ACTA PHYSIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

E. ERNST, B. ISSEKUTZ SEN., N. JANCSÓ, K. LISSÁK,
E. T. SZÖRÉNYI, I. WENT

REDIGIT

F. B. STRAUB

TOMUS XI FASCICULUS 1

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1957

ACTA PHYSIOL. HUNG.

ACTA PHYSIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÍSÉRLETES ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG ÉS KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Az *Acta Physiologica* német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a kísérletes orvostudományok köréből.

Az *Acta Physiologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg: több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Physiologica, Budapest 62, postafiók 440.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Physiologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 forint, külföldre 110 forint. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány utca 21 Bankszámla 05-915-111-44), külföld számára pedig

a „Kultúra" Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál

(Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankszámla 43-790-057-181 sz.), vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die *Acta Physiologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Gebiete der experimentellen medizinischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Physiologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion und den Verlag bestimmte Korrespondenz zu senden.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

ACTA PHYSIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
E. ERNST, B. ISSEKUTZ SEN., N. JANCSÓ, K. LISSÁK,
E. T. SZÖRÉNYI, I. WENT

REDIGIT
F. B. STRAUB

TOMUS XI

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1957

INDEX

Acta Physiologica Tomus XI.

BIOCHEMIA

Bárány, M., Bárány, K., Guba, F., Köteles, Gy., Nagy, E.: Über den Zustand des Aktins im Muskel 145

Feuer, Gy.: Die Wirkung der Muskeltonusveränderung auf den Kreatinphosphat- und Adenosintriphosphatgehalt 1

Garzó, T., Perl, K., T.-Szabó, M., Ullmann, Á., Straub, F. B.: Inkorporation radioaktiver Aminosäuren und Amylasesynthese im Pankreasgewebe *in vitro*..... 23

Kramer, M.: Induced Penicillinase Formation in Resting Bacterial Cells. I. The Characteristic Differences of the Formation of Penicillinase in Presence and in Absence of Free Penicillin, in Cells of B. Cereus NRRL—B—569 125

Kramer, M., Straub, F. B.: Induced Penicillinase Formation in Resting Bacterial Cells. II. On the Nature of the Latency Period of Penicillinase Formation in Cells of B. Cereus NRRL—B—569 133

Kramer, M., Straub, F. B.: Induced Penicillinase Formation in Resting Bacterial Cells. III. Induced of Penicillinase Formation by Extracts of B. Cereus NRRL—B—569/H Cells without Penicillin 139

Ullmann, Á., Straub, F. B.: Amylasesynthese in einem löslichen System aus Pankreas 11

Ullmann, Á., Straub, F. B.: Über den Mechanismus der Amylasesynthese *in vitro*..... 31

Wollemann, M., Feuer, Gy.: Die Entstehung von Fluorazetyl-Coenzym A und Fluoressigsäure und Fluorzitronensäure in Gehirnextrakten 165

PHARMACOLOGIA

Dirner, Z., Thuránszky, K., Szeghy, G.: Über die pharmakologischen Wirkungen von Butylsympaton 109

Pórszász, J., Nádor, K., Gibiszer-Pórszász, K., Bacsó, I.: Pharmakologie der Aminoketone III. Vergleichende Untersuchungen mit Largactil (3-Dimethylaminpropyl--3-chlor-10-phenothiazin), Pacatal (N-Methyl-piperidyl-3-methyl-phenothiazin) und F—933 (1-Piperidinomethyl-benzodioxan) 95

Pórszász, J., Nádor, K., Pórszász-Gibiszer, K., Such, Gy.: Pharmakologie der Aminoketone. IV. Adrenolytische Aminoketone 211

Schweiger, O., Tomcsányi, A., Kulka, F., Lehocki, M., Frau Tomcsányi, A.: Experimentelle Untersuchungen über die intrapleurale Resorption der p-Aminosalizylsäure..... 83

PHYSIOLOGIA

Bagdy, D., Banga, I. B.: Extraction and Purification of Elastase from Dried Pancreas .. 371

Bálint, P., Forgács, I.: The Apparent Expansion of the Extracellular Space (Inulin Space) in the Nephrectomized Dog 205

Bot, Gy., Szilágyi, T., Szabó, E.: Wirkung von Zuckerbelastung und Adrenalin auf die Phosphorylase- und Glukose-6-Phosphatase-Aktivität der Leber 421

Bot, Gy., Jókay, I.: Bildungs- und Umwandlungsverhältnisse von Phosphorylase-*a* im Muskelhomogenat 427

Endrőczi, E., Telegdy ,Gy., Lissák, K. : Analysis of the Individual Variations of Adaptation in the Rat, on the Basis of Conditioned Reflex and Endocrine Studies 393
Fehér, O. : Über die Bedeutung der Cholinesterase im ganglionären Erregungsprozess.. 291
Kesztyűs, L. : Über die Antigeneigenschaften des Polleneiweisses..... 399
Kiss, E., Szentiványi,M. : Über den segmentalen Ursprung der durch das Ganglion stellatum verlaufenden präganglionären sympathischen Fasern..... 339
Kocsár, L., Szalay, S., Ujhelyi, Cs., Kesztyűs, L. : Beiträge zum Wirkungsmechanismus des Kobalt-Ion-Adrenalin-Antagonismus 415
Kovách, A. G. B., Fonyó, A., Vittay, T., Pogátsa, G.: The Oxygen and Glucose Consumption and Hexokinase Activity *in vitro* of Brain Tissue of Rats in Traumatic Shock... 173
Kovách, A. G. B., Takács, L., Mohácsi, A., Káldor, V., Kalmár, Z.: Effect of Metabolism-Increasing or -Decreasing Substances on the Susceptibility of Rats to Shock..... 181
Kövér, A., Balla, L., Pusztai, L. : Automatische Apparatur zur biologischen Titrierung.. 363
Kövér, A., Kovács, T., König, T. : On the Properties of Myosincholinesterase..... 253
Kövér, A., Kovács, T. : On the Specificity of Myosincholinesterase..... 259
Lissák, K., Endrőczi, E., Fábián, I. : Further Studies on the Effect of the Humoral Inhibitory Factor 377
Martin, J., Bata, G., Endrőczi, E., Moll, Á. : Utilisation of Cortisone and Hydrocortisone on the Basis of Experiments *in vivo* and *in vitro* 385
Orosz, Á., Földes, I., Kósa, Cs., Tóth, G.: Radioactive Isotope Studies of the Connection between the Lymph Circulation of the Nasal Mucosa, the Cranial Cavity and Cerebrospinal Fluid 75
Pataky, I., Pfeifer, A. K., Ribári, O.: Studies of the State of Inhibition Following Electroshock 45
Pintér, I.: Esterase Activity of Serum Protein Fractions..... 39
Szentiványi, M., Kiss, E. : Beiträge zur Innervation der Koronargefässe 347
Szentiványi, M., Kiss, E. : Analyse der kardioakzeleratorischen Wirkung des degenerierten Vagusstammes 357
Szilágyi, T., Kocsár, L., Szatai, I. : Über die Wirkung des Kobalt-Ions auf die Andrenalin-reaktionen 409
Szűcs, E., Hetényi, E. : Untersuchung der auf Adrenalinreiz eintretenden Antagonisten-mobilisierung an denervierten Strukturen (II)..... 305
Szűcs, E., Balla, L. : Ein neuer Ordinatenschreiber..... 309
Szűcs, E., Hetényi, E., Went, I. : Analyse der biphasischen Wirkung von Adrenalin an künstlich durchströmter hinterer Extremität des Hundes 317
Szűcs, E., Hetényi, E., Went, I. : Untersuchung der auf Adrenalinwirkung primär auftretenden Vasodilatation an denervierten Strukturen 327
Takács, L., T.-Szabó, M.: On the Mechanism of the Metabolic Changes in Muscle during Shock : A Study of Dehydration and Arterial Hypoxia..... 67
Takács, L.: Coronary Circulation in Hypoxic States 55
Takács, L.: The Circulation of Limbs in Hypoxic Conditions..... 189
Takács, L.: The Metabolism of Limbs in Hypoxic Conditions 197
Varga, E., Kövér, A., Kovács, T., Hetényi, E. : Changes in Cholinesterase Activity of Striated Muscle after Denervation 235
Varga, E., Kövér, A., Kovács, T., Hetényi, E. : Changes in the Acetylcholine-Sensitivity and Cholinesterase Activity of Skeletal Muscles in the Course of Ontogenesis..... 243
Varga, E., Hetényi, E., Bot, Gy. : Einfluss von Adrenalin auf die Muskelphosphorylase Aktivität und deren Bedeutung im Mechanismus der ermüdungshemmenden Wirkung 267
Varga, E., Nagy, J., Tóth, M., Hetényi, E. : Beeinflussung der Degeneration peripherer Nerven durch Behandlung mit Adenosintriphosphat..... 277

COMMUNICATIONES BREVES

Ángyán, A. J., Finály, P., Roheim, P.: Some Characteristical Higher Nervous Activity Changes in Dogs Following Temporary Ischaemisation of the Head..... 225
Kelemen, E.: Local Inhibition of the Testicular Extract Induced Oedema of the Rat's Hind-Paw 121
Takács, L., Nagy, Z., Kállay, K.: Pulmonary Circulation in Shock..... 233

ad Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae
Supplementum Tomus IX

XXI. KONGRESS

DER

UNGARISCHEN PHYSIOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

Szeged, 30. Juni — 2. Juli 1955

Biochemia

DIE WIRKUNG DER MUSKELTONUSVERÄNDERUNG AUF DEN KREATINPHOSPHAT- UND ADENOSINTRIPHOSPHATGEHALT

Von

GY. FEUER

BIOCHEMISCHES INSTITUT DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, BUDAPEST

(Eingegangen am 29. November 1955)

Die Rolle der energiereichen Verbindungen ATP* und KrP bei den während der Muskelfunktion vor sich gehenden chemischen Veränderungen wurde von zahlreichen Forschern untersucht. LUNDSGAARD [1] stellte im Laufe seiner Untersuchungen an mit Monojodessigsäure vergiftetem Froschmuskel fest, dass unter anaeroben Verhältnissen Kontraktion auch ohne Entstehung von Milchsäure zustande kommt. Aus dieser Beobachtung wurde im Zusammenhang mit den Feststellungen von NACHMANSOHN [2] über die anaerobe Resynthese des KrP der Schluss gezogen, dass die Energie der Kontraktion von der Hydrolyse des KrP geliefert wird [3].

Später wies LOHMANN [4] nach, dass sich im Muskel zwischen ATP und Kr ein Phosphatübertragungsprozess abspielt. Nach Erkennung der Reversibilität dieser Veränderung wurde angenommen, dass der primäre Prozess der Kontraktion in der Spaltung des ATP besteht, dessen Abbau durch die Resynthese von KrP substituiert wird.

Im Gegensatz zu dieser Auffassung hatten wir bei der Untersuchung der Muskelfunktion festgestellt, dass bei der durch Verabreichung flüssiger Luft ausgelösten und eingefrorenen Kontraktur der KrP-Gehalt des kontrahierten Muskels höher und sein ATP-Gehalt niedriger ist als der des relaxierten Muskels [5].

Im Laufe dieser Versuche hatten wir die Muskeln nach dem Gefrieren der Kontraktion analysiert, so dass sie keine Aufklärung darüber boten, auf welche Phase der Muskelkontraktion die beobachtete Phosphatübertragung fällt. Deshalb suchten wir die während der Muskelfunktion auftretenden Zustände durch Veränderung des Muskeltonus annähernd herbeizuführen [6].

Die Verminderung des Muskeltonus erreichten wir mittels Nervendurchschneidung und Novocainverabreichung, die Tensionssteigerung durch Spannung mit Hilfe von Gewichten. In der vorliegenden Mitteilung besprechen wir diese Untersuchungen.

