lagen, ohne diese jedoch zu durchwachsen. Auf Grund von Lage, Aussehen und Charakter der Geschwulst darf man diese als ein Lymphoblastom bezeichnen, das vermutlich vom Thymus ausgegangen war.

2) Versuche, durch subkutane Deponierung von Methylcholanthren Tumoren hervorzurufen.

Eine solche Untersuchung wurde vorgenommen, um eine Vergleichsgrundlage für die übrigen Versuche zu

schaffen. Als Versuchsregion habe ich das subkutane Gewebe der Interskapularregion gewählt, in das ca. 10 mg kristallinisches Methylcholanthren mit Hilfe einer Lumbalkanüle und mit Glycerin als Schmiermittel eingeführt wurden.

Bei einem anderen Versuch habe ich in entsprechender Weise den cancrogenen Kohlenwasserstoff subkutan in die linke Flanke injiziert und gleichzeitig ein ca. 1 cm langes Stück eines schweren, sterilisierten Seidenfadens subkutan in der rechten Lendenregion angebracht. In keinem Falle hat sich etwas anderes gezeigt als eine Fremdkörperreaktion in der nächsten Umgebung des Fadens, und der Versuch gibt keinen Anlass zu der Vermutung, dass um den Seidenfaden herum maligne Geschwülste entstehen könnten. Die Untersuchungen sind nur deshalb von Interesse, weil in einer anderen, subkutanen Region Tumoren hervorgerufen wurden. Es ist kaum wahrscheinlich, dass der unbedeutende Eingriff auf die Geschwulstbildung in der linken Flanke von Einfluss war.

Zu jedem Versuch wurden 50 Versuchs- und 50 Kontrollmäuse mit der gleichen Anzahl Männchen und Weibchen in jeder Gruppe verwendet. Beide Untersuchungen wurden am 280. Versuchstage abgeschlossen, an dem die Kontrolltiere und die wenigen Versuchsmäuse, die nach der Injektion von Methylcholanthren keine Geschwülste gebildet hatten, getötet wurden.

In dem Versuch, in dem das Methylcholanthren subkutan unter der Rückenhaut deponiert wurde, entstand bei ca. $\frac{1}{4}$ der Mäuse ein Haarverlust über der Deponierungsstelle. Das Symptom zeigte sich in der 5. bis 13., durchschnittlich zwischen der 9. und 10. Woche nach Beginn des Versuches. Noch bevor das geringste Anzeichen

einer Tumorbildung zu sehen war, entstand im Laufe von 13—16 Wochen bei ein paar Mäusen ein ulzeröser Prozess an der Versuchsstelle. Im Gegensatz zur sekundären Ulzeration, die über einer voll entwickelten Geschwulst entstehen kann, ist diese primäre Ulzeration ausschliesslich einer Wirkung des cancrogenen Kohlenwasserstoffs zuzuschreiben.

Die Tumoren entstanden zwischen der 14. und der 38. Woche nach Beginn des Versuches. Die Geschwülste machten sich als kleine, harte Verdickungen an den Methylcholanthrendepots bemerkbar. Nach den palpatorischen Befunden war man nicht im Zweifel darüber, ob sich ein Tumor gebildet hatte. Diese harten, gut abgegrenzten Verdickungen konnten sich 1—6 Wochen lang unverändert halten, worauf sie plötzlich schnell und progressiv zu wachsen anfangen. Der Zeitpunkt, zu dem die Geschwülste in dieser Weise ihren Charakter veränderten, liess sich durch die wöchentlichen Aufzeichnungen genau bestimmen, und dies war ausserdem der einzige Anhaltspunkt dafür, dass klinische Malignität eingetreten war.

Im Vergleich zur folgenden Untersuchung, wo der Stoff subkutan in der linken Flanke deponiert wurde, konnte man hier seltener die Tumoren schon in einem ganz frühen Stadium in der Interskapularregion palpieren. Man erkannte sie erst bei beginnender klinischer Malignität, was sicher dadurch zu erklären ist, dass die Scapulae eine Palpation dieser Region erschweren. Die Beurteilung des Zeitpunktes des Erscheinens der Geschwulst ist daher ein so unzuverlässiges Kriterium, dass es bei dieser Untersuchung ohne Interesse ist.

Die klinische Malignität zeigte sich zwischen der 14. und der 38. Woche, zu den gleichen Zeiten also, die für die

Entstehung der Geschwülste angegeben wurden. Mäuse mit malignen Tumoren gehen spontan zwischen dem 109. und dem 279. Tage nach Beginn des Versuches ein.

Die Geschwülste waren weiss, hatten Ähnlichkeit mit Fischfleisch und waren von ihrer Umgebung nicht scharf abgegrenzt. Sie konnten sehr gross werden; so wurde z. B. ein Tumor gefunden, der 11,75 g wog, während die Maus nach Entfernung des Tumors ein Gewicht von 22,75 g hatte. Nekrose, sekundäre Ulzeration und Infektion traten in der Regel erst auf, wenn die Geschwülste eine ansehnliche Grösse erreicht hatten.

Bei Tieren, die vor dem Erscheinen der ersten Tumoren verendeten, sah man das eingeführte Methylcholanthren immer als einen zusammenhängenden Klumpen im subkutanen Gewebe. Bei anderen Versuchen habe ich manchmal sichtbare Reste der gelben Kristalle in voll entwickelten, malignen Geschwülsten gefunden. Bei Abschluss des Versuches, 280 Tage nach seinem Beginn, lebten noch 2 Mäuseweibchen, die nicht mit Tumorbildung reagiert hatten. Bei diesen Tieren sowie bei einem Mäuseweibchen, das am 267. Versuchstage einging, liessen sich keine Reste des Kohlenwasserstoffes beobachten, was wohl bedeuten muss, dass er von der Deponierungsstelle entfernt worden ist.

Bei der mikroskopischen Untersuchung erwiesen sich die meisten Geschwülste als infiltrativ wachsende Spindelzellensarkome. Die Tumoren waren ungeheuer zellreich und nur sehr spärlich mit Grundsubstanz versehen (Tafel II, Fig. 3). Die Geschwulstzellen lagen meist in groben, unregelmässigen Strängen und Bündeln angeordnet. Das Aussehen der Spindelzellen schwankt etwas: man trifft alle Formen, von kurzen abgestumpften Formen bis zu langen, mehr oder weniger schlanken Elementen. Nach dem vor-

liegenden Material hat man keinen Anlass zu der Vermutung, dass diese Zellen mit glatter Muskulatur verwandt sein könnten, wie das in einzelnen Fällen bei ähnlichen Versuchen mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen (HAAGENSEN & KREHBIEL, 1936, und HVAL, 1937) und mit 3:4-Benzpyren (DUNNING, CURTIS & BULLOCK, 1936) beschrieben worden ist. In der Regel enthielten die Zellen nur einen mittelchromatinreichen Kern, der spindelförmig, oval oder rund war.

Im Vergleich zu den Plattenepithelzellenkarzinomen waren hier weniger Mitosen zu sehen. In den Tumoren verstreut konnte man einzelne Riesenzellen finden. In der spärlichen Grundsubstanz liessen sich kollagene Fibrillen mit van Gieson-Hansen-Färbung schwer nachweisen; mit Färbung a. m. Mallory oder Foot liess sich jedoch immer ein fibrilläres Netz nachweisen, das nicht nach Weigert gefärbt werden konnte.

Eine einzelne Geschwulst wurde als Sarcoma polymorphocellulare aufgefasst (Tafel II, Fig. 4), weil Form und Grösse der Zellen starke Unterschiede aufwiesen; aber auch hier gab es nur wenige multinukläre Riesenzellen. Die morphologische Diagnose ist jedoch kaum von grosser Bedeutung, weil diese Geschwulst bei einer Transplantation in allen positiven Fällen sich zu einem reinen Spindelzellensarkom entwickelte.

Die am häufigsten konstatierten Spindelzellensarkome entsprechen jenen Beschreibungen, die von ähnlichen Versuchen an Mäusen vorliegen, die mit 1:2:5:6 Dibenzanthracen (BURROWS, HIEGER & KENAWAY, 1932 u. a.), mit 3:4-Benzpyren (DUNNING, CURTIS & BULLOCK, 1936 u. a.) und mit Methylcholanthren vorgenommen wurden (BARRY, COOK, HASLEWOOD, HEWETT, HIEGER &

KENNAWAY, 1935 u. a.). Das einzige subkutane, durch Teerinjektionen hervorgerufene Sarkom, ist gleichfalls von demselben Typus (RUSSEL, 1922).

Zwei Geschwülste erwiesen sich als Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome (Tafel II, Fig. 5), da sie die gleiche histologische Beschaffenheit wie die entsprechenden Tumoren hatten, die beim Pinselungsversuch besprochen wurden. Diese Geschwülste waren nicht bei jenen Mäusen entstanden, die eine Ulzerationsbildung über der Stelle, wo das Methylcholanthren deponiert war, gehabt hatten. Karzinombildung bei Mäusen infolge subkutaner Injektionen von cancrogenem Kohlenwasserstoff ist früher schon hin und wieder beschrieben worden. HAAGENSEN & KREHBIEL (1936) und DOBROVLSKAĀ-ZAVADSKAĀ & ADAMOVA (1938 und 1939) haben bei Versuchen mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen vereinzelt Male Plattenepithelzellenkarzinome gesehen, die von Sarkombildung begleitet sein konnten. Mit 3:4-Benzpyren haben DUNNING, CURTIS & BULLOCK (1936) unter 427 Geschwülsten 23 ähnliche Karzinome in Verbindung mit Sarkomen gefunden. BONSER & ORR (1939) haben 160 Tumoren an Mäusen hervorgerufen, indem sie subkutan Paraffinstäbchen einführten, die 1:2:5:6-Dibenzanthracen, 3:4-Benzpyren oder Methylcholanthren enthielten. In diesem Material wurden 12 Plattenepithelzellenkarzinome gefunden, die in der Hälfte der Fälle von Sarkombildung begleitet waren.

Im ganzen haben 29 (91 %) von 32 reellen Versuchstieren mit Tumorbildung an der Injektionsstelle reagiert. Beim Pinselungsversuch bekamen sämtliche reellen Versuchstiere eine Geschwulst. Diese Zahlen müssen jedoch mit einigem Vorbehalt aufgefasst werden, weil die Tumoren

bei den einzelnen Mäusen zu verschiedenen Zeiten auftraten. Auch wenn das Material in der Weise aufgestellt wird, wie es hier geschehen ist, kann eine zufällige Sterblichkeit unter den Tieren doch zu Schwankungen in den Zahlenangaben führen. Von den 29 Tumoren wurden 23 als Spindelzellensarkome aufgefasst, 1 als polymorphzelliges Sarkom, 4 als Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome, und eines hat sich schliesslich als reines Plattenepithelzellenkarzinom erwiesen. Die Sarkome haben keine Metastasen gebildet, während 2 Mäuse Metastasen von rein epithelalem Charakter in der Lunge oder einer Lymphdrüse hatten.

Die Mittelwerte der Versuchsergebnisse mit reinen Sarkomen sind in Tabelle 2 angegeben. Hieraus geht hervor, dass eine Maus verendet ist, ehe die Geschwulst Haselnussgrösse erreicht hatte. Das Kriterium der klinischen Malignität muss als die genaueste Angabe angesehen werden. Die mittleren Zeiten für das Erscheinen haselnussgrosser Geschwülste werden durch die etwas verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumoren beeinflusst, und hier macht sich auch das individuelle Ermessen in grösserem Umfange geltend. Da sich dieses Kriterium auf lebende Tiere bezieht, muss es eine bessere Grundlage für die Bewertung abgeben als die für den Tod der Tiere gewonnenen mittleren Zeiten, die einen falschen Eindruck erwecken können, wenn aus zufälligen Ursachen unter den sarkombehafteten Mäusen eine grössere Sterblichkeit auftritt.

Im folgenden Versuch, bei dem das Methylcholanthren subkutan in der linken Flanke deponiert wurde, ist weder Haarverlust noch eine primäre Ulzeration an der Deponierungsstelle aufgetreten. Dies lässt sich sicher dadurch erklären, dass der Stoff in grösserem

Abstand von der Haut gelagert war, die hier loser mit der Unterlage verbunden ist. Schliesslich mag die Haut hier vielleicht etwas dicker sein als auf dem Rücken.

Die Tumoren entstanden zwischen der 7. und der 22. Woche nach Beginn des Versuches. Die Geschwülste wurden zuerst als kleine, harte, gut abgegrenzte Verdickungen palpirt, die sich bis zu 22 Wochen ganz unverändert halten konnten, dann aber plötzlich in schnelles und progressives Wachstum übergangen. Im allgemeinen ist dieses Intervall weniger lang, und in einzelnen Fällen haben die Tumoren sofort Zeichen klinischer Malignität getragen.

Zwischen der 9. und der 35. Woche gehen die Geschwülste in ein klinisch malignes Stadium über. Meine Erfahrungen haben auch hier gezeigt, dass sich dieser Übergang durch die wöchentlichen Aufzeichnungen erstaunlich genau bestimmen lässt.

Mäuse mit malignen Geschwülsten gingen zwischen dem 115. und dem 278. Versuchstage ein. Im ganzen haben 34 (94 %) von 36 reellen Versuchstieren einen Tumor bekommen. Die Geschwülste haben in keinem Falle Anlass zu Metastasen gegeben. Von den 34 Tumoren waren 26 Spindelzellensarkome, 1 ein polymorphzelliges Sarkom, 2 benigne, fibröse Geschwülste, 2 Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome und 3 reine Plattenepithelzellenkarzinome.

Die mittleren Zeiten für die Versuchskriterien sind in Tabelle 2 angegeben; es wurden hier jedoch nur Geschwülste von rein fibröser oder sarkomatöser Natur bei der Berechnung mitgezählt. Die Berechnungen der Mittelzahlen wurden aus einer verschiedenen Anzahl von Tieren vorgenommen, weil 2 Mäuse mit benignen, fibrösen Ge-

schwülsten eingegangen und noch 2 weitere Tiere verendet sind, bevor sich die Sarkome bis zu Haselnussgrösse entwickelt hatten.

Tabelle 2.

Mittlere Zeit in Wochen vom Beginn des Versuches bis	Untersuchung, bei der das Methylcholanthren subkutan deponiert wurde		Mittelwerte ¹ aus 1 & 2
	1) unter der Rückenhaut	2) in der Flanke	
zum Erscheinen der Tumoren	—	12,2 (28)	—
zur klinischen Malignität..	20,2 (24)	17,6 (26)	18,8 (50)
zu haselnussgrossen Geschwülsten	22,3 (23)	21,5 (24)	21,9 (47)
zum Tode der sarkom- behafteten Maus	25,0 (24)	23,7 (26)	24,3 (50)

¹ Die Mittelwerte wurden aus dem ursprünglichen Zahlenmaterial berechnet und nicht als Mittelzahlen aus 1 & 2.

Das beste und sicherste Mass zum Vergleich und zur Beurteilung der Versuche, bei denen Methylcholanthren subkutan unter der Rückenhaut, bzw. in der linken Flanke deponiert wurde, sind die mittleren Zeiten für die beginnende klinische Malignität. Es ist eigentlich merkwürdig, dass diese zuverlässige Angabe bei früheren Versuchen, bei denen krebserzeugende Kohlenwasserstoffe subkutan angebracht wurden, keine Anwendung gefunden hat. Bei Untersuchungen mit ganz verschiedenartiger Technik bilden die Zeiten für das Erscheinen der Tumoren stets die Berechnungsgrundlage, wenn auch oftmals davon die Rede ist, wie schwierig die genaue Bestimmung dieses Zeitpunktes ist (BURROWS, HIEGER & KENNAWAY, 1932, SHEAR, 1936, BOYLAND & WARREN, 1937 u. a.).

Es lässt sich kein wirklicher Unterschied zwischen den Versuchskriterien dieser beiden Gruppen nachweisen, bei denen der krebserzeugende Stoff subkutan unter der Rückenhaut, bzw. in der linken Flanke deponiert wurde. Man muss daher annehmen, dass die Reaktion des Gewebes in beiden Regionen mit der gleichen Geschwindigkeit vor sich geht. Auf Grund theoretischer Überlegungen könnte man vermuten, dass Unterschiede zwischen den Versuchskriterien bestehen, dass z. B. eine verschiedene Gefäßversorgung im subkutanen Gewebe der beiden Gebiete die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst.

Um für spätere Untersuchungen eine bessere Vergleichsgrundlage zu schaffen, habe ich auf Grund des vorliegenden Zahlenmaterials die Mittelwerte der Versuchskriterien der beiden Untersuchungen mit subkutanem Gewebe als Versuchsobjekt ausgerechnet (Tabelle 2).

Frühere Versuche mit Mäusen, denen subkutan Methylcholanthren zugeführt wurde, sind zum grössten Teil mit Injektionen in die Flanke oder in die Achsel ausgeführt worden. Bei Untersuchungen mit Dosen von 0,8 mg oder darüber ist die geringste Menge mit maximaler Wirkung sicher überschritten (ESMARCH, 1940 b). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen erschienen die subkutanen Geschwülste bei Bagg-Mäusen, denen 10 mg des Stoffes in die linke Flanke injiziert worden war, zwischen der 7. und der 22. Woche, d. h. nach einer mittleren Zeit von 12,2 Wochen. Obwohl sich die Ergebnisse bei verschiedenen Versuchsanordnungen ändern und das Versuchskriterium sehr unzuverlässig ist, muss man annehmen, dass das subkutane Gewebe der Bagg-Mäuse verglichen mit dem anderer, reiner Mäusestämme in seiner Reaktion auf das Methylcholanthren als etwa mittelempfindlich zu bezeich-

nen ist (SHEAR, 1936, BOYLAND & WARREN, 1937, ANDERVONT, 1938 a, b und NICOD & REGAMEY, 1938).

Um die vollständige Erörterung der beiden Versuche abzuschliessen, mag noch erwähnt werden, dass bei einer Untersuchung, bei der das Methylcholanthren subkutan unter der Rückenhaut deponiert wurde, keine primären Geschwülste abseits der Einspritzungsstelle angetroffen wurden. Bei einem anderen Versuch, wo der Stoff in der Flanke angebracht war, sind bei 2 Mäusen (1 ♂ und 1 ♀) Lungenadenome vorgekommen: diese Tiere sind am 171. bzw. 280. Tage eingegangen. Das eine Tier hatte mit Sarkombildung an der Injektionsstelle reagiert, während das andere keine Tumoren aufwies.

Experimentell hervorgerufene Sarkome sind ausnahmslos weniger nekrotisch und infiziert als jene Karzinome, die bei Pinselungsversuchen entstehen. Sie sind daher öfter zum Gegenstand von Homotransplantationsversuchen gemacht worden, und verschiedene Forscher können über eine wohlgelungene Weiterführung durch mehrere Passagen berichten (BURROWS, HIEGER & KENNAWAY, 1932, SCHABAD, 1935 u. a.). In der ersten Generation konnte man jedoch keinen grösseren Prozentsatz positiver Fälle erzielen, es sei denn, dass die Geschwülste auf Mäuse desselben reinen Stammes übertragen wurden, an dem sie hervorgerufen waren (ANDERVONT, 1934, LEWIS & LICHTENSTEIN, 1936 a, b und LEWIS, 1937).

Im ganzen habe ich 5 Geschwülste, die im subkutanen Gewebe unter der Rückenhaut oder in der Flanke hervorgerufen waren, weitergeführt. Je nach dem Reichtum des Materials wurden von jeder Geschwulst auf 10—20 Mäuse von gleichem Geschlecht und Stamm Überimpfungen vorgenommen. Im Vergleich zu der Transplantation der ex-

perimentellen Plattenepithelzellenkarzinome gingen diese Überimpfungen schneller, häufiger und regelmässiger an. Alle Geschwülste des Versuches liessen sich übertragen. Bei ca. $\frac{2}{3}$ der Tiere entstanden die Impfgeschwülste im Laufe von ein paar Wochen, und sie gingen nur selten später zurück.

Ein polymorphzelliges Sarkom wuchs in allen positiven Fällen als reines Spindelzellensarkom, was darauf hindeuten muss, dass die morphologische Diagnose ohne besondere Bedeutung ist. Bei der Weiterführung verändern dagegen die Spindelzellensarkome ihren Charakter nicht. Ein Sarkom wurde auf diese Weise zum Gegenstand von Serientransplantationen gemacht, sodass es sich jetzt in der 53. Generation befindet, ohne dass sich seine Morphologie geändert hätte.

Bei beiden Versuchen wurden hin und wieder reine Plattenepithelzellenkarzinome oder Geschwülste konstatiert, die als Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome bezeichnet wurden, weil die beiden Arten maligner Gewebe in geschlossenen Massen so gelegen haben, dass nur an den Berührungstellen eine Mischung der Elemente vor sich gegangen ist. Epitheliale Tumoren wurden, wie erwähnt, gelegentlich jener Untersuchungen beschrieben, wo cancrogene Kohlenwasserstoffe subkutan eingeführt wurden. Man kann annehmen, dass diese Geschwülste von der Haut ausgehen. Mit 3:4-Benzpyren haben PEACOCK & BECK (1938) gezeigt, dass die Tumoren einige wenige Millimeter vom subkutanen Depot selbst entfernt entstehen, vermutlich weil die Konzentration des Stoffes hier optimale Bedingungen für die Bildung von Geschwülsten bietet. Trotzdem die krebserzeugende Verbindung in das subkutane Gewebe selbst eingeführt wird, besteht also die Möglichkeit, dass

epitheliale Elemente in einer Zone zu liegen kommen, in der eine für eine Geschwulstbildung günstige Konzentration besteht. Ferner wurde nachgewiesen (ESMARCH, 1940 a), dass man beim Einstich mit der Kanüle ein Hautstückchen in das Gewebe dislozieren kann, wo es unter der Einwirkung des gleichzeitig injizierten Methylcholanthrens maligne degenerieren wird.

Diese Tatsachen geben eine passende Erklärung für das Auftreten der malignen, epithelialen Geschwülste; gleichzeitig erhebt sich aber die Frage, ob ein Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit besteht, wenn Haut und subkutanes Gewebe der Einwirkung eines cancerogenen Kohlenwasserstoffs ausgesetzt werden. CLOWES & CHEN (1936) geben an, dass bei intrakutaner Injektion von Lösungen mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen oder 3:4-Benzpyren in Öl ausschliesslich Sarkome entstehen. Leider ist die Grösse des Materials nicht angegeben; der Versuch muss aber als ein Ausdruck dafür aufgefasst werden, dass sich das Bindegewebe schneller als epitheliales Gewebe zu malignen Tumoren umbilden lässt. Auf Grund von Berechnungen an Hand früherer Versuche mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen an Mäusen hat FIESER (1938) gezeigt, dass die gleichen Stoffe überall längere Zeit brauchen, um bei Pinselungsversuchen Hautgeschwülste hervorzurufen als bei Injektionsversuchen subkutane Tumoren. Beim Methylcholanthren handelt es sich um eine 1,38 mal so lange Zeit. Aus einer solchen Berechnung kann man indessen nicht den Schluss ziehen, dass die Haut langsamer reagiert; denn hier werden Versuche mit weit verschiedener Technik verglichen.

Ein Vergleich zwischen den Versuchskriterien meiner eigenen Versuche, bei denen das Methylcholanthren in einigen Fällen der Haut, in anderen Fällen dem subkutanen

Gewebe zugeführt wurde, lässt sich schwer anstellen, weil die gleiche Mittelzahl in beiden Untersuchungsgruppen nicht gleich zuverlässig ist. Aus den Tabellen 1 und 2 geht hervor, dass die Tumoren bei beiden Versuchen nach praktisch der gleichen Zeit entstehen; es muss aber daran erinnert werden, wie schwer sich der Zeitpunkt des Erscheinens der Geschwülste bestimmen lässt, wenn der Stoff im subkutanen Gewebe deponiert wurde. Das beste Mass für einen Vergleich sind sicher die mittleren Zeiten für das Erscheinen der klinischen Malignität, die bei den subkutanen Versuchen nach 1,18 mal so langer Zeit auftritt als beim Pinselungsversuch.

Im Vergleich zu Mäusen anderer Stämme muss man annehmen, dass die Haut der Bagg-Mäuse besonders empfindlich ist, während das subkutane Gewebe in seiner Reaktion auf die krebserzeugende Fähigkeit des Methylcholanthrens von mittlerer Empfindlichkeit ist. Meine eigenen und FIESER's Angaben sind auch ein Ausdruck für dieses relative Verhältnis. Ein festes Verhältnis zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit der Haut und des Bindegewebes kann man nicht erwarten, da BRANCH (1936) gezeigt hat, dass sich subkutane Tumoren mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen bei zwei Mäusestämmen, die nicht die gleiche Empfindlichkeit gegen Pinselungsversuche mit dem Stoffe haben, mit gleicher Leichtigkeit hervorrufen liessen.

Um ein Bild von der Reaktivität der Haut und des Bindegewebes bei dem verwendeten Mäusestamm zu bekommen, will ich voraussetzen, dass das subkutane Gewebe bei den Pinselungsversuchen der Einwirkung des Methylcholanthrens ebenso ausgesetzt ist wie das Epithelgewebe, wenn der Stoff subkutan deponiert wird. Bei meinem Pinselungsversuch waren 2 (6 %) von 31 malignen

Tumoren zum Teil sarkomatös. Bei den beiden Versuchen, bei denen die Verbindung im subkutanen Gewebe deponiert wurde, erwiesen sich 10 (16 %) von 61 malignen Geschwülsten ganz oder teilweise als karzinomatös. In Anbetracht der vielen Fehlerquellen in der Voraussetzung wage ich nicht den Schluss zu ziehen, dass die Haut bei dem verwendeten Mäusestamm schneller reagiert als das Bindegewebe; die Zahlen stehen jedoch in einem wohlbe-gründeten Gegensatz zu den Vermutungen, dass sich Tu-moren schneller vom subkutanen als vom epithelialen Ge-webe aus bilden.

3) Versuch, in der Mamma durch direkte Reizung des Gewebes mit Methylcholanthren Tumoren her-vorzurufen.

Jeder Maus wurde das Methylcholanthren unter einer Pa-pille in der linken Inguinalregion deponiert. Die Kontroll-tiere und ein Versuchstier, das nicht mit Tumorbildung reagiert hatte, wurden 280 Tage nach Beginn der Untersuchung ge-tötet, während ein geschwulstbehaftetes Versuchstier am Leben gelassen wurde, damit es spontan verenden konnte.

Die normalen Verhältnisse des Brustgewebes bei Mäuse-weibchen brauchen nicht besonders besprochen zu werden. Bei Männchen kann das Brustgewebe so rudimentär sein, dass es sich nicht einmal durch Serienschritte nachweisen lässt (LACASSAGNE, 1932, und BONSER, 1936). Bei Mäuse-männchen war es zuweilen unmöglich, in der Mammaregion eine Papille zu finden, weshalb die Injektionen nach bestem Ermessen vorgenommen werden mussten. Der Grund, weshalb Männchen überhaupt in den Versuch mit einbezogen wurden, ist der, dass untersucht werden sollte, ob der Kohlenwasserstoff das rudimentäre Organ mög-

licherweise zur Entwicklung bringen könnte, wie das z. B. vor dem Entstehen maligner Geschwülste im Mammagewebe bei Mäusemännchen der Fall ist, die mit grossen Dosen von östrogenen Hormonen behandelt werden (LACASSAGNE, 1936).

Für diese Untersuchung war charakteristisch, dass es bei praktisch allen Tieren über der nächsten Umgebung der Deponierungsstelle zu Haarverlust kam. Die Erscheinung trat im Laufe von 1 bis 9 Wochen auf, durchschnittlich im Laufe von ca. 5 Wochen. Ferner kam es oft zu einer Ulzerationsbildung vor dem Erscheinen von palpierbaren Tumoren, und solche Prozesse konnten auch über den klinisch benignen, kleinen Tumoren entstehen, die in den ganz frühen Stadien nachzuweisen waren. Dieses Symptom hat sich zwischen der 16. und der 22. Woche gezeigt, nach einer mittleren Zeit von ca. 17 Wochen. Es lässt sich kaum annehmen, dass die Ulzerationen hier infolge von Drucknekrosen entstanden sein sollten, weshalb man in beiden Fällen vermuten muss, dass sie infolge einer Wirkung des Methylcholanthrens aufgetreten sind.

Wenn man Kristalle von Methylcholanthren oder anderen cancrogenen Kohlenwasserstoffen in der gleichen Weise in der Achsel von Mäusen des Stammes A deponiert, so kommt es, wie SHEAR (1936 und 1938) angibt, meist zu Haarverlust und Ulzerationsbildung, bevor Tumoren entstehen, und die Geschwülste können sich dann von den Wundrändern aus entwickeln. Diese Beobachtungen stimmen völlig mit den Erfahrungen aus dem soeben besprochenen Versuch überein. Bei einer Untersuchung, bei der das Methylcholanthren unter die Rückenhaut eingeführt wurde, entstand der Haarverlust seltener und später, und es bildeten sich auch nur in einzelnen Fällen Geschwüre. Bei Deponierung in der linken Flanke wurde weder Haarverlust

noch Ulzeration beobachtet. Diese Schwankungen von Versuch zu Versuch sind sicher darauf zurückzuführen, dass die Haut in den verschiedenen Regionen nicht gleich dick ist, und Unterschiede in der Dicke der Subkutis können bewirken, dass das Methylcholanthren mehr oder weniger dicht an der Epidermis zu liegen kommt.

Diese Ulzerationsprozesse sind bei der Beurteilung des Erscheinens der Geschwülste sehr störend. Einerseits kann es recht schwierig sein, zwischen Entzündungserscheinungen und wirklicher Tumorbildung zu unterscheiden, andererseits können solche Prozesse sicher festgestellte Geschwülste zum Verschwinden bringen. Es ist daher nicht möglich, über das Erscheinen der Tumoren bestimmte Angaben zu machen, und mittlere Zeiten für derartige Kriterien werden ebenfalls wertlos sein.

Man hat gesehen, dass das Methylcholanthrendepot völlig offen am Boden der Ulzeration gelegen hat, so dass die Gefahr eines bedeutenden Verlustes des Stoffes bestand; aus diesem Grunde ist die Dosis bei dieser Untersuchung absolut nicht konstant.

Die klinische Malignität trat zwischen der 12. und der 31. Woche ein. Wie bei den früheren Versuchen, in denen der Stoff subkutan zugeführt wurde, machte es keine Schwierigkeiten, mit Hilfe der wöchentlichen Aufzeichnungen den Zeitpunkt zu bestimmen, von dem ab der Tumor in raschem und progressivem Wachstum war. Mäuse mit malignen Geschwülsten starben zwischen dem 129. und dem 299. Tage nach Beginn des Versuches.

35 (90 %) der 39 realen Versuchstiere haben Tumoren bekommen. Von diesen 35 festgestellten Geschwülsten wurden 23 als reine Spindelzellensarkome aufgefasst, 9 als Plattenepithelzellenkarzinome, 2 als Plattenepithelzellen-

karzinome + Spindelzellensarkome, und ein Spindelzellensarkom schliesslich war von Papillombildung in der darüberliegenden Haut begleitet.

Bei einer Maus, die am 154. Tage einging, fand man ein Papillom über einem voll entwickelten Spindelzellensarkom. Dies muss sicher als ein Zeichen dafür angesehen werden, dass die darüberliegende Haut in einer Zone gelegen hat, wo das Methylcholanthren in einer die Entwicklung von epithelialen Geschwülsten begünstigenden Konzentration vorhanden war. Bei den Plattenepithelzellenkarzinomen + Spindelzellensarkomen in unseren Versuchen, waren die beiden Tumorformen in zusammenhängenden Massen gelagert, und zwar in der Weise, dass ihre Elemente nur an den Berührungsstellen gemischt vorkamen (Tafel III, Fig. 5). Dies muss wohl seinen Grund darin haben, dass die epithelialen und sarkomatösen Geschwülste in einem gewissen weiteren Abstand voneinander entstanden sind. Am Boden der Ulzerationen kann das Methylcholanthrendepot völlig offen liegen, und man muss annehmen, dass das Epithel der Wundränder die Ausgangsstelle für die Karzinombildung ist. Diese Annahme wird durch mikroskopische Untersuchungen gestützt, die zeigen, dass die Haut in der Randpartie der Ulzerationen kontinuierlich in ein Plattenepithelzellenkarzinom übergehen kann.

Wenn man weiter in Betracht zieht, dass ein disloziertes Hautstückchen unter der Einwirkung des cancrogenen Kohlenwasserstoffs maligne degenerieren kann, so liegt eine ausreichende Erklärung dafür vor, dass die Plattenepithelzellenkarzinome von den Elementen der Haut ihren Ausgang nehmen können. Spontane, maligne Mammatumoren mit Verhornung hat man bei Mäusen nur äusserst selten angetroffen (HAALAND, 1911). Die Karzinome, die in

der Mammaregion mit Methylcholanthren hervorgerufen wurden, waren alle stark verhornt und von ganz demselben Typus wie beim Pinselungsversuch oder bei den übrigen Versuchen, bei welchen der Stoff subkutan eingeführt wurde. In keinem Falle sind alveoläre oder solide Mammakarzinome der Typen vorgekommen, die man bei Mäusen am häufigsten antrifft. Zu keinem Zeitpunkt wurden Zeichen von hyper- oder metaplastischen Prozessen in der Mamma oder ihren Ausführungsgängen gefunden, trotzdem das Kohlenwasserstoffdepot oder die hervorgerufenen Tumoren in enger Verbindung mit dem Drüsengewebe standen. Es liegen also kein experimenteller Anhaltspunkt dafür vor, dass die verhornten Plattenepithelzellenkarzinome von der Mamma oder ihren Ausführungsgängen ausgehen. Trotzdem ist es auffallend, dass bei den Weibchen unter 18 malignen Tumoren 8 ganz oder teilweise karzinomatöse Geschwülste vorkamen, während bei den Männchen unter 17 malignen Geschwülsten nur 3 Karzinome waren. Es ist jedenfalls sicher, dass das Mammagewebe der Bagg-Mäuse, wenn es der direkten Einwirkung des Methylcholanthrens ausgesetzt wird, nicht mit einer Tumorbildung desselben Typus wie die spontan vorkommenden Mammatumoren reagiert, und die Plattenepithelzellenkarzinome sind wahrscheinlich von der darüberliegenden Haut aus entstanden.

Zwei Geschwülste haben Anlass zu Metastasen gegeben. In einem Falle handelte es sich um ein reines Plattenepithelzellenkarzinom, das in der Muskulatur des Diaphragmas Metastasen gebildet hatte, im anderen Falle um ein Spindelzellensarkom, das an der Testiskapsel eine Metastase aufweisen konnte. Diese beiden Geschwülste haben in das Peritoneum hineingeragt, so dass ihre Lage eine peritonäale Ausbreitung ermöglichte. Wie man beim nächsten

Versuch sehen wird, können Spindelzellensarkome jedoch auch auf dem Lymphwege Metastasen bilden.

Die mittleren Zeiten für die Versuchskriterien sind in Tabelle 3 aufgeführt, wobei ganz oder teilweise karzinomatische Geschwülste nicht mitgerechnet wurden. Bei diesem Versuch muss daran erinnert werden, dass die Geschwulstbildung von Infektionsprozessen begleitet war, die zu Substanzverlusten im Methylcholanthrendepot führen können, so dass die Dosis unkontrollierbar wird. Man darf daher auch dem Umstande, dass die mittleren Zeiten hier etwas länger sind als in den vorausgegangenen Versuchen (vgl. Tabelle 2), keine wirkliche Bedeutung beimessen.

Tabelle 3.

Untersuchung, bei der das Methylcholanthren in der Mamma deponiert wurde.

Mittlere Zeit in Wochen vom Beginn des Versuchs bis	
zum Erscheinen der Tumoren	—
zur klinischen Malignität	22,2 (24)
zu haselnussgrossen Geschwülsten	25,9 (24)
zum Tode der sarkombefallenen Maus	28,0 (24)

Bevor wir den Bericht über die Untersuchung abschliessen, darf noch erwähnt werden, dass bei zwei Versuchsmäusen (1 ♂, 1 ♀) Lungenadenome vorgekommen sind. Die Tiere verendeten am 204. bzw. 252. Tage nach der Injektion des krebserzeugenden Stoffes, der bei beiden die Bildung eines Spindelzellensarkoms an der Behandlungsstelle verursacht hatte.

Von den experimentell hervorgerufenen, malignen Geschwülsten wurden 5 homotransplantiert. 4 Spindelzellensarkome gingen regelmässig und häufig an, während es

nicht gelang, ein Plattenepithelzellenkarzinom weiterzuführen. Die Transplantationstumoren hatten überall die gleiche histologische Beschaffenheit wie die Primärgeschwülste.

4) Versuch, durch intramuskuläre Deponierung von Methylcholanthren Tumoren hervorzurufen.

Um sicher zu gehen, dass das Depot des krebserzeugenden Stoffes intramuskulär zu liegen kommt, habe ich es — im Gegensatz zu früheren Versuchen — vorgezogen, den Stoff durch einen operativen Eingriff einzuführen. Da die Behandlungsstelle epiliiert wurde, kann man sich kein zuverlässiges Urteil über einen eventuellen Haarverlust bilden. Die Geschwülste entstanden im Innern der Muskulatur, und sie liessen sich daher nur selten fühlen, bevor die wöchentlichen Aufzeichnungen ergaben, dass sie sich als Zeichen klinischer Malignität in schnellem und progressivem Wachstum befanden. Klinisch maligne Geschwülste entstanden zwischen der 12. und der 36. Woche, und Mäuse mit bösartigen Tumoren verendeten zwischen dem 131. und dem 280. Tage nach Beginn des Versuches.

Unter 33 realen Versuchstieren bekamen 31 (94 %) eine Geschwulst. Von den 31 konstatierten Geschwülsten waren 26 Spindelzellensarkome, 2 polymorphzellige Sarkome (Rhabdomyosarkome?), 1 Plattenepithelzellenkarzinom, 1 Papillom, und 1 Spindelzellensarkom endlich war von einer Papillombildung in der darüberliegenden Haut begleitet.

Das makroskopische Aussehen der entwickelten Geschwülste zeigte keinen Unterschied gegenüber den Tumoren, die an anderer Stelle hervorgerufen wurden. Bei zwei Mäusen, die am 177. bzw. 184. Tage eingingen, hatte das

histologische Bild einen etwas anderen Charakter als das der früher als polymorphzellige Sarkome beschriebenen Tumoren (Tafel III, Fig. 6). In einer reichlicheren Grundsubstanz fand man Zellen, deren Aussehen und Grösse schwankten, und zwar von ganz kleinen Spindelzellen bis zu grossen, scharf abgegrenzten, länglichen oder spindelförmigen, bisweilen mehr polygonalen Zellen. Im Protoplasma konnte man ziemlich grosse, klare Vakuolen finden; in der Regel war es aber feinkörnig und sehr intensiv gefärbt, mit einer Struktur, die an unregelmässige Querstreifung denken liess. Diese war jedoch nirgends so ausgesprochen, dass man die Elemente mit Sicherheit als unreife Muskelzellen bezeichnen konnte. Möglicherweise muss man damit rechnen, dass das quergestreifte Aussehen durch degenerative Veränderungen im Protoplasma zustande gekommen ist. In der Regel enthielten die Zellen nur einen Kern. Es gab nur wenig Mitosen, und polynukleäre Riesenzellen fanden sich nur spärlich. Bei dieser und den übrigen Untersuchungen wurden während des Eindringens der Sarkome in die quergestreifte Muskulatur verschiedenartige Degenerationsformen in der Muskulatur angetroffen; die verfallenen Muskelzellen haben aber nicht dasselbe Aussehen gehabt wie die soeben beschriebenen Zellen. Bei den beiden eigentümlichen Geschwülsten kann die angegriffene Muskulatur ausserdem weitab von den merkwürdigen Zellen gelegen haben.

Wenn wir voraussetzen, dass es sich hierbei wirklich um Rhabdomyosarkome handelte, dann sind solche Geschwülste in dem vorliegenden Material nur selten entstanden. Die Versuchskriterien bei beiden Mäusen entsprechen praktisch den Mittelwerten, die für die anderen, sarkombehafteten Tiere des Versuches berechnet wurden. Deshalb kann man sich aber doch gut denken, dass sich

Spindelzellensarkome und Rhabdomyosarkome nach einer weit verschiedenen Latenzzeit entwickeln, und dass die beiden muskulären Geschwülste im Laufe von relativ kurzer Zeit entstanden sind. Könnten die Versuche so vorgenommen werden, dass sich keine Spindelzellensarkome bilden, so erhielte man möglicherweise eine grössere Ausbeute an Rhabdomyosarkomen.

Aus der Untersuchung lassen sich indessen keine anderen Schlüsse ziehen, als dass man vielleicht Rhabdomyosarkome hervorrufen kann, wenn das Methylcholanthren intramuskulär deponiert wird. Ist dies der Fall, so brauchen solche Geschwülste wahrscheinlich längere Zeit zu ihrer Entwicklung als die gewöhnlichen Spindelzellensarkome.

In dieser Untersuchungsreihe hat ein Spindelzellensarkom eine Metastase gebildet. Es handelte sich um eine Geschwulst, die sich gut 7 Wochen lang in klinisch malignem Wachstum befunden hatte. Die Metastase lag retroperitonäal an der Vorderseite der Aorta, und aus der mikroskopischen Untersuchung ergab sich, dass eine Lymphdrüse Sitz des Prozesses war.

Die Spindelzellensarkome bildeten nur selten Metastasen. Bei meinen Untersuchungen habe ich ausser diesem einen Fall nur noch den gefunden, der gelegentlich des vorigen Versuches, bei dem das Methylcholanthren in der Mamma-region angebracht war, besprochen wurde. Als BURROWS, HIEGER & KENAWAY (1932) zeigten, dass man durch subkutane Injektion von 1:2:5:6-Dibenzanthracenlösung Tumoren hervorrufen kann, wurden bei Ratten sogleich Metastasen beobachtet, nicht dagegen bei 31 geschwulstbehafteten Mäusen. Bei anderen Versuchen mit subkutaner Anbringung von krebserzeugenden Kohlenwasserstoffen wurden ebenfalls Metastasen bei Ratten gefunden (MAISIN &

COOLEN, 1934 u. a.), während man niemals mit Sicherheit solche Prozesse bei Mäusen angetroffen hat. DEELMAN (1922) hat bei einer Maus, deren Geschwulst durch Pin selung der Haut mit Teer hervorgerufen war, ein Spindel zellensarkom gesehen, das in der Lunge eine Metastase gebildet hatte.

Die Mittelwerte für das Erscheinen der Sarkome sind in Tabelle 4 angegeben. Die Werte sind hier durchgehend etwas höher als bei den subkutanen Versuchen (siehe Tabelle 2), ohne dass man jedoch diesem Unterschied eine wirkliche Bedeutung beimessen dürfte.

Tabelle 4.

Untersuchung, bei der das Methylcholanthren intramuskulär deponiert wurde.

Mittlere Zeit in Wochen vom Beginn des Versuchs bis	
zum Erscheinen der Tumoren	—
zur klinischen Malignität	21,9 (29)
zu haselnussgrossen Geschwülsten	24,2 (29)
zum Tode der sarkombehafteten Maus	27,4 (29)

Bei dieser Untersuchung konnten keine Geschwülste abseits der Einspritzungsstelle nachgewiesen werden. Mit den Geschwülsten zweier moribunder Mäuse wurden Homotransplantationen vorgenommen. Ein Spindelzellensarkom liess sich ohne Schwierigkeiten übertragen. Ferner wurden von einem polymorphzelligen Sarkom (Rhabdomyosarkom?) Transplantationen vorgenommen. Leider entstand in allen Fällen ein Abszess an der Impfstelle. Dies darf jedoch nicht dahin ausgelegt werden, dass die infizierte Geschwulst nicht myogenen Ursprungs gewesen sei, da

andere infizierte Sarkome niemals das gleiche morphologische Aussehen gehabt haben.

5) Versuch, durch intraperitonäale Deponierung von Methylcholanthren Tumoren hervorzurufen.

Alle Versuchsmäuse, denen intraperitonäal 10 mg mit Glycerin angefeuchtetes Methylcholanthren deponiert wurde, bekamen zwischen der 6. und der 12. Woche nach Beginn des Versuches ein aufgetriebenes Abdomen. Bei der Palpation hatte man den Eindruck, dass sich im Peritoneum Flüssigkeit angesammelt hatte. Diese Annahme wurde durch die Sektion der Tiere, die zufällig in diesem Abschnitt der Untersuchungsperiode eingingen, verifiziert. Im Peritoneum fand man eine gelbliche oder, wenn eine Blutung stattgefunden hatte, mehr rötliche Flüssigkeit, die gelbe, grösstenteils von Resten des Methylcholanthrens herführende Flocken und Brocken enthielt. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Ascitesflüssigkeit wurden nur einzelne, mehr oder weniger degenerierte Leukozyten und abgestossene Zellen aus der Peritonäalhöhle gefunden. In jenen Fällen, in denen eine Blutung stattgefunden hatte, wurde das Bild von den zelligen Elementen des Blutes beherrscht.

Die Flüssigkeitsansammlung war nach einer durchschnittlichen Zeit von 7 bis 8 Wochen zu fühlen und, wenn sie ein paar Monate bestanden hatte, konnte eine Resorption erfolgen, weshalb das Symptom bei den Mäusen, die am Schlusse des Versuches sezirt wurden, unkonstant war, ob die Tiere nun tumorbehaftet waren oder nicht. Dies steht nicht direkt im Gegensatz zu NAKAHARAS & FUJIWARAS (1937 b) Beobachtungen, die immer von Ascites berichten; man muss hierbei berücksichtigen, dass diese Forscher einmal wöchentlich während des ganzen Versuches eine Lösung

des cancrogenen Kohlenwasserstoffs injiziert haben. Meine Untersuchungen zeigen also, dass die Ascites, der nach einer einmaligen intraperitonäalen Zufuhr von kristallinischem Methylcholanthren entsteht, wieder verschwinden kann. Wo dies der Fall ist, wurden auch keine sichtbaren Reste des Kohlenwasserstoffs gefunden.

Bei dieser und den folgenden Untersuchungen, bei welchen die Geschwülste in inneren Organen hervorgerufen wurden, konnte man an lebendigen Tieren nur eine unsichere Beurteilung der Tumoren vornehmen, weshalb man praktisch auf Beobachtungen an toten Mäusen angewiesen war. Reelle Versuchstiere wurden daher die erste geschwulst-behaftete Maus, die sezirt wurde, sowie alle Versuchsmäuse, die zu diesem Zeitpunkt noch am Leben waren.

Geschwülste im Abdomen wurden zuerst bei einem Tier gefunden, das am 93. Untersuchungstage einging, und zuletzt bei der letzten Versuchsmaus, die zusammen mit den Kontrolltieren am 280. Tage getötet wurde.

Die Untersuchungen umfassten 24 reelle Versuchstiere, von denen 19 (79 %) Geschwülste bekommen haben. Bei diesen 19 Mäusen wurden im ganzen 32 Geschwülste gefunden, und von diesen waren 7 in der vorderen Bauchwand lokalisiert, 7 im kleinen Becken, 5 im Diaphragma, 6 waren mit dem Ventrikel unlöslich verbunden, 4 mit den Dünndärmen oder deren Gekröse, und 3 endlich lagen an den Nieren.

Bei intraperitonäaler Zufuhr des cancrogenen Kohlenwasserstoffs ist zu bedenken, dass der Stoff hier auf einer sehr grossen Oberfläche seine Wirkung entfaltet. Die multiplen Tumoren können daher sehr wohl als primäre Bildungen nach einer direkten Einwirkung des Methylcholanthrens entstehen. Diese Erklärung ist sicher die wahr-

scheinlichste, da nur selten nachgewiesen wurde, dass Spindelzellensarkome Metastasen bilden können. Bei den Versuchen, bei denen der Stoff in der Mamma oder in der Oberschenkelmuskulatur deponiert wurde, haben die hervorgerufenen Geschwülste meist in die Peritonäalhöhle hineingeragt, so dass also die Möglichkeit einer intraperitonäalen Ausbreitung bestand. Trotzdem wurde bei diesen Versuchen nur eine Metastase gefunden, die möglicherweise auf diese Art entstanden ist. Man darf daher davon absehen, dass einzelne Geschwülste hier Metastasen sein könnten, und kann damit rechnen, dass sie primär durch eine direkte Einwirkung des Methylcholanthrens entstanden sind.

Bei der mikroskopischen Untersuchung haben die Geschwülste sich alle als Spindelzellensarkome von demselben Aussehen, wie früher beschrieben, erwiesen; Tumoren, die man als Endotheliome bezeichnen könnte, wurden nicht gefunden. Die Geschwülste wuchsen invasiv in die angrenzende Muskulatur und das Fettgewebe hinein sowie in Organe wie Leber, Milz, Nieren und Pankreas. Bei Hohlorganen wie dem Ventrikel und dem Darm können die Tumoren die Muscularis mucosa durchbrechen; ich habe aber kein infiltratives Wachstum in der Schleimhaut gefunden.

NAKAHARA & FUJIWARA (1937 a) haben bei einer Untersuchung mit 3:4-Benzpyren in einem Falle Metastasen in der Lunge gesehen. Bei ihren Versuchen mit Methylcholanthren (1937 b) wurden solche sekundären Tumoren ebensowenig angetroffen wie bei meinem eigenen Versuch.

Sämtliche geschwulstbehafteten Tiere verendeten durchschnittlich 25,8 Wochen nach Beginn des Versuches.

FIESER (1938) hat aus Nakaharas und Fujiwaras Ver-

such berechnet, dass die Erzeugung intraperitonäaler Geschwülste mit 3:4-Benzpyren 1,2 und mit Methylcholanthren 1,1 mal so lange dauert wie die Erzeugung subkutaner Tumoren. Die mittlere Induktionszeit für subkutane Geschwülste mit Methylcholanthren wurde nach sämtlichen veröffentlichten und einigen unveröffentlichten Versuchen berechnet. Das Material besteht dann aus 185 Mäusen, die unter nicht allzusehr voneinander abweichenden Versuchsbedingungen ziemlich gleichartig reagiert haben. Der unbedeutende Zahlenunterschied hat jedoch kaum reelle Bedeutung. Etwas anderes ist es, dass man meiner Ansicht nach die beiden Versuchsserien nicht vergleichen kann. Die mittlere Induktionszeit wurde für die subkutanen Geschwülste nach dem Zeitpunkt berechnet, zu dem man die Tumoren zum erstenmal fühlte. Die mittlere Induktionszeit für die Peritonäalgeschwülste entspricht in Fiesers Berechnung dem mittleren Todestage. Ein Vergleich mit der mittleren Induktionszeit für das Erscheinen der subkutanen Geschwülste ist daher irreführend.

Mäuse mit intraperitonäalen Geschwülsten gehen in der Regel zu einem Zeitpunkt ein, da die Tumoren im Abdomen eine Gesamtgrösse haben, die dem Rauminhalt einer Haselnuss entspricht. Bei subkutaner Deponierung von Methylcholanthren braucht man 21,9 Wochen, um haselnussgrosse Geschwülste hervorzurufen (siehe Tabelle 2), während die entsprechende Zahl bei diesem Versuch 25,8 Wochen ist. Nach bestem Ermessen muss man daher vermuten, dass kein wirklicher Unterschied in der Geschwindigkeit besteht, mit der die Sarkome sich in den beiden Regionen entwickeln. Man muss jedoch vorsichtig sein und darf nicht zu weitgehende Schlüsse ziehen, weil das Methylcholanthren bei dem einen Versuch als ein zusammen-

hängendes Depot im Gewebe liegt, während der Stoff bei dem anderen Versuch über die ganze Peritonäalhöhle verteilt ist. Im Hinblick auf Fiesers Berechnung muss bemerkt werden, dass subkutane Geschwülste im günstigsten Falle nach einer mittleren Zeit von 12,2 Wochen zu fühlen sind, wodurch ein entsprechender Vergleich zu einem ganz anderen Ergebnis führen würde.

An 4 Mäusen, 2 Männchen und 2 Weibchen, wurden bei Sektionen zwischen dem 132. und dem 280. Versuchstage Adenome in den Lungen konstatiert. Das eine dieser Tiere hatte sonst keine Geschwulst.

