

Über die circadiane Variation der Stoffwechselgröße des isolierten Gewebes

Circadian Rhythm of Metabolic Rate in Isolated Tissue

H. J. Schmidt

Physiologisches Institut I der Universität Bonn (Direktor Prof. Dr. J. Pichotka)

Z. Naturforsch. 33 c, 955–961 (1978) ; eingegangen am 3. April/22. August, 1978

O₂-Uptake of the Isolated Mouse Diaphragm, Circadian Rhythm, Relation between Organ Size and Metabolic Intensity

The circadian variation of oxygen uptake of isolated mouse diaphragm has been measured by means of the direct Warburg-technique in two series with sets of each 8 successive experiments. Under our experimental conditions oxygen uptake in the isolated diaphragm remains constant for 5 hours at least. The 24-hour period could therefore be completed with 8 single measurements of each 10–20 isolated diaphragms started at 3 h intervals with a overlap in experimental time of 2 h hours between each single experiment. Similar to the results concerning the spontaneous locomotive activity of the mouse (ASCHOFF 1955) we found maximum values of metabolic rate during the night, minimum values during day time and a interpolated relative maximum of oxygen uptake between 6⁰⁰–8⁰⁰ h. Oxygen uptake after the stabilisation period of approximately 1 h seems to be determined by the time of the death of the animal.

Einleitung

Seit den Arbeiten von Bornstein [1] und Völker [2] 1926/27 haben sich viele Autoren mit der tagesperiodischen Variation der verschiedenen metabolischen Parameter bei Wirbeltieren und bei Menschen befaßt. (Zusammenfassende Darstellungen bei Kalmus [3], Jores [4], Aschoff [5–7] und Sollberger [8].) Daß die verschiedenen Leistungen der Gewebsperipherie einer endogenen Tagesrhythmus unterliegen, ist durch punktuelle und summative Messungen des O₂-Verbrauches von Leber und Skelettmuskel bei der Ratte [9–11] sowie des Leucineinbaues am Mäusezwerchfell [12] wahrscheinlich geworden.

In unseren Untersuchungen traten zeitabhängige Unterschiede der Stoffwechselgröße zunächst als Störungen auf. Wir hatten uns mit den Bedingungen befaßt, die für die Konstanz und Reproduzierbarkeit der Stoffwechselgröße isolierter Gewebe im Warburg-Versuch maßgeblich sind. Dabei stellte sich heraus, daß Größe und Reproduzierbarkeit der O₂-Aufnahme zunächst abhängen von experimentellen Bedingungen im engeren Sinne – nämlich von der Art des Mediums, von der Größe und Konstanz der Sauerstoffspannung und der Tempe-

ratur sowie von der Schüttelgeschwindigkeit [13–22].

Dazu kommen Bedingungen von Seiten des Versuchstieres bzw. des Gewebes, Alter und Körpergewicht des Tieres, Organgewicht und Präparation des Gewebes [23, 24]. Die angemessene Kontrolle aller dieser Bedingungen führt zu einer außerordentlichen Reproduzierbarkeit und Konstanz der Sauerstoffaufnahme isolierter Gewebe für die Dauer von mehreren Stunden. In diesen Versuchen stellte sich aber auch heraus, daß unter Kontrolle aller dieser Bedingungen die zu verschiedenen Zeiten des Tages gemessenen Werte der Sauerstoffaufnahme signifikant verschieden sein konnten. Bei dem von uns am meisten gebrauchten Gewebe, dem Zwerchfell der Maus, war die O₂-Aufnahme in der üblichen Meßzeit zwischen 9⁰⁰ und 14⁰⁰ Uhr erheblich niedriger als in Messungen um Mitternacht. Da wir aus mehreren Gründen Messungen zu verschiedenen Tageszeiten durchführen mußten, war es notwendig, diese Unterschiede systematisch zu untersuchen.

Methodik

Die Messungen der O₂-Aufnahme wurden an den isolierten Zwerchfellen erwachsener, männlicher Mäuse mit der direkten Warburg-Methode [25] durchgeführt. Die Tiere gehören zu einem Stamm (Agnes Bluhm), der schon vor 20 Jahren von uns übernommen und in Inzucht weitergeführt worden

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. J. Schmidt, Physiologisches Institut I der Universität Bonn, Nußallee 11, D-5300 Bonn 1.

ist. Die Tiere erhielten gekörntes Standardfutter und Wasser mit Ascorbinsäurezusatz ad libitum. Sie hatten einen künstlichen Tag von 15 Stunden ($6^{\text{h}} - 21^{\text{h}}$) Dauer. Die Temperaturkonstanz der Tierräume war für unser Problem von besonderer Bedeutung. Die Temperatur wurde bei hohem Luftdurchsatz durch eine sehr wirksame Regelung auf $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Leistung der Regelanlage wurde durch fortlaufende Registrierung kontrolliert.