* Es werden folgende Abkürzungen benutzt: ATP = Adenosintriphosphat; ADP = Adenosindiphosphat; KrP = Kreatinphosphat; Kr = Kreatin; P = anorganisches Phosphat.

Methoden

Die Untersuchungen wurden am M. gastrocnemius oder M. sartorius von Fröschen *(Rana esculenta* oder *temporaria)* vorgenommen. Bei jedem Versuch verglichen wir stets die bilateralen parallelen Muskeln. Auf den Tabellen zeigen wir aus unseren Versuchen an mehreren hundert Fröschen eine charakteristische Serie ; die Angaben beziehen sich stets auf einzelne Frösche. Die Fixierung der Muskeln geschah unter Verwendung von mit flüssiger Luft abgekühltem Alkohol. Nach dem Gefrieren wurden die Muskeln mit abgekühltem Azeton entwässert und aus dem so gewonnenen trockenen Pulver der ATP- und KrP-Gehalt bestimmt.

Zur Feststellung der KrP-Menge verwendeten wir die spezifische Methode von ALEXEJEWA [7]. Anorganisches P wurde nach LOHMANN und JENDRASSIK [8] bestimmt. Die ATP-Menge wurde aus dem anorganischen P und dem Wert des während 7 Minuten hydrolysierbaren P errechnet. Die Methoden wurden in der vorangegangenen Mitteilung [5] eingehend besprochen, in der auch alle Einzelheiten über die Kontrollversuche angeführt sind.

Bei der statistischen Auswertung der Resultate gelangte die »t«-Probe zur Anwendung [9].

Ergebnisse

I. *Tonusverminderung mittels Nervendurchschneidung*

Wird ein unilateraler N. ischiadicus des Frosches durchschnitten und untersuchen wir die Muskeln unmittelbar nach der Durchtrennung, ist der KrP- und ATP-Gehalt auf beiden Seiten ungefähr gleich. Analysieren wir jedoch die Mm. gatrocnemii nach etwa 10—15 Minuten, enthält der zum durchschnittenen Nerv gehörende Muskel mehr KrP und weniger ATP als der entsprechende Parallelmuskel. Mehrere Wochen nach der Durchschneidung des Nervs, wenn die Funktion wiederhergestellt ist, wird die KrP- und ATP-Menge in beiden Gastrocnemien wieder gleich.

Diese Versuche wurden in Äthernarkose durchgeführt. Über den hinteren Oberschenkelmuskeln der eingeschläferten Tiere schnitten wir die Haut auf und durchtrennten den N. ischiadicus bei seinem Austritt aus dem Becken. Auch nach der Nervendurchschneidung wurden die Frösche weiterhin oberflächlich narkotisiert, damit nicht nach dem Erwachen auf der einen Seite Zuckungen eintreten und den KrP- und ATP-Gehalt der Muskeln beeinflussen. Erfolgte die Untersuchung der Muskeln nach längerer Zeit, z. B. nach 24 Stunden, wurden die Frösche etwa 10—15 Minuten vor der Muskelresektion erneut narkotisiert.

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Haut vom Gastrocnemius abgezogen und das ganze Tier plötzlich in mit flüssiger Luft abgekühltem Alkohol (Temperatur etwa —100 — —110° C) gelegt, in dem die Muskeln sofort einfroren. Hiernach wurden die Gastrocnemien herausgelöst und in eiskaltem Azeton entwässert. Die gewonnenen Trockenpulver wurden analysiert. Einige Angaben dieser Versuche sind auf Tabelle I angeführt.

Wir nehmen an, dass bei diesen Versuchen, im Hinblick darauf, dass der Gastrocnemius der beiden Beine — von der Durchschneidung abgesehen —

Tabelle I

Analyse von Frosch-Gastrocnemien nach Durchschneidung eines unilateralen N. ischiadicus

Nr.	Zeitpunkt der Analyse nach der Durchtrennung	KrP-Gehalt µg/mg		ATP-Gehalt µg/mg	
		durchtrennt	Kontrolle	durchtrennt	Kontrolle
1	1.—2. Minute	2,43	2,39	13,55	14,6
2	1.—2. «	2,38	2,23	15,5	14,9
3	1.—2. «	2,57	2,57	11,2	12,5
4	1.—2. «	5,5	5,13	19,5	17,2
5	1.—2. «	4,3	4,05	12,0	11,8
6	20. Minute	4,26	2,54	14,6	18,0
7	20. «	3,44	1,98	14,6	17,35
8	30. «	3,16	2,1	10,1	16,0
9	30. «	2,75	1,9	15,3	20,5
10	30. «	2,31	1,47	16,5	24,0
11	60. «	3,55	3,09	12,4	20,1
12	60. «	4,3	2,55	14,6	18,0
13	24. Stunde	3,1	2,42	11,0	14,6
14	24. «	2,89	1,8	11,2	11,0
15	24. «	3,86	2,4	10,2	12,8
16	4. Tag	5,33	3,14	8,6	14,2
17	4. «	4,57	2,9	12,2	14,2
18	22. «	4,35	4,35	13,9	15,4
19	22. «	4,71	4,56	9,66	10,6
20	28. «	3,27	3,13	15,2	14,5
Mittelwert: 6.—15. Versuch ..		3,36	2,16	13,0	17,2
	t:	4,6		2,94	
	P:	$\leqslant 0{,}01$		$< 0{,}01$	

vollkommen gleich behandelt wurde, die bei der Analyse beobachtete Differenz mit der durch die Nervdurchtrennung herbeigeführten Tonusverminderung zusammenhängt. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die gewonnenen Werte bei dem tonusverändernden Eingriff durch die Wirkung des mit flüssiger Luft abgekühlten Alkohols, den Tiefkühlungsreiz, bis zu einem gewissen Grade modifiziert wurden.

Die nach der Nervdurchtrennung wahrgenommene Wirkung kam nicht zustande, wenn wir den Tieren 2—3 Stunden vor der Durchschneidung des Ischiadicus 3—4 µg/g Gewicht Curare in den Lymphsack verabreichten. In diesem Fall konnten wir im KrP- und ATP-Gehalt der parallelen Gastrocnemien

keine Differenz feststellen. Bei diesen Versuchen erfolgte die Fixierung der Muskeln 30 Minuten nach der Durchtrennung. Die Angaben dieses Versuchs zeigt Tabelle II.

Tabelle II

Analyse von Frosch-Gastrocnemien nach Durchtrennung eines unilateralen Ischiadicus und Curare-Verabreichung

Nr.	KrP-Gehalt µg/mg		ATP-Gehalt µg/mg	
	durchtrennt	Kontrolle	durchtrennt	Kontrolle
1	4,42	4,50	14,2	14,8
2	3,12	2,95	15,2	16,1
3	3,75	3,60	12,2	11,8
4	4,95	5,05	18,5	17,9
5	4,2	3,9	17,1	17,8

Curare schaltet die Tonusreaktion der Muskeln aus, durch seine Wirkung tritt in beiden Gastrocnemien motorische Lähmung auf, und die Reizbarkeit durch die Nerven geht völlig verloren. Darauf ist zurückzuführen, dass nach Verabfolgung von Curare bei Durchtrennung eines unilateralen Ischiadicus im KrP- und ATP-Gehalt der bilateralen Gastrocnemien kein Unterschied beobachtet werden kann.

II. *Tonusverminderung nach Novocaingabe*

Bei mehreren Versuchsserien erzielten wir Tonusverminderung durch Novocain. In einen Froschschenkel injizierten wir subkutan 0,5—1,0 ml 2%ige Novocain-Lösung und nahmen 20—30 Minuten später die Gastrocnemien heraus. Bei diesen Versuchen fand sich in dem zu der mit Novocain behandelten Seite gehörenden relaxierten Gastrocnemius mehr KrP und weniger ATP als im Kontrollmuskel. Untersuchten wir die Muskeln 24 Stunden nach der Novocaineinführung, als sich das Anästhetikum aus dem Organismus bereits völlig entfernt hatte, war im ATP- und KrP-Gehalt der parallelen Muskeln kein Unterschied mehr vorhanden. Das Resultat einer Versuchsreihe geht aus Tabelle III hervor.

Die Novocainzufuhr erfolgte auf der einen Seite am Schenkel über dem oberen Abschnitt des M. triceps femoris subkutan. Auf diese Weise wirkt das Mittel nur auf den Nerv und übt auf den Muskel selbst keinen unmittelbaren Einfluss aus. Durch Einführung des Anästhetikums wird die tonusbedingte Kontraktur aufgehoben, es verursacht vollständige Relaxation, ohne irrever-

sible strukturelle Veränderungen herbeizuführen. Die Wirkung des in einen Schenkel gegebenen Novocains greift nicht auf die andere Seite über, Tonusverminderung tritt nur im unilateralen Gastrocnemius auf. Im Muskel mit herabgesetztem Tonus, d. h. auf der mit Novocain behandelten Seite, ist im Vergleich zur anderen Seite mehr KrP und weniger ATP anzutreffen.

Tabelle III

Analyse von Frosch-Gastrocnemien nach Novocaingabe

Nr.	Zeitpunkt der Analyse	KrP-Gehalt µg/mg		ATP-Gehalt µg/mg	
		nach Novocain	Kontrolle	nach Novocain	Kontrolle
1	30. Minute	4,06	2,95	7,26	16,0
2	30. «	5,3	3,35	9,1	11,7
3	30. «	5,27	3,04	8,6	13,6
4	30. «	3,88	2,62	6,38	16,45
5	30. «	5,6	4,2	9,95	11,05
6	24. Stunde	3,89	3,94	13,85	14,9
7	24. «	2,17	2,4	16,45	15,0
8	24. «	4,28	4,18	17,75	17,65

III. *Passive Spannung durch Belastung*

Die Tonussteigerung erzielten wir durch Belastung mit Gewichten. Die bilateralen Gastrocnemien des dekapitierten Frosches wurden *in situ* herauspräpariert, auf den Muskeltelegraphen gelegt und am Muskel der einen Seite mit Hilfe der Sehne ein grösseres Gewicht (100—300 g) befestigt. Nach kurzer Belastung wurden die Muskeln eingefroren. Diese Versuche ergaben, dass im Vergleich zum KrP- und ATP-Gehalt des weniger belasteten Muskels der gespannte Muskel geringeren KrP- und höheren ATP-Gehalt aufweist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind auf Tabelle IV enthalten.

Bei den Belastungsversuchen erhielten wir, wie aus Tabelle IV hervorgeht, nicht in allen Fällen eindeutige KrP- und ATP-Veränderungen. Die Ursache dürfte vielleicht darin liegen, dass die experimentellen Bedingungen bei diesen Untersuchungen nicht optimal waren. Wir verwendeten dekapitierte Frösche, und die Dekapitation sowie Rückenmarkzerstörung wirken als Reize, welche den KrP- und ATP-Gehalt des Muskels beeinflussen können. Das Gefrieren erfolgte auch in diesem Falle mit durch flüssige Luft abgekühltem Alkohol in der Weise, dass die auf den Muskeltelegraphen gelegten Muskeln plötzlich in die alkoholhaltige Wanne gegeben wurden.