Von 2 moribunden Mäusen habe ich Ascitesflüssigkeit subkutan auf Tiere gleichen Stammes und Geschlechts übertragen, ohne dass nach einer Beobachtungszeit von 3 Monaten an der Injektionsstelle Tumoren entstanden wären. Die eine Maus hatte in der Bauchhöhle Geschwülste, die andere keine. Mengen von 6,4, bzw. 7,6 ccm wurden auf 20, bzw. 15 Mäuse verteilt. Die experimentelle Untersuchung deutet also nicht darauf hin, dass in der Ascitesflüssigkeit lebensfähige Tumorzellen vorhanden sind, was auch durch mikroskopische Untersuchungen nicht zu entdecken war. Dies muss die Vermutung stützen, dass die multiplen Abdominalgeschwülste als primäre Bildungen entstehen.

Voll entwickelte Spindelzellensarkome konnten ohne Schwierigkeit auf Mäuse gleichen Stammes übertragen werden. Die Transplantationsgeschwülste hatten dasselbe histologische Aussehen wie die primären Tumoren. Die Transplantationsverhältnisse bei Sarkomen, die durch intraperitonäale Zufuhr von Methylcholanthren hervorgerufen wurden, wichen also nicht von den übrigen Erfahrungen ab.

6) Versuche, Tumoren hervorzurufen, wenn das Methylcholanthren in der Niere deponiert wird.

Die Untersuchung umfasst zwei Versuchsserien, bei denen die Operationen auf verschiedene Weisen ausgeführt wurden. Es besteht kein Grund, die beiden Versuchsserien jede für sich zu behandeln, und im ganzen ist also 100 Mäusen Methylcholanthren in der einen Niere deponiert worden.

Infolge grosser Sterblichkeit umfasst die Untersuchung nur 13 reelle Versuchstiere. Die erste Geschwulst wurde durch eine Sektion am 105. Tage konstatiert, zu welchem Zeitpunkt 12 Tiere am Leben waren. Die letzte geschwulst-behaftete Maus verendete am 173. Tage nach Beginn des Versuches. An lebenden Tieren haben die Geschwülste nicht sicher palpiert werden können, bevor sie grössere Dimensionen erreichten. Wie beim vorigen Versuch war man daher im wesentlichen auf Sektionsbefunde angewiesen.

Von 13 realen Versuchstieren bekamen 12 an der Einspritzungsstelle maligne Geschwülste. Von den konstatierten Geschwülsten wurden 11 als Spindelzellensarkome und 1 als polymorphzelliges Sarkom aufgefasst. Die Sarkome wichen nicht von den Typen ab, die nach subkutaner Deponierung des Stoffes beschrieben wurden. Sie wuchsen invasiv und infiltrativ in die Umgebung und ins Nierenparenchym hinein, und es wurde auch beobachtet, dass eine Geschwulst in die Milz eingedrungen ist, vermutlich durch das Ligamentum phrenicolienale. Obwohl die Tumoren dicht an der Bauchhöhle lagen, wurden bei keinem Tiere an anderen Stellen der Bauchhöhle Geschwülste angetroffen. Dies zeigt wieder, dass man nur in seltenen Fällen mit einer intraperitonäalen Ausbreitung

rechnen kann, und es hat überhaupt keine der Geschwülste Metastasen gebildet.

In einem einzelnen Falle hat ein Sarkom Wallnussgrösse erreicht; sonst haben aber bereits haselnussgrosse Geschwülste den Tod der Tiere herbeigeführt. Die geschwulstbehafteten Tiere sind durchschnittlich nach 20,2 Wochen eingegangen. Bei subkutaner Deponierung des Methylcholanthrens entstanden haselnussgrosse Geschwülste nach einer mittleren Zeit von 21,9 Wochen (Tabelle 2). Da diese beiden Zahlen nicht wesentlich voneinander abweichen, darf man wohl damit rechnen, dass sich die Sarkome gleich schnell entwickeln, ob nun die Verbindung subkutan oder in einem stark vaskularisierten Organ wie der Niere deponiert wird.

In keinem Falle wurden Tumoren einer morphologischen Struktur gefunden, die darauf hindeuten könnte, dass sie aus Zellen des Nierenbeckens oder der Niere entstanden sind. Das Ergebnis der Untersuchung stimmt also nicht mit den Beobachtungen ILFELDS (1936) überein, wo ausschliesslich Epidermoidkarzinome entstanden waren. Bei seinen Untersuchungen wurden an Mäusen der Stämme A und C₃H Tumoren hervorgerufen, während 7 Mäuse des Stammes M nicht mit Geschwulstbildung reagiert haben. Möglicherweise lässt sich die mangelnde Uebereinstimmung durch eine bei diesen Mäuserassen und bei den Baggmäusen verschiedene Reaktion erklären.

Bei einem Mäuseweibchen, das am 137. Versuchstage ohne Geschwulst an der Einspritzungsstelle einging, wurde ein Lymphoblastom gefunden, das vermutlich vom Thymus ausgegangen ist. Mikroskopisch hatte es das gleiche Aussehen und die gleiche Lage wie das Lymphoblastom, das beim Pinselungsversuch entstanden war. Bei der mikro-

skopischen Untersuchung erwies sich der Tumor als etwas nekrotisch. Er war auffallend reich an Zellen, die als grosse Lymphozyten aufgefasst werden mussten, und auch Mitosen waren häufig zu sehen; im übrigen hatte er den gleichen Charakter wie die früher beschriebene Geschwulst.

2 Spindelzellensarkome, die transplantiert wurden, wuchsen wie gewöhnlich weiter als reine Spindelzellengeschwülste, während das polymorphzellige Sarkom bei 3 positiven Impfungen mit reinen Spindelzellen und bei 2 positiven Impfungen mit unveränderter histologischer Struktur weiterwuchs.

7) Versuch, Tumoren hervorzurufen, wenn das Methylcholanthren in der Leber deponiert wird.

Diese Untersuchung umfasst die üblichen 50 Versuchstiere. Der operative Eingriff verursachte eine ziemlich grosse Sterblichkeit. So waren 3 Wochen nach Vornahme der Operation nur noch 12 Versuchsmäuse am Leben, und die Untersuchung umfasst 7 reelle Versuchstiere. Von diesen bekamen 6 in unmittelbarer Nähe der Operationsstelle Geschwülste. Tiere mit Tumoren an der Injektionsstelle verendeten zwischen dem 105. und dem 189. Tage nach Beginn des Versuches. Geschwulstbehaftete Tiere gingen durchschnittlich im Laufe von 20,0 Wochen ein, was den Angaben bei den beiden vorigen Versuchen entspricht. Aus dieser Untersuchung darf man jedoch keine zu weitgehenden Schlüsse ziehen, weil die Geschwülste bei den Sektionen von weit verschiedener Grösse waren. Bei der mikroskopischen Untersuchung erwiesen sich die Tumoren als Spindelzellensarkome des gewöhnlichen Typus.

Beim Einstich mit der groben Lumbalkanüle in das

Lebergewebe wird hin und wieder eine sehr kräftige Blutung verursacht, die zur Folge haben kann, dass Methylcholanthrenkristalle frei in die Bauchhöhle hineingeraten. Bei den reellen Versuchstieren ist es kaum zu einer Verbreitung des krebserzeugenden Kohlenwasserstoffs gekommen; ich habe den Eindruck, dass Mäuse mit Blutungen kurz nach der Operation verenden. Wenn grössere Mengen Methylcholanthrens ins Peritoneum gelangt sind, so hätte man im Laufe von etwa zwei Monaten Zeichen eines Ascites erwarten sollen; etwas derartiges hat sich aber bei keinem Versuchstiere ergeben, weder bei der Palpation noch bei der Sektion. Ferner wurden nur bei einer Versuchsmaus Tumoren in der Bauchhöhle, abseits der Einspritzungsstelle, gefunden. Es handelt sich um eine Maus, die ausser dem Sarkom an der Deponierungsstelle noch ein Spindelzellensarkom in der einen Nierenregion hatte. Es lässt sich darüber streiten, ob diese Geschwulst als ein primärer Tumor oder als eine Metastase aufzufassen ist. Im grossen und ganzen deuten die Beobachtungen nicht darauf hin, dass bei den reellen Versuchstieren grössere Mengen Methylcholanthrens frei im Peritoneum vorgekommen sind. Bei der Sektion von Tieren, die frühzeitig während des Versuches eingingen, wurde das gelbe Kristalldepot daher auch in der Leber wiedergefunden, und nur wo gleichzeitig Spuren einer Blutung vorhanden waren, sah man den Stoff frei in der Bauchhöhle.

Nach der Operation adhäriert die Leber der vorderen Bauchwand, die auf diese Weise unmittelbar an den krebserzeugenden Kohlenwasserstoff angrenzen kann. Dies hindert die Untersuchung insoweit nicht, als das Lebergewebe für die Einwirkung des Methylcholanthrens immer leichter zugänglich ist als die Bauchwand.

Die voll entwickelten Spindelzellensarkome, die an der Einspritzungsstelle entstanden, sind in jedem Falle sowohl in die Leber wie in die Bauchwand eingedrungen. 4 dieser Geschwülste waren gut haselnussgross und sind in unmittelbarer Nähe des Methylcholanthrens entstanden. Diese Tumoren haben im wesentlichen in der Leber gelegen, wenn sie auch auf die vordere Bauchwand übergreifen haben. Die grösseren Geschwülste, die bei dieser Untersuchung ungefähr die Grösse einer Pflaume erreichen konnten, haben im wesentlichen in der Bauchwand gelegen, wenn auch die Leber in allen Fällen einer bedeutenderen Zerstörung durch die Tumoren ausgesetzt war. Möglicherweise ist dies ein Ausdruck dafür, dass sie in dem Teil der Bauchwand entstanden sind, der an das Methylcholanthren angrenzt hat, möglicherweise ein Ausdruck dafür, dass die Tumoren im Lebergewebe keine so guten Wachstumsbedingungen wie in der Bauchwand finden.

Der Versuch zeigt also, dass die Geschwülste am Kohlenwasserstoffdepot entstehen. Wenn der Stoff so eingeführt wird, dass das Lebergewebe der Einwirkung am meisten ausgesetzt ist, werden ausschliesslich Spindelzellensarkome hervorgerufen.

Bei der Invasion der Spindelzellensarkome in die Leber können während der Destruktion eigenartige Zellen und Zellkomplexe entstehen; es wurden aber niemals Zeichen von primären Leberzellenkarzinomen gefunden.

Die Untersuchung stimmt also auch hierin nicht mit ILFELDS Beobachtungen (1936) mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen überein, und die Abweichungen lassen sich nur aufgrund ähnlicher Ueberlegungen erklären wie bei den Nierenversuchen. An Bagg-Mäusen werden jedenfalls die Spindelzellensarkome mit Methylcholanthren so schnell

hervorgerufen, dass nicht zu entscheiden ist, ob sich primäre Leberzellenkarzinome bilden können.

Bei einem Mäuseweibchen, das am 121. Tage nach Beginn des Versuches verendete, fand sich ausser der Geschwulst an der Einspritzungsstelle ein Lymphoblastom mit gleicher Lage, gleichem Aussehen und Charakter wie das beim Pinselungsversuch beschriebene, während Lungenadenome bei keinem Tiere gefunden wurden.

Es wurde keine Versuchsaus in moribundem Zustand angetroffen, und mit Rücksicht auf die Versuchsanordnung wurden daher keine Transplantationsversuche vorgenommen.

8) Versuch, Tumoren hervorzurufen, wenn das Methylcholanthren in der Lunge deponiert wird.

Die folgende Untersuchung wurde an einem Tiermaterial der üblichen Grösse vorgenommen, und der Versuch wurde im Laufe von 259 Tagen abgeschlossen.

Es muss zunächst bemerkt werden, dass die Anbringungsweise des krebserzeugenden Stoffes sich bei dieser Untersuchung nicht als zweckmässig erwiesen hat. In den früheren Versuchen hat man das Depot der Methylcholanthrenkristalle bei Tieren, die ohne Geschwulst im Laufe der ersten 2—3 Versuchsmonate eingingen, immer wiederfinden können, und oft waren Reste des Stoffes in den hervorgerufenen Tumoren zu sehen. Dies war nicht der Fall, wenn das Methylcholanthren in entsprechender Weise in der Lunge deponiert wurde. Bei Mäusen, die nach dem 6. Versuchstage zur Sektion gelangten, wurden überhaupt keine sichtbaren Reste der gelben Verbindung in den Lungen gefunden, und auch die mikroskopische Untersuchung hat keine Spur der Kristalle zutage bringen können. Der

Stoff muss daher von der Einspritzungsstelle entfernt worden sein. Man wird kaum annehmen können, dass dieser Transport ausschliesslich auf dem Blut- oder Lymphwege vor sich gegangen ist, weil dann bei den früheren Untersuchungen etwas Aehnliches hätte stattfinden müssen. Man muss daher annehmen, dass die feinen Kristalle hauptsächlich durch die Alveolen entfernt worden sind, von wo sie durch die Bronchien aus dem Organismus ausgeschieden werden können. Wenn die Lumbalkanüle durch die Interkostalmuskulatur geführt wird, kann von der schräggeschliffenen Spitze der Kanüle etwas Methylcholanthren abgewischt werden. Diese sichtbaren Kristallteilchen lassen sich selten vollständig entfernen, da die Einstichstelle in der Thoraxwand selbst eine sehr unebene und ausgefranzte Oberfläche hat und weil man auch Muskeln durchschneiden musste, um die Brustwand selbst freizulegen. Diese Fehlerquelle gab dem Versuch ganz unerwartet sein Gepräge: verschiedene Geschwülste entstanden im Gewebe ausserhalb der Brustwand um die Stelle selbst herum, wo der Einstich vorgenommen worden war.

Frühere Untersuchungen haben diesen Mangel der Technik nicht merkbar werden lassen. Wurde die Verbindung subkutan oder in der Mammaregion angebracht, dann entstanden die Tumoren dicht am Depot, während man längs des ca. 2 cm langen Stichkanals keine Geschwülste hat sehen können. Wenn der Stoff in die Oberschenkelmuskulatur eingeführt wurde, konnte man leicht während der kleinen Operation überflüssige Kristalle von der glatten Faszie entfernen, und es hat niemals die geringste Vermutung bestanden, dass die malignen Geschwülste über der Faszie entstehen. Wurde das Methylcholanthren intraperitonäal angebracht, so hat ebenfalls kein Verdacht

bestanden, dass die in der vorderen Bauchwand entstandenen Geschwülste von der Subcutis ausgegangen sein sollten. Bei den Untersuchungen an Niere und Leber haben die Versuche gleichfalls gezeigt, dass die Tumoren in unmittelbarem Anschluss an das Depot entstehen. Man kann sich daher kaum denken, dass meine früheren Untersuchungen von dieser Fehlerquelle beeinflusst sein sollten.

Wenn sich bei den Tieren, die zu Beginn des Versuches zur Sektion gelangen, kein zusammenhängendes Depot von Methylcholanthrenkristallen nachweisen lässt, so muss die Annahme erlaubt sein, dass der Stoff in die Lunge selbst eingeführt worden ist. Man kann ferner sicher sein, dass die an der Einstichstelle entstehenden Tumoren durch ganz minimale Mengen Methylcholanthrens hervorgerufen wurden, weil weitaus der grösste Teil der 10 mg erst aus der Kanüle ausgestossen wird, wenn die Spitze im Lungengewebe liegt. Bei einzelnen Mäusen lag der Stoff bei der Sektion in der Pleura, wo er eine Flüssigkeitsansammlung von gleichem Charakter hervorrufen kann, wie wir sie von jenem Versuch her kennen, bei dem der Kohlenwasserstoff ins Peritonaeum eingeführt wurde. Aufgrund solcher Befunde und der Lokalisation der entstandenen Geschwülste lässt sich vermuten, dass der grösste Teil des Methylcholanthrens bei 39 Mäusen in die Lunge und bei 3 Tieren in die Pleura eingeführt worden ist. Bei 8 Mäusen wurde die Kanüle zu tief eingeführt, sodass sie durch die *Apertura thoracis superior* ging, wodurch das Kristalld Depot in der *Regio supraclavicularis* zu liegen kam.

Dieser Versuch kann daher nur spärliche Aufschlüsse über das Auftreten von Tumoren in der Lunge geben, wenn das Gewebe einer direkten Einwirkung des Stoffes ausgesetzt wird. Der Versuch umfasst 29 reelle Versuchstiere. Bei 3 entstand ein Spindelzellensarkom in der behandelten

Lunge. Diese Geschwülste wurden bei den Sektionen der Tiere am 103., 105. und 128. Tage nach Beginn des Versuches gefunden. Ferner wurde am 155. bzw. 225. Tage bei 2 anderen Tieren ein Spindelzellensarkom in der Pleura parietalis gefunden. Diese Geschwülste in Lunge und Pleura waren nicht von einer Flüssigkeitsansammlung in der Lungenhöhle begleitet. Es lässt sich nicht feststellen, ob die Tumoren in der Lunge nach einer intrapulmonalen Anbringung von Methylcholanthren entstanden sind. Soweit man sich ein Urteil darüber erlauben kann, ist der Stoff nur selten in der Pleura angebracht worden; die Möglichkeit lässt sich aber nicht abweisen, dass die Lungengeschwülste in ähnlicher Weise wie die Spindelzellensarkome in der Pleura entstanden sein könnten. Diese entstehen sicher auf ähnliche Weise wie die Sarkome im Abdomen, wo die Injektion auch in eine serosabekleidete Leibeshöhle erfolgt. Ebensowenig wie bei meiner früheren Untersuchung (1940 a) ist es hier gelungen, mit Methylcholanthren in der Lunge Karzinome hervorzurufen. Die 4 Lungensarkome, die ich im ganzen hervorgerufen habe, stehen im Widerspruch zu ANDERVONTS Versuch (1937), bei dem 2 Adenokarzinome und 5 Plattenepithelzellenkarzinome hervorgerufen wurden. Andererseits sind alle diese Geschwülste wohl kaum reine Karzinome gewesen, da eine der Geschwülste nach einer Transplantation durch 4 Generationen als reines Sarkom gewachsen ist.

Bei 2 Tieren, einem Männchen und einem Weibchen, wurden in den behandelten Lungen multiple Adenome gefunden. Die Geschwülste wurden am 122. bzw. 176. Versuchstage konstatiert, viel früher als bei den Kontrolltieren.

Das frühzeitige Auftreten von Lungenadenomen muss von einer Wirkung des Methylcholanthrens herrühren.

ANDERVONT (1937) hat nicht angegeben, dass die adenomatösen Bildungen um den imprägnierten Seidenfaden herum entstanden sind, und bei meinem früheren Versuch entstanden multiple Adenome in der behandelten Lunge. Die multiplen Lungenadenome dieser Untersuchung sind vielleicht ganz zufällig auch in der Lunge, die Gegenstand der Behandlung gewesen ist, entstanden. Keine der Beobachtungen lässt darauf schliessen, dass eine mehr begrenzte Reizung des Lungengewebes mit einem krebserzeugenden Kohlenwasserstoff das Auftreten adenomatöser Bildungen begünstigt. Der Mechanismus ihres frühzeitigen Erscheinens kann daher ebensogut auf Verhältnissen beruhen, die in einer späteren Untersuchung näher besprochen werden sollen.

Bei einem der reellen Versuchsmäuseweibchen, das am 110. Versuchstage einging, wurde in der obersten Mediastinalregion ein Lymphoblastom desselben Typus gefunden wie jenes, das wir anlässlich des Versuches beschrieben haben, bei dem die Rückenhaut mit in Benzol aufgelöstem Methylcholanthren gepinselt wurde. Ein weiterer, ähnlicher Fall wurde bei einem Mäuseweibchen angetroffen, das schon am 56. Tage eingegangen ist. Unserer Definition gemäss wurde das Tier bei dieser Untersuchung nicht als reelles Versuchstier betrachtet. Bei sämtlichen Versuchen hat man frühestens von der 7. Woche an eine Geschwulst am Methylcholanthrendepot selbst fühlen können. Bereits jetzt konnte man annehmen, dass die Lymphoblastome durch eine Wirkung des Methylcholanthrens entstehen, und es wirkt daher überraschend, dass sie nach einer so kurzen Versuchsperiode auftreten können. Lage und makroskopisches Aussehen weichen nicht von den früher beschriebenen ab. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden

keine anderen Eigenarten entdeckt, als dass es aus grossen und insbesondere kleinen Lymphozyten bestand, während die früher beschriebenen Lymphoblastome hauptsächlich aus grossen Lymphozyten bestanden haben.

Man kann kaum annehmen, dass diese merkwürdigen Bildungen um ein Kristalldotter herum entstanden sind. Bei Einführung des Methylcholanthrens ist die Kanüle nicht so gerichtet gewesen, dass der obere Teil des Mediastinums hätte getroffen werden können. Sektionen dieser Tiere haben auch keine Befunde ergeben, die darauf hindeuten, dass der Stoff hier oder in der Pleura gelagert gewesen sei. Man muss diese Lymphoblastome daher als Geschwülste betrachten, die, ähnlich wie bei den früher beschriebenen Fällen, abseits der Injektionsstelle selbst entstanden sind.

D. Diskussion der Versuche, bei denen Methylcholanthren an Mäusen in direkten Kontakt mit verschiedenem Gewebe oder verschiedenen Organen gebracht wurde.

In Versuchen, bei denen man auf eine möglichst gleichartige Weise an Mäusen des Bagg'schen Albinostammes Methylcholanthren in direkten Kontakt mit verschiedenem Gewebe oder verschiedenen Organen brachte, wurden maligne Geschwülste hervorgerufen, die sich ausschliesslich als Plattenepithelzellenkarzinome oder Sarkome des Spindelzellentypus erwiesen. Die Untersuchungen haben sich über Haut, subkutanes Gewebe, quergestreifte Muskulatur und Organe wie Niere, Leber und Peritoneum erstreckt. Es gelang nicht, maligne Geschwülste anderer Art hervorzurufen. Aehnliche Versuche mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen an anderen Mäusestämmen eröffnen jedoch

die Möglichkeit, dass die Stoffe für das Auftreten anderer Geschwulstformen von Bedeutung sein könnten, wenn Niere, Leber oder Lunge als Versuchsobjekte benutzt werden. Dies lässt sich damit erklären, dass die verschiedenen Gewebe und Organe bei verschiedenen Mäuserassen nicht dieselbe relative Empfindlichkeit gegen Reizung mit krebserzeugenden Kohlenwasserstoffen haben. Diese Vermutung wird durch den Versuch von BRANCH (1936) gestützt, durch den nachgewiesen wird, dass sich subkutane Tumoren mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen gleich leicht bei zwei in Inzucht gehaltenen Mäusestämmen hervorrufen lassen, die nicht die gleiche Empfindlichkeit zeigen, wenn Lösungen des Stoffes auf die Haut gepinselt werden. Die Versuche wurden meist mit anderen krebserzeugenden Kohlenwasserstoffen als Methylcholanthren vorgenommen. Es besteht daher auch die Möglichkeit, dass die abweichenden Ergebnisse darauf zurückzuführen sind, dass verschiedene carcinogene chemische Verbindungen Geschwülste an verschiedenem Gewebe nach verschiedener Zeit hervorrufen.

In der Literatur wurden einzelne Versuche beschrieben, krebserzeugende Stoffe mit anderen Geweben und Organen in Kontakt zu bringen. Es hat sicher an technischen Schwierigkeiten gelegen, dass die Untersuchungen nur wenige positive Resultate ergeben haben.

DOBROVOLSKAĪA-ZAVADSKAĪA & SIMSILEVICH (1935) haben an 21 Mäusen zweier verschiedener in Inzucht gehaltener Stämme in den Genitalorganen keine Tumoren hervorrufen können. Den Tieren wurde jeden 3. bis 4. Tag eine 0,1 %ige Lösung von 1:2:5:6-Dibenzanthracen zugeführt. Mit Hilfe einer ähnlichen Technik gelang es, bei 1 von 4 Mäusen eines anderen Stammes mit Teer ein Myxosarkom in der Vagina hervorzurufen.

Bei ILFELDS Untersuchungen (1936) wurden an Mäusen in Inzucht gehaltener und gemischter Stämme in verschiedenen Organen »cholesterol pellets« mit krebserzeugenden Kohlenwasserstoffen operativ angebracht. Es ist nicht gelungen, mit 1:2:5:6-Dibenzanthracen Tumoren hervorzurufen, weder an 50 Mäusen in der Milz, noch an 21 Mäusen in den Testes, noch an 2 Mäusen im Gehirn. Die Beobachtungszeit war 8 bis 11 Monate. Bei einer Maus, der Methylcholanthren in die Milz eingeführt wurde, entstand im Laufe von $4\frac{1}{2}$ Monaten ein Fibrosarkom, das mit der Milz eng verbunden war und in den Pankreas eindrang. Von 21 Mäusen, denen 1:2:5:6-Dibenzanthracen in dem einen Uterushorn deponiert worden war, wurde bei einer Maus im Laufe von 9 Monaten ein Epidermoidkarzinom konstatiert.

BARNES & FURTH (1937) und FURTH & FURTH (1938) haben unter 95 Mäusen, denen 0,05 ccm einer 4 %igen Lösung von 3:4-Benzpyren in Fett injiziert worden war, 2 Sarkome in der Milz beschrieben. Bei 9 % der Tiere sind ausserdem leukämieähnliche Zustände aufgetreten.

Bei Injektion von 1 mg in Oel gelösten Methylcholanthrens in die Testes von Mäusen haben NICOD & REGAMEY (1938) bei 1 von 30 behandelten Tieren an der Injektionsstelle ein Sarkom entstehen sehen. Die Geschwulst wurde 116 Tage nach Beginn des Versuches konstatiert. ESMARCH (1940 a) hat im Laufe von 22 Wochen bei 1 von 5 Baggmäusen, denen mit einer geringen Fettmenge 8 mg Methylcholanthren in die Testes injiziert worden war, einen Tumor in der Testes gefunden. Das Tier verendete am 219. Versuchstage mit Metastasen, und die Geschwulst erwies sich als ein transplantierbares, verhorntes Plattenepithelzellenkarzinom.

Bei einer Untersuchung, die 81 Mäuse umfasste, denen

1:2:5:6-Dibenzanthracen ins Gehirn injiziert worden war, hat PEARS (1939) keine Geschwulstbildung in diesem Organ hervorrufen können. Von 20 C₃H-Mäusen haben SELIGMAN & SHEAR (1939) nach intrazerebraler Deponierung von Methylcholanthren bei 11 Tieren Gliome hervorgerufen. Bei 2 entstanden Fibrosarkome, die vermutlich von der Dura ausgegangen sind. Die Tumoren entstanden 8—17 Monate nach Beginn der Untersuchung.

Bei Injektion von 3:4-Benzpyren in die Parotis von 55 Mäusen haben BENECHÉ & SCHRÖDER (1939) 3 Spindelzellensarkome und 1 Plattenepithelzellenkarzinom konstatiert.

Durch Anbringung von Cholesterolstäbchen mit 10%igem 3:4-Benzpyren im Knochenmark von 12 Mäusen ist es BRUNSCHWIG und BISSEL (1938) gelungen, bei einer Maus in der Tibia ein Osteosarkom hervorzurufen. Die Geschwulst wurde nach einer Versuchszeit von 8½ Monaten konstatiert.

Bei meinen Untersuchungen traten abseits der Einspritzungsstelle bei auffallend jungen Tieren Lungenadenome auf, und bei 1% der 500 Versuchstiere wurden Lymphoblastome konstatiert, die vermutlich auf eine Wirkung des Methylcholanthrens zurückzuführen sind. Um den Beweis zu erbringen, dass diese letzte Geschwulstform durch eine Wirkung des Stoffes entsteht, sollen besondere Versuche vorgenommen werden, und es wird deshalb am zweckmässigsten sein, diese Tumoren im Zusammenhang mit den neuen Untersuchungen zu besprechen.

Zusammenfassung.

Unter möglichst gleichartigen Versuchsbedingungen wurde Methylcholanthren bei Mäusen in direkten Kontakt mit verschiedenem Gewebe und verschiedenen Organen ge-

bracht. Zu diesem Zwecke wurden insgesamt 500 Versuchs- und 500 Kontrollmäuse des Bagg'schen Albinstammes verwendet. Es wurden 10 Versuche vorgenommen, die sich in die folgenden 8 Gruppen einteilen lassen, bei denen bei 197 Tieren an der Applikationsstelle maligne Geschwülste hervorgerufen wurden:

1) Durch Pinselung der Rückenhaut mit in Benzol gelöstem Methylcholanthren wurden 29 Plattenepithelzellenkarzinome und 2 Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome hervorgerufen.

2) Durch subkutane Deponierung des Stoffes, in einigen Fällen unter der Rückenhaut in anderen in der linken Flanke, wurden 49 Spindelzellensarkome, 2 polymorphzellige Sarkome, 4 Plattenepithelzellenkarzinome und 6 Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome hervorgerufen.

3) Als der Kohlenstoff in der Mamma angebracht wurde, entstanden 24 Spindelzellensarkome, 9 Plattenepithelzellenkarzinome und 2 Plattenepithelzellenkarzinome + Spindelzellensarkome.

4) Bei intramuskulärer Zufuhr wurden 27 Spindelzellensarkome, 2 polymorphzellige Sarkome (Rhabdomyosarkome?) und 1 Plattenepithelzellenkarzinom konstatiert.

5) Bei intraperitonäaler Injektion der Verbindung entstanden an 19 Versuchsmäusen insgesamt 32 Spindelzellensarkome in der Bauchhöhle.

6) Als das Methylcholanthren in der Niere angebracht wurde, wurden 11 Spindelzellensarkome und 1 polymorphzelliges Sarkom hervorgerufen.

7) Bei Deponierung des Stoffes in der Leber wurden 6 Spindelzellensarkome hervorgerufen.

8) Als man versuchte, den Stoff in die Lunge einzuführen, entstanden nur 3 Spindelzellensarkome.

Wenn Methylcholanthren bei Bagg-Mäusen in direkten Kontakt mit verschiedenem Gewebe und verschiedenen Organen gebracht wird, gelingt es also nicht, andere maligne Geschwulstformen als Plattenepithelzellenkarzinome, Spindelzellensarkome und polymorphzellige Sarkome hervorzurufen.

Wenn die subkutanen Tumoren plötzlich anfangen, schnell und progressiv zu wachsen, wurden sie als klinisch maligne bezeichnet. Durch die wöchentlichen Aufzeichnungen liess sich dieser Zeitpunkt genau feststellen, und man bekommt hierdurch ein besseres Versuchs-kriterium als es die früheren, auf das Auftreten der Geschwulst aufgebauten Angaben waren.

Durch die Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Tumoren, die nach ihrem histologischen Aussehen als Plattenepithelzellenkarzinome oder Spindelzellensarkome bezeichnet werden müssen, Metastasen bilden und transplantiert werden können. Bei den experimentell hervorgerufenen Mäusegeschwülsten sind also alle Zeichen von Malignität zu finden.

Ueberall im Organismus der Mäuse, wo das kristallinische Methylcholanthren eingeführt wurde, haben sich die Sarkome nach der gleichen Zeit entwickelt. Man versuchte, sich an Bagg-Mäusen ein Urteil darüber zu bilden, ob ein Unterschied besteht in der Zeit, die Haut und subkutanes Gewebe brauchen, um unter der Einwirkung des krebserzeugenden Stoffes Geschwülste zu bilden. Die dahingehenden Ueberlegungen führten zu Schlüssen, die in einem wohlbegründeten Gegensatz stehen zu der Vermutung, dass sich Tumoren bei Deponierung cancerogener Kohlenwasserstoffe in der Subkutis schneller bilden.

Literaturverzeichnis.

- ANDERVONT, H. B.: Pub. Health Rep. **49**, 620, 1934.
 — Pub. Health Rep. **52**, 1584, 1937.
 — Pub. Health Rep. **53**, 229, 1938 a.
 — Pub. Health Rep. **53**, 1647, 1938 b.
- BACHMANN, W. E., COOK, J. W., DANSI, A., DE WORMS, C. G. M., HASLEWOOD, G. A. D., HEWETT, C. L. & ROBINSON, A. M.: Proc. Roy. Soc., Ser. B. **123**, 343, 1937.
- BAGG, H. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **22**, 419, 1925.
- BANG, F.: Bidrag til Studiet af Kræftsygdommens Klinik og Pathogenese. Copenhagen, 1924.
- BARNES, W. A. & FURTH, J.: Am. J. Cancer **30**, 75, 1937.
- BARRY, G., COOK, J. W., HASLEWOOD, G. A. D., HEWETT, C. L., HIEGER, I. & KENNAWAY, E. L.: Proc. Roy. Soc., Ser. B. **117**, 318, 1935.
- BENECKE, E. & SCHRÖDER, J.: Ztschr. f. Krebsforsch. **49**, 505, 1939.
- BONSER, G. M.: J. Path. & Bact. **42**, 169, 1936.
- BONSER, G. M. & ORR, J. W.: J. Path. & Bact. **49**, 171, 1939.
- BOYLAND, E. & BURROWS, H.: J. Path. & Bact. **41**, 231, 1936.
- BOYLAND, E. & WARREN, F. L.: J. Path. & Bact. **45**, 171, 1937.
- BRANCH, C. F.: Am. J. Cancer **26**, 110, 1936.
- BRUNDSCHWIG, A. & BISSEL, A. D.: Arch. Surg. **36**, 53, 1938.
- BURROWS, H. HIEGER, I. & KENNAWAY, E. L.: Am. J. Cancer **16**, 57, 1932.
- CLOWES, G. H. A. & CHEN, K. K.: Am. J. Cancer **27**, 566, 1936.
- COOK, J. W., HIEGER, I., KENNAWAY, E. L. & MAYNEORD, W. V.: Proc. Roy. Soc., Ser. B. **111**, 455, 1932.
- DEELMAN, H. T.: Ztschr. f. Krebsforsch. **18**, 261, 1922.
- DOBOVOLSKAÏA-ZAVADSKAÏA, N. & ADAMOVA, N.: Bull. l'Assoc. Franc. p. l'Étud. du Cancer **27**, 308, 1938.
- — Bull. l'Assoc. Franc. p. l'Étud. du Cancer **28**, 76, 1939.
- DOBOVOLSKAÏA-ZAVADSKAÏA, N. & SIMSILEVICH, F.: Libro de oro por Prof. Dr. A. H. Roffo 1935 p. 293.
- DOMAGK, G.: Medizin und Chemie III. »BAYER« 1936 p. 274.
- DUNNING, W. F., CURTIS, M. R. & BULLOCK, F. D.: Am. J. Cancer **28**, 681, 1936.

- ESMARCH, O.: Acta path. et microbiol. Scand. **12**, 9, 1940 a.
— Studier over Methylcholantren og dets kræftfremkaldende Virkning paa Mus. Copenhagen, 1940 b.
- FIBIGER, J. & BANG, F.: Compt. rend. Soc. de Biol. **83**, 1157, 1920.
— — D. Kgl. Danske Vidensk. Selskab, Biol. Medd. **III**, 4, 1921.
- FIESER, L. F.: Am. J. Cancer **34**, 37, 1938.
- FIESER, L. F. & SELIGMAN, A. M.: J. Am. Chem. Soc. **58**, 2482, 1936.
- FURHT, J. & FURTH, O. B.: Am. J. Cancer, **34**, 169, 1938.
- HAAGENSEN, C. D. & KREHBIEL, O. F.: Am. J. Cancer **26**, 368, 1936.
- HVAL, E.: Om 1 : 2 : 5 : 6-dibenzanthracensarcomernes udvikling. Bergen, 1937.
- ILFELD, F. W.: Am. J. Cancer **26**, 743, 1936.
- KEIJSIR, S.: Nederl. tijdschr. v. geneesk. **79**, 2019, 1935.
- KLINKE, J.: Ztschr. f. Krebsforsch. **47**, 348, 1938.
- LACASSAGNE, A.: Compt. rend. l'Acad. Sci. **195**, 630, 1932.
— Am. J. Cancer **27**, 217, 1936.
- LEWIS, M. R.: Am. J. Cancer **29**, 510, 1937.
- LEWIS, M. R. & LICHTENSTEIN, E. G.: Am. J. Cancer **27**, 246, 1936 a.
— — Am. J. Cancer **28**, 746, 1936 b.
- LYNCH, C. J.: J. Exp. Med. **43**, 339, 1926.
— Am. J. Cancer **31**, 77, 1937.
- MAISIN, J. & COOLEN, M.-L.: Compt. rend. Soc. de Biol. **117**, 109, 1934.
- MERCIER, L.: Compt. rend. Soc. de Biol. **102**, 503, 1929.
— Compt. rend. Soc. de Biol. **103**, 125, 1930.
- NAKAHARA, W. & FUJIWARA, T.: Gann **31**, 568, 1937 a.
— — Gann **31**, 660, 1937 b.
- NICOD, J. L. & REGAMEY, J.: Bull. l'Assoc. Franc. p. l'Étud. du Cancer **27**, 706, 1938.
- PEACOCK, P. R. & BECK, S.: Brit. J. Exp. Path. **19**, 315, 1938.
- PEERS, H. J.: Am. J. Path. **15**, 261, 1939.
- RUSSEL, B. R. G.: J. Path. & Bact. **25**, 409, 1922.
- SCHABAD, L. M.: Ztschr. f. Krebsforsch. **42**, 295, 1935.
- SEEDORFF, J.: Compt. rend. Soc. de Biol. **87**, 466, 1922.
- SELIGMAN, A. M. & SHEAR, M. J.: Am. J. Cancer **37**, 364, 1939.
- SHEAR, M. J.: Am. J. Cancer **26**, 322, 1936.
— Am. J. Cancer **33**, 499, 1938.
- STRONG, L. C.: J. Exp. Zool. **36**, 67, 1922.
- TSUTSUI, H.: Gann **12**, 17, 1918.

II. Untersuchungen über die Fähigkeit des Methylcholanthrens, abseits der Applikationsstelle Geschwülste hervorzurufen.

Im ersten Teil dieser Untersuchungsreihe traten bei auffallend jungen Versuchsmäusen Lungenadenome auf, und bei 1 % der 500 Versuchstiere haben sich Lymphoblastome entwickelt, die vermutlich vom Thymus ausgegangen sind. Die lymphatischen Leiden können bereits am 56. Tage nach Beginn der Untersuchung auftreten, also früher, als man die Entstehung von Tumoren an der Behandlungsstelle erwarten kann. Es ist daher zwecklos, über die Häufigkeit, mit der Lymphoblastome bei realen Versuchstieren vorkommen, Berechnungen anzustellen, weil dieser Begriff ja auf Angaben über das Vorkommen der Geschwülste an der Applikationsstelle aufgebaut ist. Die Lymphoblastome entstanden hauptsächlich bei Mäusen, die mit Methylcholanthrenlösungen gepinselt wurden, oder bei Tieren, denen der kristallinische Stoff im Peritoneum oder in stark vaskularisierten Organen deponiert worden war. Man darf annehmen, dass unter allen diesen Umständen besonders günstige Bedingungen für eine Resorption der chemischen Verbindung bestehen.

Im folgenden habe ich mir die Aufgabe gestellt zu beweisen, dass die Lymphoblastome durch die Wirkung des Methylcholanthrens entstehen.

Die hauptsächlichste Aufgabe zur Erreichung dieses

Zieles muss sein, den Stoff in der Weise einzuführen, dass die Resorptionsverhältnisse besonders günstig werden. Es wird ausserdem wünschenswert sein, in grösstmöglichem Ausmass die krebserzeugende Fähigkeit des Stoffes an der Applikationsstelle zu eliminieren. Ich habe mich deshalb dahin entschieden, das Methylcholanthren entweder durch Pinselungen mit einer Benzollösung oder durch subkutane Injektionen einer Emulsion dieses Stoffes zuzuführen. Bei diesen Untersuchungen wurde der Maus die Verbindung an 12 bzw. 8 verschiedenen Stellen zugeführt, und die Behandlung wurde in der Reihenfolge vorgenommen, dass immer 4 bis 8 Wochen vergingen, bis der Stoff dem Tiere wieder an derselben Stelle beigebracht wurde. Eine ähnliche Pinselungstechnik wurde früher u. a. bei Untersuchungen mit Teer angewandt (MURPHY & STURM, 1925, und LYNCH, 1927), wo man Lungentumoren hervorzurufen beabsichtigte; eine entsprechende Injektionstechnik hat aber bisher noch keine Anwendung gefunden.

Versuche.

Eine Untersuchung, wobei dreimal wöchentlich mit einer 0,3 %igen Lösung von Methylcholanthren in Benzol gepinselt wurde, umfasste 50 Mäusemännchen und 50 Weibchen, von denen die Hälfte Kontrollversuchen diente. Die Kontrolltiere wurden in der gleichen Weise behandelt, doch nur mit Benzol. Die Pinselungen wurden fortgesetzt bis die Tiere eingingen. Der Reihenfolge nach wurde an folgenden 12 Stellen gepinselt: rechte Achsel, linke Hüfte, rechte Flanke, linke Flanke, rechte Hüfte, linke Achsel, Hals, Regio sacralis, Abdomen, Rücken, Regio publica und Nacken. Die letzte Versuchsmaus ging am 201.

Tage ein, und die Kontrolltiere wurden 29 Wochen nach Beginn des Versuches getötet.

Leider war es nicht zu vermeiden, dass in der Haut Geschwulstbildungen entstanden, die oft multipel auftraten. Die Tumoren hatten den gleichen Charakter wie bei den gewöhnlichen Pinselungsversuchen. Um einen Ueberblick über die Sterblichkeit zu geben, mag erwähnt werden, dass die erste Geschwulst in der Haut 16 Wochen nach Beginn der Untersuchung konstatiert wurde, zu welchem Zeitpunkt noch 23 Versuchstiere (8 ♂ und 15 ♀) am Leben waren.

Bei 4 reellen Versuchstieren, alle Weibchen, wurden Geschwülste an den inneren Organen konstatiert. In 3 Fällen handelte es sich um Lungenadenome. Das eine Tier verendete am 170. Versuchstage ohne Geschwülste an anderen Stellen, während die 2 anderen Mäuse am 170. bzw. 201. Tage mit ausgesprochenen Plattenepithelzellenkarzinomen in der Haut eingingen. Im 4. Falle handelte es sich um eine Maus, die am 161. Versuchstage mit einem Lymphoblastom verendete, das gleiches Aussehen, gleiche Lage und gleichen Charakter hatte, wie ich es beim ersten Pinselungsversuch beschrieben habe. Ausserdem hatte das Tier ein Plattenepithelzellenkarzinom und ein Spindelzellensarkom in zwei verschiedenen Regionen.

Wenn man subkutane Injektionen von Methylcholanthren in der Weise vornehmen will, dass die günstigsten Bedingungen für eine Resorption geschaffen werden, ist es am zweckmässigsten, Emulsionen zu verwenden, weil dadurch eine grössere Gewebeoberfläche mit dem Stoff in Berührung kommt. Die verwendete Emulsion war in entsprechender Weise hergestellt wie die von BURROWS (1932) bei einigen Versuchen benutzte, wo er Ratten intraperitonäal 1:2:5:6-Dibenzanthracen injizierte.

Das Methylcholanthren wird in einer Konzentration von 0,4 ‰ bei einer 100° nicht übersteigenden Temperatur in Olivenöl aufgelöst. Die Lösung wird in 3 Teilen einer 5 ‰igen wässrigen Akaziengummilösung emulgiert, die zwecks Stabilisierung der Emulsion bis auf ein p_H von 8,2 gebracht wird. Diese enthält also schliesslich 0,1 ‰ des Kohlenwasserstoffs. Für die Kontrollmäuse wird eine ähnliche Emulsion hergestellt, der aber der krebserzeugende Stoff nicht zugesetzt wird. Alle verwendeten Flüssigkeiten sind autoklaviert, und die Zubereitung geschieht unter sterilen Vorsichtsmassregeln.

Die Injektionen wurden einmal wöchentlich mit einer Tuberkulinspritze vorgenommen. Die Haut wurde an der Einstichstelle mit Alkohol behandelt; der Stichkanal wurde so lang wie möglich gemacht, einmal damit die eingespritzte Flüssigkeit nicht wieder herausfliessen kann, und dann, um eine Infektion an der Deponierungsstelle zu vermeiden. Der Reihenfolge nach wurden subkutane Injektionen an folgenden 8 Stellen vorgenommen: linke Achsel, rechte Flanke, Lendenregion, rechte Achsel, linke Flanke, rechte Inguinalregion, Nacken und linke Inguinalregion. Es vergingen also 8 Wochen, bis wieder an der gleichen Stelle injiziert wurde.

Die Untersuchung wurde in zwei Versuchsreihen vorgenommen, weil die erste eine grosse Sterblichkeit unter den Versuchsmäusen aufwies.

Der erste Versuch wurde an 50 Versuchs- und 50 Kontrolltieren gemacht mit gleich vielen Männchen und Weibchen in jeder Gruppe. Die wöchentlichen Injektionen betragen 0,625 ccm. Bei Tieren, die frühzeitig während des Versuches verendeten, sah man Reste der einzelnen Injektionen. Wasser wurde schnell resorbiert, während sich

Olivenöl mit dem Methylcholanthren über Areale von 2—3 ccm verteilt hatte. Die Resorptionsmöglichkeiten für das eingespritzte Methylcholanthren müssen daher sehr günstig sein. An Tieren, die lang genug lebten, wurden insgesamt 16 Einspritzungen vorgenommen, was soviel besagt wie dass jedem Tier 10 mg des krebserzeugenden Stoffes zugeführt wurden. Es bekamen aber nur 5 Versuchstiere die gesamte Dosis. Die letzte Versuchsmaus ging am 159. Tage ein; die Untersuchung wurde am folgenden wöchentlichen Untersuchungstage abgeschlossen und die Kontrolltiere wurden getötet.

Bei dieser Versuchsanordnung begegnete man zum erstenmal einer ausgesprochen toxischen Wirkung des Methylcholanthrens. 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn des Versuches lebten, in entsprechender Reihenfolge aufgeführt, 16, 15 und 13 Versuchstiere, während 36, 28 und 22 Kontrolltiere zu den gleichen Zeitpunkten noch am Leben waren. Die Zahlen zeigen, dass der Verlust an Versuchstieren infolge von Intoxikation im Laufe der ersten 4 Wochen erfolgt, weshalb die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen ist, dass die Tiere sich an die Giftwirkung des Stoffes gewöhnen.

Leider war es nicht zu vermeiden, dass im subkutanen Gewebe Spindelzellensarkome vorkamen, die oft multipel auftraten. Von der 13. Woche an konnten solche Tumoren in einem klinisch malignen Stadium nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch 12 Versuchstiere, ebenso viele Männchen wie Weibchen.

Bei keinem Versuchstier wurden Lungenadenome konstatiert. Unter den Versuchsmäusen wurden bei 2 Weibchen Lymphblastome im Mediastinum gefunden. Die Tiere verendeten schon am 89. bzw. 90. Tage nach Beginn der

Untersuchung, also zu einem Zeitpunkt, wo noch keine Tumoren im subkutanen Gewebe konstatiert werden konnten.

Die grosse Sterblichkeit infolge von Intoxikation hat dazu angeregt, die Untersuchung mit geringeren Dosen vorzunehmen. Der Versuch wurde deshalb mit wöchentlichen Injektionen von 0,31 ccm wiederholt. Die letzte Versuchsmaus ging am 181. Tage ein, und die Kontrolltiere wurden 27 Wochen nach Beginn der Untersuchung getötet. Kein Versuchstier hat also 32 Injektionen bekommen, was 10 mg Methylcholanthren entsprechen würde. Bei dieser Dosierung wurde der Versuch nicht durch Sterblichkeit infolge von Intoxikation gestört. 16 Wochen nach Beginn des Versuches wurde die erste Geschwulst im subkutanen Gewebe konstatiert, und zu diesem Zeitpunkt lebten noch 34 Versuchstiere, wovon die Hälfte Männchen waren.

Bei 3 Tieren dieses Versuches kamen Lungenadenome vor, nämlich bei 1 Männchen und 2 Weibchen, die am 155., 149. bzw. 184. Tage eingingen. Alle diese Mäuse hatten ausserdem multiple oder solitäre subkutane Sarkome.

Zwei Versuchstiere, ein Männchen und ein Weibchen, die am 130. bzw. 187. Untersuchungstage ausschieden, hatten vermutlich vom Thymus ausgehende Lymphblastome, während sonst an anderen Stellen bei den Tieren keine Tumoren konstatiert wurden. Zwei weitere Mäuseweibchen verendeten am 137. bzw. 139. Versuchstage mit ähnlichen Lymphblastomen, und gleichzeitig wurden solitäre Spindelzellensarkome im subkutanen Gewebe gefunden.

Bei den Tieren mit Lymphblastomen sind niemals Metastasen, vergrösserte Lymphdrüsen am Halse, in der Achsel, in der Inguinalregion oder im Abdomen gefunden worden. Leber und Milz haben keine sicheren Veränderungen aufzuweisen gehabt. Eine Zählung der Blutkör-

perchen hat sich an den von selbst verendeten Tieren nicht durchführen lassen, und Präparate vom Knochenmark sind leider misslungen. Alles spricht dafür, dass es sich um ein lokales, lymphatisches Leiden handelte, weshalb ich mich auf die Bezeichnung Lymphoblastom beschränke. Die Geschwülste waren haselnussgross und haben im oberen Teil des Mediastinums gelegen, wo sie hauptsächlich um die grossen Gefässe herum gelagert waren. Sie infiltrierten die Muskulatur an der Apertura thoracis superior, bildeten Ausläufer ins Mediastinum hinab und breiteten sich mantelförmig an den Gefässen der Lunge und an den Bronchien entlang aus. Der vordere Teil der Tumoren war oft deutlich abgegrenzt und wie von einer Kapsel umgeben; in anderen Fällen waren die Bildungen aber auch unlösbar mit der vorderen Thoraxwand verbunden. Die Geschwülste bestanden aus Rundzellen, die als kleine oder auch als grosse Lymphozyten aufgefasst werden mussten. Zeichen einer Follikelbildung waren nicht vorhanden, und man konnte einzelne Mitosen beobachten. Eine dieser Geschwülste, die bereits am 56. Tage nach einer intrapulmonalen Injektion von 10 mg kristallinischem Methylcholanthren aufgetreten war, hat im Gegensatz zu den übrigen Lymphoblastomen überwiegend aus kleinen Lymphozyten bestanden.

Der Ausgangspunkt der Lymphoblastome hat sich nicht mit Sicherheit bestimmen lassen. Bei der Sektion dieser Tiere waren keine Reste des Thymus zu finden, weshalb ich diesem Organ meine besondere Aufmerksamkeit zugewandt habe. Andererseits habe ich bei mikroskopischen Untersuchungen keine Reste von Hassallschen Körperchen in den Geschwülsten nachweisen können.

Die Lymphoblastome müssen als primäre Tumoren auf-

gefasst werden, da sie unabhängig von malignen Geschwülsten an Stellen entstehen, die in direktem Kontakt mit dem Methylcholanthren gewesen sind.

Spontane lymphatische Leiden ähnlichen Charakters sind bei Bagg-Mäusen bisher nicht beschrieben worden. Unter den 650 Kontrolltieren, die bei allen Versuchen zusammen angewandt wurden, konnten keine Lymphoblastome gefunden werden, weshalb man mit Sicherheit annehmen darf, dass die verwendeten Lösungs- oder Schmiermittel nicht imstande sind, in den Versuchsperioden solche Prozesse hervorzurufen.

Diskussion.

Im folgenden sollen die Versuche, die im vorigen Artikel beschrieben wurden, als erste Untersuchungsreihe, und die letzten Versuche als zweite Untersuchungsreihe bezeichnet werden.

Da Lymphoblastome entstehen können noch bevor sich Geschwülste an den Applikationsstellen entwickeln, wird die Aufstellung auf Grund der absoluten Anzahl von Versuchsmäusen berechnet. Die erste Untersuchungsreihe umfasst 500 Versuchstiere, von denen $5 = 1\%$ Lymphoblastome bekommen haben. Bei der zweiten Untersuchungsreihe gelang es, das Leiden bei $7 = 4,7\%$ von 150 Mäusen hervorzurufen. Bei einem Versuch, bei dem die Maus an verschiedenen Stellen der Haut mit einer Methylcholanthrenlösung gepinselt wurde, gelang es nur unter 50 Tieren 1 Lymphoblastom hervorzurufen. Man kann daher nicht annehmen, dass das Leiden bei diesem Versuch häufiger als bei der vorhergehenden Untersuchungsreihe entstanden sei. Bei einem Versuch, bei dem die Methylcholanthren-

emulsion in Mengen von 0,625 ccm injiziert wurde, wurden nur 2 Lymphoblastome hervorgerufen, da der Versuch eine grosse Sterblichkeit infolge von Intoxikation aufwies. Als die Untersuchung mit Injektionen von 0,31 ccm wiederholt wurde, lagen die idealsten Versuchsbedingungen vor; denn jetzt entstand das Leiden bei $4 = 8\%$ der Mäuse.