Die Tiere wurden durch Nackenschlag betäubt und anschließend dekapitiert. Zur Entblutung wurden sie etwa für 1 Minute an den Schwänzen aufgehängt, danach abgehäutet und auf Korkbretter aufgespannt. Mit dieser Vorbereitung konnte die Öffnung der Bauchhöhle haarfrei und steril durchgeführt werden. In der geöffneten Bauchhöhle wurden die Verbindungen zwischen Leber und Zwerchfell und die Gefäßverbindungen sorgfältig getrennt. Das Zwerchfell wurde an den Ansätzen der Crura an der Wirbelsäule abgetrennt. Danach erfolgte mit einer feinen Schere unter Vergrößerung die weitere Ablösung entlang der Insertionsleiste an der inneren Thoraxwand.

Das unverletzte Zwerchfell wurde in toto für die Messungen verwandt. Nach unseren Erfahrungen beeinflussen Verletzungen und Durchtrennung des Zwerchfells Größe und Stabilität der O_2 -Aufnahme. Das Gewicht der Gewebe wurde auf einer Analysenwaage bestimmt. Die mittlere Dicke der Zwerchfelle erwachsener, männlicher Mäuse hatte sich aus einer früheren Untersuchung mit $0,25 \pm 0,03$ mm ergeben [22]. Nach dem Wägen wurden die Gewebe in das mit Sauerstoff äquilierte Suspensionsmedium gegeben. Auf Grund unserer Erfahrungen wurde für diese Untersuchung ausschließlich Medium II Typ A nach Krebs [26] benutzt. Es hat folgende Zusammensetzung:

Kationen	Anionen
Na^+ : 147,5 mval/l	Cl^- : 103,1 mval/l
K^+ : 5,9 mval/l	H_2PO_4^- : 4,0 mval/l
Ca^{2+} : 0,0 mval/l	HPO_4^{2-} : 22,2 mval/l
Mg^{2+} : 2,4 mval/l	SO_4^{2-} : 2,4 mval/l
Substrate	
Pyruvat: 4,9 mval/l (= 0,16 M)	
Fumarat: 10,8 mval/l (= 0,10 M)	
Glutaminat: 5,0 mval/l (= 0,16 M)	
Glukose: 11,5 mmol/l (= 0,30 M)	

Das Medium wurde jeweils am Tag vor dem Versuch aus Stammlösungen hergestellt. Als Schutz gegen Bakterienwachstum wurde Streptomycin in einer Konzentration von 10^{-5} mg/ml zugesetzt. Durch ausgedehnte Kontrolluntersuchungen war nachgewiesen, daß diese Konzentration ohne Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme bleibt [14]. Nur in Medium II konnten wir bei entsprechenden Versuchsbedingungen eine über mindestens 5 Stunden konstante Sauerstoffaufnahme des isolierten Zwerchfells erreichen.

Als Thermostaten wurden Geräte von Typ S 85 der Firma Braun, Melsungen, benutzt, die eine stufenlose Einstellung von Temperatur und Schüttelfrequenz ermöglichen. Die Temperaturkonstanz dieser Apparate ist besser als $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$ und die mögliche Querdisparation etwa $0,005^{\circ}\text{C}$. Jeder Thermostat ist mit 14 Meßeinheiten ausgerüstet. Zehn Einheiten wurden mit Geweben beschickt, vier dienten als Thermobarometer.

Die Schüttelfrequenz wurde nach der Erfahrung der letzten Jahre auf 40/min, die Amplitude auf 3 cm nach beiden Seiten eingestellt [16, 17, 27]. Die Belüftung mit reinem Sauerstoff für die Dauer von 5 min erfolgt simultan für alle Gefäße durch ein Verteilersystem sofort nach dem Einsetzen der Meßgefäß in die Thermostate. Jedes Reaktionsgefäß wird dabei von ca. 5 l reinem Sauerstoff durchströmt. Der resultierende Sauerstoffdruck der flüssigen Phase beträgt im Mittel 530 ± 27 Torr und ist in den Einzelversuchen außerordentlich stabil. Die Sauerstoffaufnahme wurde durch Ablesen der Druckwerte in 5-minütigem Abstand über eine Gesamtmeßzeit von durchschnittlich 5 Stunden bestimmt. Für jedes einzelne Zwerchfell ergeben sich daraus 60 Meßwerte pro Versuch.