Tabelle IV

Analyse von Frosch-Gastrocnemien nach Belastung eines unilateralen Muskels

Nr.	KrP-Gehalt µg/mg		ATP-Gehalt µg/mg	
	Belastung			
	1 g	100 g	1 g	100 g
1	4,8	4,32	6,5	12,2
2	5,6	4,22	11,5	13,2
3	6,65	5,37	9,8	15,2
4	4,2	3,55	12,2	10,6
5	3,0	3,65	12,85	13,5
	1 g	300 g	1 g	300 g
6	5,65	4,65	17,5	18,4
7	4,26	4,35	16,0	13,5
8	2,65	3,02	19,0	12,1
9	5,1	4,0	10,7	17,5
10	4,15	3,75	13,0	11,8

IV. *Fermentuntersuchungen*

Im Laufe unserer Versuche stellten wir bei den Tonusveränderungen im ATP- und KrP-Gehalt der parallelen Froschmuskeln einen Unterschied fest. Auf Grund dieser Resultate ergab sich die Frage, wie diese Veränderung in den energiereichen Verbindungen des Muskels zustande kommen kann. Wir untersuchten daher, wie sich in den nach Nervdurchtrennung gewonnenen Muskeln die in der ATP- und KrP-Umwandlung mitwirkenden Fermente verändern. Wir bestimmten die Adenosintriphosphatase- und Kreatinphosphoferase-Aktivität von Muskelhomogenaten in Anwesenheit exogen zugegebener Substrate.

Bei diesen Untersuchungen gingen wir der obigen Beschreibung entsprechend vor, mit dem Unterschied, dass wir nicht mit flüssiger Luft abgekühlten Alkohol benutzten, sondern die narkotisierten Frösche unmittelbar mit flüssiger Luft einfrieren liessen, um die auf Alkoholwirkung gegebenenfalls eintretende oberflächliche Denaturierung zu vermeiden. Bei der Fixierung auf diese Weise war in der von uns untersuchten Fermentfunktion der Muskeleiweisse keine Veränderung zu beobachten.

Von den gefrorenen Extremitäten präparierten wir die zur nervdurchtrennten und Kontrollseite gehörenden Gastrocnemien heraus und lösten sie ab. Nach etwa 10 Minuten lässt der Gefrierzustand soweit nach, dass die Muskeln gemahlen oder homogenisiert werden können. Von den mit destilliertem Wasser oder mit 0,1 *M* KCl im Verhältnis 1 : 2 bereiteten Homogenaten verglichen

wir — auf das Muskelfeuchtgewicht oder den Eiweissgehalt berechnet — gleiche Mengen. Einen typischen Versuch veranschaulicht Abb. 1.

Die Untersuchungen ergeben, dass in der Adenosintriphosphatase-Aktivität des nervdurchtrennten und Kontrollmuskels kein wesentlicher Unterschied besteht, während sich demgegenüber das ATP + Kr ⇌ KrP + ADP-Gleichgewicht im nervdurchtrennten Muskel im Vergleich zum Kontrollmuskel in Richtung des oberen Pfeils verschiebt. Diese Fermentuntersuchungen wurden an 5 Fröschen vorgenommen und in allen Fällen mit dem obigen Beispiel übereinstimmende Resultate erzielt.

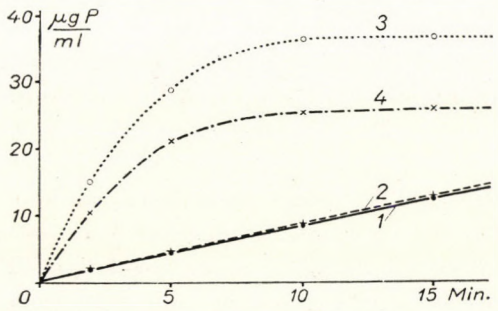


Abb. 1. Untersuchung der Adenosinphosphatase- und Kreatinphosphoferase-Aktivität der aus dem M. gastrocnemius von Fröschen hergestellten Muskelhomogenate
Zusammensetzung des Versuchsgemisches: je ml 4 mg Muskelhomogenat, 0,1 *M* pH = 8,6 Glykokollpuffer, 1 mg ATP bzw. hierzu noch 4 mg Kr.

1 = Adenosintriphosphatase-Aktivität des Muskels auf der durchschnittenen Seite
2 = Adenosintriphosphatase-Aktivität des Kontrollmuskels
3 = Kreatinphosphoferase-Aktivität des Muskels auf der durchschnittenen Seite
4 = Kreatinphosphoferase-Aktivität des Kontrollmuskels

Ähnliche Beobachtungen machten wir auch bei Untersuchung der Muskeln der mit Novocain behandelten Frösche. Diese Versuche wurden in 4 Fällen durchgeführt und ergaben ähnliche Kurven wie auf Abb. 1. Hier verschiebt sich auf Wirkung der im Muskel befindlichen Kreatinphosphoferase die Reaktion auf der novocainbehandelten Seite in Richtung des oberen Pfeils.

Das Gefrieren der passiv gespannten Muskeln war — wie schon erwähnt — ziemlich umständlich, so dass wir nicht in allen Fällen eindeutige ATP- und KrP-Veränderungen erhielten; mit diesen Muskeln wurden Fermentversuche nicht vorgenommen.

Besprechung

Bei den an Froschmuskeln durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sich der ATP- und KrP-Gehalt des Muskels auf Wirkung der Tonusverschiebung verändert. Bei der mittels Nervdurchtrennung und Novocaineinführung herbeigeführten Tonusverminderung enthält der Muskel

mit herabgesetztem Tonus etwa 15 Minuten später mehr KrP und weniger ATP als der entsprechende Kontrollmuskel. Bei passiver Spannung ist eine umgekehrte Veränderung zu beobachten: der Muskel mit erhöhter Tension weist weniger KrP und mehr ATP auf als der Parallelmuskel. Im letzteren Fall erhielten wir nicht immer identische Resultate.

Wir stellten fest, dass diese Veränderungen wahrscheinlich auf Wirkung des Kreatinphosphoferase-Ferments stattfinden. Aus den Muskeln mit verschiedenem Tonus stellten wir Homogenate her und untersuchten die Fermentfunktion in Anwesenheit zugegebener Substrate. Es wurde festgestellt, dass sich das durch Kreatinphosphoferase katalysierte Gleichgewicht: ATP + + Kr $\rightleftharpoons$ ADP + KrP im Muskel mit herabgesetzter Tension im Vergleich zum Kontrollmuskel in Richtung der KrP-Zunahme verschoben hat.

Im Zusammenhang mit den chemischen Prozessen der Muskelkontraktion wurden die ATP- und KrP-Veränderungen in letzter Zeit von zahlreichen Autoren untersucht. Einige Forscher, z. B. LUNDSGAARD [11] und MUNCH-PETERSEN [12] stellten ATP-Verminderung fest, während FLECKENSTEIN [13] und MOMMAERTS [14] bei der Kontraktion keine Veränderung der ATP-Menge beobachten konnten. Nach LANGE [15] findet ebenfalls ATP-Veränderung statt.

Diese widersprechenden Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die Verschiedenheiten und Fehler der angewandten Methoden zurückzuführen. LUNDSGAARD erzielte die Relaxation des Muskels durch vorsichtige Abkühlung und brachte die Kontraktion mit flüssiger Luft zustande, MUNCH-PETERSEN lähmte die Frösche mit Tubocurarin und führte den Gefrierzustand nach elektrischer Reizung mit flüssigem Propan herbei. FLECKENSTEIN löste die Kontraktion durch elektrische Reizung und Eintauchen in isotonische KCl-Lösung aus und brachte die Muskeln dann mit flüssiger Luft zum Gefrieren. MOMMAERTS fixierte den Muskel nach der Reizung mit flüssigem Propan. Bei der Bewertung dieser Versuche muss berücksichtigt werden, dass auch die plötzlich erfolgende Abkühlung Kontraktur verursachen kann und man nicht nachzuprüfen vermag, welche Veränderung während dieser Behandlung in den Phosphatestern vor sich geht.

Bei unseren Untersuchungen arbeiteten wir *in situ* am ganzen Tier, die Muskeln wurden in verschiedenen Tonuszustand versetzt und die parallelen Muskeln in dem auf -100 — $-110°$ C abgekühlten Alkohol auf einmal eingefroren. So stellten wir nach Möglichkeit klar umschriebene Bedingungen her, welche die Bewertung der Resultate ermöglichen.

LORÁND [10] fand bei seinen Untersuchungen über die Muskelfunktion, dass Kreatinphosphoferase bei der Relaxation eine Rolle spielt. Unsere Versuche ergeben darüber hinaus, dass dieses Ferment auch an den Kontraktionsprozessen unmittelbar teilnimmt, d. h. zwischen der Muskelfunktion und dem durch das Kreatinphosphoferase-Ferment katalysierten Prozess ein enger Zusammenhang besteht.

Die Untersuchungen bringen uns dem Verständnis der Rolle des Kreatinphosphoferase-Ferments in der Muskelkontraktion näher, wenn sie auch nicht völlig beweisen, dass die KrP- und ATP-Veränderung *während* der Kontraktion vor sich geht. Um diese Frage zu klären, bedarf es weiterer genauerer Untersuchungen der Kontraktionsphasen.

Die hier erzielten Ergebnisse weisen auch noch auf ein anderes Problem der Muskelfunktion hin. Die Tonusverminderung hatten wir mittels Nervdurchschneidung und durch Novocainverabreichung erzielt. Als wir vor der Durchtrennung des Ischiadicus Curare gaben, konnten wir unter den energiereichen Phosphatestern der Muskeln keine Verschiebung beobachten. Mit Curare wurde die unmittelbare Wirkung des Nervs ausgeschaltet ; eine Phosphatübertragung war hiernach nicht festzustellen, d. h. es scheint, dass die KrP- und ATP-Veränderung auf neuralen Einfluss vor sich geht. Auf Grund dieser Erfahrung stellen unsere Ergebnisse einen Beitrag zur Auffassung von der neuromuskulären Einheit dar.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei Versuchen an Gastrocnemien von Fröschen *(Rana esculenta* und *temporaria)* wurde festgestellt, dass nach der Tonusveränderung, bei Verminderung der Tension, der Muskel im Vergleich zum kontralateralen mehr KrP und weniger ATP enthält. Bei passiver Spannung ist im Vergleich zur Kontrolle die KrP-Menge geringer, die ATP-Menge grösser.

Auch in der Kreatinphosphoferase-Aktivität der aus den in verschiedenem Zustand fixierten Muskeln bereiteten Homogenate wurden Abweichungen festgestellt. Infolgedessen kann angenommen werden, dass die bei den energiereichen Phosphatestern beobachteten Unterschiede durch die Funktion dieses Ferments zustande kamen.

LITERATUR

1. Lundsgaard, E. : Biochem. Z. **217**, 162 (1930) ; **227**, 51 (1930).
2. Nachmansohn, D. : Biochem. Z. **196**, 73 (1928) ; **208**, 237 (1929).
3. Meyerhof, O., Lundsgaard, E., Blaschko, H. : Biochem. Z. **236**, 326 (1931).
4. Lohmann, K. : Biochem. Z. **231**, 264, 278 (1934).
5. Feuer, Gy. : Acta Physiol. Hung. **7**, 13 (1955).
6. Feuer, Gy. : Acta Physiol. Hung. **6**, Suppl. 74 (1955).
7. Alexejewa, A. M. *(Алексеева, А. М.)*: Биохимия **16**, 97 (1951).
8. Lohmann, K., Jendrassik, L. : Biochem. Z. **178**, 419 (1926) ; **194**, 306 (1928) ; **202**, 466 (1928).
9. Kovách, A. : A Kísérleti Orvostudomány Vizsgálómódszerei. Akadémiai Kiadó, Budapest (1954). **II**, S. 679.
10. Lóránt, L. : Nature **172**, 1181 (1953).
11. Lundsgaard, F. : Proc. Roy. Soc. *B* **137**, 73 (1950).
12. Munch-Petersen, A. : Acta Physiol. Scand. **294**, 202 (1953).
13. Fleckenstein, A., Janke, I., Davies, R. E., Krebs, H. A. : Nature **174**, 108 (1954).
14. Mommaerts, W. F. H. M. : Nature **174**, 1083 (1954).
15. Lange, G. : Biochem. Z. **326**, 172, 225, 369 (1955).