Die Lymphoblastome sind überwiegend bei Mäuseweibchen entstanden; nur einer von sämtlichen 12 Fällen kam bei einem Männchen vor. Mit dem Leiden behaftete Tiere wurden durchschnittlich 125 Tage nach Beginn des Versuches seziert, und das Leiden wurde frühestens am 56. und spätestens am 187. Untersuchungstage festgestellt.

In seltenen Fällen sind hin und wieder spontan lymphatische Leiden mit ähnlichen Lokalisationen beschrieben worden. TYZZER (1907) hat unter 20 Mäusen einen Fall von Lymphosarkom gesehen. Aus seiner Beschreibung geht hervor, dass die Geschwulst in keinem Punkte von den Tumoren abwich, die ich hervorgerufen habe. HAALAND (1911) hat unter 499 Mäusen mit verschiedenen Geschwülsten 4 Fälle von Lymphomen konstatiert, die im Mediastinum oder im Thymus lokalisiert waren. Bei 15.000 Autopsien von Mäusen aus Slyes Stall hat SIMONDS (1925) 32 Lymphosarkome mit intrathorakalem Ausgangspunkt beschrieben; das Leiden hatte sich aber ausserdem noch in Leber und Milz gezeigt. Schliesslich hat McCoy HILL (1930) bei einem Material von 216 Mäusen eines in Inzucht gehaltenen Stammes 24 Lymphosarkome gefunden, die im Mediastinum oder Mesenterium lokalisiert waren, wenn auch oft andere Organe mit angegriffen waren.

Aus den Beschreibungen der Lymphosarkome gewinnt man den Eindruck, der gleichen Tumorform gegenüberzustehen, die ich als Lymphoblastom bezeichnet habe.

Der Grund, weshalb ich diese mehr symptomatische Diagnose vorgezogen habe, ist der, dass das Leiden in allen meinen Fällen rein lokaler Natur war.

Die erwähnten, spontan vorkommenden Lymphosarkome sind in mehreren Fällen zum Gegenstand von Transplantationsversuchen gemacht worden, die jedoch keine positiven Resultate ergaben.

Wie man sieht, kann also dasselbe lymphatische Leiden in seltenen Fällen spontan bei Mäusen entstehen, und durch Inzucht kann man Mäusestämme erzielen, bei denen derartige Leiden besonders häufig vorkommen.

Bei experimentellen Versuchen hat man hin und wieder entsprechende Krankheiten angetroffen. MAISIN & LIÉGOIS (1933) haben bei 1 von 50 Mäusen ein Lymphosarkom im Mediastinum gesehen; die Mäuse waren 3 mal wöchentlich mit einer gesättigten Lösung von 1:2:5:6-Dibenzanthracen in Benzol gepinselt worden. Die Geschwulst wurde 137 Tage nach Beginn des Versuches gefunden. DOBROVOLSKAĪA-ZAVADSKAĪA & ADAMOVA (1939) haben einen Fall von Lymphosarkom im Thymus einer Maus beschrieben, die zwei Monate vorher eine subkutane Injektion von 1:2:5:6-Dibenzanthracen bekommen hatte. Bei dem Versuch waren insgesamt 271 Mäuse in der gleichen Weise behandelt worden. KREBS, RASK-NIELSEN & WAGNER (1930) haben 10 Fälle von Lymphomatosis infiltrans (Lymphosarkomatose) gefunden, die im Mediastinum lokalisiert waren. Hiervon hatte der eine Neigung, knotenförmige Metastasen zu bilden. Von diesen Geschwülsten waren 6 unter 5550 Mäusen entstanden, die Gegenstand einer Röntgenbestrahlung gewesen waren, während die übrigen 4 unter 10.500 Mäusen vorkamen, die keine Röntgenbestrahlung erhalten hatten. Einem der röntgenbehandelten Tiere war

ausserdem ein Tropfen Teerlanolin in beide Testes injiziert worden, und eine der unbestrahlten Mäuse war früher mit Teerpinselungen behandelt worden. Eines dieser Sarkome hat sich transplantieren lassen. Die Geschwulst wird im Institut immer noch weitergeführt, und es darf in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass die Bagg-Mäuse für solche Transplantationsversuche nicht geeignet sind (KAA-LUND-JÖRGENSEN, 1936).

LACASSAGNE (1936, 1937 und 1938) hat in einem Material von ca. 200 Mäusen 15 Lymphosarkome bei Tieren verschiedener Stämme entstehen sehen. Ausser mit Oestrin waren die Mäuse mit einem oder mehreren der folgenden Präparate behandelt worden: Hypophysenvorderlappenextrakt, Progesteron, Equilin oder Equilenin. Die Geschwülste, die oft Metastasen bildeten, wurden nach einer Behandlung von 155—403 Tagen konstatiert, und fast alle scheinen vom Thymus ausgegangen zu sein. Die verwendeten Mäusestämme waren frei von spontanen Lymphosarkomen; sie hatten aber eine verschieden starke Neigung zu Brustkrebs. Ein einzelner Stamm war völlig frei von Tumoren. GARDNER (1937) berichtet über 3 Thymustumoren und einen Fall von Leukämie, die unter ca. 100 östrinbehandelten Mäusen vorkamen. Die eine dieser Geschwülste wurde mit Erfolg transplantiert. Von anderer Seite (BURNS, SUNTZEFF & LOEB, 1938) wird über eine von 247 Mäusen berichtet, die $7\frac{1}{2}$ Monate hindurch wöchentliche Injektionen von Progynon B bekommen hatten. Bei ihrem Tode fand man ein Sarkom in der Vaginalwand, ein Lymphosarkom in der Brusthöhle und ausserdem ein Mammakarzinom.

Hieraus geht hervor, dass im Mediastinum lokalisierte Lymphosarkome im allgemeinen auch unter experimentellen Verhältnissen seltene Leiden sind.

Unter den 650 Kontrolltieren wurden solche Leiden nicht angetroffen. Es ist jedoch zu bedenken, dass diese Tiere spätestens getötet wurden, wenn sie ein Jahr alt waren. Ausserdem hat das Kontrollmaterial nur 209 Mäuse enthalten, die mehr als ca. $9\frac{1}{2}$ Monate alt waren, d. h. Tiere, die nach dem 203. Versuchstage eingingen. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, dass die Linie von Bagg-Mäusen, mit der hier gearbeitet wurde, vielleicht in einem späteren Alter spontan solche Geschwülste bekommen könnte. Diese Möglichkeit erscheint jedoch kaum wahrscheinlich, da bei alten Zuchtmäusen, die unser Lieferant routinemässig einer Sektion unterwirft, keine Lymphoblastome oder ähnliche Leiden gefunden wurden. Auch bei Bagg-Mäusen, die sonst in den Laboratorien der Radiumstation verwendet wurden, sind keine solchen Symptome gefunden worden.

Wenn es sich nicht gerade um besonders in Inzucht gehaltene Stämme handelt, entstehen Lymphosarkome im Mediastinum nur äusserst selten spontan. Trotz dieser Tatsache habe ich nicht recht glauben können, dass die Lymphoblastome, die bei meiner ersten Untersuchungsreihe mit einer Häufigkeit von 1 % vorkamen, durch eine Wirkung des Methylcholanthrens hervorgerufen sein sollten. Da hier nicht mit einem durchkontrollierten Stamm gearbeitet wurde, besteht die Möglichkeit, dass der Stoff nur das Auftreten eines spontanen Leidens beschleunigt hat. Wenn es bei der letzten Untersuchungsreihe gelungen ist, mit einer Häufigkeit von 4,7 % Lymphoblastome hervorzurufen, so spricht alles dafür, dass die Krankheit direkt durch den cancrogenen Kohlenwasserstoff hervorgerufen wurde. Bei einem einzelnen Versuch, bei dem die idealsten Versuchsbedingungen geschaffen waren, haben 8 % von 50

Versuchstieren Lymphoblastome gehabt. Man darf also wohl sagen: es ist der Beweis geführt worden, dass das Leiden durch das Methylcholanthren hervorgerufen wurde. Hätte man die Versuche ausschliesslich an Mäuseweibchen vorgenommen, so wäre zu erwarten gewesen, dass das Leiden doppelt so häufig hätte hervorgerufen werden können.

Da ähnliche Leiden bei den zahlreichen Versuchen mit Methylcholanthren oder anderen krebserzeugenden Kohlenwasserstoffen fast niemals beschrieben worden sind, lässt sich die Möglichkeit nicht gänzlich von der Hand weisen, dass Mäuse des hier verwendeten Stammes vielleicht besonders geeignete Versuchstiere sind, wenn es sich darum handelt, Lymphoblastome hervorzurufen. Es muss jedoch daran erinnert werden, dass meine Untersuchungen, im Gegensatz zu den meisten früheren Versuchen, mit weit grösseren Dosen vorgenommen wurden, und dass in grösserem Ausmasse Mäuseweibchen verwendet wurden.

Es ist merkwürdig, dass die Lymphoblastome ausschliesslich im oberen Teil des Mediastinums lokalisiert waren und dass keine Zeichen von Metastasen gefunden wurden. Generalisierte leukämische Zustände wurden ebenfalls nicht angetroffen, wie BRUES & MARBLE (1939) sie bei Teerpinselungsversuchen mit einer Linie von Baggmäusen beschrieben haben, bei der gelegentlich spontane Fälle von solchen Leiden vorkommen.

In Anbetracht dessen, dass Methylcholanthren oder ähnliche Stoffe möglicherweise bei einem abnormen Gallensäure- oder Cholesterolfstoffwechsel entstehen können (COOK, 1936, und ESMARCH, 1939), eröffnet die Untersuchung die Möglichkeit, gewisse lymphatische Krankheiten durch abnorme Stoffwechselprozesse zu erklären. Lacassagnes Ver-

suchsbericht über Mäuse, die im wesentlichen mit grösseren Dosen östrogenen Hormone behandelt worden waren, nötigt uns, unsere Aufmerksamkeit auch diesen Verbindungen zuzuwenden. Allen diesen Stoffen gemeinsam ist, dass sie das Cyclopentanoperhydrophenanthren-Ringsystem enthalten. Bei meinen Versuchen ist es auffallend, dass die Lymphoblastome fast ausschliesslich bei Mäuseweibchen entstanden sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Leiden im weiblichen Organismus leichter hervorgerufen werden kann, da hier, wie man sich denken könnte, die Lymphoblastome durch ein Zusammenwirken des Methylcholanthrens mit den natürlich vorkommenden östrogenen Hormonen entstehen. Leider lassen sich aus dem vorhandenen Material keine sicheren Schlüsse ziehen. Dies würde weit umfassendere Untersuchungen mit diesen und ähnlichen Stoffen an Mäusen verschiedener, in Inzucht gehaltener Stämme erfordern. Die Versuche schaffen jedoch die Möglichkeit für zielbewusste experimentelle Forschung über die Aetiologie gewisser lymphatischer Leiden.

Bei den einzelnen Versuchen der letzten Untersuchungsreihe sind merkwürdigerweise Lungenadenome nicht so häufig entstanden wie bei gewissen Versuchen der ersten Untersuchungsreihe. Bei der Zusammenstellung dieser Geschwülste besteht also kein Grund, die beiden Versuchsreihen getrennt zu behandeln. An insgesamt 19 Versuchsmäusen wurden Lungenadenome nachgewiesen, die bei der histologischen Untersuchung keine Zeichen von Malignität entdecken liessen. In 8 Fällen wurde das Leiden bei Männchen und in 11 Fällen bei Weibchen gefunden. Die Adenome in den Lungen entstanden, ebenso wie die Lymphoblastome, im Mediastinum, unabhängig von Tumoren, die an jenen Stellen auftreten können, wo das Methylcholanthren ange-

bracht wurde. Von 650 Versuchstieren bekamen 2,9 % Lungenadenome, während bei den Kontrolltieren 2,0 % unter einer gleichen Anzahl von Mäusen gefunden wurden. Der kleine Zahlenunterschied deutet nicht darauf hin, dass das Leiden wesentlich häufiger bei mit Methylcholanthren behandelten Tieren entsteht als bei den entsprechenden Kontrolltieren.

Bei den Kontrolltieren wurde die erste Maus mit einem Lungenadenom am 203. Versuchstage seziert. Unter 441 Kontrolltieren, die an diesem Tage oder vorher eingegangen waren, fanden sich also 0,2 % mit Adenomen in den Lungen. Bei den übrigen 209 Kontrollmäusen hatten 12 = 5,7 % ein Lungenleiden. Von 595 Versuchsmäusen, die bis zum 203. Untersuchungstage ausgeschieden waren, hatten 13 = 2,2 % Lungenadenome, von den übrigen 55 Mäusen 6 = 10,9 %. Diese Aufstellung zeigt, dass die Lungenadenome bei jungen Versuchsmäusen weit häufiger auftreten als bei jungen Kontrollmäusen.

Bei Tieren, die mit Methylcholanthren behandelt waren, wurden Lungenadenome frühestens am 122. Tage festgestellt und, wie bei den Kontrolltieren, spätestens am 280. Tage nach Beginn der Untersuchung. Durchschnittlich gelangten die 19 Versuchsmäuse und die 13 Kontrollmäuse am 194., bzw. 269. Tage zur Sektion. Diese Zahlen zeigen auch, dass das Leiden als Folge der angewandten Technik bei den Versuchstieren früher vorkommt.

Die Untersuchung bestätigt im wesentlichen frühere Beobachtungen. Versuche mit Teerpinselung von Mäusen haben gezeigt, dass die Tiere nach einer Behandlung von ca. 6 bis 10 Monaten weitaus häufiger primäre Lungengeschwülste bekommen können als unbehandelte Kontrollmäuse. Auch wenn keine Tumoren auf der Haut entstehen,

erscheinen doch Geschwülste in den Lungen (MURPHY & STURM, 1925, BONNE, 1927, SCHABAD, 1928 und 1930 u. a.). Diese Geschwülste sind Gegenstand einer Reihe von Ueberlegungen gewesen, weil es schwer zu entscheiden ist, ob sie im wesentlichen durch eine universelle Teerintoxikation verursacht oder auf eine besondere Reizung des Lungengewebes durch Teer zurückzuführen sind. Ausserdem ist diskutiert worden, wie der Teer vom Organismus aufgenommen wird. MURPHY & STURM (1925) nehmen an, dass der Stoff wahrscheinlich durch den Verdauungskanal oder möglicherweise durch die Haut aufgenommen wird, während CAMPBELL (1934) und SEELIG & BENIGNUS (1936) vermuten, dass der Stoff durch die Lungen eingeführt wird, weil man an Mäusen Lungengeschwülste hervorrufen kann, wenn sie teerhaltigen Staub einatmen. Diese letzte Anschauung hat P. MÖLLER bereits 1924 anlässlich einer Untersuchung an Ratten vertreten, und später haben SEELIG & BENIGNUS (1938) bei Mäusen, die unter Versuchsbedingungen lebten, wo sie Gelegenheit hatten, russhaltiges Material einzuatmen, Russpartikel in den Lungen mikroskopisch nachweisen können. Schliesslich wurde gezeigt (LYNCH, 1927, 1933 und 1936 u. a.), dass die Empfänglichkeit für Lungengeschwülste infolge Teerpinselung erblich bedingt ist. Histologisch bestehen die Tumoren aus Bindegewebsfalten, die mit Zellen von zylindrischem oder kubischem Charakter bekleidet sind (MURPHY & STURM, 1925, und LYNCH, 1936).

Man darf sicher cancrogenen Kohlenwasserstoffen nicht ohne weiteres alle die Eigenschaften beilegen, die an Teer festgestellt worden sind. In jedem einzelnen Falle muss man einen experimentellen Beweis verlangen. Da Teer ein Mischprodukt ist, so besteht die Möglichkeit, dass er ausser einer oder vielleicht mehreren Verbindungen, die an der

Applikationsstelle cancrogen wirken, noch Stoffe enthält, die an anderer Stelle im Organismus Geschwülste hervorrufen können.

Durch Versuche an Mäusen hat sich indessen gezeigt, dass 1:2:5:6-Dibenzanthracen eine dem Teer entsprechende Fähigkeit besitzt, primäre Lungengeschwülste hervorzurufen. Dies wurde sowohl bei Pinselungsversuchen (SCHABAD, 1936) beschrieben wie bei Versuchen, bei denen der Stoff subkutan (ANDERVONT, 1935, SCHABAD, 1935 u. a.), oder in Oel oder Fett aufgelöst, intramuskulär injiziert wurde (KEIJSIR, 1937). Das Einatmen von Partikeln des krebserzeugenden Stoffes ist also zum Entstehen der Lungengeschwülste nicht erforderlich. Durch intravenöse Injektion von Suspensionen von 1:2:5:6-Dibenzanthracen oder Methylcholanthren in Dosen von 0,1 mg lassen sich an erblich belasteten Mäusen ebenfalls Lungengeschwülste hervorrufen, und im Vergleich zu den Ergebnissen, die bei intrachealer Injektion derselben Stoffe erzielt werden, gibt das intravenöse Verfahren eine grössere Ausbeute (SHIMKIN, 1939). Genauere Studien an in Inzucht gehaltenen Mäusestämmen, denen 1:2:5:6-Dibenzanthracen- und Methylcholanthrenlösungen subkutan injiziert wurden, zeigen, dass man bei gewissen Mäuserassen besonders leicht Lungentumoren hervorrufen kann. Es handelt sich dabei insbesondere um Stämme, bei denen ältere Mäuse spontan Lungengeschwülste bekommen (ANDERVONT, 1937 a und 1938 a, b u. a.). LYNCH (1935) hat 3 subkutane Injektionen von in Fett gelöstem 1:2:5:6-Dibenzanthracen an Mäusen des Baggschen Albinostammes gemacht. Die Einspritzungen wurden in einem Abstand von 14 Tagen vorgenommen, und insgesamt wurde den Tieren 4 mg des krebserzeugenden Stoffes zugeführt. Hierbei entstanden bei 81 bis 89 %

der Tiere, die nach der Feststellung der ersten Lungengeschwulst noch am Leben waren, Geschwülste in den Lungen. Spontan pflegten 32 % der Mäuse, die über $\frac{1}{2}$ Jahr alt waren, Tumoren in den Lungen zu bekommen.

Die erbliche Konstitution der Tiere ist jedoch nicht der einzige Faktor, der die Häufigkeit beeinflusst, mit der sich Lungengeschwülste bei Mäusen hervorrufen lassen. Die Art und Weise, wie das 1:2:5:6-Dibenzanthracen zugeführt wird, ist ebenfalls von Bedeutung. Wenn man 1 ccm einer Dispersion in Pferdeserum, das 1 mg des Stoffes enthält, in die Subkutis einspritzt, so bekommt man eine grössere Ausbeute an Lungengeschwülsten, als wenn die gleiche Menge, in Fett gelöst oder in Glycerin suspendiert, zugeführt wird (ANDERVONT, 1937 b). Ausserdem muss man eine gewisse Menge des cancrogenen Kohlenwasserstoffs eingeben, bevor man erwarten kann, dass in den Lungen Tumoren auftreten. Dies ist aus LETTINGAS Versuch (1937) zu ersehen. Die erforderliche Dosis wird hier auf 2,5 mg in Fett gelöstes 1:2:5:6-Dibenzanthracen angesetzt. Schliesslich zeigen LETTINGAS (1937) und SCHABADS (1936) Untersuchungen, dass eine grössere Dosis von Dibenzanthracen auch eine grössere Ausbeute an Lungengeschwülsten gibt.

Es liegen nur vereinzelte Mitteilungen darüber vor, dass es mit cancrogenen Kohlenwasserstoffen gelungen sein soll, Geschwülste anderer Art abseits der Applikationsstelle hervorzurufen.

MAISIN & COOLEN (1936) haben bei einem Pinselungsversuch unter Mäusen, die dreimal wöchentlich mit einer 0,3 %igen Lösung von Methylcholanthren in Benzol behandelt wurden, 20 % Cancer mammae gesehen. Aehnliche Beobachtungen wurden an Tieren gemacht, die mit einer 0,2 %igen Lösung des Stoffes gepinselt wurden. Die Ver-

suche umfassten 67, bzw. 85 Mäuse, und es wird angegeben, dass der Brustkrebs weit häufiger bei den Versuchstieren auftrat als bei unbehandelten Mäusen gleichen Alters und gleicher Zucht. Von 4 in Inzucht gehaltenen Mäusestämmen, bei denen die Weibchen praktisch frei von Cancer in der Mamma sind, haben DOBROVOLSKAĪA-ZAVADSKAĪA & ADAMOVA (1938) 103 Tiere mit Teerpinselungen und 445 Tiere mit subkutanen Injektionen von in Olivenöl oder Fett gelöstem 1:2:5:6-Dibenzanthracen behandelt. Der krebserzeugende Kohlenwasserstoff wurde in Dosen gegeben, die zwischen 0,005 und 0,1 mg lagen. Es gelang nicht, bei auch nur einem Tier einen glandulären Cancer hervorzurufen. In einer späteren Untersuchung (DOBROVOLSKAĪA-ZAVADSKAĪA & ADAMOVA, 1939) wurde der Versuch an einem gründlich kontrollierten Mäusestamm, bei dem die Weibchen sehr häufig Brustkrebs bekamen, wiederholt. 63 Mäuse wurden mit Teer behandelt, und 271 bekamen subkutane Injektionen von 1:2:5:6-Dibenzanthracen in Dosen von 0,0025 bis 0,1 mg. Die Fälle von Cancer mammae, die bei den Versuchstieren entstanden, liessen sich nicht auf eine Wirkung des Stoffes zurückführen. Bei dem verwendeten Stamm konnten überhaupt keine Lungenadenome hervorgerufen werden.

Zusammenfassung.

Unter besonderen Versuchsbedingungen gelang es, Lymphoblastome im Mediastinum mit einer Häufigkeit von 4,7 % hervorzurufen. Bei einem einzelnen Versuch, bei dem die idealsten Bedingungen geschaffen waren, entstand das Leiden unter 50 Mäusen mit einer Häufigkeit von 8 %. Die Lymphoblastome kamen fast ausschliesslich bei Mäuse-

weibchen vor; 11 von sämtlichen 12 Fällen wurden bei diesem Geschlecht festgestellt. Die Bedeutung der Beobachtung wird erörtert, und die Ueberlegungen eröffnen die Möglichkeit, dass die Aetiologie gewisser lymphatischer Leiden sich zum Teil aus abnormen Stoffwechselfprozessen erklären lässt.

Sämtliche Untersuchungen zeigen ferner, dass die Lungenadenome unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht wesentlich häufiger hervorgerufen werden, dass das Leiden aber bei den Versuchstieren in einem früheren Alter als bei den Kontrolltieren auftritt.

Aus der Abteilung für Röntgen- und Lichtbehandlung des Städtischen Krankenhauses in Aarhus und der Radiumstation für Jütland.

(Direktor: Chefarzt Dr. CARL KREBS.)

Die Versuche sind mit freundlicher Unterstützung des Landesvereins zur Krebsbekämpfung ausgeführt.

Literaturverzeichnis.

- ANDERVONT, H. B.: Pub. Health Rep. **50**, 1211, 1935.
— Pub. Health Rep. **52**, 212, 1937 a.
— Pub. Health Rep. **52**, 1584, 1937 b.
— Pub. Health Rep. **53**, 229, 1938 a.
— Pub. Health Rep. **53**, 232, 1938 b.
- BONNE, C.: Ztschr. f. Krebsforsch. **25**, 1, 1927.
- BRUES, A. M. & MARBLE, B. R.: Am. J. Cancer **37**, 45, 1939.
- BURNS, E. L., SUNTZEFF, V. & LOEB, L.: Am. J. Cancer **32**, 534, 1938.
- BURROWS, H.: Proc. Roy. Soc., Ser. B. **111**, 238, 1932.
- CAMPBELL, I. A.: Brit. J. Exp. Path. **15**, 287, 1934.
- COOK, J. W.: Berichte A. **69**, 38, 1936.
- DOBROVOLSKAĪA-ZAVADSKAĪA, N. & ADAMOVA, N.: Bull. l'Assoc. Franc. p. l'Étud. du Cancer **27**, 308, 1938.
— — Bull. l'Assoc. Franc. p. l'Étud. du Cancer **28**, 76, 1939.
- ESMARCH, O.: Ugeskr. f. Læger 1939 p. 156.
- GARDNER, W. U.: Occas. Pub. Am. Assoc. Advancem. of Sci. 1937 p. 67.
- HAALAND, M.: IV Sci. Rep. Imp. Cancer Res. Fund. 1911 p. 1.
- KAALUND-JØRGENSEN, O.: Experimental studies on a transmissible myelomatosis (reticulosis) in mice. Suppl. Acta radiol. XXIX. Copenhagen, 1936.
- KELJSIR, S.: Nederl. tijdschr. v. geneesk. **79**, 2019, 1935.
- KREBS, C., RASK-NIELSEN, H. C. & WAGNER, A.: The origin of lymphosarcomatosis and its relation to other forms of leucosis in white mice. Suppl. Acta radiol. X. Stockholm, 1930.
- LACASSAGNE, A.: Compt. rend. Soc. de Biol. **121**, 607, 1936.
— Compt. rend. Soc. de Biol. **126**, 193, 1937.
— Bull. l'Assoc. Franc. p. l'Étud. du Cancer **27**, 96, 1938.
- LETTINGA, T. W.: De carcinogene werking van kleine doses 1:2:5:6-dibenzanthracen. Assen, 1937.

- LYNCH, C. J.: J. Exp. Med. **46**, 917, 1927.
— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **31**, 215, 1933.
— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **33**, 401, 1935.
— Am. J. Clin. Path. **6**, 293, 1936.
MAISIN, J. & COOLEN, M.-L.: Compt. rend. Soc. de Biol. **123**, 159, 1936.
MAISIN, J. & LIÉGOIS, P.: Compt. rend. Soc. de Biol. **114**, 536, 1933.
MCCOY HILL, F.: J. Cancer Res. **14**, 325, 1930.
MURPHY, J. B. & STURM, E.: J. Exp. Med. **42**, 693, 1925.
MØLLER, P.: Acta path. et microbiol. Scand. **1**, 412, 1924.
SCHABAD, L. M.: Compt. rend. Soc. de Biol. **99**, 1497, 1928.
— Ztschr. f. Krebsforsch. **30**, 24, 1930.
— Ztschr. f. Krebsforsch. **42**, 295, 1935.
— II. Internat. Cancer Congr. Bruxelles 1936 Bd. 2 p. 12.
SEELIG, M. G. & BENIGNUS, E. L.: Am. J. Cancer **28**, 96, 1936.
— Am. J. Cancer **33**, 549, 1938.
SHIMKIN, M. B.: Am. J. Cancer **35**, 538, 1939.
SIMONDS, J. P.: J. Cancer Res. **9**, 329, 1925.
TYZZER, E. E.: J. Med. Res. **17**, 155, 1907.
-
-

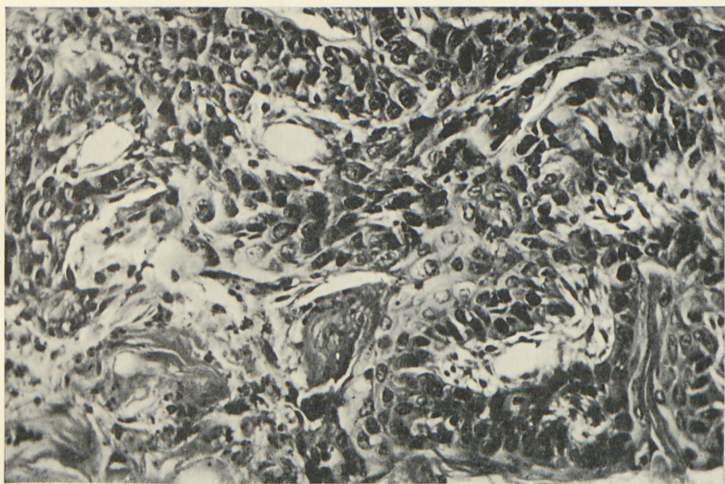


Fig. 1. Plattenepithelzellenkarzinom einer Maus, die mit Methylcholanthren gepinselt wurde ($\times 250$).

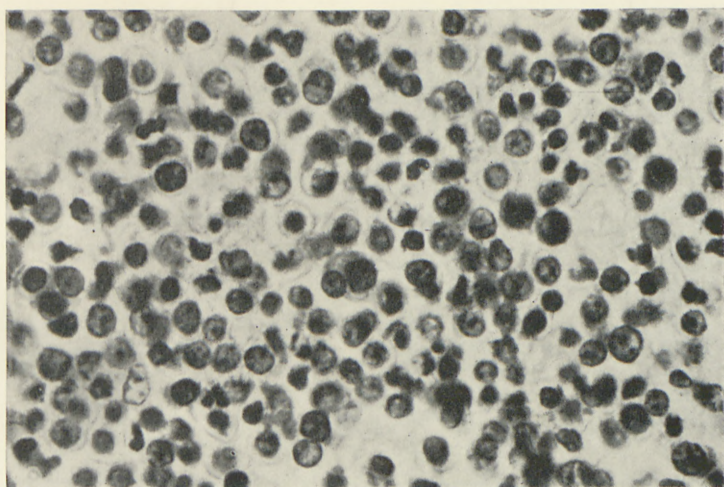


Fig. 2. Vermutlich vom Thymus ausgehendes Lymphoblastom einer Maus, die auf der Rückenhaul mit Methylcholanthren gepinselt wurde ($\times 1150$).

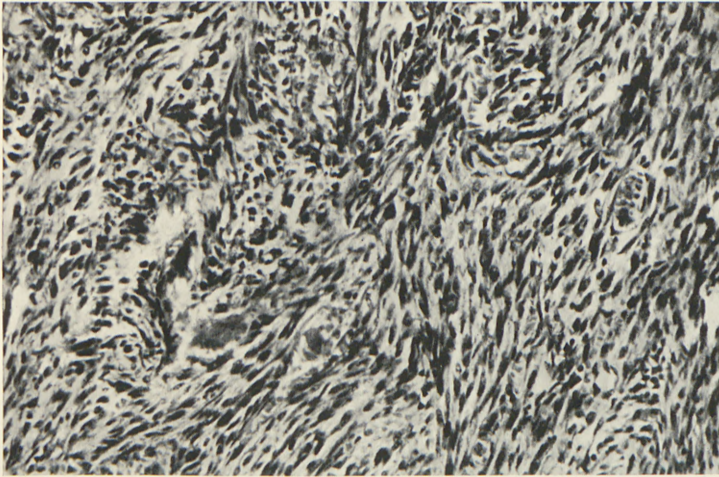


Fig. 3. Spindelzellensarkom einer Maus, der Methylcholanthren subkutan deponiert wurde ($\times 250$).

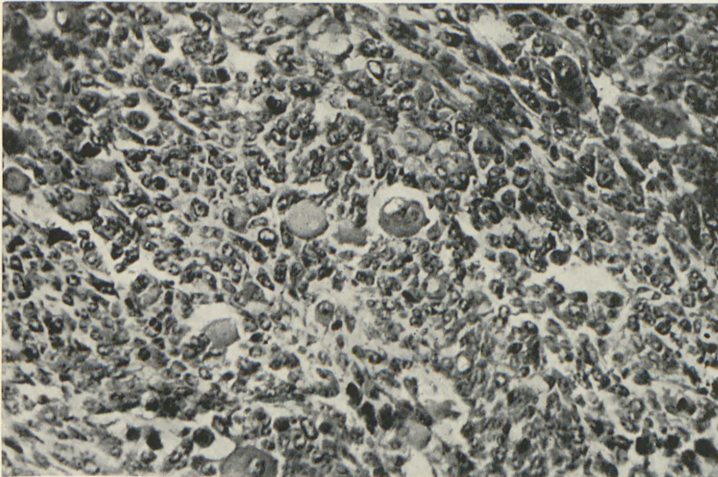


Fig. 4. Polymorphzelliges Sarkom einer Maus, der Methylcholanthren subkutan deponiert wurde ($\times 250$).

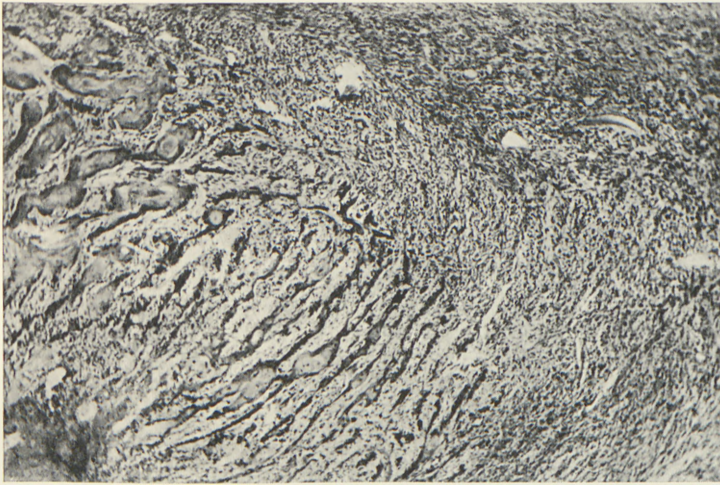


Fig. 5. Plattenepithelzellenkarzinom + Spindelzellensarkom, an der Berührungsstelle photographiert ($\times 70$).

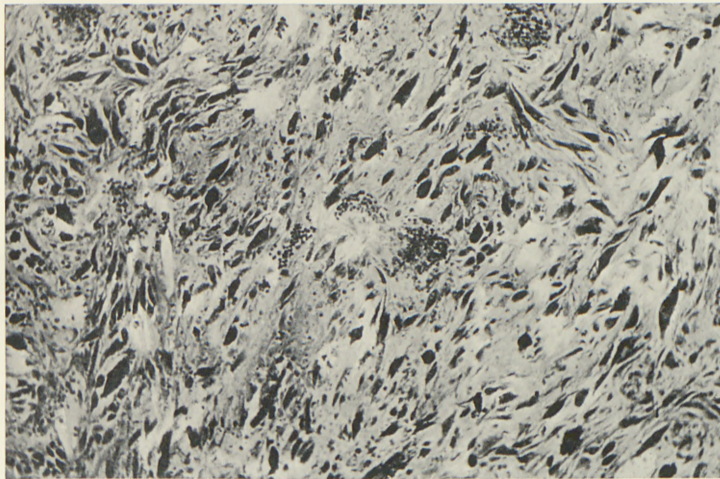
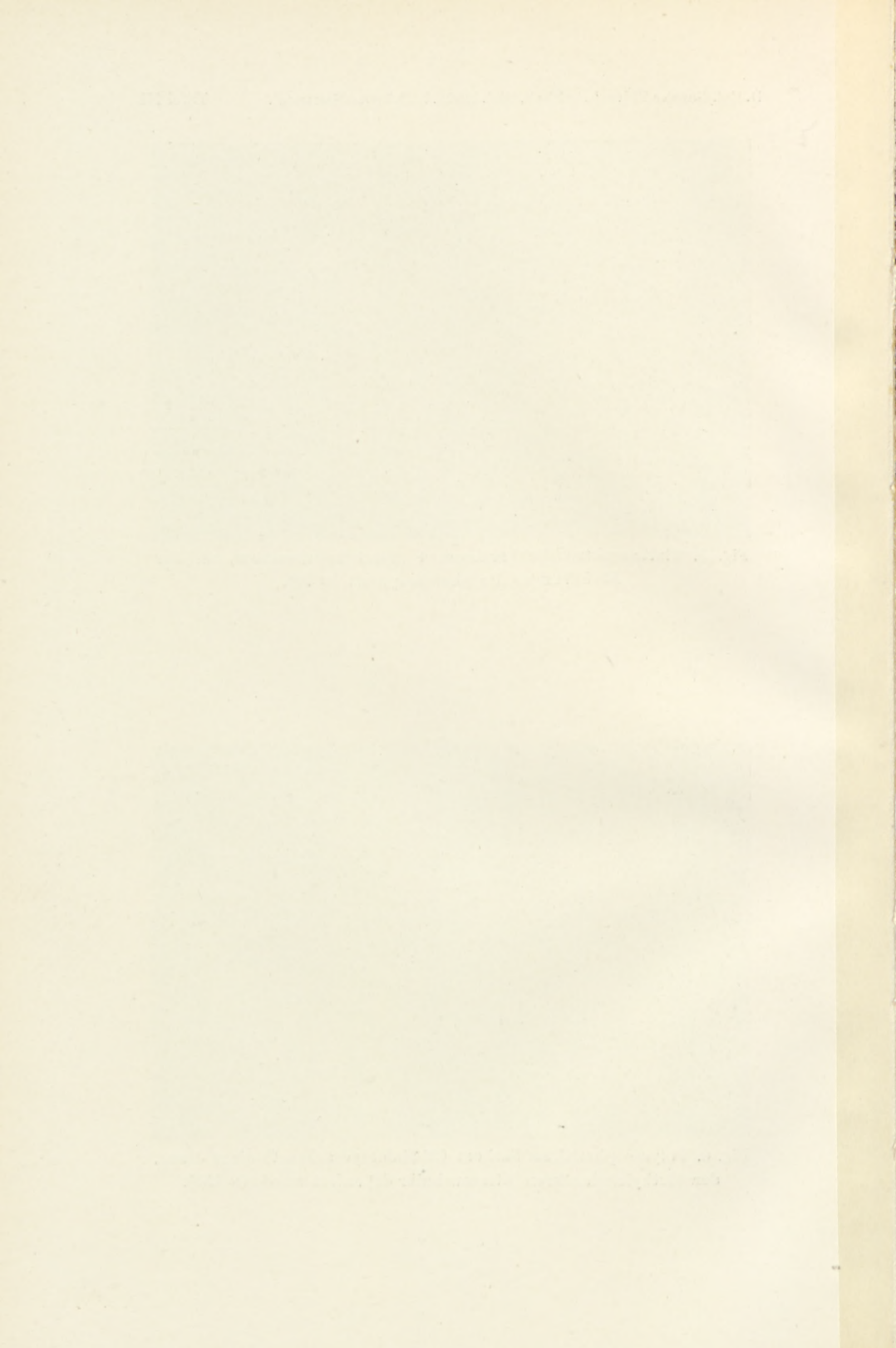


Fig. 6. Polymorphzelliges Sarkom (Rhabdomyosarkom?) einer Maus, der Methylcholanthren intramuskulär deponiert wurde ($\times 150$).



Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

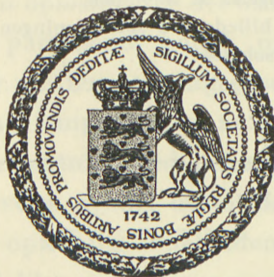
Biologiske Meddelelser **XVI**, 6.

AKTIV
IONOPTAGELSE HOS FLODKREPS
OG STRANDKRABBE

MED PÅVISNING AV IONOPTAGENDE CELLER

AV

KNUT SCHMIDT-NIELSEN



KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

INNHALDSFORTEGNELSE

	Side
Innledning	
De fysikalsk-kjemiske forhold ved osmotiske prosesser	3
Aktiv transport gjennom membraner	6
Oversikt over de osmotiske forhold hos vanddyr	7
Undersøkelser over flodkreps	
I. Tidligere undersøkelser	11
II. Egne undersøkelser	
Forsøksmetodikk	14
Forsøk over aktiv saltoptagelse	17
Differentieringen i den ionoptagende mekanisme	
a. Selektiv optagelse av kationer og anioner	18
b. De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne	23
Sammenfatning	28
Undersøkelser over strandkrabbe	
I. Tidligere undersøkelser	28
II. Egne undersøkelser	
Forsøksmetodikk	31
Strandkrabbens hypertoni i fortynnet saltvann	34
Den aktive saltoptagelse hos strandkrabben	36
Differentieringen i den saltoptagende mekanisme	
a. Selektiv optagelse av kationer og anioner	37
b. De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne	42
Sammenfatning	45
Sammenfattende bemerkninger	46
Påvisning av ionoptagende celler	
Tidligere resultater	49
Egne forsøk	51
Bevis for aktiv optagelse af sølvionen	52
Det makroskopiske bilde ved sølvfarging	53
Mikroskopisk undersøkelse	54
Sammenfatning	56
Literatur	57

INNLEDNING

Den store rolle det osmotiske trykk spiller for den levende celle blev først fremhevet av PFEFFER (1877), som utførte grunnleggende fysikalsk-kjemiske og plantefysiologiske arbeider. PFEFFER beskjeftiget sig med den betydning det osmotiske trykk har for saftspenningen i planter. Plante-celler kan meget vel ha et stort indre trykk, da de har en fast cellulosemembran. Før de dyriske celler gjelder helt andre forhold, da de i almindelighet ikke har noen fast membran. Før de forhold som da gjør sig gjeldende omtales, skal de almindelige osmotiske lover kort skisseres, samtidig som det redegjøres for den senere brukte terminologi.

De fysikalsk-kjemiske forhold ved osmotiske processer.

Enhver vandig oppløsning av et stoff har som bekjent et osmotisk trykk. I en oppløsning er det osmotiske trykks størrelse avhengig av partiklenes antall, men ikke av deres størrelse. (Innenfor de temperaturgrenser som tillater liv, er avhengigheten av temperaturen av så liten størrelse at den settes ut av betraktning ved behandling av biologiske forhold.) Ved angivelse av det osmotiske trykks størrelse, går man ut fra en oppløsning inneholdende 1 grammolekyl av et oppløst stoff i 1 liter vann. Denne oppløsning inneholder $6,06 \cdot 10^{23}$ molekyler av stoffet (LOSCHMIDT's tall), og det osmotiske trykk av denne oppløsning er 22,4 atmosfærer

(ved 0°). En sådan molar opløsning har en bestemt kokepunktsforhøielse ($0,521^\circ$), og likeledes en bestemt frysepunktsdepressjon ($1,86^\circ$). Denne siste har særlig betydning for biologiske forhold, da måling av frysepunktsdepressjonen tidligere var den best egnede metode til bestemmelse av osmotisk trykk i biologiske væsker (BECKMANN'S metode). Man finner derfor ofte, særlig i eldre avhandlinger, det osmotiske trykk angitt som frysepunktsdepressjon (betegnet med Δ) i grader.

Det blev nevnt at en opløsning inneholdende $6,06 \cdot 10^{23}$ partikler pr. liter vann har et osmotisk trykk på 22,4 atmosfærer. For stoffer som i vandig opløsning foreligger i dissociert tilstand gjelder det at de enkelte partiklers (ioners) antall og ikke molekylenes antall er bestemmende for det osmotiske trykk. Et molekyl NaCl dissociert i Na^+ og Cl^- vil derfor utøve det dobbelte osmotiske trykk, og et molekyl H_2SO_4 fullstendig dissociert i 2H^+ og SO_4^{2-} vil utøve det tredobbelte osmotiske trykk.

Da natriumklorid i vandig opløsning er nesten fullstendig dissociert, vil altså et grammolekyl NaCl oppløst i en liter vann utøve et osmotisk trykk på nesten $2 \cdot 22,4$ atmosfærer. I biologien er det nu almindelig å angi det osmotiske trykk som styrken av den natriumkloridopløsning som utøver et like stort osmotisk trykk. Man går da ut fra en opløsning inneholdende et grammolekyl NaCl pr. liter, en molar opløsning; men da de osmotiske trykk som finnes i biologiske væsker som regel ligger lavere, er det praktisk å bruke en mindre enhet. Man bruker $1/1000$ av den molare styrke, og angir væskens styrke i millimolaritet (mM). Denne betegnelsesmåte har mange teoretiske ulemper, bl. a. den at natriumklorid ikke er fullstendig dissociert i vandig opløsning. Derimot er den meget hensiktsmessig i eksperimentell

arbeide, og dette gjelder særlig nu når det osmotiske trykk nesten alltid bestemmes ved direkte sammenligning med kjente natriumkloridopløsninger (HILL's dampspenningsmetode). For de fleste arbeider kan man også se bort fra den lille feil som fremkommer ved at natriumkloridet ikke foreligger fullstendig dissociert, dette gjelder særlig hvor det dreier sig om relative verdier.

Ved å angi et stoffs konsentrasjon i millimolaritet, kan man straks se hvilken rolle det spiller for det samlede osmotiske trykk. En slik direkte sammenligning vil være umulig hvis stoffets konsentrasjon er oppgitt i prosent eller lignende, idet man da først må foreta en omregning hvor man skal kjenne stoffets molekylvekt. Hvis det dreier sig om flere stoffer i en oppløsning, og deres konsentrasjon kjennes i millimolaritet, kan deres osmotiske betydning også direkte sammenlignes. Disse fordeler er så iøinefallende at man nu mer og mer angir konsentrasjoner og osmotisk trykk i millimolaritet i biologiske arbeider over osmotiske forhold. Denne betegnelsesmåte er fullstendig gjennomført i det foreliggende arbeide. Hvor det er trukket sammenligninger med tidligere arbeider, er forfatterens resultater også såvidt mulig omregnet til millimolaritet for å gjøre en direkte sammenligning mulig.

De forhold som fremkommer når væsken på de to sider av en membran har forskjellig sammensetning, vil være avhengig av membranens karakter. Hvis vi betrakter en membran som er permeabel for salter og vann, vil en forskjell i osmotisk trykk forårsake: 1) En vanntransport fra den mindre koncentrerte til den mere koncentrerte oppløsning. 2) En transport av de oppløste salter fra den mer koncentrerte oppløsning til den mindre koncentrerte. Er det samme stoff i oppløsningen på begge sider, foregår trans-

porten til det har innstilt sig en likevekt med samme kon-
entrasjon på begge sider (forutsatt at det hydrostatiske
trykk er det samme). Er det forskjellige stoffer eller samme
stoffer i forskjellig forhold på de to sider, innstiller like-
vekten sig for hvert stoff, forutsatt at membranen er per-
meabel for de stoffer det dreier sig om. Er membranen ikke
gjennemtregelig for alle stoffene (hvis det f. eks. er en
blanding av salter og kolloide eggehvitestoffer som i plasma),
innstiller det sig en mere komplisert likevektstilstand, en
Donnanlikevekt. Det samlede osmotiske trykk vil være det
samme på begge sider av membranen, på den side hvor
kolloidene er, vil de diffusible stoffer derfor foreligge i en
tilsvarende lavere konentrasjon. Da eggehvitestoffene i al-
mindelighet utøver en meget liten del av det samlede osmo-
tiske trykk i biologiske væsker, vil de forskjeller som opstår
i konentrasjonen for de øvrige stoffer på grunn av Donnan-
likevekten i almindelighet ikke være av vesentlig praktisk
betydning for de forhold som skal behandles i det forelig-
gende arbeide.

Aktiv transport gjennom membraner.

De nu omtalte forhold gjelder den fysikalske transport
gjennom den ikke levende membran. Det er utført et stort
teoretisk og praktisk arbeide over membranpermeabilitet og
stofftransport gjennom livløse membraner, hvor det er tatt
hensyn til partiklenes og membranenes elektriske ladning
o. s. v. Man kan kalle dette en passiv transport i motsetning
til den aktive transport som i visse tilfeller kan foregå gjen-
nem levende membraner, hvor aktive celleprocesser deltar
i transporten under forbruk av energi.

For å undersøke den aktive transport, foretas under-
søkelser av forskytninger i konentrasjonen på den ene

eller begge sider av membranen. Kriterium for en aktiv transport er at den transport som har foregått ikke kan forklares ved de simple fysiske forhold. Hvis det således har foregått en stofftransport til det mer koncentrerte medium, eller en vanntransport til det mindre koncentrerte medium, er det en aktiv transport.

Sådanne aktive stofftransporter i retning mot de osmotiske krefter er kjent i en rekke tilfeller. Transporten av salter fra de tynne oppløsninger som omgir planterøtter og inn i disse, transport gjennom tarmveggen, transport i visse avsnitt av nyren, transport av salter fra de tynne oppløsninger i ferskvann til det mer koncentrerte medium i blodet av et vanndyr, er eksempler på sådanne aktive transporters.

Nærmere klarleggelse av disse aktive transportmekanismers virkemåte foreligger ikke. Eksperimenteltt arbeide som har vært forsøkt, har ikke ført frem. Teorier for mulige forklaringer av den aktive transport er fremsatt, bl. a. av OSTERHOUT (1933) og LUNDEGÅRDH (1937) (begge botanikere), og av INGRAHAM og VISSCHER (1937) (for den aktive transport gjennom tarmveggen hos pattedyr).

Det er funksjonen av de transportmekanismer som finnes i vanndyrenes integument, som i det foreliggende arbeide er gjort til gjenstand for nærmere studium. Det manglende kjennskap til processenes natur, hindrer ikke undersøkelse av mekanismenes funksjon.

Oversikt over de osmotiske forhold hos vanndyr.

De osmotiske problemer som foreligger for vanndyr, skal i det følgende kort gjennomgås.

Da vanndyrenes overflate, eller iallfall en del av den i almindelighet er noget gjennemtregelig for vann og oppløste stoffer, vil der gjennom denne membran foregå osmotiske

processer. Det gjelder for alle vanndyr at de har respiratoriske flater som er permeable for surstoff og kulldioksyd. Det kan dreie sig om hele overflaten (mange mindre organismer), eller overflaten av særlig utviklede gjeller. En membran med respiratorisk betydning må være relativt tynn, og skal den være lett gjennemtregelig for i vann oppløste gasser, kan den vanskelig tenkes impermeabel for vann og salter. (At en membran kan være noget permeabel for surstoff, og samtidig helt uigjennemtregelig for vann, er vist av KROGH og USSING (1937) på ørretegg i den første periode efter befruktningen, hvor deres surstoffbehov er meget lite.)

Da organismenes indre medium alltid avviker noget fra det omgivende medium i sammensetning, vil det foregå osmotiske prosesser gjennom overflaten som søker å utjevne denne forskjell, mens organismen selv søker å opprettholde den. De forhold som gjør sig gjeldende for en del forskjellige dyr, skal kort omtales i det følgende. Det er her umulig å følge den systematiske inndeling av dyregruppene, en mere oversiktlig fremstilling fremkommer ved en inndeling efter de økologiske forhold. Det er nemlig helt forskjellige problemer som oppstår for organismer som lever i ferskvann og saltvann.

De problemer som reiser sig for ferskvannsorganismene er lettest å overse, og skal derfor omtales først. Disse organismers osmotiske konsentrasjon er høiere enn det omgivende vann, og denne forskjell vil forårsake: 1) Et salttap for organismen på grunn av den osmotiske transport fra blodet til det omgivende vann, og 2) en osmotisk innstrømming av vann.

Overskuddet av vann skal elimineres, — det kan skje gjennom nyrene, og her oppstår igjen et salttap, idet intet

nyreorgan er i stand til å utskille rent vann. Disse osmotiske problemer er de samme for alle ferskvannsdyr; men størrelsen av de enkelte prosesser vil naturligvis variere med en rekke forhold, som overflatens størrelse, dens gjennemtregelighet, konsentrasjonsforskjellen, nyrens effektivitet o. s. v.

Av de to osmotiske prosesser som organismen må motarbeide, nevntes det at overskudd av vann kan elimineres gjennom nyreorganene. Vi har nu det forhold at organismen på tross av et stadig salttap skal oprettholde en konstant saltkonsentrasjon. Dette kan skje på to måter, enten a) at de nødvendige salter foreligger i tilstrekkelig mengde i føden og optas fra tarmen, eller b) at organismen har særlige mekanismer til å opta salter fra de meget lave konsentrasjoner som foreligger i ferskvann.

Det er påvist eksperimentelt at begge disse muligheter virkelig forekommer. For å klarlegge forholdene skal et par eksempler nevnes. Mange individer av den almindelige ål (*Anguilla vulgaris*) tilbringer en vesentlig del av sitt liv i ferskvann. KROGH (1937) har undersøkt ålens osmotiske regulasjon i ferskvann. Resultatene er at ålen dekker sitt salttap gjennom næringen, og det har ikke vært mulig å påvise at den kan skaffe sig de nødvendige salter på noen annen måte. For en lang rekke ferskvannsorganismer er det derimot funnet at de har evnen til å opta salter fra ferskvann. Som eksempel kan nevnes gullfisk (*Carassius auratus*) hvor KROGH (1937) har vist at det skjer en optagelse av salter i gjellene, således at de er i stand til å oprettholde sin saltkonsentrasjon på tross av det stadige tap, selv om de ikke får føde. Det er ingen grunn til at alle de organismer hvor sådanne optagelsesmekanismer er funnet, ikke også skulde kunne utnytte de salter som fore-

kommer i føden, men de er altså for sin saltregulering uavhengig av føden. En lang rekke organismer, særlig evertebrater, er da også i stand til å sulte i meget lange perioder.