Der zeitliche Abstand zwischen Töten des ersten Versuchstieres und dem eigentlichen Meßbeginn lag bei dem üblichen Versuch mit 20 Meßansätzen und 8 Thermobarometern bei 20 min. Darin enthalten sind Äquilibrierungszeiten von 10 min für Gasdrucke und Temperatur. Die Sauerstoffaufnahme pro Zeit- und Gewichtseinheit (= Stoffwechselintensität) wurde auf Grund der Meßwerte und Gefäßkonstanten mittels eines Computerprogramms an der Großrechenanlage der Universität Bonn berechnet; sie ist angegeben in $\text{ml/kg} \cdot \text{min}$. Eine detaillierte Beschreibung unserer Methodik findet sich in anderen Veröffentlichungen [15, 19, 20]. Auf Grund des experimentellen Verhaltens mußten 8,5% der Einzelmessungen von der Auswertung

ausgeschlossen werden. In etwa 2% der Fälle mußte die Messung abgebrochen werden, weil keine meßbare O_2 -Aufnahme auftrat, obwohl keine technischen Mängel aufzufinden waren. Die verbleibenden 6,5% gehen praktisch ausschließlich zurück auf das Überschlagen von Lauge aus dem zentralen Gefäß in das Suspensionsmedium. Charakteristisch dafür ist ein steiler Abfall der O_2 -Aufnahme nach normalem Beginn. Der Vorgang läßt sich mit der pH-Messung des Suspensionsmediums sicher nachweisen. Aus der allgemeinen Erfahrung wurden alle Messungen ausgeschlossen, in denen der pH-Wert des Mediums am Ende der Versuchszeit 7,6 oder mehr betrug. In einer sehr kleinen Zahl von Messungen war die Undichtigkeit der Armaturen die Ursache des Ausfalls.

Die im folgenden berichteten Ergebnisse stützen sich auf Messungen an 799 Zwerchfellen mit ca. 48 000 Einzelwerten der O_2 -Aufnahme.

Ergebnisse

Die durchgeföhrten Messungen ergaben als erstes, daß bei gleichaltrigen Tieren mit geringen Unterschieden des Körpergewichtes ($26 \pm 2,1$ g S. D.), das Gewicht des Zwerchfells in weiten Grenzen verschieden ist. Bei einem Mittelwert von 85 ± 11 mg (S. D.) lag die Hauptzahl der Werte zwischen 75 und 100 mg; insgesamt erstreckten sie sich aber von 60 bis 120 mg (Abb. 1). In Messungen an Tieren aller Altersklassen hatten wir bei einer ähnlichen Streuung eine enge Beziehung zwischen Zwerchfellgewicht und Stoffwechselintensität beobachtet. Die Stoffwechselintensität fiel mit steigendem

Zwerchfellgewicht; der Zusammenhang war mit einer linearen Regression am besten repräsentiert. Die Korrelation zwischen Zwerchfellgewicht und Stoffwechselintensität war in dieser Untersuchung signifikant besser als die gleichfalls berechneten Korrelationen von Körpergewicht und Alter zur Stoffwechselintensität [24].

Wir überprüften diese Beziehung für gleichalte Tiere (18–20 Wochen) wie sie in dieser Untersuchung verwandt wurden. Das Ergebnis für eine Gruppe von 105 Tieren, die alle zur gleichen Tageszeit (10^{00} h) getötet wurden, ist in Abb. 1 dargestellt. Die Sauerstoffaufnahme pro Gewichtseinheit fällt mit steigendem Zwerchfellgewicht. Der Zusammenhang ist durch die lineare Regression hinreichend genau dargestellt. Der Korrelationskoeffizient für diese Beziehung ist $r = 0,695$ und damit $p < 0,001$. Die folgenden Messungen der Sauerstoffaufnahme sind nach dieser Gleichung auf ein Standardgewicht von 85 mg reduziert worden. Durch diese Operation wurden die Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen nicht geändert; dagegen verminderte sich die Streuung der Werte sehr wesentlich.

Die Sauerstoffaufnahme des Zwerchfelles von Tieren, die zur gleichen Tageszeit getötet wurden, verhält sich außerordentlich übersichtlich. Sie steigt für etwa 30 min in charakteristischer Weise an und erreicht am Ende dieser Periode einen konstanten Wert, der in der anschließenden Versuchszeit von 5 h in engen Grenzen eingehalten wird. Der Anstieg der O_2 -Aufnahme ist seinem Verhalten nach als Einstellvorgang anzusehen. Diese Einstellbewegung ist nicht unter allen Bedingungen gleich ausgeprägt.