AMYLASESYNTHESE IN EINEM LÖSLICHEN SYSTEM AUS PANKREAS

Von

Á. ULLMANN und F. B. STRAUB

CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen am 31. Juli 1956)

In früheren Untersuchungen haben wir nachgewiesen, dass in Homogenaten des Taubenpankreas, sowie in der »Mitochondrienfraktion« solcher Homogenate, wenn man diese Präparate in Gegenwart eines Aminosäuregemisches und einer hohen Konzentration von ATP inkubiert, eine Zunahme der Amylaseaktivität zu beobachten ist. Indirekte Beweise unterstützten die Folgerung, dass es sich hier um die Synthese des Fermentmoleküls handelt [1, 2, 3].

Ein Homogenat oder dessen isolierte Granülen besitzen noch immer Permeabilitätshindernisse, so dass sie für die Untersuchung des Mechanismus dieser Reaktion nicht den günstigsten Fall bedeuten. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir unsere Erfahrungen mit einem gelösten System, das von den genannten Strukturen frei, jedoch imstande ist, Amylase zu synthetisieren. Es werden weitere Beweise aufgeführt, die dafür sprechen, dass die Zunahme der Amylaseaktivität analog der Eiweisssynthese aus Aminosäuren ist. Über diese Ergebnisse erschien eine »Vorläufige Mitteilung« [4].

Methoden

1. *Reinigung des Azetons.* Zu 1 Liter Azeton (puriss.) werden 4 g $KMnO_4$ und 100 ml einer 6 %igen Na_2CO_3-Lösung zugesetzt. Das Gemisch wird bei Zimmertemperatur 36—48 Stunden lang stehen gelassen, von Zeit zu Zeit umgerührt. Während dieser Zeit darf nur ein kleiner Teil des $KMnO_4$ reduziert werden. (Kommt eine ausgiebige Reduktion zustande, so wird dieses Azeton nicht weiter verarbeitet). Nach der Behandlung mit $KMnO_4$ wird das Gemisch filtriert und dann destilliert. Die Fraktion zwischen 56—59° C wird mit geglühtem $CaCl_2$ (p. a.) versetzt. Nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur wird das Azeton abgegossen und destilliert. In dunkler Flasche aufbewahrt, ist das Azeton für 1 Monat haltbar.

2. *Darstellung des Azetontrockenpulvers.*

a) *Aus Taubenpankreas.* Nach Dekapitieren wird das Pankreas sofort herausgeschnitten, vom Bindegewege befreit und in 15—20 ml —10° C kaltes Azeton geworfen, das sich in einem, in gesalztem Eis vorgekühlten POTTERschen Glashomogenator befindet. Die Homogenisierung wird 1—2 Minuten lang vorgenommen, das Rohr soll inzwischen aus dem Kältegemisch nicht herausgenommen werden. Das Gemisch wird durch einen (im Kälteraum vorgekühlten) Büchner-Trichter rasch abgesaugt, und der nasse Rückstand wieder in —10° C kaltes Azeton (15—20 ml) gebracht. Nun wird das Gemisch wieder 1 Minute lang homogenisiert, rasch abgesaugt und im Kälteraum in einen Exsikkator über $CaCl_2$ gelegt und in Vakuum getrocknet. Das Pulver soll innerhalb 5—10 Minuten trocken sein und innerhalb 10 Minuten zum Versuch verwendet werden.

b) *Aus Hundepankreas.* Der Hund wird durch Entblutung getötet, eventuell in Chloralose-Narkose. Nachdem wird das Pankreas herausgenommen, vom Bindegewebe befreit in einem

gekühltem Becherglas in Stücke von ungefähr 2 g geschnitten. Die einzelnen Stücke werden in ca. 20 ml —10° C kaltem Azeton, wie oben beschrieben, homogenisiert. Ein Teil des Bindegewebes bleibt dabei zurück. Das Homogenat wird in ein Becherglas gegossen (das Becherglas ist auch in Kältemischung gekühlt) und das am Boden bleibende Bindegewebe weggeworfen. Während die weiteren Portionen des Pankreas in derselben Weise homogenisiert werden, vereinigt man das Gemisch. Dann wird es in Kälte rasch abgesaugt, der nasse Rückstand mit —10° C kaltem Azeton verrührt und in ebensoviele Portionen, durch Zugabe von insgesamt desselben Azetons, wie vorher, zum zweiten Male je 1 Minute lang homogenisiert. Die (gut gekühlten) zweiten Homogenate werden vereinigt und in Kälte rasch abgesaugt. Der Rückstand wird in einem Exsikkator über $CaCl_2$ in Kälte rasch getrocknet. Bei Aufarbeitung eines grösseren Pankreas von ca. 20 g wird zum vollständigem Trocknen eine längere Zeit (½—1 Stunde) benötigt. Um das Trocknen zu beschleunigen, wird das Pulver inzwischen erneut zerrieben.

c) *Aus Schweinepankreas.* Die Drüse wird vom Schlachthof angeschafft und in Eis gekühlt ins Laboratorium transportiert. Sie wird, so weit wie möglich, vom Fett befreit und weiter wie unter 2*b* verarbeitet.

3. *Aufbewahrung des Trockenpulvers.* Das Azetontrockenpulver soll immer in Kälte in einem evakuierten Exsikkator über $CaCl_2$ gehalten werden. Auch so bewahrt es seine Aktivität nicht länger als 5—10 Stunden.

4. *Wässriges Extrakt.* 1 g Azetontrockenpulver wird mit 5 ml eiskaltem glasdestilliertem Wasser 10 Minuten lang bei 0° C verrührt und dann bei 0° C 10 Minuten lang mit einer Schwerkraft von 14 000 *g* zentrifugiert. Die Wasseraufnahme des Rückstandes ist bedeutend grösser beim Trockenpulver des Taubenpankreas, als bei dem des Hundepankreas, am geringsten ist sie beim Schweinepankreas. Das wässrige Extrakt ist eine klare, gelbliche Flüssigkeit aus Taubenpankreaspulver. Das zentrifugierte Extrakt des Schweinepankreas-Trockenpulvers ist meistens eine trübe, gelbe Flüssigkeit.

5. *Azetat-Niederschlag aus Schweinepankreas-Extrakt.*

Methode A : Das Trockenpulver wird, wie unter 4. beschrieben, mit Wasser extrahiert, der Rückstand abzentrifugiert. 1,5 ml der überstehenden Flüssigkeit werden mit 0,75 ml kaltem destillierten Wasser verdünnt und mit 0,2 ml eines 0,2 *M* Azetatpuffer von pH 4,2 versetzt. Das pH sinkt dabei auf 5,0. Das Gemisch wird bei 0° C mit 8500 *g* 7 Minuten lang zentrifugiert, die überstehende Lösung weggeworfen, der Niederschlag mit 0,2 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt und mit dem Inkubationsgemisch (s. unten) verrührt.

Methode B : 300 mg Azetontrockenpulver werden 10 Minuten lang mit 5 ml kaltem destillierten Wasser verrührt, und mit 10 000 *g* 10 Minuten lang bei 0° C zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird mit 0,2 ml 0,2 *M* Azetatpuffer von pH 4,2 versetzt. Das weitere Verfahren ist wie in Methode A beschrieben.

6. *Entfernen der Amylase durch Adsorption an Stärke.* 4,5 ml eines wässrigen Extraktes aus Hundepankreas-Trockenpulver werden mit 3 g LINTNER-Stärke verrührt und sofort 5 Minuten lang bei 0° C mit 10 000 *g* abgeschleudert. In einigen Fällen wurde die überstehende Flüssigkeit (1,5 ml) in derselben Weise mit einer zweiten Charge von LINTNER-Stärke (1 g) behandelt.

7. *Zusammensetzung des Inkubationsgemisches für die Amylasesynthese.*

Reagenzien :

Als Adenosintriphosphat verwendeten wir das sauere Na-Salz der Firma *Richter*, Budapest. Eine 10 %ige Lösung wird mit KOH auf ungefähr pH 4 gebracht. Diese Lösung wird dann 6—8mal durch eine Kolonne von IRC—50 (Wasserstoffzyklus) getrieben (20 ml Lösung : 1,5 g Austauscher ; Kolonnehöhe 5 cm), mit KOH auf pH 7 eingestellt und in gefrorenem Zustande aufbewahrt. Haltbarkeit : etwa 2 Wochen.

Salzlösung. Die Stammlösungen der Krebs-Bikarbonat-Ringerlösung werden in der doppelten der angegebenen Konzentration bereitet, vor dem Versuch in entsprechenden Proportionen gemischt und mit CO_2 durchgespült. NaCl, KCl und $NaHCO_3$ waren pro analysi Präparate von *Chinoin*, Budapest. $MgSO_4$ und $CaCl_2$ waren pro analysi *Merck* Präparate.

Glyzerin-Salzlösung. 100 ml destilliertes Glyzerin werden mit 7,2 ml einer 4,6 *M* NaCl Lösung gemischt, und von den (doppelt konzentrierten) KCl-, $MgSO_4$-, und $CaCl_2$-Lösungen die entsprechende Menge hinzugefügt.

In der späteren Phase unserer Untersuchungen haben wir KH_2PO_4 und $NaHCO_3$ der Salzlösung nicht mehr zugesetzt. Die hohe Konzentration des Adenosintriphosphats versichert eine sehr starke Pufferung, so dass die genannten Komponenten überflüssig, sogar störend waren.

Eiweisshydrolysat. Wir gebrauchten ein lyophilisiertes Pulver »Protolysate« von *Mead and Johnson.*

Aminosäuregemisch. Die Gesamtkonzentration im Reaktionsgemisch war 0,02 *M*. Die verwendeten Aminosäuren waren: L-Tryptophan, L-Arginin.HCl, D,L-Threonin, D,L-Valin, L-Tyrosin, D,L-Lysin, D,L-Leucin, D,L-Isoleucin, D,L-Histidin.HCl, D,L-Phenylalanin.

Askorbinsäure. Schwermetallfreie Askorbinsäure wird in 0,33 *M* Lösung mit $KHCO_3$ neutralisiert. Die Lösung wird vor jedem Versuch frisch bereitet.

Inkubationsgemisch. 1 ml der ATP-Lösung, 0,24 ml Askorbinsäurelösung, 34 mg Eiweisshydrolysat (oder 0,2 ml einer Lösung von Aminosäuregemisch) werden mit 3,2 ml der doppelt konzentrierten Krebs-Salzlösung oder der Glyzerin-Salzlösung gemischt.

p-Fluor-D,L-Phenylalanin. Das Präparat wurde in unserem Institut von L. Polgár nach der Methode von Bergman [5] dargestellt. Schmelzpunkt: 240° C.

Ribonuklease. Das Ferment wurde in unserem Institut von G. Zachariev aus Rindepankreas nach der modifizierten Kunitz-Methode [6] kristallisiert.

8. *Inkubation.*

A. *Wasserextrakt:* man versetzt 0,4 ml mit 0,6 ml des gekühlten Inkubationsgemisches.

B. *Azetat-Niederschlag:* der Niederschlag aus 1,5 ml Wasserextrakt (s. 5. A) oder der Niederschlag aus dem Extrakt von 300 mg Trockenpulver (s. 5. B) wird mit 0,2 ml kaltem destillierten Wasser aufgeschwemmt und mit 0,7 ml Inkubationsgemisch gelöst.

Wenn die Wirkung irgendwelcher Substanz auf die Amylasesynthese untersucht wird, so wird sie in einem Volumen von nicht mehr als 0,05 ml gelöst zugesetzt. Das Gesamtvolumen in einem Versuch ist 0,8—1,2 ml. Das Reaktionsgemisch wird in kleinen Reagenzröhren in einem Wasserbad von 38° C geschüttelt.