For saltvannsdyrene er forholdene fullstendig anderledes, da de lever i et medium som er sterkt osmotisk koncentrert. Her må evertebrater og benfisk behandles hver for sig (bruskfisk viser noenlunde samme forhold som evertebratene). Evertebratene er nemlig i de fleste tilfeller i osmotisk likevekt med det omgivende vann, mens benfiskene har et osmotisk trykk som ligger vesentlig under havvannets, i størrelsesorden på $\frac{1}{3}$ av dette.

Det har meget lenge vært kjent at de marine evertebrater er poikilosmotiske, d. v. s. deres osmotiske trykk svinger med det omgivende vann. Det finnes saltvannsorganismer som bare tåler meget små forandringer i vannets saltholdighet, det er de utpreget stenohaline saltvannsdyr. Andre tåler større variasjoner i saltholdigheten, de er euryhaline. Dette gjelder særlig organismer som lever i kystfarvann, og mange kan tåle variasjoner i blodets saltholdighet på f. eks. ned til $\frac{1}{3}$. Men det har vist sig at en rekke av de organismer som kan tåle lave saltholdigheter, og særlig de som trenger inn i brakkvann, har en evne til å opprettholde et høiere osmotisk trykk enn det omgivende vann. Ved sterkere fall i ytterkoncentrasjonen er de altså ikke mer strengt poikilosmotiske. Prinsipielt blir da forholdene for deres vann- og saltomsetning de samme som for ferskvannsdyr, en osmotisk innstrømning av vann og et osmotisk salttap. De har også de samme midler til å motvirke dette, nemlig vanneliminasjon gjennom nyrene og aktiv optagelse av salter fra det omgivende vann. Evnen til å opprettholde det osmotiske trykk er hos noen saltvannsdyr så sterkt utviklet at de ikke bare tåler meget saltfattig brakkvann (f. eks. i den Botniske

bukt), men endog kan trenge helt inn i ferskvann. Et velkjent eksempel er at skrubben ofte trenger langt op i elver, langt høiere op enn saltvann fra flodbølgen kan nå.

De marine benfisker holder en lavere osmotisk konsentrasjon enn det omgivende vann, og forholdene blir da det rent motsatte av forholdene for ferskvannsorganismene. De er utsatt for en osmotisk transport av salt innad, og et osmotisk vanntap til det mer koncentrerte havvann. Begge processer forårsaker en konservering av blodet. Det er vist at vanntapet kan dekkes ved at fiskene drikker av det omgivende saltvann (HOMER SMITH 1930). Det eiendommelige ved dette er at ikke bare vannet, men også saltene optas fra tarmen, og gir en videre økning av saltene i blodet. Man kunde tenke sig at dette overskudd av salt kunde utskilles gjennom nyrene, og det kan sikkert også finne sted. Men det viser sig at en hel del fisker normalt har svakt hypotonisk urin, og saltoverskuddet må derfor utskilles på en annen måte. Svarende til dette er det vist for ålen at den utskiller salt gjennom gjellene så snart konsentrasjonen utenfor overstiger blodets (KEYS 1931, SCHLIEPER 1933). Sannsynligvis har andre fisker lignende mekanismer.

Undersøkelse av de osmoregulatoriske mekanismer hos flodkreps.

I. Tidligere undersøkelser over flodkrepsen.

Før de undersøkelser som forfatteren utførte over de osmoregulatoriske mekanismer hos flodkrepsen (*Potamobius fluviatilis*) omtales nærmere, skal noen av de arbeider som tidligere er utført over flodkrepsens osmotiske forhold omtales.

Den som først gjorde opmerksom på at flodkrepsen har et osmotisk trykk i blodet som ligger langt over ferskvannets var FREDERICQ (1898). Flere forskere har forsøkt å overføre flodkreps til saltvann, og har konstatert at den ikke kan akklimatiseres til almindelig havvann. Den første mer systematiske undersøkelse over dette blev foretatt av FRANZISKA HERRMANN (1931) som ledd i en lang rekke undersøkelser som fremkom under ledelse av SCHLIEPER (Marburg). HERRMANN'S undersøkelser synes å vise at det er en aktiv saltoptagelse hos flodkrepsen, og den mulighet nevner hun også selv. Men det synes ikke som om problemstillingen med en aktiv saltoptagelse med koncentration i blodet på dette tidspunkt er fullt klar. EVA BERGER (1931) beskjeftiget sig også med overføring av flodkreps til fortynnet saltvann, og til destillert vann, og har fulgt forandringene i blodets saltinnhold under disse forhold. De forandringer som inntreer er at blodets saltinnhold stiger med stigende konsentrasjon i det omgivende vann, og at blodets konsentrasjon faller i destillert vann. En av hennes konklusjoner er at overflaten er permeabel for vann og ioner, mens SCHOLLES (1933) påpeker at denne konklusjon ikke er absolutt riktig da BERGER ikke har tatt hensyn til muligheten av eliminasjon av en saltholdig urin. SCHOLLES anser forøvrig at vevene har depoter av salt, som hindrer sterke fall i blodets konsentrasjon. Hans forsøk viser i virkeligheten ikke meget, da han ikke har vært opmerksom på muligheten for en aktiv saltoptagelse. SCHWABE (1933) påviser at det normalt med konstant ytre medium forekommer store svingninger i blodets konsentrasjon, f. eks. i forbindelse med sult, egglegging, skallskifte o. s. v. SCHWABE beskjeftiger sig også med stoffskiftet i forskjellig koncentrert medium, og viser at flodkrepsen får 25% lavere stoffskifte i

blodisotonisk saltvann. Dette tydes som at det større stoffskifte i ferskvann er det arbeide som er nødvendig for å oprettholde den sterke hypertoni. SCHWABE's konklusjon er altså at osmoreguleringen fordrer energi (hvor meget forsøkene i virkeligheten viser, blir ikke nærmere diskutert på dette sted), og har neppe vært i tvil om at det skjer en aktiv regulering. Men en uttalelse av HUF (1933) synes å vise at det vesentlige problem, en aktiv saltoptagelse, ikke er klart på dette tidspunkt: »Aus welchen Quellen aber die dauernden Verluste an Salz unter ganz normalen Verhältnissen gedeckt werden, bleibt vor der Hand unklar.« HUF har ellers vist at flodkrepsen dør i destillert vann når blodets kloridinnhold er sunket 30—35%; men hvis dyret i tide flyttes over til almindelig ferskvann klarer det sig.

BOGUCKI (1934) utførte en rekke analyser av mineralbestanddelene i blodet hos flodkrepsen i forskjellig ytre medium, og viste at selv om blodets konsentrasjon stiger i saltvann, skjer det en aktiv regulering av de enkelte bestanddeler. I 50% saltvann er blodet isotonisk med det omgivende vann, men f. eks. magnesiumkonsentrasjonen i blodet holdes betydelig under den ytre konsentrasjon. Det fremgår ikke av BOGUCKI's arbeide hvordan den betydelige forskjell mellom det ytre og det indre medium oprettholdes, han nevner som muligheter: 1) Legemsoverflatens forskjellige permeabilitet for forskjellige ioner, 2) Antennekjertelens ekskresjonsfunksjon, og 3) At vevene optar visse av blodets bestanddeler. Muligheten av en aktiv absorpsjon av visse ioner fra det ytre medium nevnes overhodet ikke.

ERNA WIDMANN (1935) har undersøkt en lang rekke krustaceer, og har funnet årlige svingninger i blodets osmotiske konsentrasjon, i et tilfelle (*Porcellio*) vistes det eksperimentelt at svingningene skyltes temperaturen.

I 1936 foretok KROGH noen forberedende forsøk med flodkreps. Disse forsøk viste at den har evne til aktivt å opta salter fra det omgivende vann; men disse forsøk blev ikke fullført, og publisertes først i KROGH's monografi over osmotisk regulasjon hos vanndyr (1939).

Foruten de her nevnte arbeider foreligger det en del som har behandlet forskjellige forhold som mere perifert berører problemene om den aktive saltoptagelse hos flodkrepsen. Det gjelder arbeider over nyrefunksjon, permeabilitet av integumentet o. l.

II. Egne undersøkelser.

Forsøksmetodikk.

Det principp som i det foreliggende arbeide er brukt for å påvise en aktiv salt- (eller ion-) optagende mekanisme, er å bringe forsøksdyrets saltinnhold noget ned under det normale, — når mekanismene derefter optar ioner, vil konsentrasjonen i blodet stige og konsentrasjonen i yttervæsken synke. Man kan ved hjelp av analyser følge forandringene begge steder, men ofte vil det ene være tilstrekkelig. Har det skjedd en transport fra den lavere konsentrasjon i omgivelsene til en høiere konsentrasjon i blodet må det, som nevnt i innledningen, være en aktiv optagelse.

Saltkonsentrasjonen i blodet hos flodkrepsen kan man bringe ned ved å sette den i destillert vann. Den vil da på grunn av de osmotiske prosesser miste noget salter til vannet. De optagende mekanismer vil søke å opta av disse salter igjen, men deres effektivitet er ikke så stor at de kan bringe konsentrasjonen i vannet ned til null, det vil bli en likevekt ved en meget lav konsentrasjon i vannet (ca. 0,01—0,02 mM), hvor saltoptagelsen dekker salttapet. Hvis man

bytter det destillerte vann med visse mellomrum (f. eks. 1 døgn), kan man på denne måten opnå å »vaske ut« en del av saltene i en kreps.

En mere bekvem fremgangsmåte for utvaskning er det å la en jevn strøm av destillert vann passere krepsen med passende hastighet.

Salttapet følges lettest ved kloridbestemmelser i utvaskningsvannet. Som eksempel på gangen i en utvaskning, kan nevnes resultater som fantes ved å bestemme salttapet på den nevnte måten, når en kreps blev utvasket med en vannpassasje på 0,2 liter/time (tabell 1).

Tab. 1. Forsøk utført ²⁻⁷/₉ 1939.

Utvaskning av flodkreps. Vannpassasje: 0,2 l/time.

	Tidspunkt for vannprøven	Cl-konc. i vannet
1. dag	kl. 9.20 Utvaskning beg.
	kl. 9.45.....	0,007 mM
	kl. 10.20.....	0,010 -
	kl. 13.05.....	0,0125 -
	kl. 14.45.....	0,0135 -
	kl. 15.15.....	0,0125 -
2. dag	kl. 20.00.....	0,014 -
	kl. 11.00.....	0,013 -
3. dag	kl. 9.00.....	0,0125 -
	kl. 20.00.....	0,0095 -
4. dag	kl. 9.00.....	0,0085 -
	kl. 16.00.....	0,014 -
5. dag	kl. 8.00.....	0,011 -
6. dag	kl. 10.30.....	0,017 -

Man ser at størrelsesordenen av salttapet er temmelig konstant, og de variasjoner som finnes er tilsynelatende helt uregelmessige. Det må tilføies at dette likesom alle andre forsøk er gjort med dyr som har sultet i noen tid, opptil flere uker, for å forhindre at optagelse fra tarmen eller forurening av yttervæsken med ekskrementer skal kunne spille inn.

Lignende verdier for kloridmengden i utvaskningsvann er til stadighet funnet for de andre kreps, så det nevnte eksempel representerer de verdier som normalt fremkommer når en kreps settes i destillert vann.

Den metode som blev brukt til kloridbestemmelsene, er opprinnelig utarbeidet som mikrometode av REHBERG (1926). Den blev siden modifisert av SCHNOHR (1934) for bestemmelser i blod og plasma, og er beregnet til bruk på 0,1 ml menneskeplasma.

Metodens prinsipp er å felle kloridene med en kjent mengde sølvnitrat, og bestemme den overskytende mengde sølv ved titrering med tiocyanat (rhodanid).

Hele analysen foretas i et analyseglass som også brukes til en rekke andre mikroanalyser, — det er spisst for at bunnfall skal kunne samles ved centrifugering, og har en innsnevring for å kunne henges op i burettestativet.

Prøven avpipetteres direkte i glasset. Det tilsettes en avmålt mengde (0,5 ml) AgNO_3 oppløst i $\frac{4}{5}$ konc. HNO_3 (5,75 g/l). Prøven ophetes så på vannbad, de organiske stoffer destrueres herved av salpetersyren. Hvis det viser sig at destruksjonen går langsomt, kan det tilsettes et par dråper H_2O_2 . Dette har ingen innflytelse på analysens gang. Etter avkjøling av den nu praktisk talt farveløse prøve, tilsettes ca. 0,1 ml jernammoniumsulfat (mettet opl.) som indikator, og 1 ml eter. Titreringen foregår med en Rehberg kvikksølvburette som rummer 200 mm³. Glasset ophenges i stativet således at burettespissen stikker gjennom eterlaget ned i væsken. Omrøring foregår ved gjennomledning av en svak luftstrøm. Eterlaget vil ved denne blanding opta bunnfallet, og titreringen utføres i helt klar væske til det fremkommer en svak rosafarve ved tilsetning av et minimalt overskudd av ammoniumtiocyanat fra buretten. Avlesningen av buretten skjer lettest med en avleserlupe. Metodens nøiaktighet er meget god, almindelig ca. 0,5 relative %, og kan ved særlige forholdsregler bringes op til 1 : 20 000 (KEYS 1931).

Ved analyse på væsker med forskjellige konsentrasjoner, avpipetteres volumina som gir en passende kloridmengde. Den samlede kloridmengde må ligge under 15 μ Mol (= 0,9 mg), svarende til 0,1 ml 150 mM væske. De bør ikke være vesentlig under $\frac{1}{10}$ av dette, da nøiaktigheten så blir mindre. Ved analyse på meget tynne oppløsninger (f. eks. utvaskningsvann) benyttes en inndamp-

ningskolbe (KROGH 1937), hvor analysen efter inddampning av større prøver (f. eks. 100 ml) til ca. 1 ml volum, føres videre som vanlig, idet den nederste del av samme kolbe benyttes som analyseglass. Man undgår derved enhver overføring av analysen til annet glass, en fordel av uhyre betydning for mikroanalyser.

Forsøk over aktiv saltoptagelse.

Ved forberedende forsøk viste det sig at flodkrepsen har evne til aktiv optagelse av salt fra almindelig ferskvann, og resultatene av KROGH's forsøk blev således bekreftet. Protokollene fra forsøk med en enkelt kreps skal anføres som eksempel, da det også viser hvor effektiv optagelsen er, d. v. s. hvor langt ned krepsen kan bringe yttervæskens konsentrasjon.

Tab. 2. Forsøk nr. 9. $3^{-6}/_{10}$ 1939.

Kreps utvasket med 60 liter destillert vann (dens salttap beregnes til et fall på ca. 30 mM i blodet). Blodets konsentrasjon hos krepsen er før utvaskningen ca. 190 mM. Overført til ledningsvann fortynnet til $1/_{10}$ med destillert vann (200 ml).

Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken
1. dag kl. 17 ved forsøkets begynnelse	0,235 mM
4. dag kl. 9	0,0885 -

Dette viser aktiv optagelse fra vann med kloridmengde som svarer til det almindelige i norske vann og elver (f. eks. Drammenselven ca. 0,2 mM).

Forsøket fortsattes umiddelbart med å sette samme kreps i en oppløsning av rent NaCl (110 ml).

Tab. 3. Forsøk nr. 10. $6^{-13}/_{10}$ 1939.

Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken
1. dag kl. 16 ved forsøkets begynnelse	0,100 mM
7. dag kl. 11.30	0,0154 (\pm 0,0005)

Her ser man at krepsen er i stand til å redusere klorid-koncentrasjonen i oppløsningen ned til de samme verdier som man får når en kreps utvaskes med destillert vann (se tab. 1, side 15). Man har derfor grunn til å slutte at når en kreps settes i destillert vann, skyldes den saltkoncentrasjon som fremkommer i vannet en balance mellom optagelsen og det stadige salttap. Grensen nedad er nådd ved at de optagende mekanismer ved denne koncentrasjon akkurat klarer å holde salttapet kompensert. Til sammenligning av mekanismens effektivitet kan anføres at den nederste grense som ved lignende forsøk kan nås av ullhåndskrabben (*Eriocheir sinensis*) er ca. 0,3 mM (KROGH 1938).

De her omtalte forsøk dokumenterer fullt ut at flodkrepsen har evnen til aktiv saltoptagelse fra det omgivende vann. Det er sannsynlig at mekanismen er lokalisert i gjellene; men på dette tidspunkt blev det ikke nærmere undersøkt, da det ikke er av prinsipiell betydning for studiet av mekanismens funksjon.

Differentieringen i den ionoptagende mekanisme.

a) *Selektiv optagelse av kationer og anioner.*

Det var planen å undersøke om kationen og anionen i et salt kan optas uavhengig av hverandre, eller om de må optas samtidig og følge hverandre.

Den svenske botaniker LUNDEGÅRDH (1937) har med meget hell undersøkt optagelsen av salter av plantenes røtter. Han har vist at anionen optas aktivt av røttene under forbruk av bestemte energimengder. Kationene følger så med på grunn av de elektrostatiske krefter. Det foreligger dog forsøk som tyder på at forholdene ikke alltid er så enkle hos planter (COLLANDER 1937).

Hos dyr har KROGH (1938) undersøkt mekanismen for

saltoptagelse hos ullhåndskrabben, og har funnet at kationer og anioner optas uavhengig av hverandre. En kation kan således meget vel optas uten at det samtidig må optas en anion, og omvendt. Princippet skal forklares her, da det samme er benyttet til undersøkelsen av flodkrepsen.

1) Bevis for selektiv optagelse av kationer. Settes en utvasket ullhåndskrabbe i en oppløsning av natriumsulfat, Na_2SO_4 , vil den opta natriumionen selektivt, konsentrasjonen av Na^+ i oppløsningen vil synke, men konsentrasjonen av $\text{SO}_4^{\ddot{-}}$ -ionen vil forbli uforandret. Oppløsningens innhold av natrium var naturligvis lavere enn blodets, så det virkelig forelå en aktiv transport av natriumionen mot konsentrasjonsforskjellen. Na^+ -ionen er således optatt aktivt uten at det samtidig er fulgt noen anion med, og her foreligger det altså en aktiv selektiv kationoptagelse. Kontrollforsøk blev utført ved å vise at konsentrasjonen av natrium i blodet virkelig er steget, mens sulfatmengden er uforandret. Lignende forsøk med optagelse fra natriumkarbonatopløsninger kan også utføres. Kontrollen av anionens forhold er her vanskelig å gjennomføre, da forsøksdyret hele tiden produserer kullsyre; men en aktiv transport av $\text{CO}_3^{\ddot{-}}$ -ionen innad er utenkelig da gjelleoverflaten a priori er fritt gjennemtregelig for oppløst CO_2 .

2) Bevis for selektiv optagelse av anioner. Forsøkene med selektiv optagelse av anioner er gjort efter lignende prinsipp. Optagelse av ammoniumionen, NH_4^+ , finner ikke sted, og optagelse av kalciumionen finner bare sted under særlige forhold. Kan man således fra ammoniumklorid- eller kalciumkloridopløsninger påvise en optagelse av Cl^- -ionen uten at en tilsvarende mengde av kationen fjernes fra oppløsningen, har man beviset for en selektiv anionoptagende mekanisme.

Egne forsøk.

Forsøkene med påvisning av en kationoptagende mekanisme hos flodkrepsen utførtes etter de ovenfor omtalte prinsipper. Derfor refereres forsøkene bare ganske kort.

Tab. 4. Forsøk nr. 11. ¹³⁻¹⁴/₁₀ 1939.

Utvasket kreps satt i 50 ml NaHCO₃-opløsning.

Tidspunkt for prøvetagning	Na-konc i væsken
1. dag kl. 11.45 ved forsøkets begynnelse	2,04 mM
2. dag kl. 14.00	1,32 -

Tab. 5. Forsøk nr. 13. ¹³⁻¹⁷/₁₀ 1939.

Utvasket kreps satt i 50 ml NaHCO₃-opløsning.

Tidspunkt for prøvetagning	Na-konc i væsken
1. dag kl. 11.45 ved forsøkets begynnelse	2,14 mM
2. dag kl. 14.00	2,06 -
5. dag kl. 19.30	1,62 -

Begge disse forsøk viser et tydelig fall i natriummengden i oppløsningen. Dyrene har således optatt natrium fra en oppløsning hvor de ikke aktivt kan opta anionen.

For analysen av disse oppløsninger blev det utarbeidet en meget enkel metodikk. De almindelige natriumbestemmelser er ellers meget kompliserte. Det finnes få natriumsalter som er relativt uopløselige, og den analytiske felling og bestemmelse av natrium er derfor meget vanskelig og beheftet med store feilmuligheter. I de oppløsninger som bruktes i de omtalte forsøk, fantes det at natrium kunde bestemmes med tilstrekkelig nøiaktighet ved en meget enkel fremgangsmåte.

Prøvene inndampes med koncentrert saltsyre på glycerinbad, og ophetes siden i elektrisk ovn til 400°. Herved blir natriumsaltene omdannet til klorider, og overskytende saltsyre avdampes. Eventuelt dannet ammoniumklorid (krepsene utskiller alltid noget ammoniak), vil ved den høie temperatur sublimeres. En vanlig kloridtitrering vil derfor gi natriummengden i prøven. Fremgangsmåten gav uten særlige forholdsregler meget gode og sikre resultater.

Som kontroll på de omtalte forsøk utførtes også forsøk med optagelse av natrium fra natriumsulfat.

Tab. 6. Forsøk nr. 18. ¹⁰⁻¹¹/₁₁ 1939.

Utvasket krepse satt i 50 ml Na₂SO₄-opløsning.

Tidspunkt for prøvetagning	Na-konc i væsken
1. dag kl. 13.05 ved forsøkets begynnelse	1,04 mM
2. dag kl. 10.35.....	0,78 -

Dette gir fullstendig bekræftelse av at flodkrepse kan opta Na⁺-ionen fra en oppløsning hvor den ikke aktivt kan opta anionen.

Natriumanalysene kunde i disse oppløsninger ikke utføres på den nettop omtalte måte, da svovelsyreresten ikke lett lar sig fjerne med saltsyre. Bestemmelsen blev foretatt efter en modifikasjon av LINDERSTRØM-LANG's metode (1936), som blir beskrevet senere.

Forsøkene med påvisning av en selektiv anionoptagende mekanisme utførtes også efter de prinsipper som det blev omtalt at KROGH har brukt. Til forsøkene bruktes ammoniumkloridopløsninger.

I tabell 7 sees forsøksprotokollen for en utvasket krepse som er satt i 60 ml NH₄Cl-oppløsning. Man ser av dette forsøk at det de to første dager bare er mindre forandringer i kloridmengden i væsken. Den tredje dag setter inn med en kraftig reduksjon av kloridkonsentrasjonen, som ialt reduseres fra 2,00 mM til 0,60 mM. Samtidig bestemmelse av NH₃-mengden gav det resultat at denne blev redusert fra 2,00 mM til 1,84 mM. Fallet svarer ikke på noen måte til det store fall i kloridmengden, men er lett forklarlig. Krepse's gjeller er gjennemtregelige for oppløst NH₃, og ammoniakken vil derfor diffundere inn til den foreligger i samme konsentrasjon i blodet som i yttervæsken. At konsentrasjonen

Tab. 7. Forsøk nr. 2. 7-11/9 1939.

Utvasket kreps satt i 60 ml NH_4Cl -opløsning.

	Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken	NH_4 -konc i væsken
1. dag	{ kl. 15.40.....	2,00 mM	2,00 mM
	{ kl. 16.00.....	1,95 -	...
	{ kl. 17.15.....	1,90 -	...
	{ kl. 22.00.....	1,95 -	...
2. dag	kl. 11.00.....	2,10 -	...
3. dag	{ kl. 14.30.....	1,20 -	...
	{ kl. 22.30.....	1,10 -	...
5. dag	kl. 11.00.....	0,60 -	1,84 -

i yttervæsken ikke faller så meget som man kunde beregne av forholdet mellem yttervæsken og vannfasen i dyret, skyldes at krepsen hele tiden utskiller noget ammoniak.

Tab. 8. Forsøk nr. 14. 18-19/10 1939.

Utvasket kreps satt i 60 ml NH_4Cl -opløsning.

	Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken	NH_4 -konc i væsken
1. dag	{ kl. 13.50.....	1,00 mM	1,00 mM
	{ kl. 20.00.....	0,64 -	...
2. dag	kl. 10.15.....	0,18 -	2,88 -

Dette forsøk viser likesom det foregående at det eksisterer en selektiv anionoptagende mekanisme hos flodkrepsen, d. v. s. anioner kan optas aktivt uten samtidig å følges av en kation.

Ved ammoniakbestemmelsen bruktes det av KROGH (1934) konstruerte vakuumdestillasjonsapparat. Destillasjonen foregår under lavt trykk, og derfor kommer destillasjonskolben i kok allerede ved ca. 30° . En meget svak luftstrøm ledes gjennom for å drive ut ammoniakken, og destillatet opsamles i et forlag med en avmålt mengde syre. Etter 2—3 minutters destillasjon er all ammoniak destillert over, og den overskytende mengde syre i forlaget bestemmes ved retitrering med natriumhydroksyd fra en Rehberg mikroburette. Metoden er beskrevet for en kapasitet på 0,05—2 γ , men kapasiteten kan økes ved å øke syremengden i forlaget. Metoden

blev brukt med en kapasitet på op til $10 \mu\text{Mol}$ ($= 140 \gamma$), og metoden blir da lettere, idet man kan undlate en rekke forsiktighetsregler, man behøver f. eks. ikke ta hensyn til ammoniak i luften og det destillerte vann. Som syre bruktes istedenfor KROGH's bromvannstoffsyre, N/50 svovelsyre; og istedenfor naphtylrødt som indikator bruktes en modifikasjon av TASHIRO's indikator (CONWAY & BYRNE 1933). Denne består av metylenblått og metylrødt, og gir et meget skarpt omslag, idet den slår om fra rødt til grønt over et farveløst mellomstadium. Det titrertes til det farveløse mellomstadium.

b) *De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne.*

Den videre interesse ved de kation-, resp. anionoptagende mekanismer ligger nu i å undersøke om disse er generelle mekanismer som tar enhver ion med vedkommende positive eller negative ladning, eller om mekanismene er selektive og bare tar visse bestemte ioner, således at de er i stand til å skille mellom forskjellige kationer, resp. anioner i en oppløsning.

KROGH (1938) har utført forsøk over dette med ullhåndskrabben. Hans resultater er i korthet: Den kationoptagende mekanisme hos ullhåndskrabben er ikke i stand til å skille mellom natrium- og kaliumionene (Na^+ , K^+). Kalciumionen (Ca^{++}) optas i almindelighet ikke, men kan dog optas. Noen regelmessighet fantes ikke. Den anionoptagende mekanisme kan ikke skille mellom de kjemisk sett nær beslektede klorid-, bromid-, tiocyanat-, cyanat- og azidioner (Cl^- , Br^- , CNS^- , CNO^- og N_3^-). Nitrat-, jodid- og sulfationene (NO_3^- , J^- og SO_4^{--}) optas ikke aktivt.

Egne forsøk.

Ved undersøkelsen av flodkreps viste det sig at dens kationoptagende mekanisme skiller mellom natrium og kalium. Følgende forsøk viser dette.

Tab. 9. Forsøk nr. 15. ⁶13/10 1939.

Kreps satt i 100 ml væske inneholdende samme
konentrasjon av NaCl og KCl.

	Tidspunkt for prøven	Na-konc i Væsken	K-konc i væsken
1. dag	kl. 16.48.....	5,00 mM	4,95 mM
	kl. 22.10.....	...	5,05 -
2. dag	kl. 9.35.....	...	5,05 -
4. dag	kl. 10.15.....	1,54 mM	4,95 -
8. dag	kl. 11.45.....	0,32 -	5,05 -

Tab. 10. Forsøk nr. 19. ¹⁸⁻²⁰/10 1939.

Kreps satt i 50 ml væske inneholdende samme
konentrasjon av NaCl og KCl.

	Tidspunkt for prøven	Na-konc	K-konc	Cl-konc
1. dag	kl. 13.10.....	2,10 mM	2,38 mM	4,50 mM
2. dag	kl. 17.15.....	0,30 -	2,38 -	2,80 -
3. dag	kl. 10.00.....	0,18 -	2,54 -	2,68 -

Av disse forsøk ser man at flodkrepsen optar natrium fra en blanding av natrium- og kaliumklorid, mens kaliumkonentrasjonen forblir uforandret i oppløsningen. Den kationoptagende mekanisme er således i stand til å skille mellom Na^+ - og K^+ -ionene. Mekanismen er altså ikke identisk med den som KROGH har funnet hos ullhåndskrabben. Av det siste av de to nevnte forsøk, hvor kloridmengden i oppløsningen blev bestemt, ser man også at det samtidig med det optatte natrium er optatt en tilsvarende mengde Cl^- -ion.

Angående analysemetodikken skal nevnes at kalium er felt som kaliumplatinklorid, K_2PtCl_6 . Praktisk talt alle konvensjonelle kaliumanalyser benytter denne felling, men den videre fremgangsmåte varierer. NORBERG (1937), har utarbeidet en mikrometode, og hans fremgangsmåte blev i det vesentlige fulgt. Prøven inndampes med vannstoffplatinklorid, og bunnfallet vaskes i analyseglasset med absolutt alkohol. Herved oppløses natriumsaltet, mens kaliumsaltet forblir uoppløst. Glasset centrifugeres, og væsken suges fra bunnfallet. Denne vaskning gjentas to ganger. Bunnfallet av det rene K_2PtCl_6

kan nu titreres (efter Norberg) efter at det ved tilsetning av kaliumjodid er omdannet til K_2PtJ_6 . Titreringen skjer med natriumtiosulfat, $Na_2S_2O_3$, i en pufferopløsning for å holde p_H konstant. Kaliumplatinjodidet har en sterk rødbrun farve, som ved endt titrering går over i en skittengrøn. Denne fremgangsmåte blev brukt ved de forsøk som utførtes med strandkrabben, men da metoden ikke er særlig sikker (p. g. a. at omslaget ved titreringen ikke er helt tydelig), blev det ved forsøkene med flodkreps istedenfor gått over til å bestemme mengden av kaliumplatinjodid fotometrisk. Bunnfallet opløstes i en fosfatpuffer ($p_H = 6,98$), tilsattes KJ i overskudd, og farvestyrken bestemmes så i et elektrisk fotometer ved dens filtrasjonsevne overfor grønt lys.

Videre bestemtes natrium + kalium efter samme fremgangsmåte som omtalt for natriumbestemmelse i oppløsninger som bare inneholder natrium (side 20). Natriummengden blev derefter beregnet som differencen $(Na + K) - K = Na$.

For den anionoptagende mekanisme viste det sig ved forsøkene at den ikke er i stand til å skille mellem klorid-, bromid-, og tiocyanationene.

Forsøkene med optagelse av bromid skal omtales først. I tabell 11 er forsøksprotokollen for et av disse forsøk referert. Man ser her at det er et sterkt fall i bromidmengden inntil den tredje dag, men så er det noen stigning igjen mot slutten av forsøket. Dette skyldes sannsynligvis den sterke virkning bromider har på nervesystemet, og krepsen var på dette tidspunkt heller ikke i god kondisjon.

Tab. 11. Forsøk nr. 8. ¹³⁻¹⁸/₉ 1939.

Utvasket kreps satt i 50 ml natriumbromidopløsning.

	Tidspunkt for prøven	Br-konc i væsken
	kl. 16.40 forsøkets begynnelse	
1. dag	kl. 16.45	1,90 mM
	kl. 22.15	1,47 -
2. dag	kl. 10.20	1,00 -
3. dag	kl. 16.30	0,56 -
4. dag	kl. 17.15	0,75 -
6. dag	kl. 8.00	0,70 -

Tab. 12. Forsøk nr. 16. ¹³⁻¹⁷/₁₀ 1939.

Utvasket kreps satt i 40 ml NaBr-opløsning.

	Tidspunkt for prøven	Br-kone i væsken
1. dag	{ kl. 11.50 forsøkets begynnelse	
	{ kl. 11.55.....	1,835 mM
2. dag	kl. 14.00.....	1,12 -
5. dag	kl. 19.30.....	0,551 -

Ved avslutningen av dette forsøk var krepsen øiensynlig meget sterkt forgiftet, liggende på ryggen og uten kontroll over bevegelsene. Nervesystemet var tydelig i uorden. Den blev derfor satt i almindelig ledningsvann, hvor den meget langsomt kom sig, 10 dager efter var den i full vigør igjen.

Begge disse forsøk viser en aktiv optagelse av bromid, idet konsentrasjonen i krepsen må være det mangedobbelte av konsentrasjonen i yttervæsken ved forsøkets slutt. I siste forsøk veide krepsen ca. 35 g, og den må da ha hatt en bromidkonsentrasjon av over 3 mM i blodet ved forsøkets slutt.

Bestemmelsen av bromid er utført fullstendig som kloridbestemmelsene, idet bromider ved den anvendte analysemetode opfører sig fullstendig identisk med klorider. Det kan naturligvis være kommet noget klorider ut i væsken, men dette forårsaker bare at de bromidkonsentrasjoner som er funnet i slutten av forsøkene ligger noget høiere enn de virkelige verdier. Denne analysemetodes resultater viser altså en noget mindre optagelse av bromid enn det som i virkeligheten er foregått. For tydingen av forsøkene er det altså ikke nødvendig å skille kloridene fra bromidene, og da den analytiske adskillelse er meget vanskelig, blev det heller ikke forsøkt.

Tiocyanat(rhodan)ionens forhold frembyr særlig interessante momenter, da det er en ion som aldri forekommer i ferskvann. Tiocyanationen har fysikalsk-kjemisk sett stor

likhet med en halogenion, den står endog Cl^- -ionen og Br^- -ionen nærmere enn J^- -ionen står disse. Mekanismens reaksjon overfor en sådan ion, gir derfor en interessant opplysning om hvordan mekanismen virker overfor en ion den i naturen aldri blir utsatt for.

Det forsøk som er vist i tabell 13, viser en utvilsom aktiv optagelse av tiocyanat, idet konsentrasjonen i blodet stiger langt over konsentrasjonen i yttervæsken.

Et forsøk til utførtes som kontroll. Det nevnes bare at en kreps blev satt i 100 ml 2 mM NaCNS-oppløsning. 2 dager etter var konsentrasjonen i blodet 4,68 mM.

Tab. 13. Forsøk nr. 3. ¹⁴⁻¹⁸/₉ 1939.

Kreps satt i 50 ml NaCNS-oppløsning.

	Tidspunkt for prøven	CNS-konc i væsken	CNS-konc i blod
1. dag	{ kl. 13.55, begynt	2,00 mM	0
	{ kl. 14.25	1,94 -	...
	{ kl. 16.45	1,86 -	...
2. dag	kl. 13.20	1,61 -	...
3. dag	{ kl. 17.15	1,30 -	...
	{ kl. 17.45	3,90 mM
5. dag	{ kl. 8.00	1,18 -	...
	{ kl. 9.00	3,64 -

Bestemmelsen av tiocyanat utførtes kolorimetrisk. Ved tilsetning av et treverdig jernsalt til oppløsningen, fremkommer en kraftig rødbrun farve (jernrhodanfarven). Tidligere udførtes dette som en sammenligning med en oppløsning av kjent styrke. Denne metode har en meget stor ulempe i at farven blekes meget hurtig, og man må derfor ved den sammenlignende kolorimetrering for hver enkelt bestemmelse tilberede en ny kjent oppløsning. Da de metoder som i den kjemiske litteratur angis å skulle kunne forhindre avblekningen, ikke fører frem, blev farveintensiteten istedenfor bestemt i et fotometer i bestemt tid (1 minutt) efter tilsetning av jernreagensen. Fotometret var bygget av en lampe som gav konstant lys, og en fotoelektrisk celle for måling av lysstyrken. Mellem disse kunde det settes inn lysfiltre av forskjellig farve.

Ved den fotometriske bestemmelse av tiocyanat bestemtes farveintensiteten ved filtreringsevnen overfor grønt lys.

Ved de første forsøk på denne bestemmelse, opnåddes en nøiaktighet som lå langt over den ønskede.

Tiocyanatmengden i blodprøver kunde ikke direkte bestemmes i fotometret. Jernreagensen inneholder salpetersyre, og eggehvite-stoffene i blodet felles av dette. Proteinet i blodet blev derfor først felt med 20% triklorreddiksyre. Efter centrifugering går bestemmelsen på den klare væske uten vanskelighet. Ved beregningen er det tatt hensyn til den filtreringsevne blod uten tiocyanatinnhold har efter tilsetning av samme reagensmengde.

Metoden fordrer så små stoffmengder at 0,1 ml av en 1 mM NaCNS-opløsning fortynnet til 25 ml volum, er tilstrekkelig til en nøiaktig bestemmelse.

Sammenfatning av resultatene for flodkreps.

- 1) Flodkrepsen har to adskilte mekanismer for optagelse av kationer og anioner fra det omgivende vann.
- 2) Den kationoptagende mekanisme er i stand til å skille mellom natrium og kalium, og kan således opta bare natrium fra en oppløsning som inneholder begge ioner.
- 3) Den anionoptagende mekanisme er ikke i stand til å skille mellom klorid, bromid og den halogenlignende tiocyanation.

Undersøkelse av de osmoregulerende mekanismer hos strandkrabben.

I. Tidligere undersøkelser.

Det blev i innledningen nevnt at visse euryhaline evertebrater i vann med lav saltholdighet er i stand til å oprettholde et høiere osmotisk trykk enn det omgivende vann. Til denne gruppe saltvannsdyr hører strandkrabben (*Carcinus maenas*).

En av de første som har undersøkt marine dyrs osmotiske trykk er BOTAZZI (1897), som opstilte »loven om at de marine evertebrater er poikilosmotiske«. Han fremholdt at de marine evertebrater fullstendig følger det omgivende vanns osmotiske trykk. FREDERICQ (1904) undersøkte en rekke marine dyr, og fant at strandkrabben ikke følger de opstilte regler. I almindelig havvann hadde dens blod samme osmotiske trykk som det omgivende vann, men ved lavere konsentrasjoner viste dens blod en betydelig hypertoni. FREDERICQ anså dette for en ren undtagelse, og undersøkte ikke forholdet nærmere. DUVAL (1925) undersøkte blandt annet også strandkrabben. En kurve fra hans arbeide er gjengitt i fig. 1, hans viktigste resultater fremgår av denne. Man ser at krabben ved de lave konsentrasjoner opprettholder hypertoni, men ikke på et konstant nivå; det er hele tiden et fall svarende til et fall i vannets konsentrasjon, men av mindre størrelse. DUVAL betraktet fremdeles strandkrabben for et undtagelsestilfelle mellom de marine evertebrater.

I 1929 fandt SCHLIEPER at de forhold som var beskrevet for strandkrabben, er representert hos en lang rekke marine evertebrater, særlig hos brakkevannsdyr. SCHLIEPER fremhever meget sterkt at det må dreie sig om en aktiv regulering, men den nærmere mekanisme kan han på dette tidspunkt ikke si noget om. Han mener at opprettholdelsen av hypertoni er forbundet med energiforbruk, da han fant at strandkrabben i fortynnet saltvann får en betydelig økning i stoffskiftet.

SCHWABE (1933) har vist at det fall som inntreer når en strandkrabbe flyttes til fortynnet saltvann ikke skyldes en osmotisk innstrømning av vann, men et salttap. Dette forutsetter at strandkrabbens integument er gjennemtregelig for

saltvannets ioner. Tidligere var det vist at strandkrabbens integument er gjennemtregelig for jod-ioner (BETHE & BERGER 1931), men derfra kan man ikke direkte anse det bevist at integumentet i sin almindelighet er gjennemtregelig for ioner, da de konsentrasjoner av natriumjodid som blev

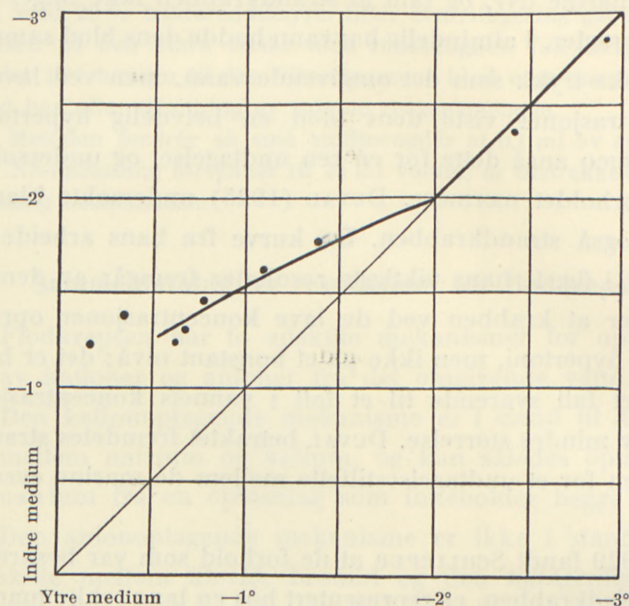


Fig. 1. Frysepunktsdepresjon i blod av *Carcinus* som funksjon av det ytre medium (etter Duval).

brukt til forsøkene kan ha hatt en skadelig innflytelse på membranenes normale funksjon. BETHE (1929 og 1934) påviste ved å forandre konsentrasjonen av en enkelt ion i det omgivende vann, at overflaten av en rekke marine dyr, deriblandt strandkrabben, er permeabel for havvannets ioner.

I de tidligste arbeider (inntil SCHLIEPER 1929), gikk man ut fra at brakkvannsdirene oprettholdt sin osmotiske konsentrasjon på den måten at overflaten var impermeabel for vann og salter. De ovenfor omtalte arbeider viser at det hos

strandkrabben må foregå et osmotisk salttap direkte gjennom huden, og videre en osmotisk vanninnstrømning (som medfører et betydelig salttap gjennom nyrene, da urinen er omtrent isotonisk med blodet), så lenge blodet opprettholder høiere osmotisk konsentrasjon enn det omgivende vann.

NAGEL (1934) har påvist hvordan strandkrabben på tross av dette salttap opprettholder hypertoni i fortynnet saltvann. Han viste at krabben har en mekanisme for aktiv salttransport fra det omgivende vann til blodet. Denne mekanisme påvistes på følgende måte: En strandkrabbe som flyttes til et fortynnet saltvann, får som omtalt et betydelig fall i blodets konsentrasjon. Øker man nu konsentrasjonen i vannet noget, men ikke mer enn at den fremdeles er under blodets konsentrasjon, får man en stigning i blodets konsentrasjon. Da blodets konsentrasjon hele tiden har ligget over konsentrasjonen i det omgivende vann, har salttransporten foregått mot det osmotiske trykk, det må være en aktiv transport. NAGEL påviste at hverken nyrene eller tarmkanalen har betydning for denne konsentrasjonsøkning, og drog den slutning at den er lokalisert i gjellene.

Efter fullførelsen av manuskriptet er det fremkommet et arbeide av WEBB (1940), som bekrefter strandkrabbens evne til osmotisk regulasjon. Ved blod og urinanalyser vises det at magnesium og sulfatkonsentrasjonen i blodet ved hjelp av nyrefunksjonen holdes på et konstant nivå. Andre forhold ved vann- og saltomsetningen diskuteres på et indirekte grunnlag.

II. Egne undersøkelser.

Metodikken ved forsøkene med strandkrabben.

Prinsippet i forsøkene med strandkrabben er det samme som for flodkrepsen. Man bringer blodets konsentrasjon

noget ned, og undersøker derefter om mekanismene er i stand til å bringe konsentrasjonen i blodet op ved optagelse av salter (ioner) fra et vann med mindre konsentrasjon av vedkommende ion enn blodet.

Strandkrabben kan ikke utvaskes med destillert vann, men dens blodkonsentrasjon bringes ned ved å sette den i et sterkt fortynnet saltvann. Blodets konsentrasjon synker til et bestemt nivå, svarende til vannets konsentrasjon, men altså betydelig høiere enn dette. Denne steady state¹ opnås i løpet av 1 døgn. DUVAL (1925) har nemlig vist at konsentrasjonen ikke synker lenger ned i de følgende 14 dager enn den var 24 timer etter at krabben var flyttet til fortynnet vann (bekreftet av SCHWABE 1933). Man kan altså bringe strandkrabbens blodkonsentrasjon ned ved at man dagen før forsøket setter den i saltvann av en passende lav konsentrasjon.

Da strandkrabbens omgivende medium alltid må være relativt saltholdige oppløsninger, opstår det ved påvisningen av de ionoptagende mekanismer visse analytiske vanskeligheter. For flodkrepsen kunde en liten forandring i det omgivende vanns konsentrasjon (f. eks. på 1 mM) lett påvises, da den alltid befant sig i meget svake oppløsninger (f. eks. 2 mM, således at det konsentrasjonsfall som skulde påvises var på 50 relative $\%$). Hvis en strandkrabbe nedsetter konsentrasjonen i det omgivende vann med 1 mM, er denne forandring vanskelig å påvise når vannets konsentrasjon ligger på f. eks. 50 eller 100 mM. For en rekke ioner vil en sådan forandring endog være mindre enn den gjennomsnittlige analysefeil. Analysenøiaktigheten er f. eks. for

¹ Mens en almindelig fysisk likevektstilstand oprettholdes uten forbruk av energi, kan der under fysiologiske forhold oprettholdes et konstant nivå avvikende fra den egentlige likevekt. Dette fordrer forbruk av energi, og en sådan tilstand kalles almindelig i fysiologien »steady state«.

alkalimetallene ca. 2 rel. ‰. Selv en temmelig sterk optagelse fra vannet, gir således ofte ikke noen tydelig påvisbar forandring i dettes sammensetning, eller den forandring man finner er så liten at man ikke med sikkerhet kan si at den skyldes optagelse og ikke tilfeldige analysefeil. Derfor må man i almindelighet foreta samtidige analyser på blodet for virkelig å vise at det har funnet sted en stigning i konsentrasjonen.

Teknikken for å ta blodprøver av strandkrabben er meget lett. Etter at krabben er fiksert i en passende stilling, og vannet tørret av med filtrerpapir, klipper man hurtig et av de ytre ledd av et av dens gangben. Det vil da i almindelighet hurtig dryppe ut blod, og efter at man har tatt tilstrekkelig til analysen (oftest noen få dråper), klemmer man såret sammen med en tang. Krabben vil da nesten alltid øieblikkelig kaste benet ved selvamputasjon, og sårflaten ved den basale del er da ikke blødende. Hvis det skulde hende at krabben ikke kaster benet, er sammenklemningen tilstrekkelig til å hindre videre blødning. Man har således en meget lett metode til å skaffe blodprøver uten å foreta større inngrep, som virker forstyrrende på de fysiologiske forhold.

Den største metodiske vanskelighet i forsøkene med strandkrabben, er at konsentrasjonen av de oppløsninger den skal gå i, må være relativt stor. Da man ofte bruker oppløsninger som i sammensetning avviker meget fra almindelig havvann, kan de komme til å virke meget skadelige. I noen forsøk må også giftige salter (f. eks. ammoniumklorid) brukes i meget høie konsentrasjoner. Mens det i forsøkene med flodkreps lot sig gjøre å la dem gå i mange dager i en svak oppløsning av ammoniumklorid, blir de konsentrasjoner som man må bruke til en strandkrabbe så høie at de virker sterkt giftige. Forsøkene må derfor ofte være meget

kortvarige, og de koncentrationsforskyvninger som de osmoregulatoriske mekanismer kan fremkalle blir tilsvarende små. Man må derfor regne med at en rekke forsøk ikke viser tilstrekkelig tydelige resultater, før man finner den rette kombinasjon av de forskjellige forsøksbetingelser. Den største vanskelighet har i forsøkene med strandkrabben vært å finne en hensiktsmessig fremgangsmåte.

Strandkrabbens hypertoni i fortynnet saltvann.

De forfattere som tidligere har behandlet strandkrabbens hypertoni i fortynnet saltvann, har bare arbeidet med konentrasjoner i vannet på ned til ca. 100 mM (= ca. 5 ‰). En undersøkelse av hvordan strandkrabben forholder sig i vann av så lav konentrasjon at forsøksdyrene såvidt kan leve i det, vil derfor være av interesse. Jeg gjorde derfor forsøk for å undersøke forholdene ved konentrasjoner i vannet på ned til ca. 20 mM (= ca. 1 ‰).

De verdier som jeg har funnet for blodets kloridinnhold hos 18 strandkrabber i vann ved forskjellige lave konentrasjoner, er grafisk fremstilt i fig. 2. Denne kurve kan betraktes som en fortsettelse av den nedre del av den kurve som blev gjengitt fra DUVAL's arbeide (s. 30).

Av figuren fremgår hvilke verdier jeg fant for kloridmengden i blodet hos krabber (avsatt som ordinat), og de tilsvarende kloridmengder i vannet (avsatt som abscisse). Alle verdier er fra relativt meget fortynnet havvann, den høieste konentrasjon er 300 mM (= ca. 18 ‰).

Man ser at for samtlige krabber er kloridkonentrasjonen i blodet høiere enn i det omgivende vann. (Den skrå linje i 45° vinkel representerer isotoni mellom vann og blod.) Den del av kurven som er av særlig interesse, er den nederste del, svarende til de saltkonentrasjoner i vannet

som er den nederste grense hvor strandkrabben kan leve. Man ser at når kloridmengden i vannet er ca. 20 mM

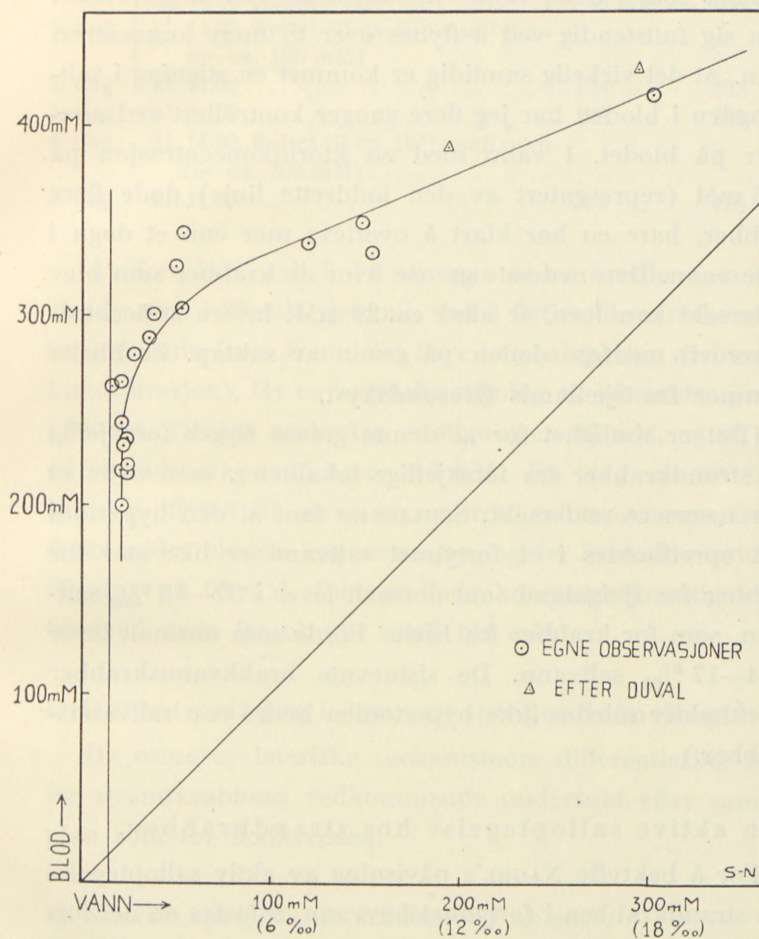


Fig. 2. Kloridinnhold i blod av *Carcinus* som funksjon av det ytre medium.