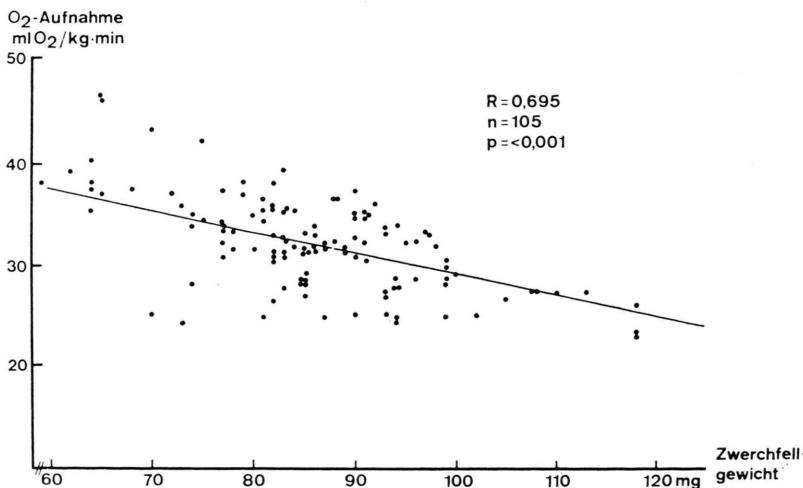


Abb. 1. O_2 -Aufnahme pro Gewichtseinheit von 105 Mäusezwerchfellen als Funktion des Organgewichtes.

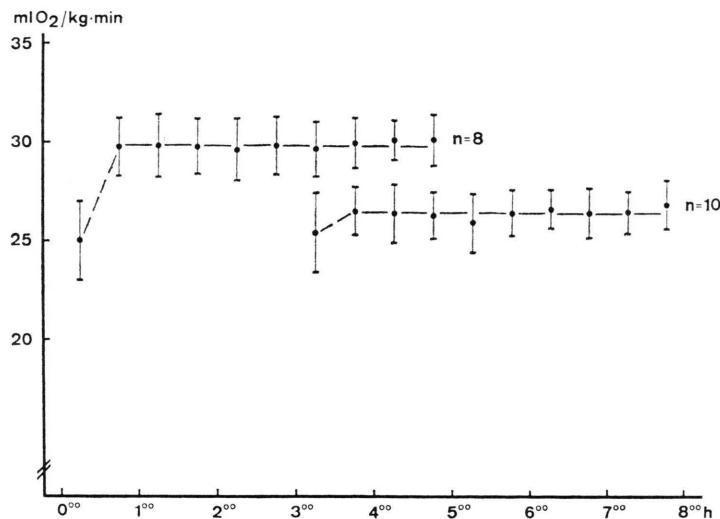


Abb. 2. O₂-Aufnahme in zwei aufeinander folgenden Versuchen mit 8 bzw. 10 Zwerchfellen mit Versuchsbeginn um 0⁰⁰ und 3⁰⁰ h. Angegeben sind die Mittelwerte der O₂-Aufnahme für 30-Minutenperioden und die S. D.

Bei gleichzeitig getöteten Tieren sind die Unterschiede in der Größe der Sauerstoffaufnahme gering. Zwischen Gruppen, die zu verschiedenen Zeiten getötet wurden, kann der Unterschied in der Höhe der Sauerstoffaufnahme beträchtlich sein. Wesentliche Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme fanden sich regelmäßig zwischen aufeinanderfolgenden Gruppen, die zwischen 0⁰⁰ h und 3⁰⁰ h getötet wurden; die Sauerstoffaufnahme bei 3⁰⁰ h lag bis zu 20% niedriger als die der vorausgehenden Gruppe. Diese

Beobachtung ist in der Abb. 2 exemplarisch dargestellt.

Um festzustellen, ob die beobachteten Änderungen der Stoffwechselintensität tagesperiodisch sind, wurden die Messungen gleichmäßig über den Verlauf von 24 h verteilt. Bei einer Meßdauer von 5 h pro Versuch und bei Intervallen von 3 h zwischen den aufeinanderfolgenden Versuchen, erreichten wir jeweils eine Überlappung der Messungen von 2 h Dauer. Mit einer Serie von 8 Versuchen