9. *Amylasebestimmung.* Zu bestimmten Zeiten während der Inkubation, werden 0,100 ml des Reaktionsgemisches in 20 ml eiskaltes Wasser pipettiert. Die verschiedenen verdünnten Proben sammelt man in einem Eisbad bis zu Beginn der Amylasebestimmung. Die Bestimmung geschieht nach der Methode von Smith und Roe [7], die wir einigermassen modifizierten. Vor jeder Serienbestimmung versuchen wir in einer Probe das Volumen (meistens 0,5—2 ml) und die Zeit (5—15 Min.) festzustellen, die bei der gegebenen Amylaseverdünnung eben zureicht, um eine Stärke-Spaltung zwischen 40—60% des Ausgangwertes zu verursachen. Die Jodfarbe wird mit Stufenphotometer, oder mit einem objektiven Photokolorimeter bestimmt.

Ergebnisse

I. *Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers*

Ebenso wie im Homogenat [2], ist auch in diesem System zur Steigerung der Amylaseaktivität eine hohe Konzentration von ATP und die Gegenwart von Aminosäuren unentbehrlich. Der Zusatz von Askorbinsäure verursacht eine regelmässige Zunahme der Amylasesynthese, für die Reaktion ist sie aber scheinbar nicht unentbehrlich. Tabelle I zeigt die gefundene Amylasesynthese in Versuchen, wo die Wirkung von ATP und Aminosäuren geprüft wurde. Man sieht ferner, dass dieselben 10 Aminosäuren, die nach Hokin [8] für die Amylasesynthese in Pankreasschnitten nötig sind, das Eiweisshydrolysat ersetzen können.

Die Anwendung von Glyzerin als Lösungsmittel hat bestimmte Vorteile. Die Extrakte aus dem Azetontrockenpulver von Pankreas besitzen immer eine proteolytische Aktivität, die von einem Präparat zum anderen variiert. Diese proteolytische Aktivität kann durch Bestimmung der freien Aminosäuren verfolgt werden. Je höher die Glyzerinkonzentration, umso kleiner ist die Proteolyse, währenddessen die Amylasesynthese bis zu 60 Volumen % Glyzerin nicht beeinflusst wird.

Abb. 1—3 zeigen die Statistik der Versuche, die wir mit Extrakten durchgeführt haben. Man sieht, dass die Synthese in 30 Minuten etwa 10—15%

Tabelle I

Einfluss der zugesetzten Substanzen auf die Amylasesynthese

Inkubationsgemisch: Glyzerin-Salzlösung mit Askorbinsäure

No.	Wasserextrakt des Trockenpulvers aus	Zusätze			Amylaseaktivität zur Zeit 0	Synthese E/ml in 45 Min.
		ATP	EH	10 AS		
1.	Schwein	+	+	—	9100	2200
		+	—	—	10100	0
		—	+	—	10100	400
2.	Taube	+	+	—	2150	390
		+	—	—	2500	60
3.	Hund	+	+	—	3920	580*
		—	+	—	4250	—200*
4.	Taube	+	+	—	2360	370
		+	—	+	2480	430
5.	Taube	+	+	—	2380	310
		+	—	+	2180	320

* Synthese E/ml in 60 Min.

EH: Eiweisshydrolysat.
10 AS: Aminosäuregemisch von 10 Aminosäuren (s. methodischen Teil).

erreicht. Die grosse Labilität des Amylase synthetisierenden Systems erklärt, warum die Synthese im Schweinepankreasextrakt die geringste ist, manchmal

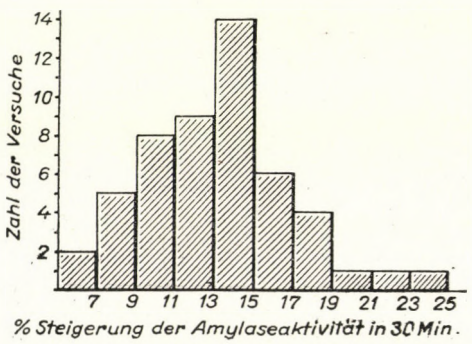


Abb. 1. Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers aus Taubenpankreas. Statistische Verteilung der Ergebnisse: Amylasesynthese in Prozenten der Ausgangsaktivität

sogar fehlt. Offensichtlich beansprucht die Verarbeitung des Gewebes immer längere Zeit in der Reihenfolge: Taube, Hund, Schwein.

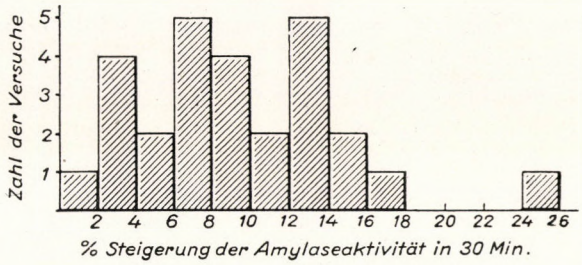


Abb. 2. Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers aus Hundepankreas. Statistische Verteilung der Ergebnisse, wie in Abb. 1

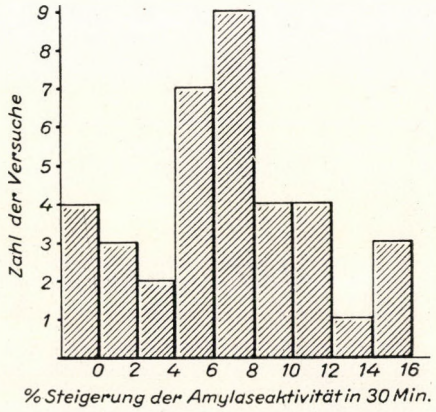


Abb. 3. Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers aus Schweinepankreas. Statistische Verteilung der Ergebnisse, wie in Abb. 1

Der Amylasegehalt im Reaktionsgemisch, zu Beginn der Versuche, zeigte folgende Verteilung :

Azetontrockenpulver aus	Zahl der Versuche	Amylaseaktivität (E/ml) im Reaktionsgemisch zur Zeit 0		Synthese, % (Durchschnitt)
		Durchschnitt	Extremwerte	
Taube	51	3410	1040— 7600	13,6
Hund.....	27	3650	1370— 7000	9,9
Schwein.....	39	7600	980—18400	6,4

II. *Versuche zur Anreicherung des aktiven Systems*

Der hohe Amylasegehalt der wässrigen Extrakte aus dem Azetontrockenpulver bietet grosse technische Schwierigkeiten für die Bestimmung der zusätzlichen Synthese. Wir haben deshalb in zwei Richtungen versucht das präformierte Ferment zu entfernen.

1. *Adsorption an Stärke.* Wie bekannt [9, 10] wird Malzamylase und die Amylase von *Clostridium acetobutylicum* aus einer wässrigen Azetonlösung an Stärke spezifisch adsorbiert. Die Adsorption der Pankreasamylase aus unseren wässrigen Extrakten ist nicht so günstig, gelingt jedoch teilweise bei Anwendung von grossen Stärkemengen und mit bedeutendem Verlust an Volumen des Extraktes. Eine tiefgreifende Entfernung der Amylase ist aber unmöglich,

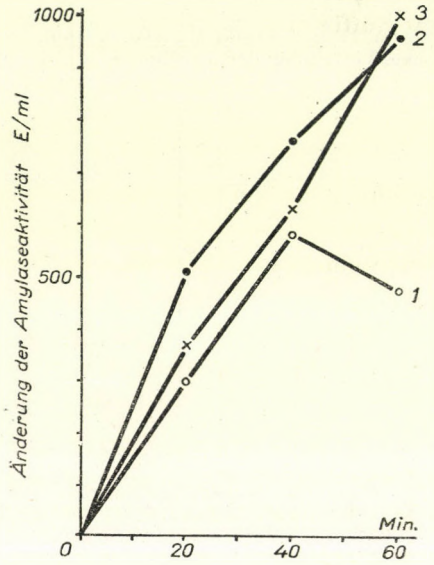


Abb. 4. Amylasesynthese im löslichen System (Hundepankreas). Entfernung der Amylase durch Stärkeadsorption. *1:* Extrakt von 5920 E/ml 8,1 %; *2:* nach einer Stärkebehandlung, von 4690 E/ml 21 %; *3:* nach zwei Stärkebehandlungen, von 3720 E/ml, 27 % Synthese in einer Stunde

da die Stärke offensichtlich auch einige Komponenten des synthetisierenden Systems adsorbiert. Es gelingt jedoch in mehreren Fällen einen Teil der Amylase zu entfernen. Abb. 4 zeigt einen solchen Versuch. Die Ausführung der Stärkeadsorption wurde im methodischen Teil beschrieben. Man sieht, dass die *Menge* der synthetisierten Amylase nach zwei Stärkeadsorptionen unverändert blieb, d. h. in Prozenten des ursprünglichen Amylasegehaltes ausgedrückt, die Synthese immer höher wurde. Diese Methode wurde jedoch des grossen Volumverlustes und der Gefahr des Aktivitätsverlustes wegen nicht weiter verwendet. Der Versuch in Abb. 4 ist jedoch lehrreich, da diese Ergebnisse die Unabhängigkeit der Amylasesynthese von der Menge des präformierten Fermentes beweisen.

2. *Azetatniederschlag.* Schweinepankreas-Trockenpulver ist ein billiges Ausgangsmaterial, hat aber den Nachteil, dass es zu viel Amylase enthält. Wir haben gefunden, dass man aus dem wässrigen Extrakt dieses Pulvers bei pH 5 einen Niederschlag bekommt, in dem das Verhältnis Amylasegehalt :

Amylasesynthesefähigkeit viel günstiger ist, als im ursprünglichen Wasserextrakt. Die Darstellung dieses Azetatniederschlages ist im methodischen Teil beschrieben, Methode A gab bessere Ergebnisse. Es stellte sich aber heraus, dass der Azetatniederschlag gegen Verunreinigungen viel empfindlicher ist, als der Wasserextrakt. Da wir die Natur dieser Verunreinigungen nicht kennen, ist das Präparat des Azetatniederschlages zur Zeit noch nicht als befriedigend zu bezeichnen, oft bekommt man inaktive Präparate. Wir haben trotzdem in mehreren Fällen solche Präparate gebraucht ; weiter unten werden wir Beispiele für ihre Aktivität aufführen.

III. *Spezifische Hemmungen der Amylasesynthese*

Die unten zu beschreibenden Versuche über die Wirkung von spezifischen Hemmstoffen haben wir in allen vier verschiedenen Systemen ausgeführt (Tauben-, Hund- und Schweinepankreas Trockenpulverextrakt, sowie Azetat-

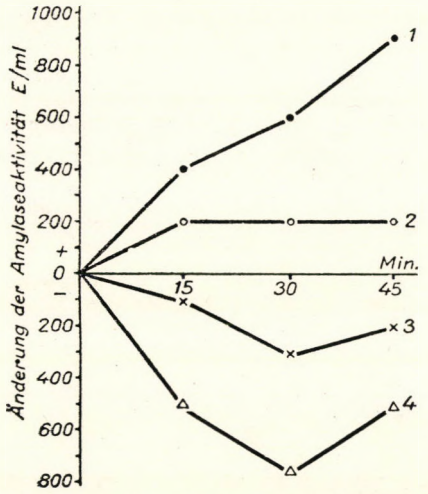


Abb. 5. Wirkung von Chloramphenicol auf die Amylasesynthese. Azetatniederschlag aus Schweinepankreasextrakt nach Methode 5. B. Ausgangsaktivität : 5200 E/ml. *1:* Kontrolle, *2*, *3* und *4:* mit 0,5 μg, 1,5 μg bzw. 4,5 μg D(−)Threo-Chloramphenicol/ml Reaktionsgemisch

niederschlag des Extraktes aus Schweinepankreaspulver) und in allen dieselbe Wirkung gefunden. Deshalb sprechen wir im folgenden von diesen Systemen im allgemeinen, und fassen sie alle unter dem Namen »lösliches System« zusammen.