(= 1,1 ‰), viser kloridmengden i krabbeblodet tilbøielighet til et sterkt fall, samtidig som det er stor forskjell på de enkelte individer. Det viser at en del av krabbene iallfall i noen tid kan klare å holde sin saltkonentrasjon oppe i

dette medium. At noen krabber ikke klarer det, fremgår av at ikke få er døde i vann av denne konsentrasjon. Flere krabber som i dette vann efter noen tid var meget svake, kom sig fullstendig ved å flyttes over til mere koncentrert vann. At det virkelig samtidig er kommet en stigning i saltmengden i blodet, har jeg flere ganger kontrollert ved analyser på blodet. I vann med en kloridkonsentrasjon på 17,5 mM (representert av den loddrette linje) døde flere krabber, bare en har klart å overleve mer enn et døgn i dette vann. Den nederste grense hvor de krabber som blev undersøkt kan leve, er altså ca. 20 mM, lavere konsentrasjoner vil medføre døden på grunn av salttap. Krabbene stammer fra Sjællands Øresundskyst.

(Det er mulighet for at denne grense ligger forskjellig for strandkrabber fra forskjellige lokaliteter, men dette er ikke nærmere undersøkt. SCHLIEPER fant at den hypertoni som oprettholdes i et fortynnet saltvann er like stor for krabber fra Helgoland som normalt lever i 32—33 ‰ saltvann, som for krabber fra Kieler Förde som normalt lever i 14—17 ‰ saltvann. De sistnevnte brakkvannskrabber oprettholder således ikke hypertonien bedre enn saltvannskrabber.)

Den aktive saltoptagelse hos strandkrabben.

For å bekrefte NAGEL's påvisning av aktiv saltoptagelse hos strandkrabben i fortynnet havvann, utførtes en del forsøk. Som eksempel på et slikt forsøk er en forsøksprotokoll anført i tabell 14.

(Alle de forsøksresultater som omtales i det følgende, er bekreftet ved gjentagne kontrollforsøk. For å lette fremstillingen, er det bare anført karakteristiske forsøksprotokoller som eksempler for å belyse de omtalte resultater.)

Tab. 14. Forsøk nr. 3. ¹⁷⁻²¹/₁ 1939.

	Tidspunkt for prøvetagning	Cl i vann	Cl i blod
1. dag	kl. 14.00 (steady state).....	38 mM	300 mM
	kl. 14.05, flyttet til ca. 10 ^{0/00} saltvann (= ca. 165 mM)
2. dag	kl. 11.00	154 -	332 -
3. dag	kl. 11.00	148 -	348 -
4. dag	kl. 18.00, flyttet til ca. 18 ^{0/00} saltvann (= ca. 300 mM)
	kl. 11.00	302 -	416 -

Av forsøket i tabell 14 ser man at en krabbe som er i steady state i 38 mM sjøvann, ved å flyttes til mere koncentrert sjøvann (som fremdeles bare har halvparten av blodets konsentrasjon), får en betydelig stigning av konsentrasjonen i blodet. Til den neste dag er stigningen 32 mM, og til den påfølgende dag ytterligere 16 mM. En dag senere blev krabben flyttet til mere koncentrert saltvann, men fremdeles under blodets konsentrasjon, og der kom så en videre stigning på 68 mM. Den samlede konsentrasjonsstigning i blodet i dette forsøk var altså 116 mM.

Differentieringen i den saltoptagende mekanisme.

De osmoregulatoriske mekanismers differentiering blev for strandkrabbens vedkommende undersøkt efter samme plan som for flodkrepsen.

a) *Selektiv optagelse av kationer og anioner.*

Det dreiet sig først om å klarlegge om strandkrabben likesom flodkrepsen har to ionoptagende mekanismer som kan arbeide uavhengig av hverandre, en for optagelse av kationer og en for optagelse av anioner.

Til påvisning av den kationoptagende mekanisme bruktes likesom for flodkrepsen oppløsninger av natrium-

sulfat og natriumkarbonat. En transport fra sådanne oppløsninger med lavere natriuminnhold enn blodet, og en økning av konsentrasjonen i dette, er bevis for en aktiv optagelse av Na^+ -ionen, idet sulfat- eller bikarbonationen ikke kan optas aktivt.

Forsøkene er her vanskeliggjort ved at krabbene meget dårlig tåler å gå i så sterke sulfat- henholdsvis bikarbonatopløsninger som det må brukes. Etter kort tid, ofte mindre enn en time, blir krabbenes kondisjon meget dårlig. De blir tetaniske, nesten ute av stand til å bevege sig, og dør temmelig snart hvis de ikke blir overført til almindlig saltvann igjen. Dette gjelder særlig for bikarbonatopløsningene. Det inntreer meget hurtig en likevekt mellom blodets og det omgivende vanns CO_2 -tensjon, da gjelleoverflaten på grunn av den respiratoriske funksjon er lett permeabel for CO_2 . For sulfatopløsningenes vedkommende inntreer tilstandene med dårlig kondisjon betydelig langsommere, da gjelleoverflaten er praktisk talt impermeabel for $\text{SO}_4^{\pm\pm}$ -ionen. Den skadelige innflytelse av sulfatopløsningene skyldes sikkert for en stor del at krabben utsettes for et stort kloridtap når den befinner sig i en kloridfri oppløsning.

Det viste sig at forsøkene på tross av disse vanskeligheter i en del tilfeller gav utvilsomme resultater. To eksempler på sådanne forsøk hitsettes, det ene er utført med natriumsulfat, det annet med natriumbikarbonatopløsning.

Forsøket i tabell 15 er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i fortynnet sjøvann inneholdende 28,5 mM natrium + kalium. Krabben blev herfra overført til en 270 mM Na_2SO_4 -opløsning.

Konsentrasjonsøkningen av natrium i blodet er utvilsom. I dette forsøk viser analysene den samlede alkalimengde i prøvene. For yttervæsken hvor det bare finnes natrium

Tab. 15. Forsøk nr. 11. $2\frac{1}{2}$ 1939.

Tidspunkt for prøven	Na (+ K) i vann	Na (+ K) i blod	Cl i blod
kl. 11.50 Forsøk beg.	270 mM	340 mM	325 mM
kl. 16.40	416,6 -	184 -

spiller dette ingen rolle. For blodet er innholdet av kalium iallfall under 10 mM, sannsynligvis ca. 5 mM, og selv om verdiene for natrium i blodet i virkeligheten er 10 mM mindre enn de som finnes i tabellen, spiller dette ingen rolle for tydningen av forsøket. Den store stigning i alkali-mengden må nemlig skyldes optagelse av natrium fra vannet. Man ser også at krabben samtidig har hatt et meget stort tap av klorider, noget som man også måtte vente da yttervæsken overhodet ikke inneholder klorider. Gjelleoverflaten er jo som tidligere omtalt permeabel for blodets ioner. Som omtalt på forrige side er det grunn til å tro at klorid-tapet spiller en betydelig rolle for krabbens manglende evne til å tåle oppløsninger av denne art.

Forsøket i tabell 16 er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i vann med klorid-konentrasjon på 21,7 mM. Krabben blev herfra overført til ca. 300 mM NaHCO_3 -opløsning.

I dette forsøk er krabben satt i så liten væskemengde som mulig for å opnå størst mulig forandring i yttervæskens konentrasjon. Man ser her at det i den første periode på $2\frac{1}{2}$ time er skjedd en sterk forøkning av natriuminnholdet i blodet. I den neste periode er forandringen ikke større

Tab. 16. Forsøk nr. 6. $23\frac{1}{1}$ 1939.

Tidspunkt for prøven	Na i vann	Na i blod	Cl i blod
kl. 16.55 Forsøk beg.	308 mM	319 mM	332 mM
kl. 19.30	368 -	208 -
kl. 21.45	185,5 -	371 -	208 -

enn analysenøiaktigheten. Man ser at optagelsen fullstendig svarer til det sterke fall i vannets natriumkonentrasjon. Som ventet er det også her et fall i kloridmengden i blodet, men ikke så stort som i forrige forsøk da det ytre væskelvolum er meget mindre. Ved forsøkets avslutning var krabbens kondisjon meget dårlig, og den døde kort etter. Allerede etter den første periode var kondisjonen temmelig dårlig, og dette forklarer at det i den annen periode ikke skjedde noen fortsatt optagelse.

Angående analysemetodikken er det i de to forsøk benyttet forskjellige analysemetoder.

I det først omtalte forsøk er analysen utført som total alkali-bestemmelse, fordi det da forsøkene blev utført ikke forelå noen enkel og pålitelig mikrometode til bestemmelse av natrium, derimot fantes det en metode utarbeidet av LINDERSTRØM-LANG (1936) for bestemmelse av total alkali i blod og vev.

Metoden går ut på å foraske de organiske stoffer med en blanding av $\text{Ba}(\text{OH})_2$ og BaCl_2 i elektrisk ovn ved 400° . Herved forbrenner alt organisk stoff, og alkaliskaltene omdannes til klorider. Asken oppløses i vann, og alt barium felles som karbonat ved tilsetning av ammoniumkarbonat. Etter centrifugering har man bare alkalikloridene og ammoniumklorid- og karbonat i oppløsningen. Etter inndampning ophetes til ca. 350° , herved sublimerer alle ammoniumsaltene, og man har bare alkalikloridene igjen. En almindelig kloridtitrering vil så gi mengden av disse. Metoden har en meget stor ulempe i at den er meget omstendelig, det tar således tre dager å gjennomføre en serie analyser.

Til de senere forsøk bruktes en metode beskrevet av HOFFMAN og OSGOOD (1938). Den går ut på å felle natrium med uranyl-zinkacetat. Det dannes et relativt uopløselig kompleks salt, som på grunn av sin sterke gule farve kan bestemmes kvantitativt i et fotometer. Denne metode gav utmerkete resultater. Det forsøk som er gjengitt i tabell 16, er utført med denne analysemetode.

For påvisning av en selektiv anionoptagende mekanisme hos strandkrabben, bruktes likesom for flodkrepsen optagelse av Cl^- -ionen fra ammoniumklorid. Det forhold

at det måtte brukes relativt koncentrerte oppløsninger i disse forsøk, gjorde sig sterkt gjeldende. Ammoniak har en sterk giftvirkning, og ved neutral reaksjon i en ammoniumklorid-oppløsning vil en vesentlig del av ammoniakken foreligge som oppløst NH_3 , og ikke som ion. Gjelleoverflaten er permeabel for fri NH_3 , men ikke for NH_4^+ -ionen. Hvis man forskyver oppløsningens reaksjon til den sure side, vil mer av den fri ammoniak gå over i ionisert tilstand, og inntrengningen av ammoniak gjennom gjelleoverflaten går langsommere. Ved $p_{\text{H}} = 5$ i en 0,2 Normal NH_4Cl -oppløsning, vil konsentrasjonen av fri NH_3 være $1,11 \cdot 10^{-5}$, mens resten foreligger som ion. Når oppløsningen inneholder så lite fri ammoniak, blev det antatt at en forgiftning inntreder vesentlig langsommere. Ved forsøkene viste det sig også at forgiftningen inntrådte langsommere når p_{H} blev holdt på ca. 5 enn i neutral oppløsning. Allikevel var det meget vanskelig å holde krabbene levende i en ammoniumkloridoppløsning så lenge at det kom en påviselig stigning i blodets kloridmengde. En rekke forsøk mislyktes, men det lyktes til slutt å få en rekke forsøk som viser sikker optagelse av klorid. En protokoll fra et av disse forsøk hitsettes som eksempel. Dette forsøk er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i 20 mM sjøvann.

Ved forsøkets avslutning efter 32 minutter var krabben død, men det er inntrådt en stigning på 19 mM i kloridmengden i blodet. Riktignok har blodets konsentrasjon ved forsøkets begynnelse vært litt under væskens (200 mM mot

Tab. 17. Forsøk nr. 12. $\frac{2}{2}$ 1939.

Tidspunkt for prøven	Cl i vann	NH_3 i vann	Cl i blod
kl. 13.22 Forsøk beg.....	208 mM	202,4 mM	200 mM
kl. 13.40	206 -	204,1 -	...
kl. 13.54	202 -	198,0 -	219 -

208 mM), men konsentrasjonsstigningen op over vannets konsentrasjon er allikevel utvilksom. Dessuten er kloridkonsentrasjonen i blodet beregnet på volum av blod; men da dette inneholder betydelige mengder protein, er kloridkonsentrasjonen i blodets vannfase betydelig høiere, og denne konsentrasjon har således hele tiden vært høiere enn yttervæskens.

Det var nødvendig å arbeide med oppløsninger hvis kloridinnhold lå så nære blodets, da forgiftningen kommer så hurtig at det osmotiske tap ved store konsentrasjonsforskjeller hurtig vil overskride optagelsen.

Det fall som i slutten av forsøket i tabell 17 er kommet i ammoniakkonsentrasjonen, skyldes at p_H ved slutten av forsøket blev forskjøvet til den alkaliske side, og fallet skyldes således NH_3 som er diffundert inn i forsøksdyret.

Som sammenfatning av de nu omtalte forsøk, fremgår det at strandkrabben likesom flodkrepsen har to ionoptagende mekanismer som kan arbeide uavhengig av hverandre, en for optagelse av kationer og en for anioner.

b) *De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne.*

Differentieringen i den kationoptagende mekanisme.

Når krabber har gått mer enn 1 døgn og er i steady state i ca. 20 mM saltvann, vil kaliumkonsentrasjonen i deres blod være ca. 4—5 mM. I vannet er kaliumkonsentrasjonen da ca. 0,45 mM. Hvis nu dette vann tilsettes kaliumklorid, således at konsentrasjonen økes, men allikevel forblir under blodets, viser det sig at krabbene i dette vann i løpet av kort tid får sterke forgiftningssymptomer. Får de fortsatt gå i dette vann dør de, blir de derimot flyttet til almindelig vann, kommer de sig hurtig. Dette tyder sterkt

på at det er foregått en aktiv kaliumoptagelse. En kaliumforgiftning skulde ellers ikke kunne inntre når konsentrasjonen i vannet er under blodets.

I de forsøk som blev gjort, viste det sig også at kaliumkonsentrasjonen i vannet sank. Av de forsøk hvor det samtidig er utført kontroll ved å bestemme kaliummengden i blodet, anføres et eksempel (tabell 18).

Forsøket er gjort med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i ca. 17,5 mM saltvann. Den blev flyttet til en oppløsning inneholdende 5 mM KCl, 5 mM NaCl og 10 mM CaCl₂. (CaCl₂ er for å øke kloridmengden uten samtidig å øke natriummengden, og for å skaffe tilstrekkelig høit osmotisk trykk.)

Tab. 18. Forsøk nr. 27. $\frac{21}{3}$ 1939.

Tidspunkt for prøven	K-kone i vann	K-kone i blod
kl. 13.50 Forsøk beg.....	4,74 mM	4,95 mM
kl. 14.30	4,55 -	...
kl. 14.50	4,50 -	5,19 -

I et annet forsøk blev samtidig forandringene i innholdet av Na, K og Cl i oppløsningen bestemt. Krabben var ved forsøkets begynnelse i steady state i ca. 20 mM saltvann.

Tab. 19. Forsøk nr. 16. $\frac{10}{2}$ 1939.

Tidspunkt for prøven	Cl i vann	K i vann	Na i vann	K i blod
kl. 13.52.....	138 mM	5,00 mM	62,5 mM	...
kl. 14.04.....	136 -
kl. 14.22.....	134 -	4,45 -	60,0 -	...
kl. 15.09.....	134 -
kl. 16.20.....	130 -
kl. 17.40.....	130 -	3,82 -	57,5 -	10,97 mM

Man ser her en avtagen i vannets klorid-, natrium- og kaliummengder. Uheldigvis var kaliummengden i blodet

ikke bestemt før forsøkets begynnelse, men sluttkoncentrasjonen ligger over det dobbelte av hvad man må anta at den har vært ved begynnelsen av forsøket (krabben var i steady state i 20 mM saltvann, og da er kaliumkoncentrasjonen i blodet normalt ca. 4,5 mM). Krabben viste også meget sterke tegn til kaliumforgiftning, men kom sig fullstendig efter å være satt over i almindelig sjøvann. (I det vann som blev brukt i forsøket, var kaliummengden ca. 4 ganger så stor som den normalt er i forhold til natriummengden.) Natriumanalysenes nøiaktighet i dette forsøk var ikke stor, men man kan allikevel se at størrelsesordenen av de natrium- og kaliummengder som er optatt er omtrent den samme.

De omtalte forsøk viser altså at den kationoptagende mekanisme hos strandkrabben ikke er i stand til å skille mellom natrium- og kaliumionene. Dette fremgår av at til tross for at de optatte kaliummengder er sterkt skadelige, eller endog så store at de virker drepende, så er dyret ikke i stand til å forhindre at optagelsen finner sted.

Differentieringen i den anionoptagende mekanisme. Strandkrabbens anionoptagende mekanisme blev undersøkt i forsøk med anvendelse av de samme ioner som i forsøkene med flodkrepsen, nemlig Cl^- , Br^- og CNS^- -ionene. Det viste sig at mekanismen ikke er i stand til å skille mellom disse ioner. Av de forsøk som viser dette, anføres noen karakteristiske eksempler.

Et forsøk som viser optagelse av bromionen fra natriumbromidopløsning, er vist i tabell 20. Forsøket er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i ca. 20 mM saltvann, og blev flyttet til en 100 mM natriumbromidopløsning.

Tab. 20. Forsøk nr. 31. ⁶⁻⁷/₁₀ 1939.

	Tidspunkt for prøven	Br-konc i vann	Cl + Br-konc i blod
1. dag	kl. 16.40 Forsøk beg.	99,5 mM	251,8 mM
	kl. 17.00	95,0 -	...
	kl. 17.40	92,0 -	...
	kl. 19.45	86,25 -	278,2 -
2. dag,	kl. 9.00	72,0 -	306,2 -

Forsøket viser optagelse av Br⁻-ionen.

Likesom i forsøkene med flodkrepsen gjelder bestemmelsene her summen av Cl og Br.

Forsøk med optagelse av tiocyanationen fra 20 mM saltvann, som er tilsatt 1 mM NaCNS.

 Tab. 21. Forsøk nr. 26. ¹⁸⁻¹⁹/₃ 1939.

	Tidspunkt for prøven	CNS-konc i vann	CNS-konc i blod
1. dag	kl. 12.00	1,00 mM	0
	kl. 15.00	0,88 -	...
	kl. 16.45	0,80 -	...
	kl. 17.20	0,79 -	1,29
2. dag	kl. 1.00	0,69 -	2,11
	kl. 14.00	0,61 -	2,31

Forsøket viser tydelig optagelse av CNS⁻-ionen.

Bestemmelsene er utført som omtalt under flodkrepsen, altså fotometrisk bestemmelse av farven med treverdig jern.

Av disse forsøk fremgår at den anionoptagende mekanisme hos strandkrabben ikke er i stand til å skille mellom Cl⁻-ionen, Br⁻-ionen og den halogenlignende CNS⁻-ion.

Sammenfatning av resultatene for strandkrabben.

- 1) Strandkrabben har to ionoptagende mekanismer som er uavhengige av hverandre, en for optagelse av kationer, og en for anioner.

- 2) Den kationoptagende mekanisme er ikke i stand til å skille mellom natrium og kalium.
- 3) Den anionoptagende mekanisme kan ikke skille mellom klorid, bromid og den halogenlignende tiocyanation.

Sammenfattende bemerkninger.

Efter at det i nærværende arbeide er påvist at det for de ionoptagende mekanismer hos flodkrepsen og strandkrabben finner en differentiering sted, vil en sammenligning med tidligere undersøkelser over de samme mekanismer hos andre dyr være av interesse.

Det eneste som foreligger over de optagende mekanismers distinksjonsevne er KROGH's undersøkelser (1938) over ullhåndskrabben (*Eriocheir sinensis*), gullfisk (*Carassius auratus*) og frosk (*Rana esculenta*). Ullhåndskrabben er et ekstremt euryhalint saltvannsdyr, mens de andre to er typiske ferskvannsformer. KROGH fant at det var en betydelig forskjell mellom ullhåndskrabben og de andre i differentieringen av de ionoptagende mekanismer. Ullhåndskrabbens mekanismer kan ikke skille mellom natrium og kalium; og ikke mellom klorid, bromid og tiocyanat (og en del andre ioner, cyanationen CNO^{\pm} , og azidionen N_3^{\pm}). Gullfisk og frosk kunde derimot skille natrium og kalium, mens de ikke kunde skille mellom klorid og bromid, men kunde dog skille disse to ioner fra tiocyanationen (og andre anioner).

Sammenligner vi nu forholdene hos ullhåndskrabben med de resultater som er nådd i det foreliggende arbeide, vil man se at ullhåndskrabben har den samme mekanisme som den euryhaline strandkrabbe. Mekanismenes evne til

å skille ioner, var for de undersøkte ioner den samme. Det ser således ut som disse to dyr har den samme mekanisme utviklet, og det bare er dens effektivitet som er forskjellig for de to dyr. Mens strandkrabben kan tåle en nedsettelse av saltkonentrasjonen til ca. 20 mM, kan ullhåndskrabben tåle et fall helt ned til en konentrasjon på ca. $\frac{1}{3}$ mM i vannet. Dette fører til at den kan trenge helt inn i ferskvann, hvis kloridmengden ligger over denne grense, således som tilfellet er for nordtyske og danske elver. (Saltinnholdet i de norske elver ligger betydelig under den nevnte grense, og noen katastrofal fremtreden av ullhåndskrabben i norske elver kan derfor neppe tenkes. Dette forhold som begrensende faktor for ullhåndskrabben er det tidligere ikke gjort oppmerksom på.)

Sammenligner vi de ionoptagende mekanismer som fantes hos den rene ferskvannsform flodkrepsen med mekanismene hos andre ferskvannsdyr, ser vi at flodkrepsen er i stand til å skille mellom natrium og kalium, slik som KROGH fant for de andre undersøkte ferskvannsdyr (gullfisk og frosk). Derimot skiller flodkrepsen ikke tiocyanationen fra klor- og bromionene. Forholdet er altså her som hos de to andre undersøkte krepsdyr, og ikke som hos de andre undersøkte ferskvannsformer. Sammenlignende fysiologisk sett er dette av særlig interesse, idet det viser at mekanismenes differensiering ikke utelukkende er betinget av de økologiske forhold, saltvann eller ferskvann.

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and that its history is a history of growth and expansion. The second is the fact that the United States is a nation of immigrants, and that its history is a history of the struggle for a better life. The third is the fact that the United States is a nation of free men, and that its history is a history of the struggle for freedom.

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and that its history is a history of growth and expansion. The second is the fact that the United States is a nation of immigrants, and that its history is a history of the struggle for a better life. The third is the fact that the United States is a nation of free men, and that its history is a history of the struggle for freedom.

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and that its history is a history of growth and expansion. The second is the fact that the United States is a nation of immigrants, and that its history is a history of the struggle for a better life. The third is the fact that the United States is a nation of free men, and that its history is a history of the struggle for freedom.

Påvisning av ionoptagende celler.

Tidligere resultater.

Tidligere har to forfattere ment å påvise celler med osmoregulatorisk funksjon.

KEYS og WILLMER (1932) mente å ha funnet noen celler i ålens gjeller, som utfører den transport av klorider fra blodet til vannet som ålen utfører ved hjelp av gjellene når den lever i saltvann (KEYS 1931). KEYS og WILLMER fant ved basis av gjellene noen store runde celler som avviker fra de andre celler i ålens gjeller, men denne avvikelse i utseende er det eneste kriterium for deres formodede funksjon. Så lenge det ikke foreligger videre opplysninger om disse celler, kan man se bort fra formodningen om deres betydning for osmoregulasjonen.

Den annen påvisning av celler med osmoregulatorisk betydning er foretatt av KOCH (1934) i gjeller av visse krepsdyr og insekter. Påvisningen er foretatt ved hjelp av sølvnitrat. De omtalte celler blir nemlig sortfarvet av redusert sølv når dyrene befinner sig i en sølvnitratopløsning. Det er nødvendig å omtale disse forhold nærmere.

Allerede KIMUS (1898) hadde funnet at »la région spéciale« i exopoditten hos *Asellus* blev sortfarvet av sølvnitrat. Han satte det i forbindelse med de anatomiske forhold. GICKLHORN (1925) fant at visse celler i daphniers gjellesekk farves sort av sølvsalter, og siden har GICKLHORN og DEJDAR

(1930, 1931, 1933) funnet lignende forhold for en rekke artropoder. De setter vedkommende cellers evne til å redusere sølv i forbindelse med deres oksydasjons-reduksjonspotential (redoxpotential), — grunnen til forekomsten i vanndyrs gjeller, satte de i forbindelse med disse organers respiratoriske betydning.

KOCH påviser det manglende grunnlag for formodningen om en sammenheng slik som GICKLHORN og medarbeidere fremsatte den, han påviser de feilaktige slutninger man kan komme til, og fremholder som sin mening at alle de organer det dreier sig om, har funksjonen »absorption des constituants minéraux«, altså osmoregulatorisk betydning.

Noget virkelig bevis for dette kan KOCH ikke gi. Han konstaterer bare at den sortfarvning som fremkommer hvis vedkommende dyr settes i meget tynne sølvnitratopløsninger (3—6 mM). Senere er det i flere tilfeller vist at vedkommende organer virkelig har osmoregulatorisk betydning (KOCH og KROGH 1936, KOCH 1938, WIGGLESWORTH 1938).

Selv om det fra KOCH's side ikke foreligger noget absolutt bevis for at de celler han har påvist, har optatt sølvet ved en aktiv process, er det ingen grunn til å tvile på at det er celler med osmoregulatorisk funksjon. Den innvending man kunde fremsette mot hans forsøk er følgende: Hvis cellemembranen er permeabel for Ag^+ -ionen, vil denne diffundere inn til samme konsentrasjon som i den omgivende væske er opnådd. Sølv vil før denne konsentrasjon er nådd, utfelles som sølvklorid, og stadig mer sølv vil diffundere inn. På denne måten kan store sølvmengder samles i de celler hvis membran er særlig lett gjennomtrengelig for sølvioner.

Egne forsøk.

For å undgå den nevnte mulighet for transport av sølv ved forsøkene med å påvise celler med osmoregulatorisk betydning hos flodkrepsen, holdtes det så lav konsentrasjon av sølvnitrat i væsken at sølvklorid ikke kunde utfelles. Ved 25° er sølvkloridets oppløselighetsprodukt $1,56 \cdot 10^{-10}$. En mettet oppløsning av AgCl er da 0,0125 mM. Det blev derfor arbeidet med en sølvkonsentrasjon på 0,010 mM i vannet. (Det må tilføies at oppløseligheten av AgCl ikke følger massevirkningsloven, således at oppløseligheten ikke synker når det er mere Cl-ion tilstede. På grunn av kompleksdannelse er det omvente tilfelle, og ved den nevnte konsentrasjon er derfor en utfelling som AgCl utelukket.)

Ved å la en flodkreps gå i en sådan oppløsning, fremkom det i løpet av et døgn en sortfarvning i gjellene som vist i tavle I, fig. 3. Her er brystskjoldet før forsøket klippet bort, så forandringene hele tiden kunde følges. En begynnende sortfarvning inntrådte allerede efter ca. 1 time, selve mørkfarvningen (reduksjonen) var dessuten tydelig avhengig av lysets påvirkning. En kreps kunde således settes noen timer i oppløsningen uten at det kom noen kraftig sortfarvning hvis den ikke blev utsatt for sterkt dagslys. Forsøket blev avbrudt, og krepsen fiksert i 70% alkohol. Neste morgen var farven ikke tydelig mørkere, og kunde karakteriseres som en lys grå skygning på gjellene. Efter noen timers belysning i dagslys fremkom en kraftig sortfarvning.

At det har foregått en ophopning av sølv i cellene kan tydelig vises, idet så sterk sortfarvning bare kan skyldes temmelig store sølvmengder. Et forsøk på å redusere den i forsøkene brukte sølvnitratopløsning med ascorbinsyre, som opgis å redusere sølvioner fullstendig til metallisk sølv, gav det resultat at man ikke fikk noen tydelig mørkfarvning

i væsken, selv ved 20 cm lagtykkelse. Sølv et må altså i de sortfarvede celler foreligge i langt høiere konsentrasjon enn i væsken.

Når det ved mine forsøk blev benyttet så lave konsentrasjoner av sølvnitrat at en utfelling som sølvklorid er utelukket, er dette ikke i og for sig noget bevis for at den opsamling av sølv som har skjedd virkelig skyldes en aktiv optagelse av sølvioner. Man kunde tenke sig en sølvalbuminatforbindelse med mindre oppløselighet enn sølvklorid (tungt oppløselige eggehvitmetallforbindelser er velkjent). Hvis det inndiffunderte sølv ved den lave konsentrasjon felles som albuminat, kunde man få en ophopning av sølv i cellen, slik som omtalt at sølv et ved høiere sølvnitratkonsentrasjoner i væsken kunde tenkes fellet som klorid.

Bevis for aktiv optagelse av sølvionen.

Hvis det kunde vises at optagelsen av sølv er knyttet til energiomsetningen, vil det derimot bevise at optagelsen og akkumuleringen av sølv et er en aktiv process.

Mitt første forsøk i denne retning blev gjort med å forgifte isolerte gjeller med cyanid, for derved å forhindre deres oksydative stoffskifte. Hvis disse forgiftede celler ikke optar sølv fra en sølvnitratopløsning, mens normale gjeller optar sølv fra en tilsvarende oppløsning, vilde dette være fyldestgjørende bevis for at sølvoptagelsen er forbundet med energiforbruk.

Det viste sig at det ikke fremkom noen sortfarvning i noen av de isolerte gjeller i en 0,010 mM sølvnitratopløsning, — de fysiologiske forhold er altså så meget forstyrret ved isoleringen av gjellene at optagelsen av sølv fra så tynne oppløsninger ikke kan foregå. Forsøkene viser derimot at sortfarvningen på det levende dyr ikke kan skyldes sølv

som er fellet efter inndiffusjon, da denne form for transport like fullt skulde kunne foregå i de isolerte gjeller. I en 10 ganger så sterk oppløsning, får man derimot en sortfarvning av den isolerte gjelle, som må skyldes at inndiffundert sølv er fellet (som klorid eller albuminat). Disse forhold gjør det vanskelig å søke forklaringen på akkumuleringen av sølvet i annet enn en aktiv celleprocess.

Det endelige bevis for at optagelsen av sølv fra de nevnte tynne oppløsninger er aktiv, er følgende: Hvis en kreps settes i en luftfri sølvnitratopløsning (opløsningens konsentrasjon forutsettes hele tiden å være 0,010 mM), kan den leve her noen timer. Resultatet er at det i denne tid kommer en meget svak gråfarvning i gjellene (forsøket foretas i dagslys), mens en kreps som har gått like lang tid i en luftholdig oppløsning får en kraftig sortfarve i gjellene. Sammenligningen er alltid foretatt efter at maksimal mørkfarvning er fremkaldt ved lyseksponering.

Ennu tydeligere fremgår forholdet av følgende forsøk. Hvis man setter en kreps 20 eller 30 minutter i en luftfri sølvnitratopløsning, kan den overleve dette. Flyttes den så til almindelig ledningsvann, er det til neste dag ikke kommet noen synlig mørkere farve i gjellene. Settes den samme kreps nu tilbake i samme oppløsning som i mellemtiden er mettet med luft ved gjennembobling, og får gå der like lenge som i forsøkets første del, vil man efter et døgns lyseksponering se en meget kraftig sortfarve i gjellene. Dette er det avgjørende bevis for at optagelsen av sølv er knyttet til det oksydative stoffskifte.

Det makroskopiske billede ved sølvfarvningen.

Av tavle I, fig. 3 fremgår at sortfarvningen er lokalisert til den nederste del av gjellene. Som det tydeligere sees på

tavle I, fig. 4, er det en anatomisk forskjell i bygningen av den nedre og den øvre del av gjellene. Dette gjelder den ytterste gjellerekke, podobranchiene. De to indre gjellerekker, arthrobranchiene, viser samme avgrensning av sortfarvningen til den nederste del. Dette fremgår av tavle I, fig. 5, hvor podobranchiene er klippet bort. Makroskopisk er det ingen forskjell i den anatomiske bygning av de to deler av arthrobranchiene, gjellene har samme frynsete bygning helt ut til spissen. Sortfarvningen kan derfor ikke, som det kunde se ut til på podobranchiene, lokaliseres til en bestemt makroskopisk bygning i gjellene.

(Koch har i en samtale om disse forhold fortalt mig at han hadde forsøkt å finne »des cellules d'argent« hos flodkrep, men han hadde bare opnådd en massiv sortfarvning av hele gjelleoverflaten. Dette vil jeg tilskrive at Koch har brukt vesentlig sterkere sølvnitratopløsninger, og at sølvet derfor er diffundert inn i cellene og felt som klorid.)

Mikroskopisk undersøkelse.

Makroskopisk viser ikke alle gjelletrådene like sterk sortfarvning. Ved den mikroskopiske undersøkelse viser noen av gjelletrådene en massiv grå eller sort overflate, mens det i andre finnes lett iakttagbare sortfarvede celler (tavle II, fig. 6).

Om det virkelig dreier sig om en sortfarvning av hele den aktive celle, eller bare en funksjonell del av den, kan først avgjøres efter meget inngående cytologiske undersøkelser. I det følgende brukes betegnelsen celle med forbehold om at dette uttrykk muligens ikke dekker det cytologisk korrekte begrep, men betegner den funksjonelle enhet ved den aktive sølvoptagelse.

Karakteristisk for cellene er at de er meget små, ca. 2,5—

5 μ . KOCH gir ikke noget billedmateriale av de celler han har vist farves av sølv hos en rekke krepsdyr og insekter, så en direkte sammenligning med hans resultater er ikke mulig. Hans karakteristikk av den histologiske karakter av de organer det dreier sig om, er at cellene er meget store og protoplasmarike; men det fremgår ikke om det her dreier sig om de celler som er farvet av sølv, eller om det er den almindelige cellekarakter i organene. Det er derfor på det nuværende tidspunkt ikke mulig å trekke sammenligninger mellem de mikroskopiske funn hos flodkrepsen og de tidligere funn av celler som farves av sølv på lignende måte.

Snitt av sølvfarvet materiale er vist i tavle II, fig. 7 (preparatet er ellers ufarvet). Den flate form av cellene virker meget overraskende, da det har vært antatt at celler med osmoregulatorisk funksjon for å kunne utføre denne funksjon måtte ha en relativt stor høide. Det kunde ikke avgjøres om cellene avviker fra de almindelige overflateceller i gjellene, da bedømmelsen av det mikroskopiske billede vanskeliggjøres av den sterke sortfarvning.

Man vil av tavle II, fig. 6 se at de sølvfarvede celler ligger uregelmessig fordelt over hele overflaten i gjelletråden. Det forhold at ikke alle overflateceller har optatt sølv, behøver ikke å vise at den sølvoptagende egenskap er knyttet til bestemte celler. Det er et almindelig kjent fysiologisk fenomen at cellene i et organ kan arbeide alternerende, således at bare en mindre del av cellene er i arbeide samtidig, og deres arbeide efter noen tid overtas av andre. Den sølvoptagende egenskap, såvel som den almindelige osmoregulatoriske funksjon, kan meget vel tenkes som en generell egenskap i overflatecellene i den del av flodkrepsens gjeller som farves sort ved aktiv optagelse av sølv.

Det foreligger god grunn til å tro at optagelsen av sølv skjer ved hjelp av den i første del av dette arbeide omtalte spesifikke kationoptagende mekanisme, idet sølvionen kjemisk sett viser betydelige likhetspunkter med alkalimetallenes ioner. Noget bevis for dette kan allikevel ikke føres på det nuværende tidspunkt.

Sammenfatning.

- 1) Det er lykket å påvise elementer i flodkrepsens gjeller, som er i stand til å opta og akkumulere sølvioner ved en aktiv process under energiforbruk.
 - 2) Denne egenskap er lokalisert til den basale del av gjellene, men kunde ikke bringes i forbindelse med den makroskopiske anatomi.
 - 3) Elementer med evne til aktiv iotnopagelse er således påvist i flodkrepsens gjeller. Det formodes at de samme elementer er sete for den spesifikke kationoptagende mekanisme.
-

Literatur.

- BERGER, Eva. Ueber die Anpassung eines Süßwasser- und eines Brackwasserkrepses an Medien von verschiedenem Salzgehalt. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **228**, 790—807, (1931).
- BERGER, Eva, & BETHE, A. Die Durchlässigkeit der Körperoberflächen wirbelloser Tiere für Jodionen. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **228**, 769—789, (1931).
- BETHE, A. Ionendurchlässigkeit der Körperoberfläche von wirbellosen Tieren des Meeres als Ursache der Giftigkeit von Seewasser abnormer Zusammensetzung. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **221**, 344—362, (1929).
- BETHE, A. Die Salz- und Wasserdurchlässigkeit der Körperoberflächen verschiedener Seetiere in ihrem gegenseitigen Verhältnis. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **234**, 629—644, (1934).
- BETHE, A. & BERGER, E. se: BERGER & BETHE.
- BOGUCKI, M. Recherches sur la régulation de la composition minérale du sang chez l'écrevisse (*Astacus fluviatilis* L.). Arch. int. Physiol. **38**, 172—179, (1934).
- BOTAZZI, F. La pression osmotique du sang des animaux marins. Arch. ital. Biol. **28**, 61—72, (1897).
- COLLANDER, R. Ueber die Kationenelektion der höheren Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **55**, 74—81, (1937).
- CONWAY, E. J. & BYRNE, A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. 1) The micro-determination of ammonia. Bioch. J. **27**, 419—429, (1933).
- DEJDAR, E. Die Funktion der »Blattförmigen Anhänge« der Embryonen von *Asellus aquaticus* (Versuch einer Analyse mit Hilfe vitaler Elektivfärbung). Z. Morph. Oekol. Tiere, **19**, 321—329, (1930).
- DEJDAR, E. Die Korrelation zwischen Kiemensäckchen und Nackenschild bei Phyllopoden. Z. wiss. Zool. **136**, 422—452, (1930).

- DEJDAR, E. Bau und Funktion des sog. »Haftorgans« bei marinen Cladoceren (Versuch einer Analyse mit Hilfe vitaler Elektivfärbung). Z. Morph. Oekol. Tiere, **21**, 617—628, (1931).
- DEJDAR, E. & GICKLHORN, J. Neue Untersuchungen zum Nachweis der Funktion des Nackenschildes der Cladoceren als Atmungsorgan. Z. Morph. Oekol. Tiere. **26**, 94—109, (1933).
- DUVAL, M. Recherches physico-chimiques et physiologiques sur le milieu intérieur des Animaux Aquatiques. Modifications sous l'influence du milieu extérieur. Ann. Inst. océanogr. **2**, 232—407, (1925).
- FRÉDÉRICQ, L. La physiologie de la branchie et la pression osmotique du sang de l'écrevisse. Bull. Acad. roy. Belg. Sér. 3, **35**, 831—833, (1898).
- FRÉDÉRICQ, L. Sur la concentration moléculaire du sang et des tissus chez les animaux aquatiques. Bull. Acad. Belg. Cl. Sci. 1901.
- GICKLHORN, J. Ueber spezifische und lokale Reduktion von Silber- und anderen Metallsalzen in den Kiemensäckchen von *Daphnia M. Lotos*, **73**, 83—96, (1925).
- HERRMANN, FRANZISKA. Ueber den Wasserhaushalt des Flusskrebse. Z. vergl. Physiol. **14**, 479—524, (1931).
- HOFFMAN, W. S. & OSGOOD, BESS. A photoelectric method for the microdetermination of sodium in serum and urine by the uranyl zinc acetate precipitation. J. biol. Chem. **124**, 347—357, (1938).
- HUF, E. Ueber die Aufrechterhaltung des Salzgehaltes bei Süßwasserkrebse (*Potamobius*). Pflüg. Arch. ges. Physiol. **232**, 559—573, (1933).
- INGRAHAM, R. C. & VISSCHER, M. B. Further studies on intestinal absorption with the performance of osmotic work. Amer. J. Physiol. **121**, 771—785, (1937).
- KEYS, A. B. Chloride and water secretion and absorption by the gills of the eel. Z. vergl. Physiol. **15**, 364—388, (1931).
- KEYS, A. B. The determination of chlorides with the highest accuracy. J. chem. Soc. Lond. 1931, p. 2440—2447.
- KEYS, A. & WILLMER, E. N. »Chloride secreting cells« in the gills of fishes, with special reference to the common eel. J. Physiol. **76**, 368—378, (1932).
- KIMUS, J. Recherches sur les branchies des crustacés. La Cellule, **15**, 297—404, (1898).
- KOCH, H. Essai d'interprétation de la soit-disant »reduction vitale«

- des sels d'Argent par certains organes d'Arthropodes. Ann. Soc. Scient. Bruxelles, Sér. B. **54**, 346—361, (1934).
- KOCH, H. & KROGH, A. La fonction des papilles anales des larves de Diptères. Ann. Soc. scient. Bruxelles, Sér. B. **56**, 459—461, (1936).
- KOCH, H. The absorption of chloride ions by the anal papillae of Diptera larvae. J. exp. Biol. **15**, 152—160, (1938).
- KROGH, A. A method for the determination of ammonia in water and air. Biol. Bull. **67**, 126—131, (1934).
- KROGH, A. Osmotic regulation in fresh water fishes by active absorption of chloride ions. Z. vergl. Physiol. **24**, 656—666, (1937).
- KROGH, A. The active absorption of ions in some freshwater animals. Z. vergl. Physiol. **25**, 335—350, (1938).
- KROGH, A. Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge Comparative Physiology, Cambridge 1939, 242 s., inneholder en almindelig fremstilling av osmoregulatoriske problemer (monografi).
- KROGH, A. & USSING, H. H. A note on the permeability of trout eggs to D₂O and H₂O. J. exp. Biol. **14**, 35—37, (1937).
- LINDERSTRØM-LANG, K. Studies on enzymatic histochemistry. XIX. Microestimation of alkalies in tissue. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Sér. chimique. **21**, (1936).
- LUNDEGÅRDH, H. Untersuchungen über die Anionenatmung. Bioch. Z. **290**, 104—124, (1937).
- NAGEL, H. Die Aufgaben der Exkretionsorgane und der Kiemen bei der Osmoregulation von *Carcinus maenas*. Z. vergl. Physiol. **21**, 468—491, (1934).
- NORBERG, B. Mikrobestimmung von Kalium. Mikrochimica Acta. **1**, 212—219, (1937).
- OSTERHOUT, W. J. V. Permeability in large plant cells and in models. Ergebn. Physiol. exp. Pharm. **35**, 967—1021, (1933).
- PETERS, H. Ueber den Einfluss des Salzgehaltes im Aussenmedium auf den Bau und die Funktion der Excretionsorgane dekapoder Crustaceen (nach Untersuchungen an *Potamobius fluviatilis* und *Homarus vulgaris*). Z. Morph. Oekol. Tiere. **30**, 335—381, (1935).
- PFEFFER, W. Osmotische Untersuchungen. Studien zur Zellmechanik. Leipzig 1877.
- PIEH, SYLVIA. Ueber die Beziehungen zwischen Atmung, Osmoregulation und Hydratation der Gewebe bei euryhalinen Meeresvertebraten. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol. Tiere. **56**, 129—160, (1936).

- REHBERG, P. B. The determination of chlorine in blood and tissues by microtitration. *Bioch. J.* **20**, 483—485, (1926).
- SCHLIEPER, C. Ueber die Einwirkung niederer Salzkonzentrationen auf marine Organismen. *Z. vergl. Physiol.* **9**, 478—514, (1929).
- SCHLIEPER, C. Ueber die osmoregulatorische Funktion der Aalkiemer. *Z. vergl. Physiol.* **18**, 682—695, (1933).
- SCHNOHR, E. A study on the cause of death in high intestinal obstruction. København, 1934. (Dissert.)
- SCHOLLES, W. Ueber die Mineralregulation wasserlebender Evertebraten. *Z. vergl. Physiol.* **19**, 522—554, (1933).
- SCHWABE, E. Ueber die Osmoregulation verschiedener Krepse (Malacostracen). *Z. vergl. Physiol.* **19**, 183—236, (1933).
- SMITH, HOMER W. The absorption of water and salts by marine teleosts. *Amer. J. Physiol.* **93**, (1930).
- WEBB, D. A. Ionic regulation in *Carcinus maenas*, *Proc. Roy. Soc. B.* **129**, 107—136, (1940).
- WIDMANN, ERNA. Osmoregulation bei einheimischen Wasser- und Feuchtluft-Crustaceen. *Z. wiss. Zool.* **147**, 132—169, (1935).
- WIGGLESWORTH, V. B. The regulation of osmotic pressure and chloride concentration in the haemolymph of mosquito larvae. *J. exp. Biol.* **15**, 235—247, (1938).
-

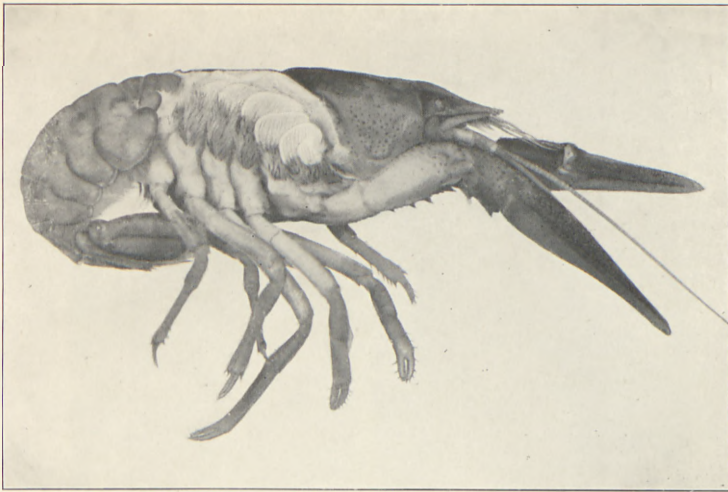


Fig. 3.



Fig. 4.

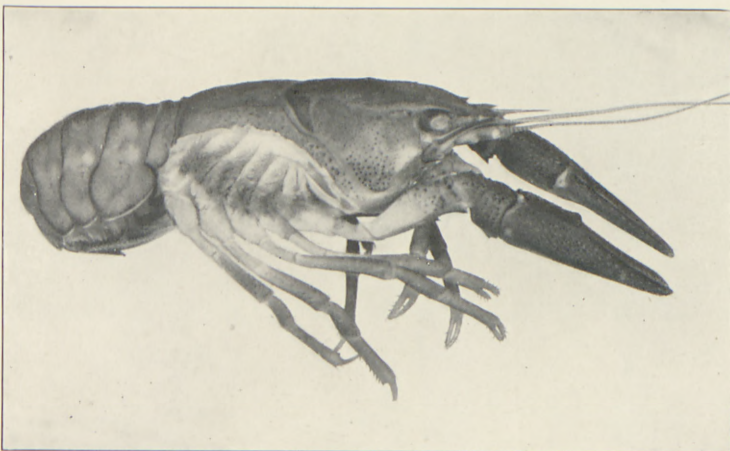


Fig. 5.

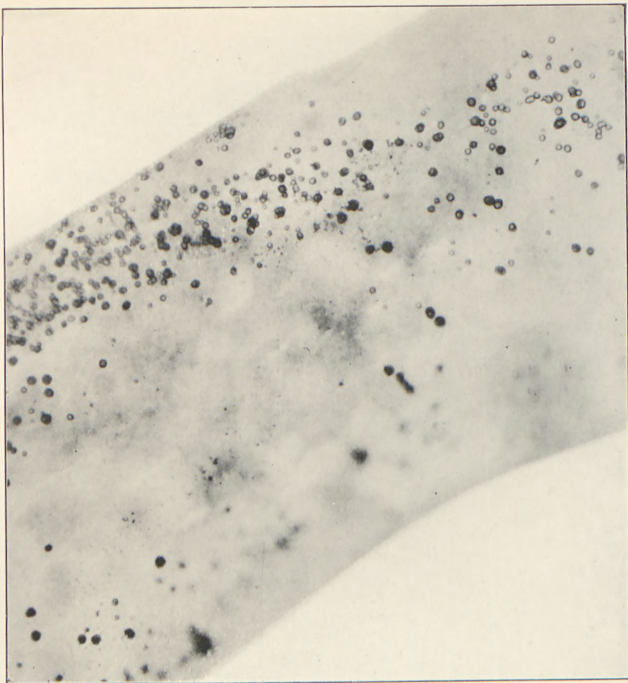


Fig. 6.

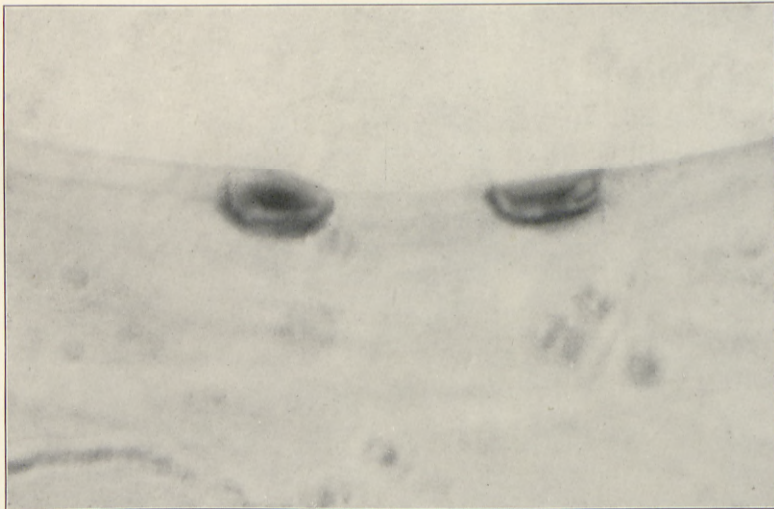


Fig. 7.

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser. **XVI**, 7.

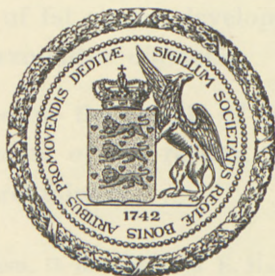
SOME
STUDIES ON VITAMIN E

BY

H. DAM, J. GLAVIND, INGE PRANGE

AND

J. OTTESEN



KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

Det Kgl. Danske Videnskabsbernes Selskab.
Biologiske Meddelelser. XVI, 7.

SOME STUDIES ON VITAMIN E

H. DAM, J. GLAVIND, INGE PRANGE
AND
J. OTTESEN



KØBENHAVN
I KONFORSKEDT HEDERLIG HANDELSGÅRD

Printed in Denmark.
Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S

Previous communications from this laboratory have dealt with two nutritional diseases in chicks, viz. the previously known alimentary encephalomalacia¹ and the new disease alimentary exudative diathesis². It was shown that these diseases are due to a deficiency of vitamin E.

In this paper, our continued studies on vitamin E are reported. The studies can be divided into the following four groups:

1. The chemical determination of tocopherols.
2. Attempts to use the exudative diathesis for the comparison of the activity of natural sources of vitamin E with α -tocopherol.
3. Comparison between the anti-exudative activity of α - and β -tocopherol.
4. The influence of fat on the development of encephalomalacia and exudative diathesis.

This paper presents the results of our studies on these subjects, though some of the results, however, are to be looked upon as preliminary.

¹ H. DAM, J. GLAVIND, O. BERNTH and E. HAGENS, *Nature* **142**, 1157 (1938).

² H. DAM and J. GLAVIND, *Nature* **142**, 1077, (1938). H. DAM and J. GLAVIND, *Nature* **143**, 810 (1939). H. DAM and J. GLAVIND, *Skand. Archiv für Physiol.* **82**, 299 (1939). H. DAM and J. GLAVIND, *Die Naturwissenschaften* **28**, 207 (1940).

I. The chemical determination of tocopherols.

For the chemical determination of vitamin E (total amount of tocopherols), several methods are described which we have tried to apply and to improve.

1. The spectrographic method. The use of the absorption spectrum of vitamin E for the chemical determination has been proposed. CUTHBERTSON et al.¹ used the method for body fat and found that tocopherol could be estimated with reasonable accuracy in crude extract when present in fat in amounts down to 1 %, and in the unsaponifiable fraction when present in amounts down to 0,1 %. A modification of the method consisting in oxidation of the unsaponifiable fraction with silver nitrate made a detection of 0,01 % possible.

We have tried to use the method for pure d,l- α -tocopherol, for wheat germ oil, and for the unsaponifiable fraction of wheat germ oil. The results appear from Fig. 1 which shows the absorption spectra measured by means of a Hilger quartz spectrograph with echelon cells.