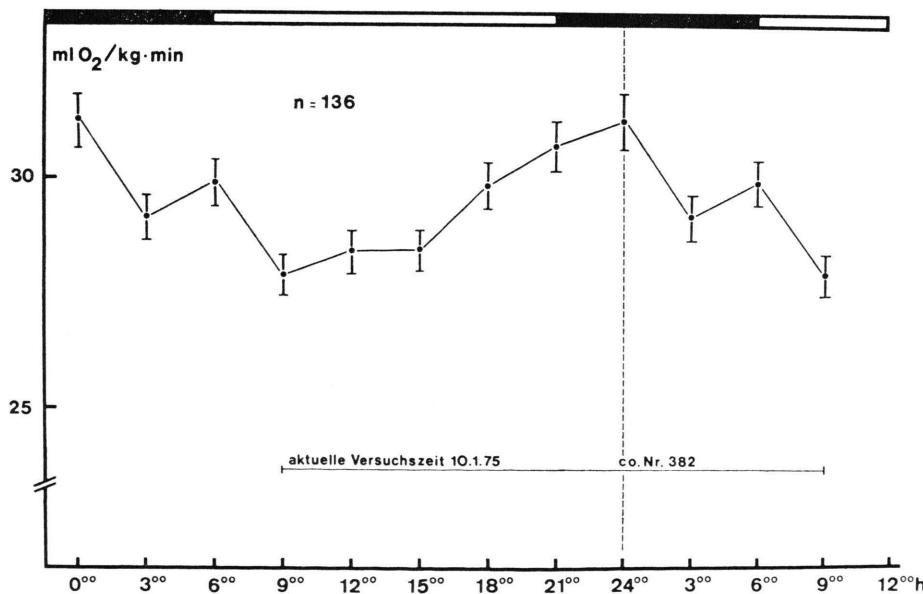


Abb. 3. Mittlere O₂-Aufnahme und S. D. von Zwerchfellen aus einer Versuchsserie (8 Versuche mit 3 Stunden Abstand). Jeder Punkt repräsentiert die mittlere O₂-Aufnahme von 15 bzw. 20 Zwerchfellen mit je 48 Werten der O₂-Aufnahme. Insgesamt ca. 6500 Meßwerte an 136 Zwerchfellen.

in 3 h Abstand deckten wir so den Ablauf eines ganzen Tages. In jedem der mit 3 h Abstand begonnenen Versuche wurden Messungen an 10 bis 20 Zwerchfellen durchgeführt. Jede Versuchsserie über einen Tagesablauf umfaßte somit Messungen an 80 bis 160 Zwerchfellen. Ein Beispiel für eine solche Versuchsserie ist in der Abb. 3 gegeben. Die Zeiten für die Tötung der Tiere und Entnahme der Zwerchfelle sind bei dieser Versuchsserie auf 3⁰⁰, 6⁰⁰, 9⁰⁰ usw. angesetzt. Mit der gleichen zeitlichen Ordnung der Einzelversuche wurden drei weitere Versuchsserien über 24 h durchgeführt. In zwei Versuchsserien wurde der Beginn der einzelnen Versuche jeweils 90 min in die Mitte der Intervalle der ersten Serien verschoben, d. h. auf 1³⁰, 4³⁰, 7³⁰ usw. In jeder der Versuchsserien, die über eine volle Tagesperiode liefen, ergab sich dasselbe Bild wie in Abb. 3 mit einem Maximum der O₂-Aufnahme zwischen 18⁰⁰ und 24⁰⁰ und einem Minimum zwischen 6⁰⁰ und 18⁰⁰. In jeder dieser Versuchsserien waren die Werte der O₂-Aufnahme in diesen beiden Perioden nach der χ^2 -Methode mit $p < 0,001$ signifikant verschieden.

In der Abb. 4 sind die fünf Versuchsserien, die über einen vollen Tag gehen, zusammengefaßt. Die 16 Mittelwerte mit 90 min Abstand sind wie auch vorher auf den Zeitpunkt der Tötung der Tiere

gesetzt. Jeder der eingetragenen Mittelwerte repräsentiert im Durchschnitt 2400 Werte der O₂-Aufnahme aus Messungen an 40 Zwerchfellen.

Dieselben Meßwerte wie in Abb. 4 sind in Abb. 5 in einer übersichtlichen Weise dargestellt. Da die beiden um 90 min verschobenen Versuchsserien den gleichen zeitlichen Gang aufweisen, sind in dieser Darstellung die Meßwerte für jeweils 3-Stunden-Perioden zu gewogenen Mitteln zusammengefaßt und in die entsprechende zeitliche Position gesetzt, d. h. auf 0⁴⁵, 3⁴⁵, 6⁴⁵ usw. Der resultierende einfache Kurvenzug gibt die wesentlichen Aussagen richtig an. Die dabei sich ergebenden geringen Streuungen beweisen die Realität der Bewegungen.

Zusammenfassung und Diskussion

Aus den vorgelegten Messungen ergibt sich, daß die Stoffwechselintensität überlebender Zwerchfelle unter geeigneten Versuchsbedingungen auf einem Niveau konstant bleibt, das zur Zeit der Tötung der Tiere festgelegt ist. Die Höhe der Sauerstoffaufnahme dieses isolierten Gewebes ist zu verschiedenen Tageszeiten signifikant verschieden. Die Werte für die Zeit von 18⁰⁰ bis 24⁰⁰ repräsentieren ein ausgedehntes Maximum; die Werte von 3⁰⁰ bis