In unseren früheren Mitteilungen haben wir beschrieben, dass die Steigerung der Amylaseaktivität im Saccharose-Homogenat oder in der »Mitochondrienfraktion« des Taubenpankreas durch Chloramphenicol gehemmt wird.

Die Wirkung von Chloramphenicol in dem löslichen System sieht man am Beispiel der Abb. 5 und 6. Es ist hervorzuheben, dass eine viel kleinere Chloramphenicolkonzentration hemmend wirkt, als im Falle der »Mitochondrien-

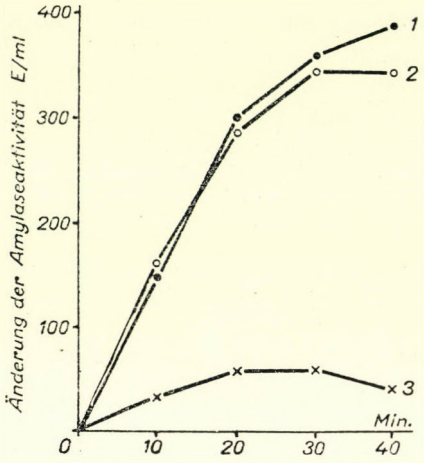


Abb. 6. Spezifität der Chloramphenicolhemmung. Amylasesynthese im löslichen System aus Taubenpankreas. Ausgangsaktivität: 1970 E/ml. *1:* Kontrolle, *2:* mit 1 μg/ml L(+)-Erythro-Chloramphenicol, *3:* mit 1 μg/ml D(−)-Threo-Chloramphenicol

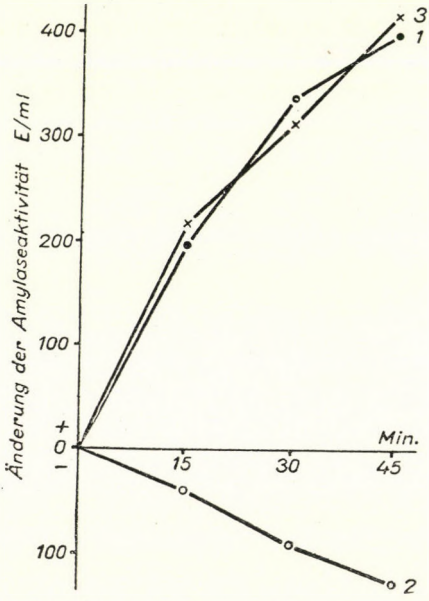


Abb. 7. Wirkung von p-Fluor-D,L-Phenylalanin (p-FPhe) und D,L-Phenylalanin auf die Amylasesynthese im löslichen System. Azetatniederschlag aus Schweinepankreasextrakt (Methode 5. A). Ausgangsaktivität: 980 E/ml. *1:* Kontrolle, *2:* mit 100 μg p-FPhe, *3:* mit 100 μg p-FPhe und 1 mg Phenylalanin

fraktion«. Diese Erscheinung kann wahrscheinlich durch die Abwesenheit von Permeabilitätshindernissen erklärt werden, da im Gewebschnitt 100 μg Chloramphenicol noch wirkungslos sind [11].

p-Fluorphenylalanin wirkt hemmend in Bakterien und hat eine hemmende Wirkung auf die adaptive Fermentsynthese, es hemmt die Inkorporation von radioaktiven Aminosäuren. Diese Hemmung wird durch Phenylalanin kompetitiv aufgehoben [12]. Es wird allgemein angenommen, dass p-Fluor-

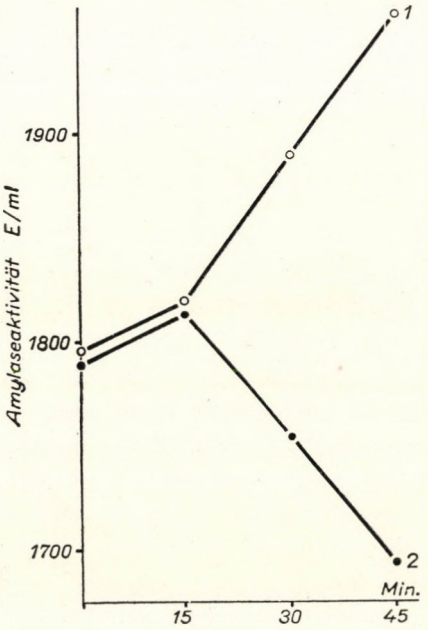


Abb. 8. Wirkung von Ribonuklease auf die Amylasesynthese im löslichen System. Wasserextrakt aus Hundepankreas. Ausgangswert: 1800 E/ml. *1:* Kontrolle, *2:* mit 16 μg kristallisierter Ribonuklease

phenylalanin als Aminosäureanalog die Eiweisssynthese hemmt. Wie aus Abb. 7 ersichtlich, hemmt p-Fluorphenylalanin in kleiner Konzentration die Steigerung der Amylaseaktivität in dem löslichen System. Die Hemmung ist durch Zugabe der zehnfachen Konzentration von D,L-Phenylalanin vollständig aufgehoben.

Ribonuklease (aus Rindepankreas) hemmt die Steigerung der Amylaseaktivität, wie aus Abb. 8 ersichtlich. Das kristallisierte Ferment war frei von proteolytischer Aktivität, die Vernichtung der Amylasesynthese kann also nicht den proteolytischen Beimengungen der Ribonuklease zugeschrieben werden, umso weniger, da ja unser gelöstes System selbst eine hohe proteolytische Aktivität besitzt.

Besprechung

Wir verzichten auf eine eingehende Besprechung der in dieser Arbeit beschriebenen Befunde, da weitere Versuche, die gleichzeitig veröffentlicht werden [12] einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Amylasesynthese erlauben. An dieser Stelle möchten wir darauf hinweisen, dass es gelungen ist, in einem löslichen System *in vitro* die Synthese eines Fermentes hervorzurufen, eine Synthese, die Energetisierung (ATP) und Aminosäuren braucht. Die Ergebnisse der spezifischen Hemmungen dieser Synthese durch Ribonuklease, Chloramphenicol und p-Fluorphenylalanin laufen parallel mit den Ergebnissen, die man bei der adaptiven Fermentsynthese in den bekannten mikrobiologischen Systemen, und mit jenen Ergebnissen, die man an verschiedenen Objekten mit Hilfe der Inkorporation rakioaktiver Aminosäuren über den Mechanismus der Eiwesssynthese gewonnen hat. Der Mechanismus der Amylasesynthese in diesem löslichen System scheint also mit der Eiweisssynthese aus Aminosäuren identisch oder nahe verwandt zu sein.

In Homogenaten und »Mitochondrienpräparaten« aus Taubenpankreas haben wir eine höhere prozentuale Zunahme der Amylaseaktivität gefunden, als in dem löslichen System. Trotzdem besitzen die Versuche mit dem letzteren eine bessere Beweiskraft. Im Homogenat und im »Mitochondrienpräparat« ist ein Teil der Amylase in gebundener Form zugegen. Im löslichen System gibt es keine Zellstrukturen mehr und durch Behandlung mit Butanol konnten wir nie gebundenes Ferment nachweisen. Obwohl in dem von uns beschriebenen Reaktionssystem auch im Homogenat und im »Mitochondrienpräparat« die Zunahme der Amylaseaktivität nicht durch eine Demaskierung gebundenen Fermentes erklärbar war, bringen diese Versuche mit dem gelösten System weitere Beweise dafür, dass die Steigerung der Amylaseaktivität *in vitro* eine wirkliche synthetische Reaktion bedeutet.

Zu Beginn unserer Arbeit über Amylasesynthese im Homogenat fanden wir, dass diese Erscheinung nur in Gegenwart einer recht hohen ATP-Konzentration zu beobachten ist. Wir fanden damals, dass Pankreashomogenate und die daraus erhaltene »Mitochondrienfraktion« ATP sehr rasch abbauen können. Das gelöste System hat eine sehr schwache Adenosintriphosphatase-Aktivität. Trotzdem braucht man dieselbe hohe Konzentration. Diese Konzentration ist etwa zweimal so hoch, wie die auf die ganze Zelle berechnete Konzentration der ATP-reichen Zellen. Es ist jedoch leicht möglich, dass die ATP-Konzentration an Ort und Stelle der synthetischen Reaktionen auch in den Zellstrukturen die von uns benutzte Konzentration erreicht.

Über die Natur der aktiven Stoffe, die die Amylasesynthese in diesem löslichen System hervorrufen, wäre noch verfrüht etwas zu sagen. Wenn wir von einem löslichen System sprechen, so soll diese Nomenklatur betonen, dass im Extrakt des Azetontrockenpulvers diejenige Strukturen, in denen das aktive

System in der Zelle vorkommt, nicht mehr vorhanden sind. Aus einem Saccharosehomogenat wird die Amylase synthetisierende Aktivität fast vollständig durch Zentrifugieren mit 14000 *g* enfernt, währenddessen wird aus dem Extrakt des Azetontrockenpulvers (ohne Saccharose) keine Aktivität bei dieser Schwerkraft abgesetzt. Trotzdem ist es leicht möglich, dass das lösliche System solche Strukturen enthält, deren Partikelgrösse diejenige der Eiweisskörper weit überschreitet.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Wasserextrakt aus speziell dargestelltem Azetontrockenpulver von Pankreasgewebe synthetisiert Amylase, wenn ein Aminosäuregemisch und eine hohe Konzentration von Adenosintriphosphat zugesetzt werden. Dieses lösliche System ist sehr labil. Die Amylasesynthese wird durch kleine Konzentrationen von Chloramphenicol (1 μg/ml), p-Fluorphenylalanin (0,1 mg/ml), und Ribonuklease gehemmt. Diese spezifischen Wirkungen zeigen, dass der Mechanismus der Amylasesynthese mit der Eiweisssynthese aus Aminosäuren identisch, oder sehr nahe verwandt ist.

LITERATUR

1. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **6**, 377 (1954).
2. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Ibid. **8**, 279 (1955).
3. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Ibid. **10**, 137 (1956).
4. Straub, F. B., Ullmann, Á., Ács, G.: Biochim. Biophys. Acta **18**, 439 (1955).
5. Bergmann, E. D.: J. Am. Chem. Soc. **74**, 4948 (1952).
6. Biochemical Preparations (ed. by E. E. Snell), Wiley, New York, (1953). Vol. **3**, p. 9.
7. Smith, B. W., Roe, J. H.: J. Biol. Chem. **179**, 53 (1949).
8. Hokin, L. E.: Biochem. J. **48**, 320; **50**, 216 (1951).
9. Starkenstein, E.: Biochem. Z. **24**, 210 (1910).
10. Hockenhull, D. J. D., Herbert, D.: Biochem. J. **39**, 102 (1945).
11. Rychlik, K.: persönliche Mitteilung.
12. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11**, 31 (1956).

INKORPORATION RADIOAKTIVER AMINOSÄUREN UND AMYLASESYNTHESE IM PANKREASGEWEBE IN VITRO

Von

T. GARZÓ, K. PERL, M. T.-SZABÓ, Á. ULLMANN und F. B. STRAUB

CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen am 31. Juli 1956)

In einigen Mitteilungen unseres Laboratoriums [1, 2, 3] haben wir beschrieben, dass die Amylaseaktivität nicht nur in den aerob inkubierten Taubenpankreasgewebschnitten [4], sondern auch in einem Saccharosehomogenat, sowie in der sogenannten »Mitochondrienfraktion«, und sogar in einem Wasserextrakt des Azetontrockenpulvers (»lösliches System«) des Pankreas zunimmt. Es wurde angenommen, dass es sich in allen diesen Fällen um die Synthese des Fermentproteins handelt. Die Beweise waren alle indirekt und es schien unbedingt notwendig, diese Ergebnisse mit Hilfe der Messung der Inkorporation radioaktiver Aminosäuren zu kontrollieren.