Curve 1 shows the absorption spectrum of pure d,l- α -tocopherol in absolute alcohol with a maximum at 293 m μ . Curve 2 gives the absorption spectrum of wheat germ oil in hexane; no maximum at 293 m μ . Curve 3 represents the absorption spectrum of unsaponifiable matter from wheat germ oil in absolute methyl alcohol; it shows a distinct maximum at 293 m μ . The extinction is, however, about 50 % greater than that corresponding to the tocopherol content as determined by the method of EMMERIE and ENGEL. Unsaponifiable matter of extract of alfalfa, even after distillation in a high vacuum, showed no

¹ W. F. J. CUTHBERTSON, R. R. RIDGEWAY and J. C. DRUMMOND, *Biochem. J.* **34**, 34 (1940).

maximum at $293\text{ m}\mu$, but a distinct inflection. However, the extinction was only to about 20% due to tocopherols.

For an exact spectrographic determination of tocopherols, a further purification of the extracts, which is rather difficult, will therefore be necessary. Even if an extinction

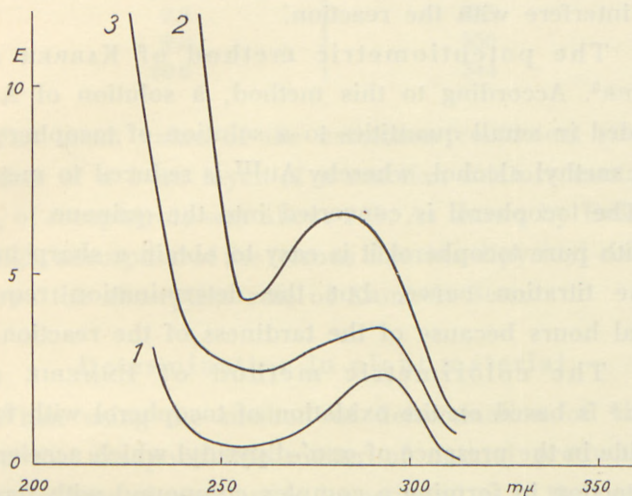


Fig. 1. Abscissae: wave length in $\text{m}\mu$.

Ordinates: extinction.

Curve 1: d,l- α -tocopherol 0.032%.

Curve 2: Wheat germ oil in hexane 10.7%, corresponding to 0.026% of tocopherol in the solution.

Curve 3: Unsaponifiable matter from 1.299 g wheat germ oil in 10 cc methyl alcohol corresponding to 0.032% of tocopherol in the solution.

four times as great is obtained by oxidation with AgNO_3 , as used by CUTHBERTSON et al., this will not suffice for an exact tocopherol determination in plant material.

2. The colorimetric method of FURTER and MEYER¹. By means of this method, the red colour developed after heating an alcoholic solution of tocopherol with nitric acid is estimated. We found, however, that this method

¹ M. FURTER and R. E. MEYER, *Helv. chim. acta* **22**, 240 (1939).

was not exact, and the results were more difficult to reproduce than when the method of EMMERIE and ENGEL was applied; therefore we worked exclusively with the last mentioned method. Other authors have found that catechol derivatives¹ and the quinone corresponding to α -tocopherol² may interfere with the reaction.

3. The potentiometric method of KARRER and KELLER³. According to this method, a solution of AuCl_3 is added in small quantities to a solution of tocopherol in 80 % methyl alcohol, whereby Au^{III} is reduced to metallic Au. The tocopherol is converted into the quinone.

With pure tocopherol it is easy to obtain a sharp break in the titration curve, but the determination requires several hours because of the tardiness of the reaction.

4. The colorimetric method of EMMERIE and ENGEL⁴ is based on the oxidation of tocopherol with ferric chloride in the presence of α : α' -dipyridyl which accelerates the reaction in forming a complex compound with ferrous ions. This complex has a red colour which may be measured after 15 min. by filter S 50 in the Zeiss-Pulfrich photometer. The reaction is carried out in ethyl alcohol which may contain up to 20 % of benzene.

Determination of the extinction coefficient.

With pure α -tocopherol the method works fairly well. We prepared the α -tocopherol by saponifying the pure acetate and used these solutions for the determination of the extinction coefficient (Table 1).

¹ L. I. SMITH, W. B. IRWIN and H. F. UNGNADE, *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2424 (1939).

² A. EMMERIE and C. ENGEL, *Rec. trav. chim.* **58**, 284 (1939).

³ P. KARRER and H. KELLER, *Helv. chim. acta* **21**, 1161 (1938).

⁴ A. EMMERIE and C. ENGEL, *Rec. trav. chim.* **57**, 1351 (1938).

Table 1

mg d,l- α -tocopherol acetate saponified	Extinction coefficient E $\frac{1 \text{ cm}}{1\%}$
268.3	345
9.8	335
9.8	350
10.6	344

The mean value of the extinction coefficient (the extinction of a 1 cm layer of a reaction mixture containing 1 % of tocopherol) was about 345. As shown by EMMERIE, the light absorption of the ferrous chloride-dipyridyl-complex follows the absorption rule of Lambert-Beer.

Determination in plant material.

When using the method of determination of vitamin E in the unsaponifiable matter of natural products, the same sources of error are to be expected as in the potentiometric method.

EMMERIE and ENGEL¹ proposed to remove carotenoids by adsorption on columns of flordin XS earth. The carotenoids are said to be adsorbed while tocopherol is passing into the filtrate. We were not able to obtain reliable results in this way.

A more suitable method to eliminate carotenoids and certain other reducing substances is the acetylation method developed by KARRER and KELLER² in their potentiometric method. They heated a mixture of β -carotene and tocopherol with acetic anhydride in pyridine solution on the water bath for two hours. The pyridine solution is then

¹ A. EMMERIE and C. ENGEL, *Rec. trav. chim.* **58**, 3 (1939).

² P. KARRER and H. KELLER, *Helv. chim. acta* **22**, 253 (1939).

diluted with petrol ether, washed with diluted hydrochloric acid, and then with water until neutral reaction. Then the petrol ether is evaporated and the remaining substances are titrated with auric chloride. Another sample of the carotene-tocopherol-mixture is titrated without acetylation and the tocopherol content is evaluated as the difference between the two titrations. KARRER and KELLER found that by this method a fairly good separation between tocopherol and carotene is obtained. We carried out similar experiments with mixtures of carotene and tocopherol and carotene alone, but we made the determinations by means of the colorimetric method. We were able to state the results of KARRER and KELLER and, consequently, to include an acetylation in our tocopherol determination. We found it to be important to use freshly distilled pyridine and to carry out the acetylation in a N_2 -atmosphere.

We obtained further separation from other reducing non-tocopherols by including in the determination a distillation in a high vacuum. According to EMERSON et al.¹, the tocopherols distill at 10^{-5} mm Hg between 110° and 140° . Our experiments revealed the fact that the unsaponifiable matter of certain natural products, for instance the lipoids of green leaves and hips, contained appreciable amounts of substances which reduce ferric chloride, but do not distill in high vacuum as vitamin E does.

We distilled pure α -tocopherol and mixtures of α -tocopherol and β -carotene for 5 minutes in high vacuum at 140° in the apparatus described below (Fig. 2) and determined the tocopherol-content of the distillate colorimetrically (Table 2).

¹ O. H. EMERSON, G. A. EMERSON, A. MOHAMMED and H. M. EVANS, *J. Biol. Ch.* **122**, 99 (1937).

Table 2.

Product distilled	Per cent recovery
1.9 mg d,l- α -tocopherol	96
1.9 - d,l- α -tocopherol	97
1.9 - d,l- α -tocopherol + 0,17 mg β -carotene..	95
0.95 - d,l- α -tocopherol + 0,68 - β -carotene..	98

Distillation longer than 5 minutes did not yield greater recovery. By distillation of unsaponifiable matter from wheat germ oil the following results were obtained (Table 3). The distillation lasted for 10 minutes.

Table 3.

Product distilled	Per cent recovery
8 mg of unsaponifiable matter of wheat germ oil	94
45 - - - - -	91
7 - - - - -	98
54 - - - - -	94

As "per cent recovery" we denote tocopherol colorimetrically determined in the distillate in relation to tocopherol colorimetrically determined before the distillation. Also here, almost total recovery was obtained if amounts not greater than 10—20 mg were distilled. After acetylation of the unsaponifiable matter of wheat germ oil, practically no reduction power remains.

The unsaponifiable matter of the lipoids of hips and green leaves behaves in quite a different way. Here, a correction of 10—50 % can be obtained by the acetylation method, and a considerably greater correction will be obtained by subtracting that part of the reducing substances which remains in the non-distillable fraction (Table 4).

Table 4.

Product distilled	Colorimetrically determined value calculated as % tocopherol in dried material		
	direct determination	after subtraction for acetylation	in the distillate
4.0 mg of unsaponifiable of hips	0.056	0.048	0.032
4.9 mg — —	0.044	0.033	0.022
6.0 mg — —	0.045	0.034	0.025
5.0 mg of unsaponifiable of spinach	0.261	0.142	0.045
5.2 mg — —	0.272	0.170	0.062
3.0 mg of unsaponifiable of alfalfa	0.192	0.138	0.044
2.0 mg — —	0.144	0.960	0.040

These results suggest the assumption that certain components hitherto unknown must be present in unsaponifiable matter from lipoids of hips and dried leaves, since, if a known amount of d, 1- α -tocopherol is added before the distillation, the total amount of tocopherol can be recovered on the condenser and, furthermore, the total reduction power of distillate + non-distillable is the same as before the distillation.

It might be of interest to investigate the chemical nature of these unknown reducing substances. They will probably be alcohols, since their reducing power is eliminated by acetylation. They have no vitamin E activity when tested on chicks (these studies are reported in Part II of this paper).

If the method is to be applied on animal material, it must be reminded that vitamin A which does not occur in plant material will also reduce ferric chloride. Vita-

min A distills in high vacuum, and the reduction power is diminished by acetylation, however, it may possess part of its reducing properties even after acetylation. Vitamin A is, therefore, not eliminated by the method.

Perhaps, it becomes possible to eliminate vitamin A by means of the antimony trichloride reaction, such as proposed by KARRER and KELLER¹.

Frequently, but a very small acetylation correction is obtained in the distillate; sometimes, this correction may amount to 10 %/o. It is, therefore, advisable in every case to examine whether an acetylation after the distillation is necessary or not.

Procedure for tocopherol-determination in dried plant material.

Production of the unsaponifiable matter. About 5 grams of the material are weighed and ground in a mortar with about equal parts of pulverized quartz and a little CaCO_3 . The mixture is extracted on a glass filter with 33 %/o freshly distilled acetone; this extract is removed. The main extraction is carried out by means of successive portions of pure acetone, until the acetone remains colourless. Then one extraction with 90 %/o acetone and two extractions with ether are carried out. The combined extracts are evaporated in vacuo at about 40° . The residue is transferred to a separatory funnel by means of ether and separated from eventually admixed water. Then the ether is dried with Na_2SO_4 overnight; the Na_2SO_4 is filtered off, washed with ether and the combined extracts are evaporated in vacuo to about 25 cc. The ether solution is then saponified with 4 n methyl alcoholic potassium hydroxide in an N_2 atmosphere in a

¹ loc. cit. p. 7.

separatory funnel for two hours. The mixture is diluted with water, the watery phase is separated and washed with ether. The combined ether phases are washed with water until they are alkali free and are dried over Na_2SO_4 . After filtration and evaporation in vacuo, the residue is soluted in ethyl alcohol plus a little benzene.

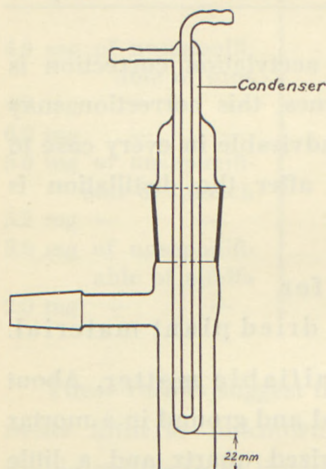


Fig. 2.

Distillation. As much of this solution as contains 5–10 mg of dried material is carefully evaporated on the bottom of the vacuum still (Fig. 2) which is thereafter connected to the high vacuum pump aggregate consisting of a mercury diffusion pump, a condenser immersed in acetone-solid CO_2 and a mechanical fore-vacuum pump. When the pressure has fallen below 10^{-3} mm Hg, measured

by means of a v. Reden manometer, the apparatus is immersed into liquid Wood's metal at 140° so that the surface of the metal is 2.5 cm above the deepest point of the condenser. This temperature is maintained for 25–30 minutes. Then, the metal bath is removed and the apparatus is allowed to cool. The distillate is collected from the condenser by washing with ethanol-benzene.

Acetylation. One part of the distillate is used directly for the colorimetric reaction. The rest is evaporated, soluted in 1 cc acetic anhydride + 5 cc freshly distilled pyridine and the acetylation is carried on for two hours in an N_2 -atmosphere on a boiling water bath with reflux-condenser. The solution is then diluted with petrol ether, and the

petrol ether layer is washed, first with diluted hydrochloric acid and then with water until neutral. The petrol ether is dried with Na_2SO_4 , evaporated and soluted in ethanol-benzene.

The colour reaction. As much of the ethanol-benzene solution as contains about 0.1 mg of tocopherol + 1 cc 0.5 % α, α' -dipyridyl in ethanol + 1 cc 0.2 % FeCl_3 in ethanol is transferred to a 25 cc measuring flask and diluted to the mark with ethanol. The photometer is read after 15 minutes by screen S 50 and 5 cm microcuvettes. The result is calculated by means of the extinction coefficient for pure d, l- α -tocopherol which is 345, as mentioned above.

The tocopherol content of some natural products.

By means of this method, the tocopherol content of a series of natural products was determined (Table 5). It is interesting to see that dried green plants such as spinach, alfalfa, and dried hips contain just as much tocopherol as wheat germ, hitherto looked upon as the most vitamin E-potent source. Lipoid extracts of these products contain much more tocopherol than wheat germ oil. The high

Table 5.

Product	% tocopherol
Wheat germ (after the season)	0.015—0.038
Wheat germ oil (after the season), pressed ...	0.14— 0.25
Wheat germ oil, extracted with petrol ether...	0.45
Wheat germ oil of the same charge pressed ...	0.23
Dried hips (without pips)	0.02— 0.05
Petrol ether extract of dried hips.....about	2.3
Dried spinach	0.05
Dried alfalfa (commercial products)	0.01— 0.045
Apple pips	0.02
Mangold..... less than	0.00001

potency of these products as vitamin E sources has been confirmed in animal experiments (Part II).

Summary.

Various chemical measures for the determination of vitamin E (tocopherols) have been examined. The best results were obtained by means of the α , α' -dipyridyl-ferric chloride method after the product had been purified by saponification and distillation in a high vacuum.

II. Some experiments on estimating the vitamin E activity of natural products by means of alimentary exudative diathesis.

In our previous works on vitamin E, we suggested to use the anti-cephalomalacia activity or the anti-exudation activity of vitamin E for its biological estimation. Such experiments have now been carried out.

Experimental. Chicks weighing about 100 g were kept as usual in individual cages under clean conditions. They were fed the vitamin E-free diet 545 consisting of diet 538 + 5 % cod liver oil.

Diet 538	*) Salt mixture No. 3
Casein, alcohol extracted. 150	Calcium carbonate.... 400
Dried brewer's yeast..... 100	Magnesium carbonate. 20
Sugar 730	Sodium chloride 88
Salt mixture No. 3*) 20	Ferric citrate 32
1000	Di-jodo-tyrosine..... 0.005
	Cupric sulphate, cryst. 3
	Manganous sulphate,
	cryst. 6
	549

Vitamin K was furnished in the form of tablets containing a highly purified product, resp. pure K₁, six times

a week. The substances, whose vitamin E activity had to be tested, resp. pure synthetic d,l- α -tocopherol acetate (kindly put at our disposal by F. Hoffmann-la Roche & Co. A.G., Basel), which was used as standard, were also furnished as tablets six times a week.

Three series of experiments, A, B and C, were carried out.

In series A, the effects of a logarithmic series of doses of dried hips were compared with a logarithmic series of doses of tocopherol. The following doses were used: 0.25 — 0.5 — 1 and 2 g of dried hips and 0.1 — 0.2 — 0.4 — 0.8 — 1.6 and 3.2 mg of d,l- α -tocopherol acetate.

In series B, the effects of varying doses of dried hips were tried again, but smaller doses were used, viz. 60 — 120 and 240 mg. At the same time, the effect of an acetone extract of the dried hips, from which tablets were made by means of lactose and talc, was tested. These tablets were fed in such amounts that the doses corresponded to 60 — 120 and 240 mg of dried hips. From d,l- α -tocopherol acetate doses of 0.1 — 0.2 and 0.4 mg were used.

The experiments in series C were carried out in order to settle the question whether the reducing but non-distilling substances from alfalfa, described in Part I, had any E activity. One group of animals received every day (except Sunday) 1 tablet containing as much of the distillate at 140° and 10⁻³ mm Hg of unsaponifiable matter of alfalfa as, on the basis of the chemical determination, corresponded to 0.4 mg of d,l- α -tocopherol acetate; the second group was fed the corresponding amount of non-distilling product. Further groups got no tablets and 0.1 — 0.2 — 0.4 mg of d,l- α -tocopherol acetate.

The animals were carefully inspected for exudates and encephalomalacia every day. Encephalomalacia was dia-

gnosed by the behaviour of the animals and by the macroscopic findings on opening the brain. After 35—40 days, the surviving animals were killed. Autopsy was made in every case. The results appear from Table 1. In this table, exudations as well as encephalomalacias are indicated by + in the respective columns. As mentioned in our previous papers, the hemorrhagic condition of the fat tissue seen by autopsy is part of the exudative symptom. Where hemorrhage in fat tissue occurred without exudate, the case was considered to be the initial stage of the full symptom. In Table 1, such cases are indicated by (+); by the statistical evaluation (Table 2) they are arbitrarily calculated as $\frac{1}{2}$ full exudation. Table 1 contains, furthermore, the time until the appearance of the exudates as well as the number of days from the beginning of the experiment until the chick died or was killed. Animals which were killed are marked with k, and those which died during the feeding period are marked with d.

The results are summarized in Table 2 which indicates the percentage of animals showing exudates resp. encephalomalacia. Animals which died before the 7th day of the experiment are left out in the calculation.

Table 1.
Series A. Started 28-29/9 1939

Group 1 no addition				Group 2 0.1 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day			
Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Encephalo-malacia days	Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Encephalo-malacia days
5931	27 d	+ 22	+ 14	5821	25 k	(+) ..	0 ..
5932	24 d	+ 20	0 ..	5822	36 k	0 ..	0 ..
5933	4 d	0 ..	0 ..	5823	35 k	0 ..	0 ..
5934	35 k	+ 16	0 ..	5824	13 k	+ 11	0 ..
5935	22 d	+ 8	0 ..	5825	35 k	0 ..	0 ..
5936	12 d	+ 12	0 ..	5826	35 k	0 ..	0 ..
5937	7 d	0 ..	0 ..	5827	35 k	+ 11	0 ..
5938	14 d	+ 12	0 ..	5828	36 k	(+) ..	0 ..
5939	8 d	+ 8	+ 8	5829	33 d	(+) ..	0 ..
5940	8 k	+ 8	+ 8	5830	36 k	+ 11	0 ..
Group 3 0.2 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day				Group 4 0.4 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day			
5831	37 k	+ 26	0 ..	5841	35 k	0 ..	0 ..
5832	35 k	0 ..	0 ..	5842	35 k	0 ..	0 ..
5833	22 k	(+) ..	0 ..	5843	35 k	0 ..	0 ..
5834	35 k	0 ..	0 ..	5844	36 k	0 ..	0 ..
5835	35 k	0 ..	0 ..	5845	35 k	0 ..	0 ..
5836	36 k	0 ..	0 ..	5846	36 k	0 ..	0 ..
5837	35 k	0 ..	0 ..	5847	36 k	0 ..	0 ..
5838	37 k	+ 20	0 ..	5848	36 k	0 ..	0 ..
5839	36 k	0 ..	0 ..	5849	37 k	0 ..	0 ..
5840	36 k	+ 19	0 ..	5850	37 k	0 ..	0 ..
Group 5 0.8 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day				Group 6 1.6 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day			
5851	35 k	0 ..	0 ..	5861	35 k	0 ..	0 ..
5852	35 k	0 ..	0 ..	5862	35 k	0 ..	0 ..
5853	36 k	0 ..	0 ..	5863	35 k	0 ..	0 ..
5854	35 k	0 ..	0 ..	5864	36 k	0 ..	0 ..
5855	35 k	0 ..	0 ..	5865	35 k	0 ..	0 ..
5856	12 d	0 ..	0 ..	5866	36 k	0 ..	0 ..
5857	36 k	0 ..	0 ..	5867	36 k	0 ..	0 ..
5858	36 k	0 ..	0 ..	5868	36 k	0 ..	0 ..
5859	36 k	0 ..	0 ..	5869	35 d	0 ..	0 ..
5860	37 k	0 ..	0 ..	5870	6 d	0 ..	0 ..

Table 1 (continued).

Group 7 3.2 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day				Group 8 0.25 g dried hips p. day			
Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Ence-phalo-mala-cia days	Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Ence-phalo-mala-cia days
5871	35 k	0 ..	0 ..	5881	35 k	0 ..	0 ..
5872	35 k	0 ..	0 ..	5882	35 k	(+) ..	0 ..
5873	35 k	0 ..	0 ..	5883	35 k	0 ..	0 ..
5874	36 k	0 ..	0 ..	5884	35 k	0 ..	0 ..
5875	27 d	0 ..	0 ..	5885	15 d	(+) ..	0 ..
5876	36 k	0 ..	0 ..	5886	36 k	0 ..	0 ..
5877	36 k	0 ..	0 ..	5887	36 k	0 ..	0 ..
5878	36 k	0 ..	0 ..	5888	37 k	(+) ..	0 ..
5879	37 k	0 ..	0 ..	5889	37 k	0 ..	0 ..
5880	36 k	0 ..	0 ..	5890	37 k	0 ..	0 ..
Group 9 0.5 g dried hips p. day				Group 10 1 g dried hips p. day			
5891	35 k	0 ..	0 ..	5901	35 k	0 ..	0 ..
5892	35 k	0 ..	0 ..	5902	36 k	0 ..	0 ..
5893	35 k	0 ..	0 ..	5903	35 k	0 ..	0 ..
5894	35 k	(+) ..	0 ..	5904	35 k	0 ..	0 ..
5895	36 k	0 ..	0 ..	5905	36 k	0 ..	0 ..
5896	36 k	0 ..	0 ..	5906	35 k	0 ..	0 ..
5897	37 k	0 ..	0 ..	5907	15 d	(+) ..	0 ..
5898	37 k	0 ..	0 ..	5908	2 d	0 ..	0 ..
5899	37 k	0 ..	0 ..	5909	36 k	0 ..	0 ..
5900	11 d	0 ..	0 ..	5910	36 k	0 ..	0 ..
Group 11 2 g dried hips p. day							
5912	35 k	0 ..	0 ..				
5913	35 k	0 ..	0 ..				
5914	35 k	0 ..	0 ..				
5915	3 d	0 ..	0 ..				
5916	35 k	0 ..	0 ..				
5917	36 k	0 ..	0 ..				
5919	20 d	0 ..	0 ..				
5920	36 k	0 ..	0 ..				
5922	37 k	0 ..	0 ..				
5925	37 k	0 ..	0 ..				
5926	37 k	0 ..	0 ..				
5927	37 k	0 ..	0 ..				

Table 1 (continued).
Series B. Started 20/11-1939.

Group 1 no addition				Group 2 0.1 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day			
Chick No.	Dura- tion of experi- ment days	Exu- date days	Ence- phalo- mala- cia days	Chick No.	Dura- tion of experi- ment days	Exu- date days	Ence- phalo- mala- cia days
5961	28 k	+ 28	+ 16	5971	40 k	0 ..	0 ..
5962	24 k	+ 16	0 ..	5972	40 k	+ 40	0 ..
5963	14 d	+ 14	0 ..	5973	40 k	0 ..	0 ..
5964	16 k	0 ..	0 ..	5974	40 k	+ 29	+ 35
5965	40 k	+ 40	0 ..	5975	43 k	0 ..	0 ..
5966	16 d	+ 14	0 ..	5976	43 k	0 ..	0 ..
5967	25 k	+ 14	+ 19	5977	43 k	0 ..	0 ..
5968	12 d	(+) ..	0 ..	5978	43 k	0 ..	0 ..
5969	12 d	(+) ..	0 ..	5979	43 k	+ 25	0 ..
5970	40 k	0 ..	0 ..	5980	43 k	+ 10	0 ..
Group 3 0.2 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day				Group 4 0.4 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day			
5981	40 k	0 ..	0 ..	5991	40 k	0 ..	0 ..
5982	40 k	+ 29	0 ..	5992	40 k	0 ..	0 ..
5983	40 k	0 ..	0 ..	5993	40 k	0 ..	0 ..
5984	43 k	0 ..	0 ..	5994	38 k	0 ..	0 ..
5985	43 k	(+) ..	0 ..	5995	38 k	0 ..	0 ..
5986	43 k	0 ..	0 ..	5996	40 k	0 ..	0 ..
5987	43 k	(+) ..	0 ..	5997	38 k	0 ..	0 ..
5988	38 k	+ 38	0 ..	5998	38 k	0 ..	0 ..
5989	43 k	0 ..	0 ..	5999	43 k	0 ..	0 ..
5990	43 k	0 ..	0 ..	7000	42 k	0 ..	0 ..
Group 5 1 tablet of dried hips (60 mg) p. day				Group 6 2 tablets of dried hips (60 mg each) p. day			
7001	40 k	0 ..	0 ..	7011	40 k	+ 30	0 ..
7002	40 k	0 ..	+ 25	7012	10 d	+ 8	0 ..
7003	40 k	0 ..	0 ..	7013	2 d	0 ..	0 ..
7004	38 k	+ 19	0 ..	7014	40 k	0 ..	0 ..
7005	20 d	0 ..	+ 19	7015	40 k	0 ..	0 ..
7006	42 k	0 ..	0 ..	7016	41 d	+ 39	0 ..
7007	38 k	+ 31	0 ..	7017	42 k	(+) ..	0 ..
7008	42 k	0 ..	0 ..	7018	10 k	+ 9	0 ..
7009	42 k	0 ..	0 ..	7019	42 k	0 ..	0 ..
7010	42 k	+ 22	0 ..	7020	42 k	0 ..	0 ..

Table 1 (continued).

Group 7 4 tablets of dried hips (60 mg each) p. day				Group 8 1 tablet (60 mg) of extract of dried hips p. day			
Chick No.	Dura- tion of experiment days	Exu- date days	Ence- phalo- mala- cia days	Chick No.	Dura- tion of experiment days	Exu- date days	Ence- phalo- mala- cia days
7021	40 k	(+) ..	0 ..	7031	22 d	0 ..	+ 10
7022	24 k	+ 22	0 ..	7032	13 d	+ 13	0 ..
7023	40 k	0 ..	0 ..	7033	40 k	0 ..	0 ..
7024	40 k	+ 30	0 ..	7034	40 k	0 ..	0 ..
7025	42 k	0 ..	0 ..	7035	37 k	+ 36	0 ..
7026	42 k	+ 42	0 ..	7036	40 k	0 ..	+ 23
7027	42 k	0 ..	0 ..	7037	42 k	0 ..	0 ..
7028	28 k	+ 23	0 ..	7038	42 k	+ 22	0 ..
7029	42 k	+ 39	0 ..	7039	16 k	+ 9	+ 10
7030	42 k	0 ..	0 ..	7040	42 k	+ 24	0 ..
Group 9 2 tablets (60 mg each) of extract of dried hips p. day				Group 10 4 tablets (60 mg each) of extract of dried hips p. day			
7041	10 k	+ 8	0 ..	7051	40 k	0 ..	0 ..
7042	40 k	0 ..	0 ..	7052	7 d	0 ..	0 ..
7043	40 k	0 ..	0 ..	7053	38 k	+ 38	0 ..
7044	40 k	0 ..	0 ..	7054	40 k	0 ..	0 ..
7045	42 k	+ 37	0 ..	7055	40 k	(+) ..	0 ..
7046	26 k	+ 15	0 ..	7056	42 k	(+) ..	0 ..
7047	42 k	0 ..	0 ..	7057	42 k	0 ..	0 ..
7048	42 k	0 ..	0 ..	7058	21 d	0 ..	+ 19
7049	42 k	0 ..	+ 18	7059	42 k	(+) ..	0 ..
7050	42 k	+ 23	0 ..	7060	42 k	0 ..	0 ..

Series C. Started 16/5-1940.

Group 1 no addition				Group 2 0.1 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day			
9080	39 d	+ 31	0 ..	9090	39 k	0 ..	0 ..
9081	34 d	+ 27	0 ..	9091	39 k	0 ..	0 ..
9082	39 k	0 ..	0 ..	9092	39 k	0 ..	0 ..
9083	39 k	0 ..	0 ..	9093	35 d	0 ..	0 ..
9084	39 k	+ 39	0 ..	9094	39 k	0 ..	0 ..
9085	39 k	+ 27	+ 36	9095	39 k	0 ..	0 ..
9086	36 k	+ 29	0 ..	9096	40 k	+ 29	0 ..
9087	30 d	+ 16	0 ..	9097	40 k	0 ..	0 ..
9088	40 k	0 ..	0 ..	9098	40 k	0 ..	0 ..
9089	40 k	0 ..	0 ..	9099	40 k	0 ..	0 ..

Table 1 (continued).

Group 3 0.2 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day				Group 4 0.4 mg d,l- α -tocopherol acetate p. day			
Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Ence-phalo-mala-cia days	Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Ence-phalo-mala-cia days
9100	39 k	0 ..	0 ..	9110	39 k	0 ..	0 ..
9101	39 k	0 ..	0 ..	9111	39 k	0 ..	0 ..
9102	39 k	0 ..	0 ..	9112	39 k	0 ..	0 ..
9103	39 k	0 ..	0 ..	9113	29 d	0 ..	0 ..
9104	39 k	0 ..	0 ..	9114	39 k	0 ..	0 ..
9105	39 k	0 ..	0 ..	9115	39 k	0 ..	0 ..
9106	40 k	0 ..	0 ..	9116	40 k	0 ..	0 ..
9107	40 k	0 ..	0 ..	9117	40 k	0 ..	0 ..
9108	40 k	0 ..	0 ..	9118	40 k	0 ..	0 ..
9109	40 k	0 ..	0 ..	9119	40 k	0 ..	0 ..
Group 5 distillate from alfalfa				Group 6 undistillable from alfalfa			
7441	39 k	0 ..	0 ..	7453	39 k	+ 27	0 ..
7442	39 k	0 ..	0 ..	7454	39 k	+ 32	0 ..
7443	38 d	0 ..	0 ..	7455	39 k	+ 25	0 ..
7444	39 k	0 ..	0 ..	7456	39 k	+ 28	0 ..
7445	30 d	0 ..	0 ..	7457	39 k	0 ..	0 ..
7446	39 k	0 ..	0 ..	7458	39 k	0 ..	0 ..
7447	39 k	0 ..	0 ..	7459	40 k	+ 25	0 ..
7448	40 k	0 ..	0 ..	7460	40 k	+ 30	0 ..
7449	40 k	0 ..	0 ..	7461	40 k	0 ..	0 ..
7450	40 k	0 ..	0 ..	7462	38 d	+ 34	0 ..
7451	40 k	0 ..	0 ..	7463	40 k	+ 40	0 ..
7452	40 k	0 ..	0 ..	7464	40 k	+ 21	+ 11

Table 2.
Series A.

Group No.	Addition	% of animals with		Total percentage of animals with E avitaminous symptoms
		exudative diathesis	encephalomalacia	
1	no	100	38	100
2	0.1 mg d,l- α -tocopherol acetate	45	0	45
3	0.2 - — — —	35	0	35
4	0.4 - — — —	0	0	0
5	0.8 - — — —	0	0	0
6	1.6 - — — —	0	0	0
7	3.2 - — — —	0	0	0
8	250 - dried hips	15	0	15
9	500 - — —	5	0	5
10	1000 - — —	5	0	5
11	2000 - — —	0	0	0

Series B.

1	no	70	20	70
2	0.1 mg d,l- α -tocopherol acetate	40	10	40
3	0.2 - — — —	30	0	30
4	0.4 - — — —	0	0	0
5	60 - dried hips	30	20	50
6	120 - — —	45	0	45
7	240 - — —	55	0	55
8	60 - extract of dried hips..	50	30	70
9	120 - — — — ..	40	10	50
10	240 - — — — ..	28	11	39

Series C.

1	no	60	10	60
2	0.1 mg d,l- α -tocopherol acetate	10	0	10
3	0.2 - — — —	0	0	0
4	0.4 - — — —	0	0	0
5	.. distillate from alfalfa	0	0	0
6	.. undistillable from alfalfa..	75	8	75

Results and discussion. The results show that it is possible to use the chick for a preventive method of standardization of vitamin E by means of the vitamin's anti-exudative, resp. anti-encephalomalacia activity. The results indicate that the exudative symptom gives the most graduated relation between the dosage of the substance and the response; the evaluation of the experiments can therefore be carried out by means of the exudative symptom alone. The encephalomalacia symptom alone may be used under other circumstances, when diets richer in fat are given. In the present case, however, we preferred to calculate the total number of animals with symptoms of E avitaminosis.

When the basal diet without addition of vitamin E is fed (see, for instance, Table 3), the symptoms occur in 60—100 % (an average of 80 %) of the animals. A comparison between the activity of two different sources of vitamin E can therefore be carried out in such a way that both substances are fed at the same time in different levels to different groups of chicks, and the doses are calculated which give symptoms by 40 % of the animals. As is the case in similar standardizations, it is necessary to test, simultaneously with every standardization, the reference standard, d,l- α -tocopherol acetate, since the response to a given dose of the vitamin fluctuates, even if animals of the same stock and on the same diet are used. Table 3 shows the reproducibility of the chick's response to the same series of doses of the reference substance. These series are collected from the experiments in this and in the following parts of the paper.

The experiments show that the dosis of the reference substance which gives symptoms by 40 % of the animals is about 0.1 mg per day.

Table 3.

Series No.	Date of experiment	Duration of experiment days	mg of d,l- α -tocopherol acetate p. day			
			0	0.1	0.2	0.4
			percentage of chicks with symptoms			
II A	28/9-39	about 35	100	45	35	0
II B	20/11-39	— 40	70	40	30	0
II C	16/5-40	— 39	60	60	5	0
III B	24/4-40	— 35	90	35	25	0

In series B, we did not feed a dose of dried hips and extract of dried hips sufficient to yield 100 % protection; furthermore, the results for dried hips were unusually irregular, whereas extract of dried hips gave more regular results. If we try nevertheless to find the dosis showing symptoms by 40 % of the animals, the results of series B lead to an amount of about 240 mg of extract of dried hips per day, and B conferred with A gives about 240 mg of dried hips per day, in the case of d,l- α -tocopherol acetate the amount is 0.1 mg. This result is in rather good agreement with the chemical determinations described in Part I, which showed a tocopherol content of 0.124 mg in 240 mg hips and of 0.092 mg in the corresponding amount of extract, calculated as acetate; the values are of the same order of magnitude as those found in rat fertility tests in earlier experiments with hips. Even if the result is no exact standardization, it shows nevertheless that this method enables us to carry out vitamin E standardizations. If exact standardizations are to be carried out, the number of days until the symptoms occur should be taken into consideration. If the amount of vitamin E ingested is increased, the number of animals showing symptoms decreases and, besides, also the number of days till the appearance of the symptoms increases.

Summary.

The principles of a method of the biological standardization of vitamin E by means of its anti-exudative and anti-encephalomalacia activity are described. By means of this method it was tried to determine the vitamin E activity of hips.

III. Comparison between the anti-exudative activity of α - und β -tocopherol.

The standardization method of Part II was applied in order to investigate whether the relation between the potency of α - and β -tocopherol in preventing exudative diathesis is the same as the relation between the potencies found in rat fertility tests.

Experimental. The experimental conditions with respect to keeping of the animals, diet, inspection for symptoms, autopsy etc. were the same as described in Part II. The results are summarized in tables with the same indications + and (+) for exudation symptoms as in Part II. The animals were inspected for encephalomalacia too, but no case showing this symptom could be found.

Two series of experiments, A and B, were carried out.

In series A, the effects of equal doses of α - and β -tocopherol acetates were compared. The tocopherol acetates were given in the form of tablets every day except Sunday. Each tablet contained 0.1 mg of the tocopherol acetate. The dose was 0.4 mg per animal per day until the weight had increased to 150 g. Thereafter, the dose increased by 50 % for every 50 g gain in weight over 100 g. The synthetic d,l- α -tocopherol acetate was supplied from F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basle. Synthetic β -tocopherol acetate was kindly put at our disposal by Prof. P. Karrer, Zürich.

In series B, the effects of varying doses of α - and β -tocopherol acetates were tested. The following doses were used: 0.05 — 0.1 — 0.2 — 0.4 mg of d,l- α - and 0.4 — 0.8 — 1.6 mg of d,l- β -tocopherol acetate per animal per day. The doses were kept constant through the whole period of experi-

Table 1.
Series A. Started 5/7-1939.

Group 1 No addition of tocopherol acetate			Group 2 Addition of d,l- α - tocopherol acetate			Group 3 Addition of d,l- β - tocopherol acetate		
Chick No.	Dura- tion of experi- ment days	Exu- date days	Chick No.	Dura- tion of experi- ment days	Exu- date days	Chick No.	Dura- tion of experi- ment days	Exu- date days
5563	6 d	0 ..	5573	40 k	0 ..	5583	19 k	+ 15
5564	5 d	0 ..	5574	40 k	0 ..	5584	17 d	0 ..
5565	14 k	+ 13	5575	40 k	0 ..	5585	15 k	+ 14
5566	29 d	0 ..	5576	40 k	+ 7	5586	28 d	+ 27
5567	35 k	+ 31	5577	40 k	0 ..	5587	5 d	0 ..
5568	20 k	+ 19	5578	40 k	0 ..	5588	11 d	0 ..
5569	20 k	+ 17	5579	38 k	0 ..	5589	27 k	+ 24
5570	15 k	+ 15	5580	9 d	0 ..	5590	35 k	+ 35
5571	15 k	+ 14	5581	40 k	0 ..	5591	19 d	0 ..
5572	9 k	+ 7	5582	40 k	0 ..	5592	20 k	+ 18

Series B. Started 24/4-1940.

Group 1 No addition of tocopherol acetate			Group 2 Addition of 0.05 mg d,l- α -tocopherol acetate			Group 3 Addition of 0.1 mg d,l- α -tocopherol acetate		
7401	34 k	+ 26	7391	34 k	0 ..	7381	34 k	0 ..
7402	34 k	+ 27	7392	34 k	+ 34	7382	34 k	0 ..
7403	33 d	+ 12	7393	34 k	(+) ..	7383	34 k	+ 22
7404	34 k	+ 24	7394	34 k	+ 26	7384	34 k	0 ..
7405	16 d	+ 16	7395	34 k	+ 15	7385	34 k	(+) ..
7406	34 k	+ 22	7396	34 k	0 ..	7386	34 k	0 ..
7407	35 k	+ 21	7397	35 k	+ 35	7387	35 k	+ 21
7408	35 k	+ 28	7398	35 k	+ 26	7388	29 d	+ 23
7409	24 d	+ 21	7399	35 k	+ 27	7389	35 k	0 ..
7410	35 k	0 ..	7400	32 d	(+) ..	7390	35 k	0 ..

Table 1 (continued).

Group 4 Addition of 0.2 mg d,l- α -tocopherol acetate			Group 5 Addition of 0.4 mg d,l- α -tocopherol acetate			Group 6 Addition of 0.4 mg d,l- β -tocopherol acetate		
Chick No.	Duration of experi- ment days	Exu- date days	Chick No.	Duration of experi- ment days	Exu- date days	Chick No.	Duration of experi- ment days	Exu- date days
7371	34 k	0 ..	7361	34 k	0 ..	7431	34 k	+ 34
7372	34 k	0 ..	7362	34 k	0 ..	7432	34 k	+ 34
7373	34 k	(+)	7363	34 k	0 ..	7433	34 k	+ 22
7374	34 k	0 ..	7364	34 k	0 ..	7434	34 k	+ 33
7375	34 k	0 ..	7365	34 k	0 ..	7435	34 k	0 ..
7376	34 k	0 ..	7366	22 d	0 ..	7436	34 k	+ 34
7377	35 k	+ 35	7367	35 k	0 ..	7437	35 k	+ 33
7378	35 k	0 ..	7368	35 k	0 ..	7438	35 k	+ 13
7379	35 k	0 ..	7369	35 k	0 ..	7439	35 k	+ 28
7380	35 k	+ 35	7390	35 k	0 ..	7440	35 k	+ 33
Group 7 Addition of 0.8 mg d,l- β -tocopherol acetate			Group 8 Addition of 1.6 mg d,l- β -tocopherol acetate					
7421	16 d	0 ..	7411	34 k	+ 12			
7422	34 k	+ 26	7412	16 d	0 ..			
7423	34 k	+ 20	7413	34 k	+ 26			
7424	34 k	+ 22	7414	34 k	+ 21			
7425	34 k	0 ..	7415	34 k	0 ..			
7426	34 k	+ 33	7416	34 k	+ 23			
7427	35 k	+ 21	7417	35 k	+ 33			
7428	25 d	+ 12	7418	35 k	+ 21			
7429	35 k	+ 20	7419	35 k	0 ..			
7430	35 k	+ 33	7420	32 d	+ 17			

ment. The β -tocopherol acetate applied in this experiment was prepared in our laboratory following the method of KARRER and co-workers¹. The phytol used in the synthesis was kindly supplied by F. Hoffmann-la Roche & Co. A.G. and Chemische Fabrik vormals Sandoz, Basle. The β -tocopherol was acetylated and again purified by chromatographic

¹ P. KARRER, H. KOENIG, B. H. RINGIER and H. SALOMON, *Helv. chim. acta* **22**, 1139 (1939).

Table 2.
Series A.

Addition	% of animals with exudate
no	88
d,l- α -tocopherol acetate	10
d,l- β -tocopherol acetate	67

Series B.

no	90
0.05 mg d,l- α -tocopherol acetate	70
0.1 mg —	35
0.2 mg —	25
0.4 mg —	0
0.4 mg d,l- β -tocopherol acetate	90
0.8 mg —	80
1.6 mg —	70

Table 3.

Addition	Weight g					
	24/4	1/5	8/5	15/5	22/5	28/5
no	96	122	147	191	229	229
0.05 mg d,l- α -tocopherol acetate	91	110	133	172	222	241
0.1 mg —	91	112	132	170	191	205
0.2 mg —	89	111	126	172	210	234
0.4 mg —	89	106	128	163	193	210
0.4 mg d,l- β -tocopherol acetate	100	120	132	177	211	241
0.8 mg —	91	115	136	181	200	215
1.6 mg —	89	118	144	202	231	251

absorption on aluminium oxide. With respect to its absorption spectrum it agreed with the spectrum of neo-tocopherol as found by KARRER¹. Furthermore, its equivalent weight, determined by reduction of FeCl₃-dipyridyl after EMMERIE and ENGEL, agreed with its formula.

The animals were weighed once a week. In series A, the animals were killed as soon as they showed exudates;

¹ P. KARRER, H. SALOMON and H. FRITZSCHE, *Helv. chim. acta* **21**, 309 (1938).

in series B, however, they were kept alive until the 34th day. A summary of the weights of the groups of this series is given in Table 3.

Results and discussion. Table 2, series A, clearly shows that there is a great difference in the effectiveness of α - and β -tocopherol acetates in preventing the exudative diathesis in chicks.

In series B, it was attempted to evaluate the relative activity of the two compounds by testing the effects of a series of doses of each of them. From Table 2, series B, it appears, however, that the potency of β -tocopherol acetate is so small that even a dose which was four times as great as the completely protecting dose of the α -compound did not exert any protective effect at all.

Since a dose of β -tocopherol acetate sufficient to protect against the symptom has not been tested, it is impossible from the results obtained in these experiments to determine the relative anti-exudative potency of the components. The results, however, suggest that the potency of the β -compound is less than 5 % of that of the α -compound.

Previous experiments carried out in several laboratories have shown that α -tocopherol has a potency in preventing rat sterility of 3—4 times that of β -tocopherol. We compared the potencies of our preparations used in series B by means of this test too. This experiment was kindly carried out by cand. pharm. Kjerbye-Nielsen, A/S Medicinalco, following the method used in this laboratory. 0.7 mg of d,l- α -tocopherol acetate gave 65 % protection; 4 mg of d,l- β -tocopherol acetate gave 100 % protection, 2 mg and 1 mg gave 0 % protection, which is in accordance with the earlier experiments.

In the chick experiment, however, it was found that 0.05 mg of d,l- α -tocopherol acetate was more potent than 1.6 mg of d,l- β -tocopherol acetate, i. e. that α -tocopherol is more than 30 times as potent as β -tocopherol. It is, therefore, possible that the relative potency of the E vitamins in preventing the most characteristic symptom of E avitaminosis in chicks is not the same as the potency of the same compounds in preventing rat sterility.

If this statement holds, it would be an analogy of the properties of the D vitamins, where the antirachitic potency of the vitamins D₂ and D₃ is not the same when tested on rats or on chicks.

It would be of great interest to reinvestigate this question by using a greater number of chicks and higher doses of β -tocopherol than applied in this experiment.

It would also be of interest to investigate the anti-encephalomalacia-activity of β -tocopherol acetate in relation to that of the α -tocopherol acetate. This would afford a diet much richer in fat than the diet used in this experiment in which the presence of 5 % cod liver oil was not sufficient to develop cases of encephalomalacia.

From Table 3 it appears that d,l- α -tocopherol acetate has no influence on the growth of chicks, when this diet is used. In earlier experiments, however, when other diets were used, we have seen a significant influence of tocopherol upon the growth of the chicks. It would be of interest to examine this question further and especially to investigate the influence of vitamin E on the growth of chicks being fed with a diet rich in fat.

Summary.

Whilst d,l- α -tocopherol acetate is 3—4 times as active as d,l- β -tocopherol acetate in preventing rat sterility, it was found to be at least 30 times as active as the β -compound in preventing exudative diathesis in chicks.

IV. The influence of fat on the development of encephalomalacia and exudative diathesis in chicks.

In accordance with the experience of PAPPENHEIMER and GOETTSCH and their co-workers¹, we observed that the encephalomalacia occurs in a greater percentage of the experimental animals when the diet contains much fat, a fact which is also in agreement with the still earlier experience that the most commonly known symptom of E avitaminosis, viz. the sterility, is particularly easy to develop by means of a fat rich diet.

As regards the exudative diathesis, our earlier experiments did not reveal any large difference in the percentage of animals afflicted with this symptom, dependent on whether the diet contained extra fat or not.

Recently, we had an opportunity of investigating the influence of fat on both symptoms on a larger scale. The results of these experiments are reported in the following.

Experimental. Experimental conditions with respect to housing of the animals, inspection for symptoms etc. were the same as described in Part II. As basal diet we used diet 538 (cfr. Part II). Other diets were prepared by addition of lard resp. cod liver oil to diet 538.

Vitamins A and D were given in the form of a mixture

¹ A. M. PAPPENHEIMER, MARIANNE GOETTSCH and E. JUNGHERR, Storrs Agricultural Experiment Station Bulletin **229** (Jan. 1939).

Table 1.

Series A Started 8/1-1940				Series B Started 9/3-1940			
Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Ence-phalo-mala-cia days	Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Ence-phalo-mala-cia days
Group 1: Diet 538 without addition of lard							
7201	49 k	0 ..	+ 47	7241	49 k	+ 31	0 ..
7202	49 k	+ 39	0 ..	7242	49 k	0 ..	0 ..
7203	49 k	(+) ..	0 ..	7243	46 k	0 ..	0 ..
7204	50 k	0 ..	0 ..	7244	49 k	0 ..	0 ..
7205	50 k	+ 35	0 ..	7245	49 k	0 ..	0 ..
7206	50 k	+ 50	0 ..	7246	51 k	0 ..	0 ..
7207	4 d	0 ..	0 ..	7247	51 k	(+) ..	0 ..
7208	49 k	0 ..	0 ..	7248	51 k	0 ..	0 ..
7209	49 k	+ 49	0 ..	7249	51 k	0 ..	0 ..
7210	49 k	0 ..	0 ..	7250	52 k	0 ..	+ 30
7211	49 k	0 ..	0 ..	7251	2 d	0 ..	0 ..
7212	36 d	0 ..	0 ..	7252	52 k	0 ..	0 ..
Group 2: Diet 538 + 1 ⁰ % of lard.							
7143	49 k	+ 49	0 ..	7253	49 k	0 ..	0 ..
7144	49 k	0 ..	0 ..	7254	49 k	0 ..	0 ..
7145	49 k	0 ..	0 ..	7255	49 k	0 ..	0 ..
7146	49 k	0 ..	0 ..	7256	49 k	0 ..	0 ..
7147	50 k	+ 44	0 ..	7257	49 k	0 ..	0 ..
7148	49 k	0 ..	0 ..	7258	51 k	0 ..	0 ..
7149	50 k	(+) ..	0 ..	7259	41 d	+ 16	0 ..
7150	50 k	(+) ..	0 ..	7260	51 k	+ 31	0 ..
7151	49 k	0 ..	+ 49	7261	52 k	0 ..	0 ..
7152	49 k	0 ..	0 ..	7262	52 k	0 ..	0 ..
7153	49 k	0 ..	0 ..	7263	52 k	0 ..	0 ..
7154	49 k	0 ..	0 ..	7264	22 d	0 ..	0 ..
Group 3: Diet 538 + 3 ⁰ % of lard.							
7155	49 k	0 ..	0 ..	7265	49 k	0 ..	0 ..
7156	49 k	0 ..	0 ..	7266	49 k	0 ..	0 ..
7157	44 d	+ 44	0 ..	7267	49 k	0 ..	0 ..
7158	49 k	0 ..	0 ..	7268	49 k	+ 37	0 ..
7159	7 d	0 ..	0 ..	7269	32 d	0 ..	0 ..
7160	50 k	0 ..	0 ..	7270	51 k	0 ..	0 ..

Table 1 (continued).

Series A Started 8/1-1940				Series B Started 9/3-1940			
Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Encephalomalacia days	Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Encephalomalacia days

Group 3 (continued).

7161	50 k	0 ..	0 ..	7271	51 k	+ 49	0 ..
7162	49 k	0 ..	0 ..	7272	51 k	+ 48	0 ..
7163	49 k	0 ..	0 ..	7273	51 k	+ 48	0 ..
7164	49 k	0 ..	0 ..	7274	52 k	(+) ..	0 ..
7165	49 k	0 ..	+ 49	7275	52 k	0 ..	0 ..
7166	49 k	+ 39	0 ..	7276	52 k	0 ..	0 ..

Group 4: Diet 538 + 9% of lard.

7167	49 k	0 ..	0 ..	7277	49 k	0 ..	0 ..
7168	49 k	0 ..	0 ..	7278	49 k	+ 42	0 ..
7169	37 d	0 ..	0 ..	7279	49 k	+ 49	0 ..
7170	49 k	0 ..	0 ..	7280	49 k	0 ..	0 ..
7171	45 d	+ 36	0 ..	7281	51 k	0 ..	+ 49
7172	43 d	+ 15	0 ..	7282	51 k	+ 45	0 ..
7173	50 k	(+) ..	0 ..	7283	51 k	0 ..	0 ..
7174	49 k	+ 41	0 ..	7284	51 k	0 ..	0 ..
7175	49 k	+ 44	0 ..	7285	52 k	+ 46	0 ..
7176	49 k	0 ..	0 ..	7286	52 k	0 ..	0 ..
7177	49 k	0 ..	0 ..	7287	52 k	+ 52	0 ..
7178	49 k	0 ..	0 ..	7288	52 k	+ 52	0 ..

Group 5: Diet 538 + 27% of lard.