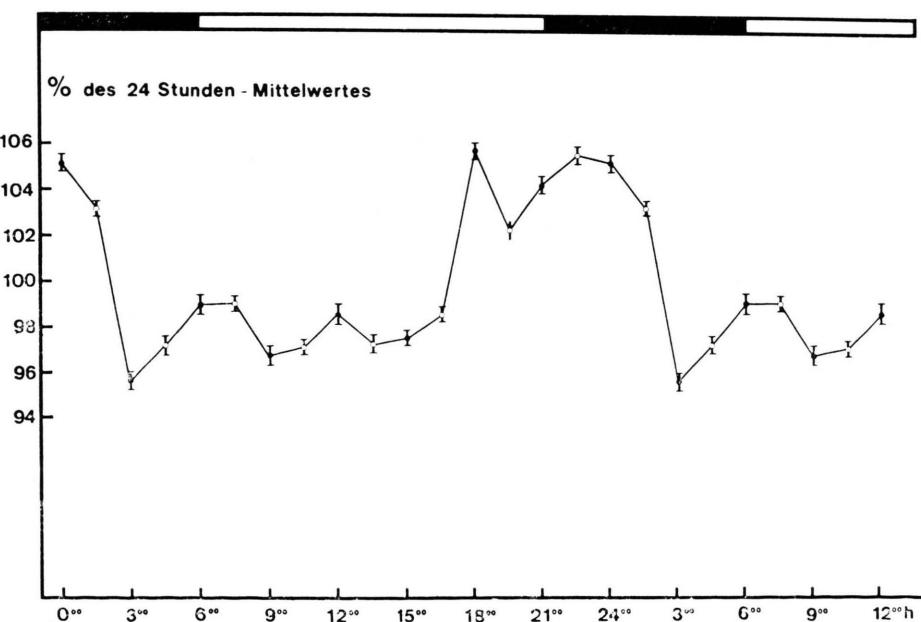


Abb. 4. Mittlere O₂-Aufnahme von Zwerchfellen aus Versuchen mit Beginn um 0⁰⁰, 3⁰⁰, 6⁰⁰ h usw. ●, bzw. mit Beginn um 1³⁰, 4³⁰, 7³⁰ h usw. ○, angegeben in % des 24 h Mittels.

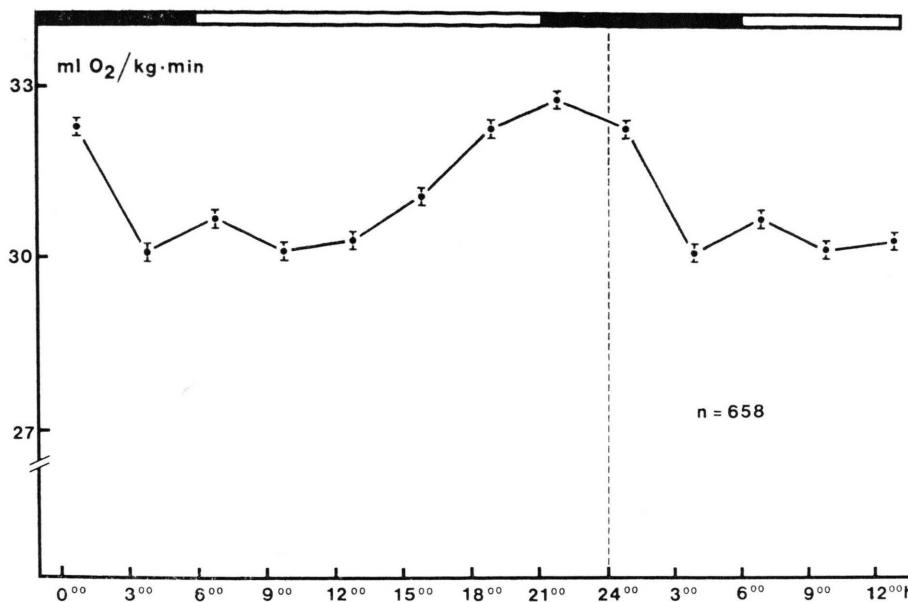


Abb. 5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den beiden Versuchsreihen in Abb. 4 zu gewichteten Mittelwerten für 3 h Perioden. Jeder Punkt repräsentiert als Mittel die O_2 -Aufnahme aus durchschnittlich 3900 Meßwerten. Insgesamt Messungen an 658 Zwerchfellern.

15⁰⁰ ein Minimum. Die Absolutwerte der Sauerstoffaufnahme des isolierten Mäusezwerchfelles für bestimmte Tageszeiten sind nicht nur an aufeinanderfolgenden Tagen, sondern auch an Versuchstagen in weitem Abstand gut reproduzierbar. An dem 24-Stunden-Rhythmus dieser Änderung der Stoffwechselintensität kann nach den vorgelegten Messungen nicht gezweifelt werden. Es ist allerdings zu betonen, daß sich in unseren Messungen auch Hinweise für längere Rhythmen der Stoffwechselintensität fanden.