Methoden

Über die Darstellung der Gewebeschnitten sei auf die Arbeit von HOKIN [4] hingewiesen Die »Mitochondrienfraktion« und der Wasserextrakt des Azetontrockenpulvers wurden nach den von ULLMANN und STRAUB beschriebenen Methoden dargestellt [2, 3]. In denselben Arbeiten findet man auch die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, das für die Gewebeschnitten selbsverständlich ganz anders, als für die anderen Systeme war.

3—4 Gewebeschnitten von insgesamt 50—100 mg Frischgewicht wurden in einer entsprechenden Anzahl von Warburg-Gefässen inkubiert (Gasraum: Sauerstoff mit 5% CO_2), das Gesamtvolumen war 3 ml. Der Inhalt eines Gefässes wurde zum gewünschten Zeitpunkt in Kälte homogenisiert und aus Aliquoten wurde dann die Amylaseaktivität und die Radioaktivität der Eiweisskörper bestimmt.

Die »Mitochondrienfraktion« und das lösliche System wurden in einem kleinen Reagenzglas inkubiert, aus dem zu bestimmten Zeitpunkten je 0,100 ml für die Bestimmung der Amylaseaktivität und 0,5 ml für die Bestimmung der Inkorporation genommen wurden.

Die Bestimmung der Amylaseaktivität geschah nach der Methode von SMITH und ROE [5.] Über die Aufarbeitung der Proben siehe [4], bzw. [1—3].

Die angewendeten radioaktiven Aminosäuren erhielten wir von der Ungarischen Atomenergiekommission. Glyzin und D,L-Tyrosin waren in der Karboxylgruppe mit C^{14} markiert, die spezifische Aktivität war 62,5, bzw. 25 mC/mg.

Für die Bestimmung der Inkorporation wurde ein Teil des Reaktionsgemisches (5—15 mg Protein) mit Trichloressigsäure gefällt. Die Aufarbeitung der Proben führten wir nach der Methode von GREENBERG et al. [6] aus. Die folgende Modifikation war eingeführt: nach der Entfernung der säurelöslichen Komponenten, Nukleinsäuren und Lipiden wurde der gewaschene Rückstand mit absolutem Alkohol in einem kleinen Glashomogenisator fein zerteilt. Aus dieser feinen Suspension wurde ein Aliquot auf einem Aluminiumplättchen unter infraroter Lampe getrocknet, ein Teil der Suspension diente für die Trockengewichtsbestimmung.

Die C^{14}-Aktivität wurde mit einem Durchströmungszähler bestimmt. Wir haben die Präparate in derart dünner Schicht aufgetragen, dass keine Korrektion für Selbstabsorption nötig war (100 $\mu g/cm^2$). Parallele Bestimmungen gaben innerhalb 5 Prozenten übereinstimmende

Ergebnisse, dieser Fehler wurde nur bei ganz kleinen Aktivitäten — die als negativ bezeichnet wurden — überschritten.

Die spezifische Aktivität wird in dieser Arbeit als Stösse/Min./mg Eiweiss angegeben. Die in einem Versuch zugegebene Menge radioaktiver Aminosäure wird in Stösse/Min. angegeben, berechnet aus der Aktivität einer entsprechenden Verdünnung in derselben Geometrie gemessen.

Ergebnisse

1. *Taubenpankreas-Gewebeschnitten*

Der zeitliche Verlauf der Inkorporation ohne Zugabe von Aminosäuregemisch ist in Abb. 1 dargestellt. Abb. 2 zeigt die Inkorporation in Gegenwart eines Eiweisshydrolysates (2 mg/ml).

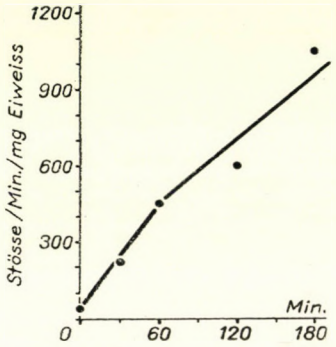


Abb. 1. Tyrosin-C^{14}-Einbau in Gewebeschnitten von Taubenpankreas. Krebs-Ringer Lösung ohne Zugabe von Aminosäuren. Tyrosin-C^{14} zur Zeit $0 : 3 \cdot 10^5$ Stösse/Min./Gefäss. Gesamttyrosin nach 180 Min. : 156 μg

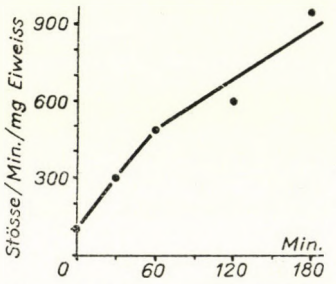


Abb. 2. Tyrosin-C^{14}-Einbau in Gewebeschnitten von Taubenpankreas. Krebs-Ringer Lösung mit 12 mg Eiwesshydrolysat in 3 ml. Tyrosin-C^{14} zur Zeit $0 : 2 \cdot 10^5$ Stösse/Min./Gefäss. Gesamttyrosin nach 180 Min. : 366 μg

Tabelle I stellt die Versuchsergebnisse zusammen, von denen man sieht, dass die Amylasesynthese und die Inkorporation gleichfalls stimuliert werden, wenn man der Suspensionsflüssigkeit das Eiweisshydrolysat zugibt (Versuch 1—2). Bei der Auswertung der Inkorporation muss daran gedacht werden,

Tabelle I

Amylasesynthese und Inkorporation in Gewebeschnitten

Taubenpankreas-Gewebeschnitten aerob bei 37° inkubiert

Versuch Zusatz	Zeit (Stunden)	Amylase E/mg Frischgewicht	Spezifische Aktivität Stösse/Min./mg	C^{14} Zusatz Stösse/Min./Gefäss
1. ohne ASG	0	30	45	Tyrosin
« «	3	40	1030	$3 \cdot 10^5$
mit ASG	3	53	2070	
2. ohne ASG	0	16	—	Glyzin
« «	2	25	1070	$4 \cdot 10^5$
mit ASG	2	27	3740	
3. mit ASG	0	33	86	Tyrosin
« «	3	57	945	$2 \cdot 10^5$
« « + 0,3 mg/ml p-FPhe	3	49,5	930	
4. ohne ASG	0	20,4	—	Tyrosin
« «	3	30	2900	$4 \cdot 10^5$
« « + 1,5 mg/ml p-FPhe	3	26	700	
5. mit ASG	0	34	—	Glyzin
« «	3	71,5	2670	$4 \cdot 10^5$
« « + 3,3 mg/ml p-FPhe	3	50	615	
« « + 3,3 mg/ml p-FPhe + + 6,6 mg Phe	3	55	364	
6. mit ASG	0	16,3	—	Glyzin
« «	2	26,8	3740	$4 \cdot 10^5$
« « + 1,73 mg/ml p-FPhe	2	21,6	540	
« « + 1,73 mg/ml p-FPhe + + 13,3 mg/ml Phe	2	25,4	565	
7. mit ASG	0	18,8	—	Tyrosin
« «	2	38,2	1117	$4 \cdot 10^5$
« « + 1,67 mg/ml p-FPhe	2	27,2	459	
« « + 1,67 mg/ml p-FPhe + + 13,3 mg Phe	2	28	261	

ASG: Aminosäuregemisch (lyophilisiertes Eiweisshydrolysat), Endkonzentration: 0,2%. p-FPhe: D,L-p-Fluorphenylalanin. Phe: D,L-Phenylalanin.

dass das Aminosäuregemisch das Isotop-Tyrosin mehr als zweifach verdünnt. Die Inkorporation ist demgemäss durch Zugabe des Aminosäuregemisches

etwa 5fach erhöht. Die Ergebnisse der Versuche 3—7 zeigen, dass p-Fluorphenylalanin die Inkorporation und die Amylasesynthese gleichfalls hemmt. Um eine ausgeprägte Hemmung zu erreichen, braucht man aber eine viel höhere Konzentration dieser Substanz, als im »löslichen System« [3]. Dies hängt vielleicht eben damit zusammen, dass die Hemmung durch Zugabe von Phenylalanin nicht aufgehoben werden konnte, da die letztere in ganz unphysiologisch hohen Konzentrationen zugesetzt werden musste.*

2. *Homogenat und »Mitochondrienfraktion« aus Taubenpankreas*

Diese Präparate besitzen auch die Fähigkeit, Amylase in Gegenwart von Aminosäuren zu synthetisieren. Es ist aber unbedingt nötig, dass die Konzentration von Adenosintriphosphat im Reaktionsgemisch hoch sei, wobei die Reinheit dieser Substanz von grösster Bedeutung ist [2, 3]. Die Präparate enthalten eine beträchtliche Menge gebundener Amylase, die unter manchen Bedingungen (z. B. leichte Alkalisierung, Schädigung der Granülen, Behandlung mit Ribonuklease) freigesetzt wird. In diesen Fällen beobachtet man auch eine starke Zunahme der Amylaseaktivität, die aber mit der Synthese nichts zu tun hat. Diese zwei Erscheinungen können durch die Beobachtung der Chloramphenicolhemmung getrennt werden. In Gegenwart von 50 μg Chloram-

Tabelle II

Amylasesynthese und Aminosäureinkorporation im Homogenat und in der »Mitochondrienfraktion« des Taubenpankreas

Nr.	Präparat	Zusatz	Amylase E/ml		C^{14}-Aminosäure zugesetzt Stösse/Min./ml	Spezifische Aktivität der Eiweisskörper	
			0 Min.	45 Min.		0 Min.	45 Min.
1	Homogenat	0	1740	2020	$2 \cdot 10^5$ Tyrosin	—	± 0
	«	Cha	1750	1780	$2 \cdot 10^5$ «	—	± 0
2	Homogenat	0	920	1040	$1 \cdot 10^6$ «	± 0	± 0
3	»Mitochondrien« ...	0	1300	1675	$3{,}5 \cdot 10^5$ «	37 ± 15	93 ± 25
	« ...	Cha	1300	1400	—	—	—
4	»Mitochondrien« ...	0	2520	3120	$3{,}0 \cdot 10^5$ «	± 0	± 0
5	»Mitochondrien« ...	0	1125	1245	$1{,}7 \cdot 10^6$ «	± 0	± 0
6	»Mitochondrien« ...	0	1510	2100	$3{,}0 \cdot 10^4$ Glyzin	± 0	27 ± 18

»± 0« bedeutet, dass die spezifische Aktivität innerhalb des statistischen Fehlers blieb. »—« bedeutet: nicht gemessen. Cha: 50 μg Chloramphenicol/ml.

* Als wir diese Arbeit abgeschlossen haben, erschien die Arbeit von YOUNATHAN und FRIEDEN [7]. Diese Autoren haben gefunden, dass die Amylasesynthese hemmende Wirkung von p-Fluorphenylalanin (10^{-3} *M*) durch Zugabe von Phenylalanin in Gewebeschnitten von Taubenpankreas aufgehoben werden kann.

phenicol wird die wahre Synthese gehemmt, das Freiwerden von gebundenem Ferment wird dabei nicht beeinflusst.

Tabelle II enthält einige Versuche, die wir mit Homogenaten und »Mitochondrienfraktion« durchgeführt haben. In keinem Falle haben wir eine nennenswerte Inkorporation gefunden. Dies ist klar, wenn man diese Ergebnisse mit denen der Tabelle I vergleicht. Dieser Vergleich ist dadurch möglich, dass in beiden Fällen ungefähr dieselbe Menge radioaktiver Aminosäuren pro mg Eiweiss zugesetzt wurde.