7179	28 d	+ 22	0 ..	7289	49 k	+ 34	+ 44
7180	47 d	+ 40	0 ..	7290	49 k	0 ..	+ 45
7181	26 d	(+) ..	+ 21	7291	49 k	+ 21	0 ..
7182	49 k	0 ..	0 ..	7292	49 k	+ 26	+ 45
7183	49 k	+ 41	+ 46	7293	23 d	+ 11	+ 22
7184	49 k	+ 43	0 ..	7294	51 k	+ 47	+ 22
7185	39 d	+ 37	0 ..	7295	51 k	0 ..	+ 22
7186	43 k	(+) ..	0 ..	7296	51 k	0 ..	0 ..
7187	48 k	(+) ..	+ 30	7297	51 k	0 ..	+ 42
7188	48 k	0 ..	0 ..	7298	52 k	+ 52	0 ..
7189	43 d	+ 32	+ 20	7299	52 k	0 ..	0 ..
7190	24 d	0 ..	+ 17	7300	52 k	+ 46	0 ..

Table 2.

% of lard	Series A			Series B		
	% of animals			% of animals		
	with exudation	with encephalomalacia	surviving the 49th day	with exudation	with encephalomalacia	surviving the 49th day
0	41	9	91	14	9	100
1	25	8	100	17	0	83
3	8	9	100	38	0	92
9	38	0	83	50	8	100
27	63	42	50	58	58	92

Table 3.
Series A.

% of lard	Weight g							
	8/1	13/1	20/1	27/1	3/2	10/2	17/2	24/2
0	95	106	135	170	208	236	264	293
1	100	112	142	176	219	259	291	326
3	101	109	139	179	207	242	264	284
9	101	112	136	163	182	200	233	228
27	96	102	117	139	145	165	180	189
1 mg d,1- α -tocopherol acetate.	95	104	138	177	207	244	265	301

Series B.

% of lard	Weight g							
	9/3	16/3	23/3	30/3	6/4	13/4	20/4	27/4
0	119	117	151	193	247	274	295	340
1	112	132	164	207	269	294	307	357
3	114	136	176	242	300	336	369	417
9	118	134	163	197	247	281	323	356
27	110	118	134	151	160	183	193	205

Table 4.

Group 1 Diet 538 + 5% of lard				Group 2 Diet 538 + 5% of cod liver oil			
Started 16/5—1940							
Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Encephalomalacia days	Chick No.	Duration of experiment days	Exu-date days	Encephalomalacia days
9070	39 k	0 ..	0 ..	9080	39 d	+ 31	0 ..
9071	39 k	0 ..	0 ..	9081	34 d	+ 27	0 ..
9072	39 k	0 ..	0 ..	9082	39 k	0 ..	0 ..
9073	39 k	0 ..	+ 14	9083	39 k	0 ..	0 ..
9074	34 d	+ 30	0 ..	9084	39 k	+ 39	0 ..
9075	40 k	+ 36	0 ..	9085	39 k	+ 27	+ 33
9076	35 d	+ 30	0 ..	9086	36 k	+ 29	0 ..
9077	40 k	+ 33	0 ..	9087	30 d	+ 16	0 ..
9078	40 k	+ 24	0 ..	9088	40 k	0 ..	0 ..
9079	40 k	0 ..	0 ..	9089	40 k	0 ..	0 ..

Summary

	% of animals	
	with exudative diathesis	with encephalomalacia
Diet 538 with 5% of lard	50	10
Diet 538 with 5% of cod liver oil..	60	10

of 1 part of Vogan + 2 parts of Vigantol (Bayer); 0.05 cc three times a week.

Vitamin K was supplied as tablets containing 0.005 mg of pure K_1 per tablet. One tablet was given 6 days of the week. For every 50 g gain in weight, the dose was increased by 50 %.

Two series of experiments, A and B, were carried out with the same diets and under the same experimental conditions; they were started with an interval of 2 months.

The results are summarized in Tables 1 and 2 which are arranged as in Part II making use of the same indications.

As already mentioned, the animals were weighed once a week. Even if the ratio between protein and total calories was not kept constant from one diet to another, it may, perhaps, be of interest to give a summary of the weights. This is done in Table 3.

In series A, the group without lard was accompanied by a corresponding group in which 1 mg of d,l- α -tocopherol acetate in the form of a tablet was given to every animal every day except Sunday. This group is not included in Table 1 because all the animals were completely protected against both symptoms. The mean weights of the animals of this group are to be seen in Table 3.

Table 4 shows the results from two experiments carried out simultaneously, group 1 with 5 % of lard added to the diet, and group 2 with 5 % of cod liver oil; a summary of these experiments is given below the table. Group 1 received vitamins A and D in the form of 0.05 cc of a mixture of 5 cc Vogan and 10 cc Vigantol three times a week.

Results and discussion. Both series A and B show that not only encephalomalacia but also exudative diathesis is markedly favoured by the presence of much fat in the diet. Our previous view, viz. that large amounts of fat do not favour the occurrence of exudative diathesis, could therefore not be maintained. Table 2 as well as the tables of the papers published on the foregoing pages (22 and 28) indicate, however, that exudative diathesis is the prevailing symptom of the diets poor in fat. In the groups with up to 9 per cent of lard the cases of exudates were 6 times as numerous as those of encephalomalacia, while in the group with 27 per cent of lard almost as many cases of

encephalomalacia as of exudative diathesis were found (comp. Table 2).

In certain previous experiments with animals living on a diet containing 5 % of cod liver oil, we worked with groups of chicks on which encephalomalacia was easily developed. On the other hand, no case of encephalomalacia was noticed on the chicks of Part III of the present series of papers; these chicks, too, were fed on a diet containing 5 % of cod liver oil. In order to check whether cod liver oil had a greater influence on the development of encephalomalacia and exudative diathesis than lard, we fed two groups, simultaneously, with diet 538 + 5 % of lard and 5 % of cod liver oil, respectively (Table 4). These two groups behaved rather similar with respect to both symptoms and, moreover, encephalomalacia occurred only in a few cases. Thus, cod liver oil does apparently not favour the symptoms more than lard does. There seems to be a still unexplained variability in the easiness with which the symptoms are developed. It is worth while noting that, in experiments with the encephalomalacia producing diet 108 of PAPPENHEIMER and GOETTSCH¹, exudates appear only very rarely. It would be of interest to investigate whether small amounts of tocopherol, as may be present in the not extracted constituents of diet 108, added to the fat rich diets prevent exudates without materially suppressing the encephalomalacia.

The presence of 1—3 % of lard in the diet does not favour the occurrence of exudative diathesis or encephalomalacia. The results found on series A might, if anything, suggest that 1—3 % of lard in the diet were favourable to suppressing the symptom as well as, perhaps, to increase

¹ A. M. PAPPENHEIMER and MARIANNE GOETTSCH, *J. Exp. Med.* **53**, 11 (1931).

the time of survival of the chicks. In order to settle this question definitely it will be advisable to carry out further experiments with greater groups of chicks.

In Table 3, we publish the weights of the chicks which may be of some interest although it is not easy to interpret the results on account of the fact that the ratio protein: total calories of the diet was not kept constant. It is clear from this table that the presence of 1—3 % of lard in the diet favours the growth of the chicks.

A great number of experiments by other investigators deal with the influence of the fat content of diets low in vitamin E, upon the occurrence of sterility in rats. The view generally held is this that lard contains substances which exert a destructive effect on vitamin E¹. Our present experiments do not contribute to the solution of the question of an antagonistic action of fat against vitamin E. However, the experiments described above and in earlier papers, which show the effect of small doses of tocopherol in diets rich in fat, may best be explained by the view that the destruction of the vitamin by substances contained in fat may be the decisive factor for an explanation of many of the experiences with vitamin E; on the other hand, there may possibly exist still further relations between the amount of fat in the diet and the requirement of vitamin E.

This important question may perhaps be studied successfully by means of chicks, since it could be proved that all three manifestations of E-avitaminosis, viz. sterility, encephalomalacia and exudative diathesis, are influenced by fat and that these chick symptoms are developed much more rapidly than the rat sterility.

¹ H. A. MATTILL, American Medical Association: The vitamins p. 575 (1939).

Summary.

The occurrence of both encephalomalacia and exudative diathesis was found to be favoured by the presence of much fat in the diet; the exudative diathesis was found, however, to be the prevailing symptom in chicks living on diets low in fat. Cod liver oil did not increase the number of chicks with symptoms more than lard. The presence of 1—3 per cent of lard in vitamin E-free diets seems to be favourable with respect to protection against E-avitaminous symptoms as well as to the growth of the chicks.

This work was aided by a grant from "Danmarks tekniske Højskoles Fond for teknisk Kemi".

Since this paper went to press, symptoms resembling exudative diathesis in chicks have been described by H. R. Bird, T. G. Culton and O. L. Kline in *J. Nutrition*, **19**, 15 (1940). Earlier the symptom was described by Pappenheimer, Goettsch and Jungherr, (*loc. cit.* p. 30).

The occurrence of both thrombocytopenia and leukopenia in the course of infectious mononucleosis was found to be related to the presence of heterophile antibodies. The presence of these antibodies was found in the blood in 100% of cases of infectious mononucleosis, but in only 50% of cases of infectious mononucleosis with leukopenia. The presence of heterophile antibodies was found in 100% of cases of infectious mononucleosis with leukopenia, but in only 50% of cases of infectious mononucleosis without leukopenia. The presence of heterophile antibodies was found in 100% of cases of infectious mononucleosis with leukopenia, but in only 50% of cases of infectious mononucleosis without leukopenia. The presence of heterophile antibodies was found in 100% of cases of infectious mononucleosis with leukopenia, but in only 50% of cases of infectious mononucleosis without leukopenia.

This work was aided by a Grant from the National Institutes of Health, Public Health Service, Department of Health, Education and Welfare, Office of Research and Development, Contract No. DA-19-011-AMC-0010.

Received for publication, July 15, 1964.

Revised manuscript received, August 10, 1964.

Address reprint requests to Dr. H. J. Cantow, Jr., Department of Pathology, University of Michigan Medical Center, 1600 East Tenth Avenue, Ann Arbor, Mich. 48106.

© 1965 by J. B. Lippincott Company

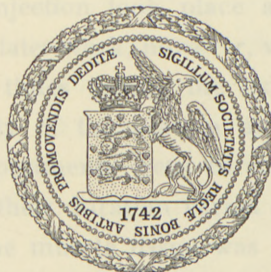
Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.
Biologiske Meddelelser. **XVI**, 8.

CIRCULATION OF PHOSPHORUS IN THE FROG

WITH A NOTE
ON THE CIRCULATION OF POTASSIUM

BY

G. HEVESY, L. HAHN AND O. REBBE



KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

Det Kgl. Danske Videnskabsnes Selskab.
Biologiske Meddelelser. XVI. 8.

CIRCULATION OF PHOSPHORUS
IN THE FROG

WITH A NOTE

ON THE CIRCULATION OF POTASSIUM

BY

G. HEVESY, I. HAHN AND O. REBBE



KØBENHAVN
I KOMMISSION HOS ERIC NUNSGAARD

Printed in Denmark.
Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.

This paper contains the description of some experiments on the circulation of phosphorus in the frog using radiophosphorus as an indicator. The experiments described were carried out in the course of the last six years¹.

Experimental procedure.

Most of the radioactive phosphorus (³²P) used in these experiments was prepared by irradiating carbon disulphide with neutrons emitted by a radium-beryllium source. The ³²P produced was extracted with diluted nitric acid and turned into sodium phosphate. This sodium phosphate of negligible weight (10⁻¹⁰ gm. or less) was dissolved in 0.6 per cent sodium chloride solution. A few tenths of a cubic centimetre of the solution were injected into the lymph sack of *Rana esculenta* or *Rana hungarica*. In our earlier experiments, the injection took place at the start of the experiment; in our later work, however, we injected labelled phosphate several times during the experiment in order to keep the activity of the plasma at an approximately constant level. Experiments were carried out both at 0° and at about 20°; their duration varied between 5 minutes and 400 hours. The muscle tissue was put into liquid air immediately after its removal and the acid soluble consti-

¹ O. REBBE, M. Sc., who has taken the deepest interest in the problems discussed in this paper and worked for several years almost incessantly on their elucidation suffered an untimely death the 5th of December, 1940.

tients were extracted with cold 10 per cent trichloroacetic acid. The filtrate obtained was at once added to a solution containing ammonia and magnesium citrate. By this procedure, all inorganic P present in the trichloroacetic extract was precipitated. The next step was to hydrolyze the creatinephosphoric acid present in the filtrate. In our early work, we decomposed the creatinephosphoric acid by adding ammonium molybdate and keeping the solution for 1 hour at 40° in 1 N. H_2SO_4 . Later, we omitted the addition of ammonium molybdate and split off the phosphate by letting the acidified solution boil for a short time, as proposed by MEYERHOF et alia¹. The phosphate group split off from the creatinephosphoric acid was then precipitated as ammonium magnesium salt. The filtrate thus obtained was acidified and the 1 N. H_2SO_4 solution obtained was boiled for 7 minutes in order to split off the pyrophosphate group of the adenosintri-phosphate. In other experiments, the solution was kept at 100° for 100 minutes. By this procedure, the hexosemonophosphate was hydrolyzed. Other fractions were secured by hydrolyzing the filtrate for some hours. The non-hydrolyzed phosphorus compounds remained in the filtrate together with large amounts of neutral salts. From this solution, after wet ashing of the organic compounds present, the phosphorus was precipitated as molybdenum compound. The ammonium phosphomolybdate was dissolved in ammonia, and phosphorus was precipitated as ammonium magnesium phosphate.

The muscle fraction which does not dissolve in trichloroacetic acid contains the phosphatides and the residual

¹ O. MEYERHOF, P. OHLMEYER, W. GENTNER and H. MAIER-LEIBNITZ, *Biochem. Z.* **298**, 400 (1938).

P. To secure the phosphatides, BLOOR's method was used. All fractions were ultimately obtained as ammonium magnesium phosphate which was dissolved in dilute hydrochloric acid. An aliquot part of the solution was used for the colorimetric determination of the phosphorus, according to FISKE and SUBBAROW, another aliquot part was applied in the radioactive measurements. The comparison of the radioactivity of the P fractions is much facilitated if all samples have the same weight. In this case, no correction for the absorption of the β -rays in the sample has to be made. Fractions of equal weight were obtained by adding to the solution of each fraction 80 mgm. of secondary sodium phosphate and by precipitating all P present as ammonium magnesium phosphate. The precipitates obtained were dried at 106° . Corrections for the decay of the activity of the ^{32}P can also be avoided if all samples are measured relatively to the same active phosphorus preparation. As such preparation an aliquot of the solution administered was used, the P content of the preparation being converted into ammonium magnesium phosphate, as described above.

Distribution of phosphorus in the frog.

We determined the phosphorus content of the different parts of the frog by wet ashing of the organs followed by a phosphorus determination by the method of FISKE and SUBBAROW. The results of these determinations are seen in Tables 1a and 1b.

Absorption of phosphate.

In order to get data on the rate of absorption of the labelled phosphate injected into the lymph sack we determined the activity of plasma samples of known weight both of frogs

Table 1 a.
Distribution of phosphorus in *Rana esculenta*
weighing 58 gm.

Organ	mgm. P	Per cent of total P
Blood ¹	0.83	0.18
Skin	31.50	6.96
Muscles	59.32	13.20
Bones	335.30	74.16
Liver ²	4.28	0.94
Remaining part	20.61	4.56
Total ...	451.84	

¹ Extrapolated value, assuming the blood content to constitute 4 per cent of the weight of the frog.

² The P content of the liver phosphatides was found to be 22 per cent of the total P content of the liver.

Table 1 b.
Distribution of phosphorus in the muscle of the frog.

Fraction	Per cent of total P content
Acid soluble P	82.1
Phosphatide P	10.8
Residual P	7.1

kept at 0° and of frogs kept at 18° at different times after injecting the labelled phosphate. The figures obtained (see Figs. 1 and 2) are not a direct measure of the amount of ³²P absorbed but indicate the difference between the amount absorbed in the circulation and the amount which left the circulation for the organs. (The amount taken up by the corpuscles in the course of a few hours is very restricted; see p. 27).

In another set of experiments, we injected large amounts of phosphate (corresponding to 6.1 mgm. P) into the lymph

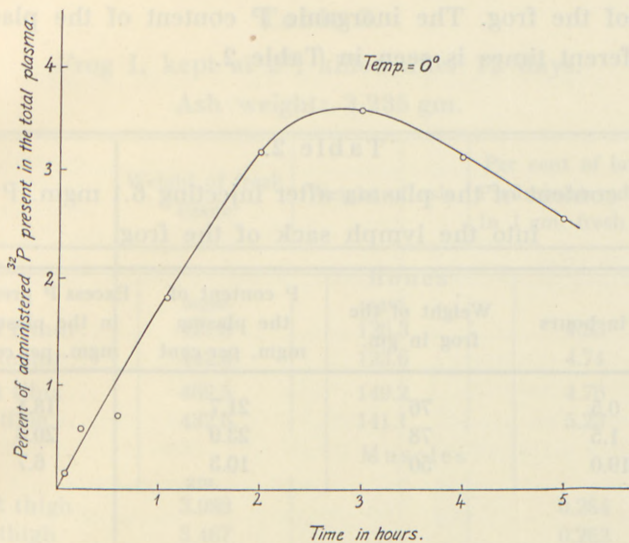


Fig. 1. ^{32}P content of the frog's plasma after injecting ^{32}P into the lymph sack. $T = 0^\circ$.

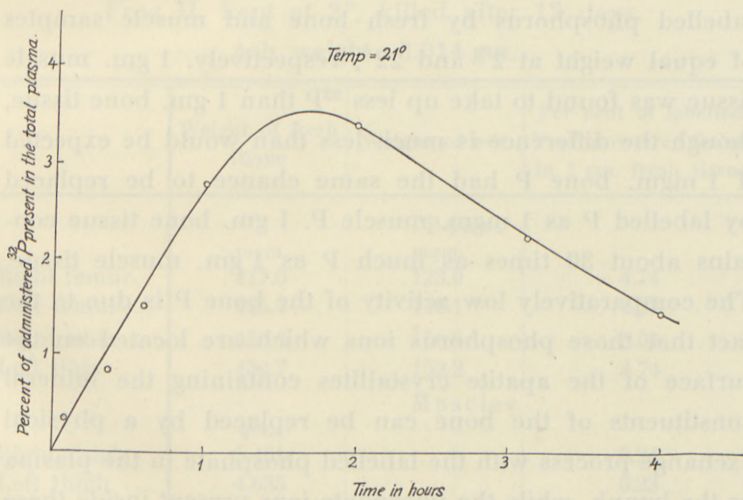


Fig. 2. ^{32}P content of the frog's plasma after injecting ^{32}P into the lymph sack. $T = 21^\circ$.

sack of the frog. The inorganic P content of the plasma at different times is seen in Table 2.

Table 2.

P content of the plasma after injecting 6.1 mgm. P into the lymph sack of the frog.

Time in hours	Weight of the frog in gm.	P content of the plasma mgm. per cent	Excess P present in the plasma mgm. per cent
0.5	76	21.7	18.1
1.5	78	23.9	20.3
19.0	50	10.3	6.7

Relative rate of uptake of labelled phosphorus by the bone and the muscle.

In our preliminary experiments, the results of which are reported in Tables 3—10, we compared the uptake of labelled phosphorus by fresh bone and muscle samples of equal weight at 2° and 22°, respectively. 1 gm. muscle tissue was found to take up less ³²P than 1 gm. bone tissue, though the difference is much less than would be expected if 1 mgm. bone P had the same chance to be replaced by labelled P as 1 mgm. muscle P. 1 gm. bone tissue contains about 30 times as much P as 1 gm. muscle tissue. The comparatively low activity of the bone P is due to the fact that those phosphorus ions which are located on the surface of the apatite crystallites containing the mineral constituents of the bone can be replaced by a physical exchange process with the labelled phosphate in the plasma or the lymph, while the phosphate ions present inside these crystals cannot be replaced. Labelled phosphate ions can

Table 3.

Frog I, kept at 2°, killed after 12 days.

Ash weight: 3.235 gm.

	Weight of fresh tissue	Weight of ash	Per cent of labelled P administered found in 1 gm. fresh tissue
Bones			
	mgm.	mgm.	
Right femur..	427.8	126.3	4.33
Left femur...	442.8	123.6	4.74
Right tibia...	469.5	149.2	4.76
Left tibia....	432.6	141.1	5.23
Muscles			
	gm.	...	
Right thigh..	3.989	...	0.284
Left thigh...	3.467	...	0.262
Right calf....	1.401	...	0.237
Left calf.....	1.366	...	0.199

Table 4.

Frog II, kept at 2°, killed after 12 days.

Ash weight: 3.014 gm.

	Weight of fresh tissue	Weight of ash	Per cent of labelled P administered found in 1 gm. fresh tissue
Bones			
	mgm.	mgm.	
Right femur..	417.0	123.9	4.74
Left femur...	425.4	116.1	4.38
Right tibia...	450.6	150.8	5.01
Left tibia....	450.7	152.2	4.74
Muscles			
	gm.	...	
Right thigh..	5.461	...	0.24
Left thigh...	4.635	...	0.23
Right calf....	1.670	...	0.28
Left calf.....	1.679	...	0.31

Table 5.

Frog III, kept at 2°, killed after 21 days.

Ash weight: 3.104 gm.

	Weight of fresh tissue	Weight of ash	Per cent of labelled P administered found in 1 gm. fresh tissue
		Bones	
	mgm.	mgm.	
Right tibia epiphysis...	155.1	29.2	6.03
Left tibia epiphysis....	142.9	29.1	5.90
Right tibia diaphysis...	205.7	77.0	6.34
Left tibia diaphysis....	200.4	76.1	6.50
		Muscles	
	gm.		
Right calf.....	1.269	...	0.51
Left calf.....	1.252	...	0.42

Table 6.

Frog IV, kept at 2°, killed after 22 days.

Ash weight: 3.347 gm.

	Weight of fresh tissue	Weight of ash	Per cent of labelled P administered found in 1 gm. fresh tissue
		Bones	
	mgm.	mgm.	
Right tibia epiphysis...	144.2	33.1	3.68
Left tibia epiphysis....	158.7	39.6	4.50
Right tibia diaphysis...	205.8	86.6	5.07
Left tibia diaphysis....	215.2	80.8	4.52
		Muscles	
	gm.		
Right thigh.....	4.116	...	0.26
Left thigh.....	4.109	...	0.29
Right calf.....	1.477	...	0.34
Left calf.....	1.548	...	0.36

Table 8.

Frog VI, kept at 22°, killed after 8 days.

Ash weight: 3.46 gm.

	Weight of fresh tissue	Weight of ash	Per cent of labelled P administered found in 1 gm. fresh tissue
		Bones	
	mgm.	mgm.	
Right femur epiphysis..	150.6	37.1	4.44
Left femur epiphysis ...	169.8	37.6	2.66
Right femur diaphysis..	398.9	130.4	3.26
Left femur diaphysis ...	382.0	122.3	3.20
Right tibia epiphysis ...	263.9	60.2	2.97
Left tibia epiphysis	252.4	60.7	3.12
Right tibia diaphysis ...	304.3	122.6	3.66
Left tibia diaphysis	282.5	120.9	3.42
		Muscles	
	gm.		
Right calf	1.520	...	1.1
Left calf.....	1.584	...	1.2

phosphorus in the muscles is present as a constituent of organic compounds, as seen in Table 1 b. The bulk (about 80 per cent) of the organic P is present in the muscle of the frog in the form of acid soluble phosphorus compounds and, in a corresponding manner, the rate of activation of the muscle P depends mainly upon the rate of formation of active acid soluble P compounds. This process is much faster than the formation of the apatite crystals of the bone tissue and this fact explains why the replacement of phosphorus in the muscle tissue takes place at a much more rapid rate than the replacement of phosphorus in

Table 9.

Frog VII, kept at 20—24°, killed after 12 days.

Weight: at the start 56.5 gm.; at the end 49.5 gm.

Ash weight: 2.359 gm.

	Weight of fresh tissue	Weight of ash	Per cent of labelled P administered found in 1 gm. fresh tissue
		Bones	
	mgm.	mgm.	
Right femur epiphysis..	79.8	17.1	4.27
Left femur epiphysis...	77.6	16.7	4.35
Right femur diaphysis..	97.9	49.1	5.02
Left femur diaphysis...	103.1	48.3	4.70
		Muscles	
	gm.		
Right thigh.....	2.608	...	1.1
Left thigh.....	2.139	...	1.1
Right calf.....	1.067	...	0.9
Left calf.....	1.630	...	1.1

the bone tissue. From the fact that the ratio of the uptake of ^{32}P by 1 gm. muscle tissue and 1 gm. bone tissue much decreases with increasing temperature (see Table 10) we can conclude that the temperature coefficient of the interdiffusion and subsequent incorporation of labelled phosphate into the organic compounds of the muscle of the frog is much greater than the temperature coefficient of the formation of apatite crystals.

Excretion of labelled P.

In a few cases, we determined the percentage ^{32}P which was excreted by the kidneys of the frog. In one experiment,

Table 10.
Comparison of the labelled P content of bones
and muscles.

Frog	Duration of the experiment days	Ratio of the labelled P content of bone and muscle of equal weight
Temperature: 2°		
I	12	19.4
II	12	17.7
III	21	12.8 (epiphysis)
III	21	13.9 (diaphysis)
IV	22	13.2 (epiphysis)
IV	22	15.5 (diaphysis)
Average value ... 15.4		
Temperature: 22°		
V	8	3.0 (epiphysis)
V	8	2.9 (diaphysis)
VI	8	2.9 (epiphysis)
VI	8	2.9 (diaphysis)
VII	12	4.1 (epiphysis)
VII	12	4.6 (diaphysis)
Average value ... 3.4		

1.5 cc. 0.6 per cent sodium chloride solution containing 0.008 mgm. P as phosphate was injected into the lymph sack of the frog weighing 55 gm. and kept at 18°. Urine was collected during 14 hours and the ^{32}P content of the urine was determined. It was found to make out 10.6 per cent of the ^{32}P injected while, in other experiments, 7.1 and 5.8 per cent, respectively, was found.

Uptake by the frog of ^{32}P from a solution containing labelled sodium phosphate.

A frog weighing 88 gm. was kept at 18° in 100 cc. 0.6 per cent sodium chloride solution containing 4 mgm.

labelled P as sodium phosphate. The solution was renewed every day. After the lapse of $2\frac{1}{2}$ days, the frog was washed, killed and its P content extracted. It was found to be 695 mgm. or 7.9 mgm. per gram of fresh weight of the frog. The specific activity of this P was found to constitute $1/450$ of the specific activity of the P of the solution in which the frog was kept. Thus, in the course of $2\frac{1}{2}$ days, $1/450$ of the total P of the frog was replaced by solution P. We investigated, furthermore, the activity of the inorganic P extracted from the liver of the frog which was found to show a specific activity amounting to 0.99 per cent of the specific activity of the solution P. It was, thus, 4.5 times more active than the average P of the frog.

Rate of renewal of the phosphorus compounds in the muscle.

In the preceding sections, experiments were described in which the percentage of the administered ^{32}P present in the skeleton and the muscles was determined. In the following, we wish to discuss the rate at which the organic phosphorus compounds present in the muscles of the frog are renewed. We shall consider those cases of renewal¹⁾ in which phosphate is split off and consecutively reincorporated into the organic molecules. For example, creatine-phosphoric acid is degraded under splitting off of phosphate and resynthesized under uptake of phosphate radicals. If labelled phosphate ions are present, they will have the same chance to be incorporated as have non-labelled ones. Let us assume 10^6 free phosphate ions present in the muscle cells to contain 10^{32}PO_4 ions while from 10^6 P atoms

¹ It is conceivable that molecules get renewed without the splitting off and reincorporation of phosphate group.

isolated from hexosemonophosphate of the muscle tissue only 1 is ^{32}P , then we have to conclude that 10 per cent of the hexosemonophosphate molecules got renewed during the experiment under incorporation of free phosphate. The ratios of the specific activities of the inorganic P and the organic P are, thus, a measure of the extent of renewal of the organic P compound which took place during the experiment. When trying to arrive at quantitative data we encounter the following difficulties: (a) The free phosphate extracted from the muscle tissue is partly cellular and partly extracellular phosphate; it is, however, the specific activity of the cellular phosphate only which is to be considered when calculating the rate of renewal. (b) The specific activity of cellular phosphate changes during the experiment, the change being due, for example, to an increasing influx of labelled phosphate into the muscle cells. In this connection it should be also mentioned that the method permits to distinguish between renewed and non-renewed, between "old" and "new" molecules; but no information is supplied on the point whether the molecules are repeatedly renewed in the course of the experiment or not.

As to point (a), to account for the share of the extracellular phosphate in the total phosphate of the muscle tissue, we must know the specific activity of the plasma phosphate which we assume to be identical with the specific activity of the extracellular phosphate. We must also know the phosphate content of the plasma and that of the muscle tissue and, finally, the size of the extracellular space. The last mentioned magnitude can be determined in each case by administering simultaneously with the labelled phosphate labelled sodium¹, or it can be assumed that the

¹ Comp. G. HEVESY and O. REBBE, *Acta Physiol. Scand.* **2**, 171 (1940).

extracellular space makes out 14 per cent of the weight of the muscles. Another procedure which we used repeatedly is the following. We remove one leg of the frog 1 hour after the start of the experiment and determine the specific activity of the free muscle phosphate P. After further 3 hours, we extract the phosphate of the other gastrocnemius and determine the specific activity of the free phosphate P. If, within 1 hour, a proportional partition of ^{32}P between plasma phosphate and the extracellular phosphate took place, then the increment of the specific activity of the tissue phosphate between 1 hour and 4 hours is solely due to an increase in the specific activity of the cellular inorganic P. By this method, we can determine the percentage of cellular P which was replaced in the muscle by plasma P between 1 hour and 4 hours after the start of the experiment.

The fact that the inorganic P of the tissue is partly of extracellular origin will lead to an overestimation of the activity of the cellular inorganic P and, thus, to an underestimation of the renewal figures of the organic P compounds. This source of error is mainly to be considered in experiments of short duration carried out at low temperature. On the other hand, even if the greatest precautions are observed, we risk a decomposition of some of the creatine phosphate present in the tissue prior to the separation of the inorganic P. Such a decomposition will lead to a decrease in the specific activity of the inorganic P, the inorganic P originating from creatine P being on the whole less active than the "free" phosphate P. We shall, thus, underestimate the specific activity of the inorganic P and, correspondingly, overestimate the rate of renewal of the organic P compounds. This error will also be larger in experiments of short duration carried out at low tem-

perature. We wish to mention a further possible experimental error. If the free phosphate is not precipitated quantitatively, we risk to find some strongly active phosphate in the creatine phosphate fraction. A non-negligible amount of phosphate may remain in solution in cases in which the amount of P to be precipitated is very small.

The following objection can be put forward regarding the calculation of renewal rates from the ratio of the specific activities of the inorganic P and the P split off from organic compounds. The P secured as inorganic phosphate might even after the most careful handling of the tissue have been largely present not as free phosphate in the tissue cells but incorporated in very labile compounds which were decomposed in the course of the extraction process. It is possible that this is the case, it is even quite possible that a large part of the inorganic P extracted as such from the muscle cells was originally present incorporated in very labile compounds and was decomposed during the extraction process. General experience indicates, however, that very labile phosphorus compounds are renewed at a fast rate and we can, therefore, expect the P of such labile phosphorus compounds to obtain within a short time a similar specific activity as shown by the inorganic P present in the cells. Should that not be the case, then the comparison of the specific activity of the "inorganic" P with that of the P split off from the organic compound in question would obviously lead to an overestimation of the rate of renewal.

The specific activity of different P fractions is seen in Tables 11—18.

Though all precautions were taken to prevent decomposition of creatinephosphoric acid it is difficult to state

whether the variations in the values obtained for the rate of renewal of creatinephosphoric acid molecules in some of the experiments are genuine or are due to a more or less successful prevention of the decomposition of the creatinephosphoric acid prior to the removal of the inorganic phosphate of the muscle tissue.

The results of an experiment, in which the frog was

Table 11.

Specific activity of phosphorus fractions extracted from the gastrocnemius of a frog, 4 hours after injecting labelled sodium phosphate into the lymph sack. Temp.: 2°.

Fraction	P content in mgm.	Activity in per cent of the standard preparation	Per cent of total activity administered per mgm. P	Relative specific activity
I. Inorganic P .	0.313	69.5	0.888	100
II. Inorganic + creatine P . . .	0.935	100	0.428	48.2
III. Creatine P calculated as II—I	0.622	30.5	0.20	22.1
IV. Creatine P (isolated)	0.362	17.1	0.19	21.4
V. Pyrophosphate + hexose P	0.215	8.3	0.16	17.4
VI. Acid soluble residual P . . .	0.113	3.2	0.11	12.7
VII. Non acid soluble P	0.500	1.6	0.013	1.4

We denote as pyrophosphate + hexose P the inorganic phosphorus obtained after the hydrolysis of a fraction for one hour at 100° in 1 N. H₂SO₄ after the removal of the inorganic and creatine P.

Table 12.

Specific activity of phosphorus fractions extracted from the gastrocnemius of frogs. Temp.: 2°.

Time of the experiment hours	Fraction	Specific activity
4	Inorganic P	100
4	Creatine P	14.8
4	Inorganic P	100
4	Creatine P	21.4
3	Inorganic P	100
3	Creatine P	8.8

Table 13.

Specific activity of phosphorus fractions extracted from the gastrocnemius of a frog 40 hours after injecting labelled sodium phosphate. Temp.: 2°.

Fraction	Relative specific activity
I. Inorganic P	100
II. Inorganic + creatine P	62.7
III. Creatine P (calculated as II—I)	33.7
IV. Creatine P (determined).....	34.4
V. Pyrophosphate + hexose P	22.8
VI. Acid soluble residual P	11.3
VII. Non acid soluble P.....	2.1

kept at 20° for 4 hours and then for 1 hour at 0°, is seen in Table 18. The muscles were immersed in liquid air and treated with cold 5 per cent trichloroacetic acid. The extract was sucked through a glass filter into cooled FISKE's reagent. These operations took 2 minutes. In this experiment, we tested to what extent the inorganic P gets precipitated by

Table 14.

Specific activity of phosphorus fractions extracted from the gastrocnemius of a frog 24 hours after injecting labelled sodium phosphate. Temp.: 20°.

Fraction	Relative specific activity
Inorganic P	100
Creatine P	95
P hydrolyzed in the course of 1 hour	91
Acid soluble residual P	36

Table 15.

Specific activity of phosphorus fractions extracted from the gastrocnemius of a frog 400 hours after injecting labelled sodium phosphate. Temp.: 20°.

Fraction	Relative specific activity
Inorganic P	100
Creatine P	99
P hydrolyzed in the course of 1 hour	87
Non acid soluble P	16

FISKE's reagent. After precipitation of the "free" phosphate, 60 mgm. sodium phosphate were dissolved in the filtrate, the phosphate was then precipitated and its activity tested. If the first precipitation was strictly quantitative, this second precipitate should be inactive. The counter registered 228 counts while, in the case of the first precipitate, 2500 counts were registered. When the 228 non-precipitated counts are considered, the specific activity of the creatine P fraction works out to be 14.1 instead of 15.6.

Table 16.

Specific activity of the phosphorus fractions of the muscles of a frog kept at 20° for 4 hours and subsequently at 0° for 1 hour.

Fraction	P content in mgm.	Counts per min.	Specific activity	Relative specific activity
Left gastrocnemius				
Inorganic P	0.055	427	7770	100
Creatine P	0.240	290	1210	15.6
Hexose P	0.143	98	686	8.7
Right gastrocnemius + sartorius				
Inorganic P	0.350	2500	7150	100
Creatine P	0.908	1010	1110	15.6
Residue after 17 hours hydrolysis	0.372	45	120	1.68

The same technique was used in the following experiments.

The lowest value found for the percentage renewal of creatinephosphoric acid molecules in the course of 4 hours at 0° is 9 and in the course of 17.5 hours 10 while, in most experiments, appreciably larger figures were found. The rate of renewal of the creatinephosphoric acid molecules of the resting frog is, thus, quite appreciable even at 0° though not as high as stated in a preliminary note¹. At 20° the lowest figure found after 4 hours is 16 per cent.

Rate of interaction of the plasma phosphate and the cellular phosphate of the muscle tissue.

In the preceding section, we calculated the rate of renewal of the organic P compounds present in the muscle tissue

¹ G. HEVESY and O. REBBE, Nature **141**, 1097 (1938).

Table 17.

Specific activity of the phosphorus fractions of the muscles of 2 frogs kept at 0° for 17.5 hours.

Frog	Fraction	P content	Specific activity
I Gastrocnemius	Inorganic P	0.330	100
	Creatine P	0.474	29.8
	Product of 100 min. hydro- lysis	0.226	27.6
	Residue after 120 hours hy- drolysis	0.070	2.0
I Sartorius	Inorganic P	0.799	100
	Product of 7 min. hydrolysis	1.056	25.1
	Product of 17 hours hydro- lysis	0.758	19.5
	Residue	0.246	6.8
II Gastrocnemius	Inorganic P	0.398	100
	Creatine P	0.452	11.6
II Sartorius	Inorganic P	0.475	100
	Creatine P	0.694	10.1

Table 18.

Specific activity of phosphorus fractions isolated from different organs of a frog after administration of labelled phosphate during 45 hours at 20°.

Fraction	Specific activity
Plasma P	100
Corpuscle P	3.6
Gastrocnemius inorganic P	4.9
Gastrocnemius creatine + pyrophosphate P	5.3
Liver P	10.1
Epiphysis P	0.35
Diaphysis P	0.20

Table 19.

Specific activity of phosphorus fractions isolated from different organs of a frog after administration of labelled phosphate during 4 days at 22°.

Fraction	Specific activity
Plasma P	100
Gastrocnemius inorganic P.....	8.3
Gastrocnemius creatine P.....	7.4
Sartorius total acid soluble P.....	8.5
Gastrocnemius phosphatide P.....	1.5

by comparing the ^{32}P content of the tissue inorganic P with the ^{32}P content of the phosphorus extracted from the compound in question. In the following, we shall discuss the interaction of the plasma phosphate with the cellular phosphate. This is clearly a very different problem, the rate of interaction between the plasma phosphate and the cellular phosphate being determined by the permeability of the cell membrane.

The low rate at which phosphate ions migrate through the membrane of the gastrocnemius is seen in Tables 18 and 19. In the course of 4 days at 22° only somewhat less than 1/10 of the P atoms present in the labile P compounds got replaced by plasma P. The molecules of the labile P compounds were repeatedly renewed during this interval (see p. 19) and many P atoms present in the muscle cells interchanged lively; however, the interchange between cellular and extracellular P took only place on a restricted scale.

The results of further experiments in which the activity of the plasma was compared with the activity of the muscle is seen in Table 20.

To keep the plasma activity at an approximately constant level throughout the experiment, 0.4 cc. solution was injected at the start of the experiment and further 0.08 cc. every hour. As seen in Table 20, within 1 hour and 4 hours the activity of the plasma changes only slightly, the

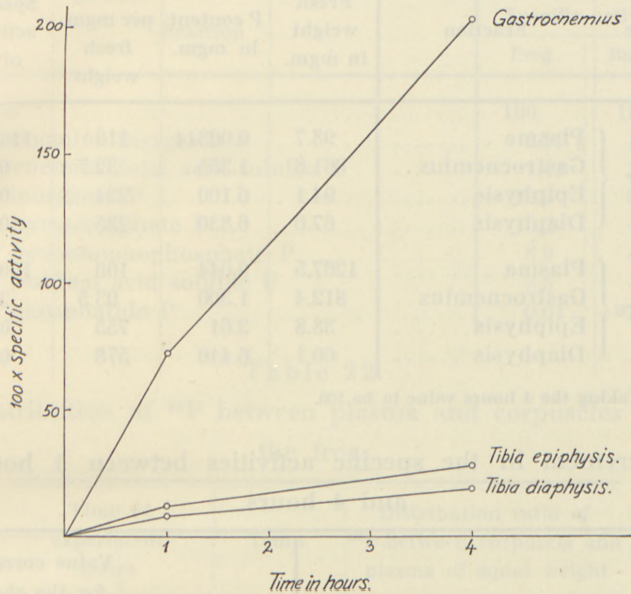


Fig. 3. Specific activity of tissue P.

average being 108, taking the end value to be 100. The values obtained for the specific activity of the tissue P are seen in Table 20 and Fig. 3.

In some cases, very low values were obtained for the distribution ratio of labelled phosphate between plasma and muscle tissue. The fact that in these experiments frogs kept through the winter were used, the experiment being carried out in the spring, suggests the explanation that poor circulation may be responsible for the low values obtained.

Table 20.

Activity of different fractions of the frog 1 hour and 4 hours, respectively, after the start of the experiment.

Temp.: 22°.

Time	Fraction	Fresh weight in mgm.	P content in mgm.	Activity per mgm. fresh weight	Specific activity of P
1 hour	Plasma	98.7	0.00344	116 ¹	116
	Gastrocnemius ..	861.8	1.355	32.7	0.72
	Epiphysis	94.1	6.100	224	0.12
	Diaphysis	67.6	6.830	235	0.08
4 hours	Plasma	1267.5	0.044	100	100
	Gastrocnemius ..	812.4	1.300	93.5	2.03
	Epiphysis	38.8	3.61	755	0.28
	Diaphysis	60.1	6.410	578	0.19

¹ Taking the 4 hours value to be 100.

Increment in the specific activities between 1 hour and 4 hours.

Fraction	Experimental value	Value corrected for the change in the specific activity of the plasma
Gastrocnemius	1.31	1.21
Epiphysis	0.16	0.148
Diaphysis	0.11	0.102

³²P content of the liver fractions.

As in the case of mammalia, in the frog the liver phosphate interacts at a much faster rate with the plasma phosphate than does the muscle phosphate. The fast rate of renewal of the acid soluble P compounds and the very

Table 21.

Specific activity of the phosphorus fractions extracted from the organs of the frog kept at 15° and the organs of the rabbit 10 hours after administration of labelled phosphate.

Fraction	Specific activity	
	Frog	Rabbit
Plasma	100	100
Gastrocnemius inorganic P	2.11	15.5
Gastrocnemius total acid soluble P	1.49	11.0
Liver inorganic P	12.9	85
Liver pyrophosphate P	15.2	—
Liver hexosemonophosphate P	8.9	—
Liver residual acid soluble P	3.5	—
Liver phosphatide P	0.04	12.8

Table 22.

Distribution of ^{32}P between plasma and corpuscles of the frog.

Time of experiment hours	Temp.	Distribution ratio of ^{32}P between corpuscle and plasma of equal weight
10	15°	0.28
14	20°	1.1
45	20°	3.6

slow renewal of the phosphatides of the liver of the frog are seen in Table 21. This table contains also corresponding data for the P fractions of the rabbit.

^{32}P content of the red corpuscles.

As seen in Table 22, a very slow interaction was found to take place between the plasma P and the corpuscle P present in the nucleated corpuscles of the frog.

In this connection, it is of interest to recall that the non-nucleated erythrocytes of the rabbit were found to contain after the lapse of 10 hours at 37° 5 times as much ^{32}P as plasma of equal weight, while the corresponding figure for the nucleated corpuscles of the hen was found to be about 0.5, only.

Summary.

The rate of absorption of phosphate injected into the lymph sack of the frog was studied using radiophosphorus as an indicator. The maximum amount of labelled phosphate present in the circulation at any moment was found to be 3 to 4 per cent of the amount administered, thus a similar value as found in the case of mammalia.

While at 2° after the lapse of 1 to 3 weeks 1 gm. bone tissue contained about 15 times as many labelled P atoms as 1 gm. muscle tissue, the corresponding ratio was found to be but 3 at 22° , showing that the temperature coefficient of the penetration of labelled phosphate into the muscle cells followed by incorporation of labelled P into the phosphorus compounds of the muscle tissue is much larger than the temperature coefficient of the formation of labelled bone apatite crystals.

The amount of labelled phosphate excreted by the kidneys and the amount of labelled phosphate taken up by the frog kept in physiological sodium chloride solution containing labelled phosphate were investigated.

The rate of renewal of various acid soluble P compounds extracted from the gastrocnemius of the frog was determined by comparing the specific activity of the inorganic P extracted from the muscle with the specific activity of the

phosphorus split off from various organic compounds of the muscle tissue. Creatinephosphoric acid molecules, adenosintriphosphoric acid molecules, and also hexosemonophosphate molecules were found to be renewed at an appreciable rate even at 0° . The rate of renewal was found to increase with decreasing chemical stability of the compound and with increasing temperature.

The rate of interaction of the plasma phosphate with the phosphate of the muscle cells was found to be very much lower than the rate of interaction of the free cellular phosphate with the phosphate of several organic phosphorus compounds.

The rate of penetration of labelled phosphate into the liver cells is much faster than the rate of penetration into the muscle cells. The rate of interaction of plasma phosphate and the phosphate of the corpuscles was found to be very low.

The authors wish to express their most hearty thanks to Professor NIELS BOHR for the kind interest taken in this work, to Professor AUGUST KROGH for his kind interest and for numerous suggestions, and to Dr. HILDE LEVI for carrying out many of the radioactive measurements. They wish also to thank Dr. KNISELY for his help in the early phase of the work (1936).

Institute of Theoretical Physics and Laboratory of Zoophysiology,
University of Copenhagen. June, 1941.

On the Circulation of Potassium.

We saw that phosphate present in the plasma (extra-cellular fluid) penetrates at a fairly slow rate into the muscle cells of the frog and it seemed of interest to compare the rate of penetration of phosphate with the rate of penetration of potassium into the muscle cells. The results of experiments in which labelled potassium (^{42}K) was used as an indicator are communicated in this note.

Experimental procedure.

About 100 mgm. potassium chloride were bombarded with a stream of deuterons in the Copenhagen cyclotron. A solution containing 8 mgm. potassium chloride per cc. was prepared and 0.5 cc. or less of this solution was injected

Table 1.

Interchange of potassium between plasma and gastrocnemius of a frog weighing 36 gm., at 18° .

Time in min.	Sample	Weight in mgm.	Per cent of ^{42}K administered, present in the sample	Per cent of ^{42}K administered, present in 1 gm.	Ratio of ^{42}K content of 1 gm. gastrocnemius and 1 gm. plasma
5	Plasma	50	0.085	1.70	} 0.31
5	Gastrocnemius .	440	0.234	0.53	
20	Plasma	247	0.393	1.59	} 1.20
20	Gastrocnemius .	549	1.05	1.91	

Table 2.

Interchange of potassium between plasma and gastrocnemius of a frog weighing 35 gm., at 18°.

Time	Sample	Weight in mgm.	Per cent of ⁴² K administered, present in the sample	Per cent of ⁴² K administered, present in 1 gm.	Ratio of ⁴² K content of 1 gm. gastrocnemius and 1 gm. plasma
10 min.	Plasma	102	0.269	2.64	} 0.57
10 —	Gastrocnemius .	342	0.517	1.51	
3 hours	Plasma	343	0.173	0.50	} 6.48
3 —	Gastrocnemius .	294	0.950	3.24	

Table 3.

Interchange of potassium between plasma and gastrocnemius of a frog weighing 62 gm., at 18°.

Time in hours	Sample	Weight in mgm.	Per cent of ⁴² K administered, present in the sample	Per cent of ⁴² K administered, present in 1 gm.	Ratio of ⁴² K content of 1 gm. gastrocnemius and 1 gm. plasma
1	Plasma	268	0.319	1.19	} 1.24
1	Gastrocnemius .	828	1.21	1.47	
24	Plasma	783	0.198	0.25	} 8.1
24	Gastrocnemius .	727	1.55	2.3	

into the lymph sack of the frog. After the experiment, a known weight of the muscle tissue and of the plasma was ashed below 360°. To the ash of the plasma non-active tissue ash and to the ash of the tissue non-active plasma

Table 4.

Interchange of potassium between plasma and gastrocnemius of a frog weighing 82 gm., at 18°.

Time in hours	Sample	Weight in mgm.	Per cent of ⁴² K administered, present in the sample	Per cent of ⁴² K administered, present in 1 gm.	Ratio of ⁴² K content of 1 gm. gastrocnemius and 1 gm. plasma
24	Plasma	547	0.144	0.25	} 4.9
24	Gastrocnemius .	1177	1.43	1.22	
64	Plasma	1010	0.15	0.15	} 9.3
64	Gastrocnemius .	1051	1.46	1.39	

Table 5.

Interchange of potassium between plasma and gastrocnemius of a frog weighing 65 gm., at 18°.

Time in hours	Sample	Weight in mgm.	Per cent of ⁴² K administered, present in the sample	Per cent of ⁴² K administered, present in 1 gm.	Ratio of ⁴² K content of 1 gm. gastrocnemius and 1 gm. plasma
24	Plasma	675	0.294	0.38	} 4.6
24	Gastrocnemius .	985	1.72	1.75	
68	Plasma	991	0.21	0.21	} 8.4
68	Gastrocnemius .	1015	1.79	1.77	

Excreted between 0 and 24 hours, 12.3 per cent of the ⁴²K administered;

Excreted between 24 and 68 hours, 1.8 per cent of the ⁴²K administered.

ash was added. By this procedure, samples of about identical weight and identical chemical composition were obtained. The activity of the samples weighing about 300 mgm. was compared using a Geiger counter.

Results.

The results obtained at 18° are seen in Tables 1—5. In experiments carried out at 0° which lasted 1 hour, 1 gm. of gastrocnemius was found to contain 0.51 and 0.63 times, respectively, as much ^{42}K as 1 gm. of plasma, a value about half as large as that found at 18° .

The labelled potassium found in the muscle tissue is located partly in the cells and partly in the extracellular space. If we assume the extracellular space of the gastrocnemius of the frog to make out 14 per cent of the tissue weight, about $\frac{1}{4}$ of the ^{42}K found in the muscle tissue after the lapse of 10 min. (see Table 2), $\frac{1}{9}$ after 20 min. (see Table 1), and $\frac{1}{46}$ of the value found after 3 hours (see Table 2) is located in the extracellular space. The amount of labelled potassium which penetrated into the muscle cells is very much larger than the amount of labelled phosphate which passed the cell membrane during the same time. The interchange of potassium between plasma and muscle cells is thus very much faster than the interchange of phosphorus between plasma and muscle cells. While it requires 10 hours or more that 1 gm. gastrocnemius contains as much labelled P as 1 gm. plasma, it takes only $\frac{1}{2}$ hour or less that the ^{42}K content of 1 gm. gastrocnemius becomes equal to the ^{42}K content of 1 gm. plasma.

est was added by the procedure samples of about identical weight and identical chemical composition were obtained. The activity of the samples was about 200 units was compared using a Geiger counter.

The results obtained in 12 are given in Tables 1-3. In experiments carried out at 0 which lasted 1 hour, 1 gm of potassium was found to contain 0.51 and 0.53 times respectively as much ^{42}K as 1 gm of plasma a value about half as large as that found in 12.

The labelled potassium found in the muscle tissue is located partly in the cells and partly in the extracellular space. If we assume the extracellular space of the gastro-intest of the dog to make out 11 per cent of the tissue weight about 1/2 of the ^{42}K found in the muscle tissue after the lapse of 10 min (see Table 2) after 30 min (see Table 1) and 1/3 of the value found after 3 hours (see Table 3) is located in the extracellular space. The amount of labelled potassium which penetrated into the muscle cells is very much larger than the amount of labelled phosphate which passed the cell membranes during the same time. The interchange of potassium between plasma and muscle still is very much faster than the interchange of phosphate between plasma and muscle cells. While it requires 10 hours or gives that 1 gm gastro-intest contains as much labelled P as 1 gm plasma it takes only 1 hour or less for the content of 1 gm gastro-intest to become equal to the content of 1 gm plasma.

^{42}K and ^{42}P were obtained from the University of California, Berkeley, California.

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

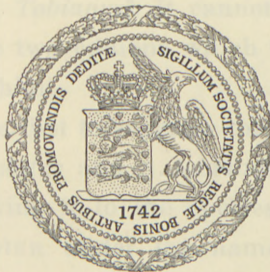
Biologiske Meddelelser. **XVI**, 9.

ON SUBSPECIES AND
RACES OF THE LESSER SAND EEL
(*AMMODYTES LANCEA* S. LAT.)

A CONTRIBUTION TO THE DISCUSSION OF
THE SPECIES PROBLEM IN FISHES

BY

AD. S. JENSEN



KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

ON SUBSPECIES AND
RACES OF THE LESSER SAND EEL
(*AMMODYTES LANCEA* S. LAT.)
CONTENTS

	Page
Nomenclature	3
<i>Ammodytes lancea</i> and <i>A. marinus</i>	6
<i>Ammodytes lancea</i> and <i>A. marinus</i> from Danish waters	13
On the Greenland <i>Ammodytes</i>	15
Concluding remarks: Do <i>Ammodytes lancea</i> , <i>A. marinus</i> and <i>A. dubius</i> represent separate species, or are they only subspecies of one single species?	26



KØBENHAVN
I KONFIRMATIONEN FOR LÆSERE MEDLEMMER

Nomenclature.