Für die statistische Sicherung der Ergebnisse konnte bei den hohen Zahlen an Meßwerten nur die χ^2 -Methode eingesetzt werden. Für keine der anderen Methoden reichten die Tabellen aus. Für jede der 5 Versuchsserien, die über eine volle 24-Stunden-Periode gingen, sind die Werte der Sauerstoffaufnahme für die Zeit von 6⁰⁰ bis 15⁰⁰ den Werten für die Zeit von 18⁰⁰ bis 24⁰⁰ gegenübergestellt. Bei jedem einzelnen dieser Vergleiche ergab sich ein $p < 0,001$. Für den Vergleich aller Werte gemeinsam war $p < 0,001$.

Der in den Abb. 4 und 5 dargestellte tagesperiodische Verlauf der Sauerstoffwechselintensität isolierte Mäusezwerchfelle stimmt in der zeitlichen Ordnung und Dauer des Maximums von 18⁰⁰ bis

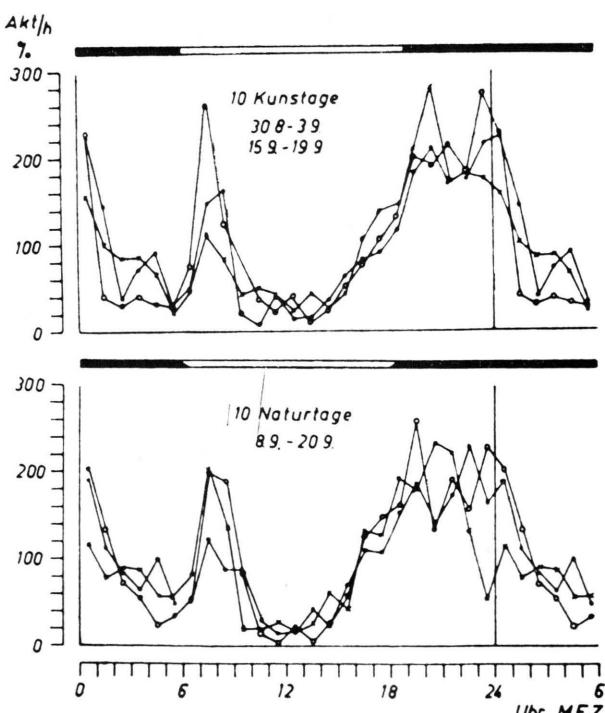


Abb. 6. Aktivität weißer Mäuse gemittelt über jeweils 10 Kunstage (oben) und 10 Naturtage (unten). Ordinate: 100% = Tagesmittel der Aktivität/Stunde. Aus: J. Aschoff, Handbuch der Zoologie, Band 8 (30), 1, 1962. Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers.

24⁰⁰ mit dem von Aschoff und Mitarbeitern [5] gemessenen Verlauf der Spontanaktivität von Mäusen gut überein. Für den übrigen Teil des Tagesganges besteht insofern ein Unterschied als sich in den Aktivitätssmessungen ein deutliches zweites Maximum um 6⁰⁰ findet, das in den Messungen der Stoffwechselintensität nicht mit gleicher Deutlichkeit auftritt. Immerhin läßt sich der mäßige Anstieg der Stoffwechselintensität gegen 6⁰⁰ für jede der beiden um 90 Minuten verschobenen Versuchsreihen einzeln mit der χ^2 -Methode mit $p < 0,001$ sichern (siehe Abb. 6 zum Vergleich).

Aus der Zusammenfassung aller Messungen in Abb. 4 ergibt sich eine tägliche Amplitude der Stoffwechselintensität isolierter Mäusezwerchfelle von etwa 10% des Mittelwertes. In den einzelnen Versuchsserien geht die Amplitude bis zu 14% des Mittelwertes. Diese Änderungen der Stoffwechselintensität liegen in der gleichen Größenordnung wie die für den Menschen berichteten tagesperiodischen Schwankungen des Grundumsatzes. Diese oft angezweifelten tagesperiodischen Grundumsatzschwankungen des Menschen finden neuerdings Unterstützung aus Modellversuchen zur Temperaturregulation. Nach den Berechnungen von Hundhausen [28]

entspricht der tagesperiodische Temperaturgang beim Menschen einer Änderung des basalen Umsatzes von etwa 10%. Auch Timbal [29] kommt bei seinen Messungen der Stoffwechselgröße unter quasi Grundumsatzbedingungen nur auf Änderungen der Umsatzgröße im Bereich von unter 10% mit Streuungswerten im Bereich von $\pm 5\%$. Erst die Berechnung des Wärmeinhaltes des Körpers führt zu einem zweifelsfreien und eindeutigen Ergebnis. Die Änderung des Grundumsatzes der Frau mit dem Menstruationszyklus liegt im allgemeinen bei Werten unter 10%.