As regards the designation of the two species of the genus *Ammodytes* (*lanceolatus* and *lancea*) which are common in north-European waters there prevailed and still prevails to-day a difference of opinion which has led to complete confusion. Before I proceed to the actual subject of the present paper I wish to set forth some guiding remarks.

By international agreement the 10th edition of LINNÉ'S *Systema Naturæ* forms the basis of zoological nomenclature. In this edition LINNÉ gives only one species of *Ammodytes* which he calls *A. Tobianus*¹. In the 12th edition LINNÉ came to the conclusion that two species of *Ammodytes* are found on the Swedish coasts, writing: "Species mihi videntur in Svecia duæ esse distinctæ"; but he used only one species name for both, viz. *Tobianus*². It cannot be seen from the text of any of these two editions which of the two species LINNÉ had before him.

LESAUVAGE is the first to separate the two species under the names *A. lanceolatus* and *A. tobianus*³; he thus retains the latter name giving it to the species which was later established by CUVIER under the name *A. lancea*, while

¹ CAROLI LINNÆI *Systema Naturæ*, Tomus I, Ed. Decima, p. 247, 1758.

² CAROLI A LINNÉ: *Systema Naturæ*, Tomus I, Ed. Duodecima, p. 430, 1766.

³ Bull. des Sciences, par le Société Philomatique, 1824, p. 140—141. To this paper I have had no accession.

CUVIER is of the opinion that it is LESAUVAGE'S *A. lanceolatus* which ought to retain the name *A. tobianus*¹.

In the following years the species name *tobianus* is used now for the one and now for the other of the two species.

In a paper on specimens contained in LINNÉ'S collections LÖNNBERG too mentions "*Ammodytes Tobianus*", writing that it is *A. lanceolatus* Lesauvage. At the same time it appears from LÖNNBERG'S account that the specimen originated from ALSTRÖMER'S collections, which were known and seen by LINNÉ, and that some of these animals were LINNÉ'S types, but this is not said to be the case with *A. tobianus*². As it is stated in the literature that according to LÖNNBERG, LINNÉ'S type specimen of *Ammodytes Tobianus*, which still exists, is *A. lanceolatus*—which would cause the latter name, being the younger, to be replaced by *tobianus*—I asked Prof. LÖNNBERG for his opinion on this point. Prof. LÖNNBERG writes in a letter of 16th May 1941 that the specimen of *A. Tobianus* which is mentioned in connection with JONAS ALSTRÖMER'S collections, and which is of the form that was later described by LESAUVAGE under the name *A. lanceolatus*, is of no importance to nomenclature; for LINNÉ did not consider it a type specimen, but only a specimen of "*A. Tobianus*". If LINNÉ in any way had chosen it for a type specimen, things would have been different; but this did not happen: the ALSTRÖMER specimen cannot be made the type of the name *tobianus*. According to the evidence we have there is no ground for retaining the species name *Tobianus* for *lanceolatus*.

¹ CUVIER: Le Règne animal, Tome II, 1829, p. 360.

² EINAR LÖNNBERG: Linnean Type-Specimens of Birds, Reptiles, Batrachians and Fishes in the Zoological Museum of the R. University in Upsala. Bihang till K. Svenska Vet.-Akad. Handlingar, Bd. 22, Afd. IV, No. 1, 1896, pp. 3, 5 & 41.

In elucidation of the relation between *A. Tobianus* and *A. lancea* the following is noted. In his 10th edition of *Systema Naturæ* LINNÉ refers under *A. Tobianus*, among other works, first to ARTEDI's description of *Ammodytes*, which at that time had not been given any species name¹.

That ARTEDI had *Ammodytes lancea* before him is clear from the following paragraph in his detailed description: "Dentes nulli in maxillis observari possunt. Palatum quoque totem glabrum". One of the most characteristic features in *A. lancea* is just that teeth are absent on the vomer, whereas the vomer in *A. lanceolatus* is provided with two fairly large pointed teeth. Since LINNÉ refers to ARTEDI it may be presumed that he also did not find teeth on the vomer in his *A. tobianus*; hereby the idea that the Linnean species is identical with *A. lanceolatus* Lesauvage is further invalidated.

Now it happened, however, that RAITT in 1934 separated an essential part of the north European population of *A. lancea* as a new species, *A. marinus*—which segregation will be discussed later—among other things characterized by a higher number of fin rays. This will appear from the following table which is based on several hundred specimens.

	Dorsal fin	Anal fin	Pectoral fin
<i>A. lancea</i>	51—57	26—31	11—13
<i>A. marinus</i>	55—63	28—34	12—15

That ARTEDI had *A. lancea* before him appears from the fact that he gives the following number of fin rays which all fall within the limits in *A. lancea*, while the number of rays in the dorsal fin excludes *A. marinus*:

D. 53—54 A. 27—28 P. 12.

¹ PETRI ARTEDI *Descriptiones Specierum Piscium*, 1738, p. 55—57.

In his 10th edition of *Systema LINNÉ* refers, besides to ARTEDI, to some works by himself in which the number of fin rays is as follows:

D. 54	A. 28	P. 13
- 50	- 26	- 12
- 60	- 32	- 15
- 60	- 30	- 14

The figures in the two first lines thus refer to *A. lancea*, in the two last to *A. marinus* (see p. 9, note 1).

In other words: LINNÉ'S *A. Tobianus* is a mixture of the two forms which were later established as *A. lancea* Cuvier and *A. marinus* Raitt.

CUVIER'S description of *A. lancea* is short, and only meant to distinguish it from *A. lanceolatus*, the differences he notes are, among other things, the different extent of the dorsal fin in relation to the pectorals. CUVIER does not mention the number of fin rays, but this is given shortly afterward by YARRELL in his description of *A. lancea*: D. 51, A. 25, P. 13¹.

On the basis of the information above and in order to clarify the matter I prefer to leave out the name *Tobianus*. If this name has been used in one or other sense by authors quoted in the following it has therefore been replaced by a specific name which cannot be misunderstood, but it is, at the same time, given in brackets and in quotation marks.

In the following we shall discuss *A. lancea* Cuvier, paying also regard to *A. marinus* Raitt and *A. dubius* Reinhardt.

Ammodytes lancea Cuv. and *A. marinus* Raitt.

In 1934 RAITT, of the Fishery Board for Scotland, Aberdeen, gave the surprising information that in the North

¹ W. YARRELL: A History of British Fishes, 1. Ed., II, 1836, p. 322.

Sea and N. E. Atlantic, both inshore and offshore from the Faroes to St. Kilda, and from the Shetland to the Firth of Forth, a species, hitherto entirely overlooked, of the genus *Ammodytes* occurs in large numbers, and he gave it the name *A. marinus*¹. It is distinguished from *A. lanceolatus*, among other things by the absence of teeth on the vomer and by the upper jaw being protrusible. In these and other respects the new species agrees with *A. lancea* ("*A. tobianus*") but *A. marinus* differs outstandingly from this in fin ray and vertebral numbers. The mean numbers of vertebrae and fin rays found in samples of the two species specially examined for the purpose were:

	Vertebrae	Dorsal fin rays	Anal fin rays	Pectoral fin rays
<i>A. lancea</i>	63.37	53.40	27.96	12.05
<i>A. marinus</i>	69.21	59.07	30.61	13.72

A. marinus is far more common in Scottish waters than *A. lancea* which has so far been found only at inshore positions. In the course of six years 3357 adult specimens were collected of *A. marinus* against 364 adult specimens of *A. lancea* (and 812 of *A. lanceolatus*).

Biologically, the two species differ from each other according to Raitt in that *A. marinus* spawns in early spring, while *A. lancea* ("*tobianus*") ripens in summer.

A. marinus occurs in the larval stage in the northwestern North Sea in countless millions in the month of March year after year and provides important nourishment to many food fishes: "This vital yearly influx of fish food,

¹ D. S. RAITT: A preliminary account of the Sandeels of Scottish Waters. Journal du Conseil, Vol. IX, No. 3, 1934, p. 365. — IDEM: The occurrence of four species of Sand Eels, of economic importance, in Scottish waters, one of which is new to science. The Scottish Naturalist, 1935, p. 62.

which has formerly been taken to belong to the species *A. lancea* ("tobianus"), is now seen to be the new form *A. marinus*".

Urged by RAITT's find of the new species of *Ammodytes* DUNCKER and MOHR made a revision of the collection in the Hamburg Museum in view of the possibility of finding new localities for *A. marinus*¹. As the material of the museum had to be spared, a determination of the number of vertebrae could not be made; instead of this the oblique cutaneous folds (*plicae*), corresponding to the transversal scale rows, were counted, the numbers of these *plicae* must to some extent be in a fixed relation to the myomere numbers and thus also to the numbers of vertebrae (in the present case about twice the number of the vertebrae). The rays in dorsal, anal, and pectoral fins were also counted. It appeared that the Hamburg Museum possesses specimens of *A. marinus* from the North Sea (56°28' N, 5°57' E and the Helgoland Bay) and from Norway (Bergen) and the Murman coast (Port Wladimir).

In 1936 and 1937 KÄNDLER, of the Deutsche wissenschaftliche Kommission für Meeresforschung, found that *A. marinus* is also very common in the Baltic, especially off the coast of Pomerania². The number of vertebrae varies from 66 to 72, the mean value being 68.5, while the species *lancea* ("tobianus") has 61 to 65 and mean value 63.1. Also the number of rays in the different fins agrees with

¹ GEORG DUNCKER und ERNA MOHR: Die nordeuropäischen *Ammodytes*-Arten des Hamburger zoologischen Museums. Zool. Anz., Bd. 110, p. 216, 1935.

² R. KÄNDLER, Report: *Ammodytes*. Rapp. et Proc.-Verb. des Réunion. Cons. Perm. Internat. pour l'Explor. de la Mer, Vol. C 2. P., 1936, p. 75. — IDEM: Beobachtungen über die Laichzeiten der *Ammodytes*-Arten in Nord- und Ostsee. Zool. Anz., Bd. 118, 1937, p. 1.

that given by RAITT for his Scottish material. Near the coast *A. marinus* is caught only singly, but if one fishes away from the coast in deeper water (about 15—20 metres) it is often caught in numbers. The spawning period falls in November to February. The spawning places are not near the coasts; thus in March 1935 a large quantity of larvae and young fishes were caught in the Bornholm basin¹.

At Helgoland the mean value of vertebrae was, according to KÄNDLER, in *A. marinus* 69.9, in *A. lancea* ("*tobianus*") 64.0.

For *A. lancea* ("*tobianus*") KÄNDLER found the peculiar feature that in the Helgoland Bay it has two spawning periods, viz. near Cuxhaven at the mouth of the Elbe in spring (March to May) and out at the island of Helgoland in summer (August to September), and that there are two varieties which cannot, it is true, be distinguished in outward appearance, but which show considerable differences in the number of vertebrae and fin rays as will appear from the following table:

	Mean value of vertebral number	Mean value of rays in		
		dorsal fin	anal fin	pectoral fin
Spring spawners (Cuxhaven).....	63.1	53.4	28.1	12.0
Summer spawners (Helgoland).....	64.1	54.2	27.7	12.5

¹ I can add that *A. marinus* also occurs in the Baltic off southeastern Sweden. This can be interpreted from a note by LINNÉ in his *Fauna Svecica* (1761, p. 109): he writes under *A. TOBIANUS*, which should be referred to the *A. lancea* group (cf. p. 5), as follows: "Obs. Numeravimus plures radios in pinnis, quam ichthyologus, sc. Dors. 60, pector. 15, ani 32, Caudæ 14". These figures show that the *Ammodytes* whose number of rays LINNÉ here states must be *A. marinus* (cf. p. 6). As to its native place LINNÉ states in the same place as follows: "Habitat in mari Baltico, ad australem Oelandiæ angulum copiose, & in Scania ad urbem Cimbrishamn". (It is found in the Baltic at the southern corner of Öland

KÄNDLER also examined a sample (30 individuals) from Iceland; they proved all to belong to *A. marinus*, but the mean value showed a high number of vertebrae, viz. 71.1, which is no less than 2.6 vertebrae more than found in the same form in the inner part of the Baltic.

BRUUN recently examined samples of *Ammodytes* from the Faroes and Iceland¹. He found that the number of vertebrae falls distinctly into two groups, one with 60—66 vertebrae and another with 68—73; the average numbers are 64.5 (22 Faroese specimens) and 62.6 (52 Icelandic specimens) for the lower group and 69.7 (129 Faroese specimens) and 71.5 (97 Icelandic specimens) for the higher group (cf. his tables 2—3). The number of dorsal fin rays falls in two distinct groups, while the anal fin rays show a very slight, and the pectoral fin rays a somewhat larger overlapping. The group with the lower number of vertebrae is identified with *A. lancea*, and the group with the higher number of vertebrae with *A. marinus*. But BRUUN finds, like KÄNDLER, that the Icelandic population of *A. marinus* has a considerably higher number of vertebrae than any known elsewhere, while on the other hand the Icelandic population of *A. lancea* has a somewhat lower number of vertebrae than any hitherto examined. The Icelandic specimens therefore seem to form two races somewhat different from the European races of *lancea* and *marinus*, as BRUUN writes.

On the basis of BRUUN's statements in his tables 2—9

in large numbers, and in Skåne near the town Cimbrishamn). By "ichthyologus" LINNÉ presumably means PETER ARTEDI who found a smaller number of fin rays in his *Ammodytes* (cf. p. 5).

¹ ANTON FR. BRUUN: Observations on North Atlantic Fishes. 2. The *Ammodytes lancea* group. Vidensk. Medd. fra Dansk naturhist. Foren., Bd. 104, 1941, p. 329.

Table 1. *A. lancea* and *A. marinus* from the Faroes.

Number of vertebrae incl. urostyle	Percentages of specimens examined		Number of Dorsal Fin Rays	Percentages of specimens examined		Number of Anal Fin Rays	Percentages of specimens examined		Number of Pectoral Fin Rays	Percentages of specimens examined	
	<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>		<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>		<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>		<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>
72	..	0,8	61	..	7,1	32	..	66,7	15	..	21,4
71	..	20,2	60	..	50,0	31	..	25,9	14	..	71,4
70	..	36,4	59	..	21,4	30	5	7,4	13	..	7,1
69	..	31,0	58	..	21,4	29	12	22,7	..
68	..	11,6	57	4,5	..	28	45	..	11	4,5	..
67	56	18,2	..	27	10
66	13,6	..	55	31,8
65	36,4	..	54	31,8
64	31,8	..	53	13,6
63	18,3
Number of specimens	22	129	..	22	28	..	20	27	..	22	28
Mean ..	64,5	69,7	..	54,7	59,4	..	28,4	31,6	..	12,2	14,2

Table 2. *A. lancea* and *A. marinus* from Iceland.

Number of vertebrae incl. urostyle	Percentages of specimens examined		Number of Dorsal Fin Rays	Percentages of specimens examined		Number of Anal Fin Rays	Percentages of specimens examined		Number of Pectoral Fin Rays	Percentages of specimens examined	
	<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>		<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>		<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>		<i>A. lancea</i>	<i>A. marinus</i>
73	..	18,6	63	..	6,5	34	..	3,2	15	..	3,7
72	..	37,1	62	..	35,5	33	..	19,4	14	..	44,4
71	..	28,9	61	..	25,8	32	..	38,7	13	..	30
70	..	11,3	60	..	19,4	31	..	38,7	12	..	51,9
69	..	2,1	59	..	12,9	30	11
68	..	2,1	58	29	10
67	57	28	..	35
66	56	27	..	40
65	..	1,9	55	26	..	25
64	..	13,5	54
63	..	36,5	53
62	..	36,5	52
61	..	9,6	51
60	..	1,9
Number of specimens	52	97	..	20	31	..	20	31	..	20	27
Mean...	62,6	71,5	..	52,9	61,0	..	27,1	31,9	..	12,2	13,5

the surveys p. 11 and p. 12 have been prepared showing the number of vertebrae and fin rays and their percentage distribution in *A. lancea* and *A. marinus* from the Faroes (table 1) and Iceland (table 2).

At Iceland *A. lancea* seems to spawn in spring, *A. marinus* in winter, which would be in good agreement with the experience of RAITT and KÄNDLER from European waters.

Ammodytes lancea and *A. marinus* from Danish waters.

After this survey of how our knowledge of the relation between *A. lancea* and *A. marinus* has developed I give an account of an investigation which I made on 83 specimens which belong partly to the Zoological Museum of

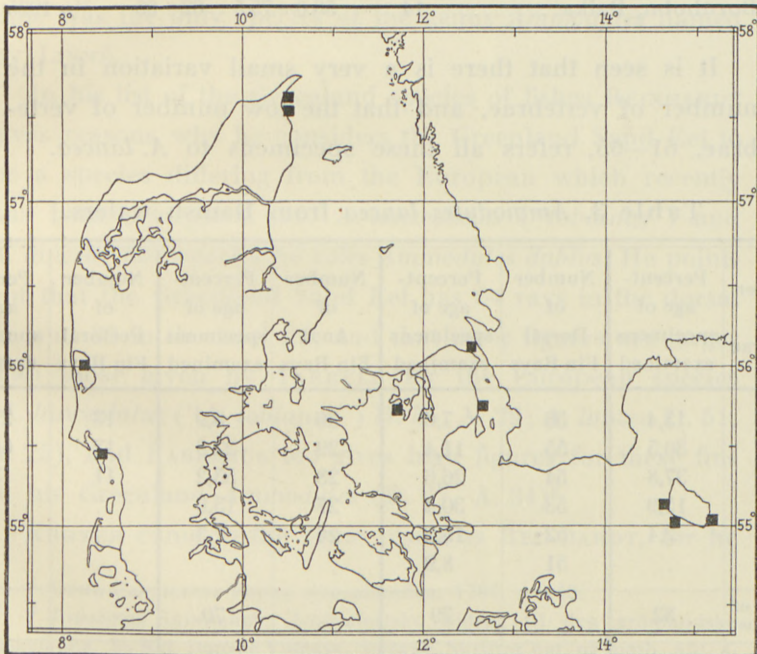


Fig. 1. ■ *A. lancea* taken in Danish waters.

Copenhagen, partly to the Danish Biological Station and lent to me by its director Dr. H. BLEGVAD. The specimens were taken in Danish waters from fiords and coasts in shallow water. The localities are seen in fig. 1.

The localities are as follows:

Locality	Number of specimens	Length in millimetres	Number of vertebrae	Date
Between Esbjerg and Fanø Off Halby, Ringkøbing	6	112—189	62—65	2 ⁻⁷ / ₉ 1935
Fjord, 1—2 metres	1	142	63	2 ¹ / ₇ 1920
Aalbæk beach	2	167.5—169	63—64	8 [/] ₁₀ 1904
Aalbæk Bay, 1—3 metres .	4	135.5—156	63—65	7 [/] ₁₁ 1905
Hellebæk	21	32.0—81.5	62—65	1898
Hellerup yacht harbour ..	18	57.0—81	61—65	3 [/] ₉ 1940
Holbæk Fjord	10	53.5—61.5	62—65	
Bornholm, Hvide Odde ..	1	95	63	28 [/] ₇ 1938
Bornholm, Arnager	6	92—107.5	62—64	28 [/] ₇ 1938
Bornholm, Balka	14	58.0—75.5	62—65	24 [/] ₆ 1935

It is seen that there is a very small variation in the number of vertebrae, and that the low number of vertebrae, 61—65, refers all these specimens to *A. lancea*.

Table 3. *Ammodytes lancea* from Danish waters.

Number of Vertebrae	Percentage of specimens examined	Number of Dorsal Fin Rays	Percentage of specimens examined	Number of Anal Fin Rays	Percentage of specimens examined	Number of Pectoral Fin Rays	Percentage of specimens examined
65	13,4	56	7,6	30	8,9	13	27,8
64	30,5	55	11,4	29	22,8	12	68,4
63	37,8	54	26,6	28	53,2	11	3,8
62	15,9	53	30,4	27	13,9
61	2,4	52	15,2	26	1,3
..	..	51	8,9
Number of specimens	82	..	79	..	79	..	79
Mean . . .	63,37	..	53,39	..	28,24	..	12,24

Table 3 further shows the percentage distribution of vertebrae within the range of variation and the number of fin rays and their percentage distribution.

The only aberration in the collection examined by me from Danish waters is due to a specimen collected on 8th May 1926 in the Little Belt south of Halk Hoved; it has the following figures:

Vert. 69, D. 59, A. 32, P. 14 and thus proves to be *A. marinus*.

On the Greenland *Ammodytes*.

OTTO FABRICIUS, in his famous work on the fauna of Greenland, has already mentioned that the Sand Eel is found in Greenland waters; he calls it *A. Tobianus*¹ which at that time was the only species of the genus *Ammodytes* named by LINNÉ.

In his list of the Greenland species of fishes REINHARDT gives reasons why he considers the Greenland Sand Eel to be a species differing from the European which recently has been segregated into *A. lanceolatus* ("tobianus") and *A. lancea*; this species he calls *Ammodytes dubius*. He points out that the Greenland Sand Eel has 64 rays in the dorsal fin and 33 in the anal fin, and that these figures are larger than those given by YARRELL for the European species (*A. lanceolatus* ("A. tobianus") D. 55, A. 29; *A. lancea* D. 51, A. 25), and FABRICIUS too gives high figures for these fins in his Greenland *Ammodytes* (D. 67, A. 34)².

KRØYER came to the same result as REINHARDT, for he

¹ OTTO FABRICIUS: Fauna Groenlandica, 1780, p. 140.

² JOHANNES REINHARDT: Ichtyologiske Bidrag til den grønlandske Fiskefauna. D. Kgl. Danske Vidensk. Selskab, Skrifter nat. og math. Afd. 4. VII, 1838, p. 131, No. 54.

wrote¹: "The species common in Greenland I consider absolutely distinct from both our species" (*A. lanceolatus* ("A. tobianus") and *A. lancea*).

VANHÖFFEN also² records the Greenland Sand Eel as a distinct species: *Ammodytes dubius* Reinhardt, since he found 66 rays in the dorsal and 35 rays in the anal fin in a specimen which he got near Umanak, while the *A. lancea* ("A. tobianus") occurring on the German coasts has 51—59 rays in D. and 27—30 in A.

LILLJEBORG, too, has taken up the problem³. After having compared a Greenland specimen given him by KRØYER with one equally large from northern Norway LILLJEBORG decides that *A. dubius* specifically agrees with *A. lancea*. He mentions a number of characters in which they agree adding, that the Greenland specimen has no more rays in the dorsal and anal fins, viz. 59 in the former and 31 in the latter, as the Norwegian specimen has 61 in the former and 32 in the latter. As will be seen later (p. 21) these figures for the rays in the dorsal and anal fins show that neither this Greenland specimen nor the Norwegian specimen belong to *lancea*, nor to *dubius* either.

In the paper of 1935 mentioned above, DUNCKER and MOHR (p. 218—19, No. 621) state that the Hamburg Museum possesses a specimen from Greenland, which was presented by Jap. Steenstrup in 1856 as *A. dubius* Reinh.; but they point out that since D. is 62 and A. 32 it differs from the description of *A. dubius* which has a larger number of rays in these fins (D. 64—67, A. 33—36). DUNCKER and MOHR, therefore, refer this specimen to *A. marinus*.

¹ HENRIK KRØYER: Danmarks Fiske, III, 1846—53, p. 590. Note *.

² DRYGALSKI: Grönland-Expedition der Gesellschaft für Erdkunde zu Berlin 1891—93, 2. Bd., I. Teil, 1897. E. Vanhöffen: Die Fische, p. 113.

³ W. LILLJEBORG: Sveriges och Norges Fiskar, II, 1891, p. 222, note.

More recently still DUNCKER and MOHR have, by means of material not only of the Hamburg Museum but also from the museums of Berlin and London, extended their studies on *Ammodytes* to comprise all the described genera and species belonging to the family *Ammodytidae*¹. As regards the species which are of interest in this connection, these authors unite *A. marinus* with *A. dubius* into one species (p. 17), which, with certain alterations of the specific characters, is now called *Ammodytes dubius* Reinhardt and thus gets a wide-spread geographical distribution.

In the paper of 1941 mentioned above BRUUN examined some Greenland *Ammodytes* (p. 335—36). He finds that they can be divided into two well limited groups according to their vertebral numbers, one with an average number 69.9 vertebrae (12 specimens, variation 68—71 vertebrae) and another with 75.2 vertebrae (21 specimens, variation 73—78 vertebrae). The group with the low number of vertebrae he identifies with *A. marinus*, that with the higher vertebral number may be *A. dubius*, as he cannot agree with DUNCKER and MOHR who consider *A. marinus* as synonymous with *A. dubius*.

After this survey I shall give the result of an investigation made by me on the Greenland collection of the genus *Ammodytes*. There are from West Greenland more than two hundred specimens from 19 different localities distributed between $60\frac{1}{2}^{\circ}$ and $72\frac{1}{2}^{\circ}$ N². Most of them are from fiords or near the coast; some from banks in Davis Strait (Fyllas Banke, Store Hellefiskebanke). A number of the specimens were extracted from cod stomachs.

¹ GEORG DUNCKER und ERNA MOHR: Revision der Ammodytidae. Mitteil. aus dem Zoolog. Museum in Berlin, 24. Bd., 1939, p. 8—31.

² *Ammodytes* is not known from the east coast of Greenland.

In the first place it can be laid down that in all the Greenland specimens teeth are absent from the vomer, and the upper jaw, or more correctly the intermaxillary, can be pushed a very considerable way forwards and downwards when the gape is widely opened. All the specimens agree in these fundamental characters with *A. lancea* and *A. marinus*. *A. lanceolatus* (subgen.: *Hyperoplus* Günther) does not occur in Greenland waters.

The vertebrae were then counted in 217 specimens. The specimens fall in two distinct groups which in my opinion correspond to RAITT's *A. marinus* and REINHARDT's *A. dubius*. In the group *A. marinus*, which comprises 38 individuals, the vertebral number lies between 67 and 72, in the group *A. dubius* which contains 179 specimens between 73 and 78. The percentage distribution appears from table 4. The mean figure in *A. marinus* is 69.39, in *A. dubius* 75.10.

Also as regards the number of fin rays the specimens fall into two groups although not so well defined. In *A. marinus* (39 specimens) the number of rays in the dorsal fin amounts to 55—62, in *A. dubius* (83 specimens) to 60—68, in the anal fin in *A. marinus* (37 specimens) 28—32, in *A. dubius* (99 specimens) 30—36, in the pectoral fin in *A. marinus* (37 specimens) 13—15, in *A. dubius* (98 specimens) 13—16. The mean figures are rather different, specially for the dorsal and anal fins:

	D.	A.	P.
<i>A. marinus</i>	59,05	30,27	13,84
<i>A. dubius</i>	64,71	33,16	14,24

If the values for vertebrae and fin rays in the Greenland *A. marinus* are compared with the figures which RAITT

Table 4. *A. marinus* and *A. dubius* from Greenland.

Number of vertebrae incl. urostyle	Percentages of specimens examined		Number of Dorsal Fin Rays	Percentages of specimens examined		Number of Anal Fin Rays	Percentages of specimens examined		Number of Pectoral Fin Rays	Percentages of specimens examined	
	<i>A. marinus</i>	<i>A. dubius</i>		<i>A. marinus</i>	<i>A. dubius</i>		<i>A. marinus</i>	<i>A. dubius</i>		<i>A. marinus</i>	<i>A. dubius</i>
78	..	1,1	68	..	2,4	36	..	1,0	16	..	3,1
77	..	8,4	67	..	6,0	35	..	9,1	15	13,5	27,6
76	..	27,4	66	..	20,5	34	..	28,3	14	56,8	60,2
75	..	32,4	65	..	25,3	33	..	37,4	13	29,7	9,2
74	..	24,0	64	..	31,3	32	13,5	16,2
73	..	6,7	63	..	9,6	31	35,1	7,1
72	2,6	..	62	2,6	2,4	30	27,0	1,0
71	18,4	..	61	10,3	1,2	29	13,5
70	21,1	..	60	30,8	1,2	28	10,8
69	39,5	..	59	23,1
68	10,5	..	58	20,5
67	7,9	..	57	7,7
..	56	2,6
..	55	2,6
Number of specimens	38	179	..	39	83	..	37	99	..	37	98
Mean...	69,39	75,10	..	59,05	64,71	..	30,27	33,0	..	13,84	14,24

found for the North-European *A. marinus*, it is seen that they agree closely:

<i>Ammodytes marinus</i>	Number of Vertebrae	Mean Number of Vertebrae	Number of Dorsal Fin Rays	Mean Number of Dorsal Fin Rays	Number of Anal Fin Rays	Mean Number of Anal Fin Rays	Number of Pectoral Fin Rays	Mean Number of Pectoral Fin Rays
Northern Europe.	67—72	69,21	56—62	59,07	28—33	30,61	12—15	13,72
Greenland	67—72	69,38	55—62	58,92	28—32	30,2	13—15	13,8

That the form which I have so far called *A. dubius* is actually identical with REINHARDT'S *A. dubius* I conclude from the following:

REINHARDT points out that the Greenland Sand Eel has more rays in the dorsal and anal fins than the European species, the specimen more closely examined by him having 64 and 33 respectively; these figures fall within the values which I found above for the specimens which I called *A. dubius*, and are larger than those found in the Greenland *A. marinus*. The number of rays in D. is even so high that it is not reached by any European *Ammodytes*. Besides I think that I have found the specimen in which REINHARDT counted the fin rays; in the Zoological Museum is kept a specimen from Greenland (Catal. No. 82) from REINHARDT'S time which has just the number of rays in D. and A. mentioned by REINHARDT; it is also of the same length as that stated by REINHARDT for his specimen, viz. 8 inches and 1 line Danish measurement (= 211 mm) and no other specimen kept in the Museum from REINHARDT'S time reaches this length. I think I am right in regarding this specimen as identical with that mentioned by REINHARDT so that it should be considered to be his original

specimen. A Roentgen photo of this specimen, which has kindly been taken for me in the laboratory of Prof. C. M. STEENBERG, shows that it has 73 vertebrae which number falls within the limits of the specimens from Greenland here considered to be *A. dubius*. Also the Greenland specimens mentioned by FABRICIUS and VANHÖFFEN belong, on account of the high number of rays in D. (67 and 66) and in A. (34 and 35), to *A. dubius*, whereas the Greenland specimen recorded by LILLJEBORG (l. c.) is *A. marinus* (and also his specimen from northernmost Norway).

On p. 22 I give a list of the specimens of *Ammodytes* examined from Greenland with statement of locality (arranged from south to north), number of specimens, their total length, vertebral number, year of capture and date of capture, if such data exist.

As regards the distribution it will be seen from this list that *A. marinus* occurs from 7 localities, of which Lichtenau in the southern district of Julianehaab is the most southern (about 60°30' N.) and Prøven in the district of Upernavik the most northern (about 72°20' N.)—Sand Eels are not known farther north. *A. dubius*, on the other hand, occurs from 13 localities, and thus is the most common; its southern limit known is also in the southern district of Julianehaab at Sydprøven (about 60°25' N.) which, like Lichtenau lies in Agdluitsokfjord; it is not known farther north than Umanak district (about 70°40' N.). It can further be noted, as seen from the lists, that while *A. marinus* hitherto has been taken in fiords and near the coasts only, *A. dubius*, besides on the coast, was found several times in Davis Strait. However, it must be stated that the present collection is not sufficient to determine the distribution in detail.

Ammodytes marinus Raitt

Locality	Number of specimens	Length in mm	Number of vertebrae	Year and date of capture
Lichtenau Fjord	1	140	72	1906
Tunugdliarfik Fjord at Itivdlerssuak	13	72—92	69—71	1932 (⁸ / ₆)
Kapisigdlit Fjord, 3—0 m	1	114	70	1925 (¹⁵ / ₆)
Kapisigdlit Fjord, eel seine	1	114	70	1926 (²⁸ / ₆)
Sukkertoppen	2	117—164	69	1905
Sukkertoppen	3	94—106	70—71	1906
Godhavn	8	107—146	67—71	1902
Godhavn	3	108—134	67—69	1908 (July and August)
Godhavn	1	160	69	1911
Jakobshavn	1	165	69	1892
Jakobshavn	2	135—153	68—69	1899
Harbour of Prøven	3	94—135	69—71	1936 (¹⁷ / ₇)

Ammodytes dubius Reinhardt.

Locality	Number of specimens	Length in mm	Number of vertebrae	Year and date of capture
Sydprøven	2	67—72	73—75	1916
Fiskenæsset, from stomach of cod ..	1	221	74	1915 (³ / ₆)
Fyllas Banke, from stomach of cod ..	2	173—205	73—75	1924 (²⁴ / ₆)
Fyllas Banke, from stomach of cod ..	2	199—237	74—75	1925 (²¹ / ₇)
Sukkertoppen	1	124	76	1885
Sukkertoppen	1	235	76	1905
Sukkertoppen	1	212	74	1909
Sukkertoppen	17	94—115	73—78	1924 (¹² / ₈)
Sukkertoppen, from stomach of cod ..	9	62—239	74—76	1924 (^{25—30} / ₈)
Kangamiut, from stomach of cod ...	5	63—71	73—76	1934 (²⁴ / ₉)
Holsteinsborg	1	226	76	1899
Store Hellefiskebanke, 21 ftms.	1	93	76	1912 (¹⁰ / ₇)
Store Hellefiskebanke, 85—100 m W	3	62—70	75—76	1925 (²³ / ₆)
Store Hellefiskebanke, 100 m W	2	89—91	73—76	1925 (²⁵ / ₆)
68°05' N., 54°37' W. 80 m W	16	45—74	73—78	1924 (¹⁸ / ₉)
Egedesminde	16	53—74	73—77	1895
Egedesminde, from stomach of cod ..	14	47—64	74—77	1936 (²⁰ / ₉)
Egedesminde, from stomach of cod ..	8	56—114	74—77	1936 (²⁸ / ₉)
Manitsok, from stomach of cod	19	55—102	74—76	1936 (²⁹ / ₉)
Manitsok, from stomach of cod	5	92—113	74—75	1936 (³⁰ / ₉)
Ikamiut	50	43—57	73—76	1905
Christianshaab	4	42—50	74—77	1901
Umanak	1	56	76	1879

It appears that *A. dubius* is most abundant, since 179 specimens have been available for counting the vertebrae, against only 38 specimens of *A. marinus*.

Finally, it can be noted, that *A. dubius* seems to attain a more considerable size than *A. marinus*; according to the lists there are among *A. dubius* from different localities specimens of 226, 237 and 239 mm against only 160, 164 and 165 mm among *A. marinus*.

For the reader's information a chart sketch is given of the distribution of *A. marinus* and *A. dubius* (fig. 2).

Among the characters by which *A. dubius* (*A. marinus* included) differs from *A. lancea*, DUNCKER and MOHR (l. c. 1939, p. 117) state that *A. dubius*, besides the two ventrolateral cutaneous folds, has a lower ridge in the middle of the belly, while such a median fold is absent in *A. lancea*. I have examined a large number of specimens of *A. marinus* and *A. dubius* from Greenland to clear up this point and found the following: the belly between the two ventrolateral folds is divided by two longitudinal grooves into a median part and two lateral portions. In the median part which runs from the isthmus to the anus a light (white or yellow) streak is seen along the midline. In several Greenland specimens this skin fold rises to a conspicuous ridge, and it must be such specimens which DUNCKER and MOHR had before them. But in other specimens which I have examined, it is only anteriorly and posteriorly, or only anteriorly or in the middle, but not on the rest of the stretch, that the median skin fold rises to a ridge; finally, there are many specimens on which the streak dwindles, becomes thin, thread-like or fine as a hair; in addition it is often sunk into a furrow in the median line of the belly and hardly visible or, at any rate, only by means of a

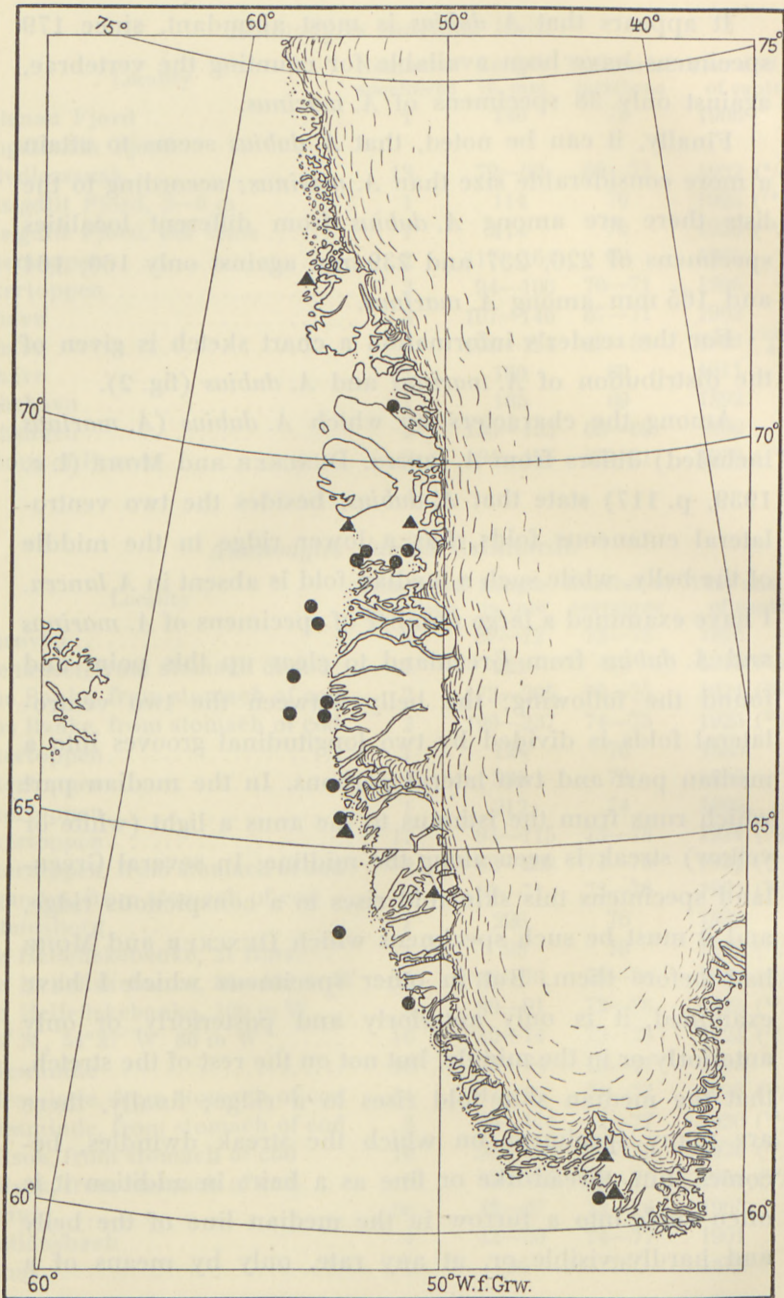


Fig. 2. Chart sketch of West Greenland showing localities where *A. marinus* (▲) and *A. dubius* (●) have been taken.

lens. I doubt therefore whether so variable a feature can be of any systematic value. As regards *Ammodytes lancea*, Danish specimens have, in the area between the two furrows, a corresponding, whitish or yellowish line; as a rule it is not very distinct, but may sometimes be slightly projecting. In *Ammodytes lanceolatus* a similar line is found.

Nor could BRUUN distinguish between *A. lancea* and *A. marinus* by aid of the character used by DUNCKER and MOHR, i. e. the absence or presence of a median fold; this fold was noticed in both species but at the same time specimens devoid of it were also found in both species.

As regards this feature I note that the middle area itself in which the ridge is found may be elevated, forming a longitudinal fold on either side of the median ridge, but in many cases the middle area is flat, sometimes even lowered.

Among the Greenland specimens of *Ammodytes* there is one measuring 144 mm sent down in 1911 by Mr. M. PORSILD, the leader of the Danish arctic station in Godhavn. It has a number of vertebrae and fin rays different from all other Greenland specimens, viz. vert. 65, D. 56, A. 29, P. 13, and thus is referable to *A. lancea*. It is hardly accidental that *A. lancea* occurs, though evidently rarely, just at Godhavn, since among the 13 specimens examined from this place there is no *A. dubius*, but only 12 *A. marinus* and the 13th specimen which is that mentioned above with still lower numbers of vertebrae and fin rays. All the 12 specimens have low figures for *A. marinus*; no other locality in Greenland shows such low figures for this species, having Vert. 67 (3 specimens) and D. 55 (1 specimen), 56 (1 specimen) and 57 (2 specimens).

Concluding remarks:

Do *Ammodytes lancea*, *A. marinus* and *A. dubius* represent separate species, or are they only subspecies of one single species?

Hitherto I have examined the present collection on the assumption that it represents three species: *A. lancea*, *A. marinus* and *A. dubius*¹. We will now enquire whether this supposition is justifiable.

In the first place we give in table 5 a survey of the

Table 5.

	Number of Verte- brae	Number of Dorsal Fin Rays	Number of Anal Fin Rays	Number of Pectoral Fin Rays
<i>A. lancea</i>				
Denmark (Jensen)	61—65	51—56	26—30	11—13
The Baltic (Kändler) . . .	61—65
Scotland (Raitt)	60—66	51—56	26—31	11—13
The Faroes (Bruun)	63—66	53—57	27—30	11—13
Iceland (Bruun)	60—65	51—54	26—28	11—13
Variation	60—66	51—57	26—31	11—13
<i>A. marinus</i>				
The Baltic (Kändler)	66—72
Scotland-Faroes (Raitt) . .	67—72	56—62	28—33	12—15
The Faroes (Bruun)	68—72	58—61	30—32	13—15
Iceland (Bruun)	68—73	59—63	31—34	13—15
Greenland (Jensen)	67—72	55—62	28—32	13—15
Variation	66—73	55—63	28—34	12—15
<i>A. dubius</i>				
Greenland (Jensen)	73—78	60—68	30—36	13—16
Variation	73—78	60—68	30—36	13—16

¹ As mentioned, DUNCKER und MOHR however united *marinus* and *dubius* into one species.

different authors' statements of numbers of vertebrae and fin rays, found by analysis of hundreds of specimens.

If we regard the number of vertebrae and fin rays we find that there is no sharp limit between the three species,

Table 6.

	Mean Number of Vertebrae
<i>A. lancea</i>	
Denmark (Jensen)	63,37
The Baltic (Kändler)	63,1
Cuxhaven (Kändler)	63,1
Helgoland (Kändler)	64,1
Scotland (Raitt)	63,4
The Faroes (Bruun)	64,5
Iceland (Bruun)	62,6
	62,6—64,5
<i>A. marinus</i>	
The Baltic (Kändler)	68,5
Helgoland (Kändler)	69,9
Scotland-Faroes (Raitt)	69,2
The Faroes (Bruun)	69,7
Iceland (Kändler)	71,1
Iceland (Bruun)	71,5
Greenland (Jensen)	69,4
	68,5—71,5
<i>A. dubius</i>	
Greenland (Jensen)	75,1
	75,1

since the figures overlap, least for the vertebrae, more for the unpaired fins; intermediate individuals are found.

If, on the other hand, we regard the average figures for vertebrae (table 6) they are seen to be well separated. The mean figures for fin rays stated by the various authors

are also different from one species to the other as will be seen from table 7.

Thus it is evident that by calculating the mean figures for a large number of specimens, both as regards vertebrae and fin rays, limits can be fixed for the three species. And

Table 7.

	Mean Number of Dorsal Fin Rays	Mean Number of Anal Fin Rays	Mean Number of Pectoral Fin Rays
<i>A. lancea</i>			
Denmark (Jensen).....	53,39	28,24	12,24
Scotland (Raitt).....	53,40	27,96	12,05
The Faroes (Bruun)....	54,7	28,4	12,2
Iceland (Bruun).....	52,9	27,1	12,2
	52,9—54,7	27,1—28,4	12,05—12,24
<i>A. marinus</i>			
Scotland-Faroes (Raitt)..	59,07	30,61	13,72
The Faroes (Bruun)....	59,4	31,6	14,2
Iceland (Bruun).....	61,0	31,9	13,5
Greenland (Jensen).....	59,05	30,27	13,84
	59,05—61,0	30,27—31,9	13,5—14,2
<i>A. dubius</i>			
Greenland (Jensen).....	64,71	33,16	14,24
	64,71	33,16	14,24

it is on this basis that *A. marinus* was recently segregated from *A. lancea* (see p. 7).

In my opinion, however, too much stress has been put on the importance of the average figures, seen from a species point of view. If we regard e. g. the Greenland *A. marinus* (table 4) the most frequent variant for the number of vertebrae is 69, while that for *A. dubius* is 75, consequently, the average figures for the vertebrae of the two species must be widely separated, while the plus

deviators in *A. marinus* and minus deviators in *A. dubius* meet, being in one case 72 and in the other 73 vertebrae. Similar conditions are found in *A. lancea* and *A. marinus*; it is seen from RAITT'S table p. 367 that the most frequent variant for the vertebral number is 64 and 69 respectively, while the plus and minus deviators lie so near each other as 66 and 67. But an establishment of species in a Linnean sense merely on differences in average numerical values of such organs as vertebrae and fin rays is in my opinion not well founded, and can only rarely be carried through in practice, the presumption being that a very large number of specimens is available to allow the count of vertebrae which is the most important criterion. Nor is it possible to show other distinguishing marks; the numerical characters are not accompanied by other differences in the other structures of the body, which show good agreement in all the specimens. In museums the designation *A. lancea* s. lat. might probably as a rule only be used.

On the other hand, the variation in the organs which have been considered cannot be regarded as accidental; there is generally a correlation between the various characters: to a low number of vertebrae in *A. lancea* corresponds a low number of fin rays, and with the increasing number of vertebrae in *A. marinus* and still more in *A. dubius* the number of fin rays is increased correspondingly. I am therefore of the opinion that the three divisions should be retained, not as species but only as subspecies of the species *Ammodytes lancea* Cuvier, and they should be called *A. lancea lancea* Cuvier, *A. lancea marinus* Raitt and *A. lancea dubius* Reinhardt.

If one asks what the reason or reasons may be why subspecies have arisen in *Ammodytes lancea*, an inves-

tigation of the external conditions under which the respective subspecies live seems to give some hints:

It is mentioned above that *Ammodytes lancea* has been taken in large numbers in Danish fiords and near the coasts in shallow water, while only a single specimen of *A. marinus* was taken off the coast (Little Belt). According to KÄNDLER *A. lancea* is a coastal form in the western and intermediate Baltic, while *A. marinus* occurs at some distance from the coast in deeper water. According to the same author *A. marinus* is found in the North Sea at 20 to 40 metres depth, while *A. lancea* lives in the coastal waters. According to RAITT *A. lancea* near Scotland occurs in the coastal waters only, while *A. marinus* is also met with offshore, from Scotland to St. Kilda, Shetland and the Faroes. On the basis of BRUUN's records (l. c. p. 330—31) I find that as well at the Faroes as at Iceland *A. lancea* occurs in shallow water, *A. marinus* mainly in deeper waters, as is seen from the list below:

	Depth metres	Specimens <i>A. lancea</i>	Specimens <i>A. marinus</i>
The Faroes	6—0	22	8
The Faroes	58—100	0	121
Iceland.....	0—5	52	2
Iceland.....	34—54	0	89

As regards the vertical distribution there is thus on the whole a distinct difference between *A. lancea* and *A. marinus*, the former being found in fiords and near the coasts in shallow water, while the latter occurs away from the coast in deeper water.

Moreover, these subspecies have a different spawning season: RAITT says that *A. marinus* spawns in early spring, while *A. lancea* ripens in summer. According to KÄNDLER

the spawning period occurs in winter for *A. marinus*, for *A. lancea* in spring and summer. According to BRUUN *A. marinus* at Iceland seems to spawn in winter, *A. lancea* in spring.

Finally, *A. dubius* is a pronounced arctic subspecies, since it occurs at Greenland, being the predominant form there. Characteristic is the high number of vertebrae and fin rays, a feature which is not unique as among some other species of fishes there may be forms in which correlation has been found between a low temperature and high number of vertebrae and fin rays.

Within the subspecies there may be a tendency to a further segregation into systematic subdivisions, races. KÄNDLER found in *A. lancea* the following peculiar feature: At Cuxhaven, which is situated near the mouth of the Elbe, it spawns in spring, while 58 km northwest hereof, at Helgoland, it spawns in late summer, and these two populations differ from each other by a distinct difference in the number of vertebrae and fin rays (cf. p. 9). Moreover, according to BRUUN, *A. marinus* of Iceland has a higher number of vertebrae and fin rays than in Europe, a feature which he is no doubt justified in connecting with the colder conditions; it may presumably be said that the Icelandic *A. marinus* in some degree forms a transition to the Greenland *A. dubius*, though it is more closely related to *marinus* than to *dubius* (this is found by studying BRUUN's fig. 3 and my fig. 3 which was made on the same principle, with addition of the Danish population and a more numerous representation of the Greenland population).

The general impression is, in my opinion, that the different conditions under which the species *Ammodytes lancea* lives, e. g. depth, temperature and salinity of the

water, spawning time, contribute towards the formation of subspecies and races, which in this respect can be considered as ecologically conditioned.

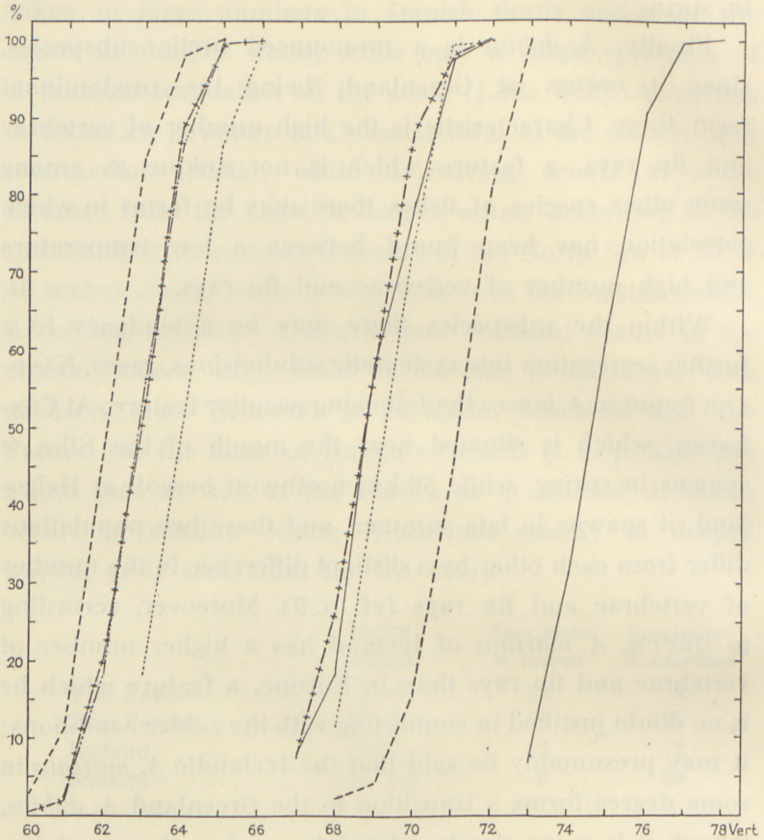


Fig 3.

Fig. 3 gives the number of vertebrae in *A. lancea* (to the left), *marinus* (in the middle), and *dubius* (to the right) for the different areas in summation curves: - · - · - Denmark, - + - + - Scotland and the Faroes, · · · · · the Faroes, - - - - Iceland, — Greenland. These curves show the difference between the individual groups better than

ordinary distribution curves. The calculation of the summation curve is made as follows: For *A. lancea* from Denmark we have e. g. the following distribution according to number of vertebrae:

	Number of vertebrae	61	62	63	64	65
Frequency	{ Percentage	2,4	15,9	37,8	30,5	13,4
	{ Summations	2,4	18,3	56,1	86,6	100

The summation curve is formed by adding to each percentage the preceding summation, as indicated in the example above; each figure thus indicates the percentage of individuals which has the particular number of vertebrae plus those below that figure. The highest figure thus will always be 100.

MR. PAUL HANSEN, M. Sc. has assisted me in the calculations, and Miss ESTHER HANSEN has counted the vertebrae and fin rays on alizarine stained specimens. I thank them both for their valuable assistance.