Die sehr ausgeprägten tagesperiodischen Aktivitätsschwankungen (Aschoff) stehen keineswegs im Widerspruch zu den von uns gemessenen, vergleichsweise geringeren Änderungen der Stoffwechselintensität isolierter Gewebe. Heusner [30] hat für die Ratte bei Änderungen der Aktivität des Tieres von 0 auf 100% nur eine Umsatzsteigerung von +35% gemessen. Änderungen des Grundumsatzes bzw. des Ruheumsatzes sind im allgemeinen gering im Verhältnis zu den gleichzeitigen Änderungen des Spontanumsatzes bzw. des Gesamtumsatzes. Das läßt sich am Einfluß der Schilddrüse und der Gonaden auf Grund- und Spontanumsatz gut darstellen.

- [1] A. Bornstein u. H. Völker, *Z. Exp. Med.* **53**, 439 (1926).
- [2] H. Völker, *Pflügers Archiv* **215**, 43 (1927).
- [3] H. Kalmus, *Biol. Gen.* **11**, 93 (1935).
- [4] A. Jores, *Tabul. Biol.* **14**, 77 (1937).
- [5] J. Aschoff, *Pflügers Archiv* **262**, 51 (1955).
- [6] J. Aschoff, *Naturwissenschaften* **42**, 569 (1955).
- [7] J. Aschoff, Spontan lokomotorische Aktivität, *Hdb. Zoologie* **8**, (30) 1 (1962).
- [8] A. Solberger, *Biological Rythm Research*, Elsevier Publishing Company, N. Y. 1965.
- [9] M. Kikuchi u. W. H. Weihe, *Experientia* **20**, 706 (1964).
- [10] J. Goulding u. D. Bellamy, *J. Endocrinol.* **51**, 203, (1971).
- [11] G. Paulet u. G. Rongin, *C. R. Soc. Biol.* **166**, 1167 (1972).
- [12] J. J. Gagliardino u. O. R. Rebollo, *Horm. Metab. Research* **4**, 178 (1972).
- [13] J. U. Claessen, Die Abhängigkeit der O₂-Aufnahme isolierter Warmblütgewebe von O₂-Druck und Temperatur. Untersuchungen zum Begriff der totalen Sättigungsatmung nach Warburg. Diss. Bonn 1974.
- [14] M. Große-Beilage, Der Einfluß der Suspensionsmedien auf die Atmung überlebender Gewebe in vitro. Diss. Bonn 1966.
- [15] L. Johannessen, Untersuchungen über die Bedingungen stabiler und instabiler O₂-Aufnahme isolierter Warmblütgewebe in vitro. Bedeutung von Sauerstoffdruck und Schüttelfrequenz. Diss. Bonn 1974.
- [16] J. Pichotka, L. Johannessen u. H. J. Schmidt, *Pflügers Archiv* **343**, R 13 (1973).
- [17] J. Pichotka, H. J. Schmidt, I. Schmidt u. H. M. Sommer, *Pflügers Archiv* **355**, R 41 (1975).
- [18] J. Pichotka, H. J. Schmidt u. H. Weigand, *Pflügers Archiv* **362**, R 16 (1976).
- [19] J. Pichotka u. H. J. Schmidt, *Muskelstoffwechsel, körperliche Leistungsfähigkeit und Diabetes mellitus* (K. Janke, H. Mehrtens und H. E. Reis, hrsg.), Schattauer Verlag, Stuttgart 1977.
- [20] H. J. Schmidt, Über die Messung der O₂-Aufnahme des isolierten Gewebes. Kritik an den bisherigen Verfahren. *Habil. Bonn* 1977.
- [21] H. Wandt, Die Temperaturabhängigkeit des Sauerstoffwechsels isolierter Mäusezwerchfelle im Bereich von 32–37 °C bei konstanten Temperaturen. *Diss. Bonn* 1970.
- [22] H. Weigand, Die Beziehung zwischen Sauerstoffspannung und Sauerstoffaufnahme isolierter Gewebe, untersucht an ungeschnittenen Organen. *Diss. Bonn* 1968.
- [23] H. J. Schmidt, F. Frenzel, U. Schaum u. J. Pichotka, *Pflügers Archiv* **343**, R 12 (1973).
- [24] H. M. Sommer, H. J. Schmidt u. J. P. Pichotka, *Pflügers Archiv* **355**, R 42 (1975).
- [25] O. Warburg, *Biochem. Z.* **152**, 51 (1924).
- [26] H. A. Krebs, *Biochem. Biophys. Acta* **4**, 249 (1950).
- [27] H. J. Schmidt, M. Sommer, H. Weigand u. J. P. Pichotka, *Pflügers Archiv* **359**, R 52 (1975).
- [28] E. Hundhausen, B. Theves u. E. Witzleb, *Pflügers Archiv* **359**, R 54 (1975).
- [29] J. Timbal, J. Colin u. J. D. Guieu, *Pflügers Archiv* **335**, 97 (1972).
- [30] A. Heusner, *C. r. Soc. Biol.* **150**, 1246 (1956).