Folgende Berechnung zeigt, dass die gefundene kleine Inkorporation mit der gemessenen Amylasesynthese in Widerspruch steht. Im Versuch 3. waren 13 mg Eiweiss/ml, und es wurde eine Synthese von 280 Amylase Einheit/ml, d. h. rund 70 μg Amylase gemessen (die Zunahme im Versuch mit Chloramphenicol wurde abgezogen). Die Konzentration des freien L-Tyrosins war 50 μg/ml. Es wurde also

$$\frac{93 \times 13 \times 50}{0{,}5 \times 3{,}4 \times 10^5} = 0{,}34\ \mu\text{g/ml}$$

Tyrosin eingebaut. Mit der gefundenen Synthese von 70 μg Amylase steht diese Zahl in keinem Verhältniss, wäre auch alles Tyrosin in das Protein der Amylase eingebaut. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir mit Glyzin und die gemessenen Werte waren eher kleiner, als der oben berechnete.

3. *Lösliches System*

Tabelle III enthält einige Beispiele der Versuche, die wir mit dem »löslichen System« durchgeführt haben. Man findet hier in den meisten Fällen eine kleine Inkorporation, die ebenso, wie die Synthese der Amylase, durch Chloram-

Tabelle III

Amylasesynthese und Inkorporation im Wasserextrakt des Trockenpulvers aus Pankreas
Im Reaktionsgemisch war eine Mischung von 9 Aminosäuren, wie in [3] angegeben, ohne Tyrosin

Nr.	Herkunft des Präparates	Zusatz	Amylase E/ml		C^{14} Tyrosin zugesetzt töss.e/Min./ml	Spezifische Aktivität der Eiweisskörper	
			0 Min.	30 Min.		0 Min.	30 Min.
1	Taubenpankreas ...	0	3340	3920	$5 \cdot 10^5$	± 0	114 ± 15
	« ...	Cha	3550	3650	$5 \cdot 10^5$	± 0	± 0
2	Hundenpankreas...	0	3800	4130	$1{,}5 \cdot 10^5$	35 ± 10	70 ± 20
	« ...	Cha	3500	3420	$1{,}5 \cdot 10^5$	37 ± 10	± 0
3	Taubenpankreas ...	0	2570	3050	$2{,}4 \cdot 10^5$	68 ± 36	276 ± 45
	« ...	Cha	2200	2400	$2{,}4 \cdot 10^5$	—	70 ± 50

»± 0« bedeutet eine Aktivität innerhalb des statistischen Fehlers, »—« bedeutet: nicht gemessen. Cha: 1 μg/ml Chloramphenicol.

phenicol gehemmt wird. Diese Inkorporation ist in Abwesenheit von Adenosintriphosphat viel kleiner, ist also mit irgendeiner synthetischen Reaktion verbunden. Wenn man aber aus der Fermentaktivitätszunahme die Amylasesynthese berechnet, so findet man auch hier, wie im Falle des Homogenats und der Mitochondrienfraktion, dass die Inkorporation all zu klein ist, um eine *de novo* Synthese der Amylase zu unterstützen.

Besprechung

Die Zunahme der Amylaseaktivität und die Inkorporation von radioaktivem Glyzin und Tyrosin verlaufen unabhängig voneinander, wenn man die Gewebschnitten und die Homogenate oder Extrakte des Pankreas vergleicht. Während die Gewebschnitten ebensogut Amylase synthetisieren und Aminosäuren einbauen können, bleibt in den granülären zellfreien Fraktionen und in dem »löslichen System« nur die Fähigkeit, Amylase zu synthetisieren. In diesen letzteren Systemen kann also von einer *de novo* Synthese der Amylase von Aminosäuren keine Rede sein.*

In den früheren Mitteilungen unseres Laboratoriums wurden die Beweise aufgezählt [1, 2, 3], die eine Aktivierung von gebundener Amylase ausschliessen. Die Möglichkeit, dass die betreffenden Amylasen gerade Glyzin und Tyrosin nicht erhalten, ist kaum zu beachten, obwohl über die Zusammensetzung dieser Fermente noch nichts näheres bekannt ist. Demnach bleibt die Möglichkeit der partiellen Synthese von Amylase aus einem vorhandenen Eiweissstoff. Diese Möglichkeit wurde experimentell bewiesen, worüber in der nachfolgenden Arbeit berichtet wird [9].

ZUSAMMENFASSUNG

In Gewebeschnitten des Taubenpankreas werden parallel mit der Amylasesynthese radioaktives Glyzin und Tyrosin in die Eiweissfraktion eingebaut.

Die Amylasesynthese im Homogenat, Mitochondrienfraktion und im Wasserextrakt des Azetontrockenpulvers aus Taubenpankreas ist nicht mit dem Einbau dieser Aminosäuren verbunden.

* H. Borsook [8] erwähnt, dass Hokin den Einbau markierter Aminosäuren in die Pankreasamylase in Gewebschnitten beobachtet hat. Diese Arbeit ist uns nicht bekannt. An Hand der Ergebnisse, die in der folgenden Arbeit veröffentlicht werden, wäre die Auswertung solcher Ergebnisse nicht so einfach, man erwartet, dass die Inkorporation in das Amylasemolekül mit der Zeit ansteigen wird.

LITERATUR

1. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **6**, 377 (1954); **8**, 279 (1955).
2. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **10**, 137 (1956).
3. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11**, 11 (1956); Vorläufige Mitteilung: Biochim. Biophys. Acta **18**, 439 (1955).
4. Hokin, L. E.: Biochem. J. **48**, 320; **50**, 216 (1951).
5. Smith, B. W., Roe, J. H.: J. Biol. Chem. **179**, 53 (1949).
6. Rabinovitz, M., Olson, M. E., Greenberg, D. M.: J. Biol. Chem. **210**, 837 (1954).
7. Younathan, E. S., Frieden, E.: J. Biol. Chem. **220**, 801 (1956).
8. Borsook, H.: Chemical Pathways of Metabolism, Academic Press, New York, [1954]. Vol. II, p. 215.
9. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11**, 31 (1956).

ÜBER DEN MECHANISMUS DER AMYLASESYNTHESE IN VITRO

Von

Á. Ullmann und F. B. Straub

CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen am 31. Juli 1956)

In früheren Arbeiten aus unserem Institut wurde beschrieben, dass *in vitro*, in einem Homogenat, oder in der »Mitochondrienfraktion«, sowie in dem Wasserextrakt des Azetontrockenpulvers aus Pankreas, Amylase aus Aminosäuren synthetisiert wird [1, 2, 3]. Die quantitative Auswertung der Inkorporation radioaktiver Aminosäuren (Glyzin, Tyrosin) zeigte jedoch, dass diese Aminosäuren nicht in das Fermentmolekül eingebaut werden [4]. Diese von uns gemessene Synthese der Amylase ist also keine Totalsynthese des Fermentproteins aus Aminosäuren. Demgemäss haben wir die Frage gestellt, welche Aminosäuren von dem Eiweisshydrolysat zur Erhöhung der Amylaseaktivität nötig seien. Wie unten beschrieben wird, entsteht Amylase aus einem Proferment, wenn ausser Adenosintriphosphat (ATP) nur zwei Aminosäuren: Threonin und Arginin, dem Präparat aus Taubenpankreas zugegeben werden.

Methoden

Die Darstellung der »Mitochondrienfraktion« und die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, in dem diese Fraktion für die Beobachtung der Amylasesynthese inkubiert wird, wurde in einer früher erschienenen Arbeit beschrieben [2]. Über die Darstellung des Azetontrockenpulvers und des glyzerinhaltigen Reaktionsgemisches für dessen Untersuchung, siehe unsere vorangehende Mitteilung [3]. Anstatt des Eiweisshydrolysats benützen wir eine Mischung einzelner Aminosäuren, wie im Text angegeben. Das Reaktionsgemisch war von dem in [3] angegebenen nur dadurch verschieden, dass wir keine Askorbinsäure mehr zugaben, da diese Substanz in Gegenwart von reinen Aminosäuren überflüssig war. Die benutzten Aminosäuren waren: L-Arginin.HCl und D,L-Threonin.

Ergebnisse

Den Einfluss verschiedener Aminosäurekombinationen auf die Amylasesynthese haben wir mit Mitochondrienpräparaten und mit dem Wasserextrakt des Azetontrockenpulvers gleichfalls untersucht. Da die Ergebnisse prinzipiell dieselben waren, die Synthese aber — in Prozenten der Ausgangsaktivität ausgedrückt — im ersteren System immer höher ist, war es bequemer, die orientierenden Versuche mit der »Mitochondrienfraktion« auszuführen. Tab. I zeigt die Ergebnisse, die wir mit den verschiedenen Aminosäurekombinationen erhalten haben.

Tabelle I.

Einfluss verschiedener Aminosäuren auf die Synthese der Amylase

Versuchszeit mit »Mitochondrien«: 45 Min., mit dem »löslichen System«: 30 Min. — Thre: D,L-Threonin, Arg: L-Arginin·HCl, Phe: D,L-Phenylalanin, His: L-Histidin·HCl, Leu: D,L-Leucin, Ileu: D,L-Isoleucin, Val: D,L-Valin. — Neben jedem Versuch führten wir eine Kontrolle aus, entweder durch Hemmung mit Chloramphenicol, oder ohne Zugabe von Aminosäuren. Die kleine Synthese oder Verminderung der Amylase in dieser Kontrolle wurde mit entsprechendem Vorzeichen in den Zahlenwerten der Tabelle berücksichtigt

Nr.	Präparat aus Taubenpankreas	Aminosäurequelle	Konzentration der Aminosäuren mg/ml	Amylase E/ml am Anfang	Synthese E/ml
1	»Mitochondrien«	Eiweisshydrolysat	4,0	965	+260
	«	Thre, Arg, His, Phe	1,0—1,0	1030	+175
	«	Phe	2,0	1200	0
2	»Mitochondrien«	Eiweisshydrolysat	4,0	1040	+130
	«	Leu, Ileu, Val, Lys	0,5—0,5	950	— 40
	«	Thre, Arg, His, Phe	0,5—0,5	940	+190
3	»Mitochondrien«	Eiweisshydrolysat	4,0	1560	+100
	«	Thre, His, Phe	0,5—0,5	1570	+ 20
	«	Arg, His, Phe	0,5—0,5	1260	— 50
	«	Thre, Arg, Phe	0,5—0,5	1220	+100
4	»Mitochondrien«	Thre, Arg	0,5—0,5	1780	+900
	«	Arg, Phe, His	0,5—0,5	1580	+420
5	»Mitochondrien«	Thre, Arg	0,5—0,5	1145	+615
	«	Arg	0,5	1585	+225
	«	Thre	0,5	1340	+410
6	»Mitochondrien«	Eiweisshydrolysat	4,0	750	+190
	«	Thre, Arg	0,5—0,5	585	+170
7	»Mitochondrien«	Eiweisshydrolysat	4,0	3530	+530
	«	Thre, Arg	0,5—0,5	3560	+835
8	»Mitochondrien«	Eiweisshydrolysat	4,0	600	+300
	«	Thre, Arg	0,5—0,5	610	+300
9	»Lösliches System«	Eiweisshydrolysat	4,0	4940	+560
	« «	Thre, Arg	0,5—0,5	3930	+600
	« «	Arg, His	0,5—0,5	4530	—130
	« «	Thre, His	0,5—0,5	4800	+ 50

Man sieht, dass Threonin und Arginin das Eiweisshydrolysat vollständig ersetzen können. Zunächst wurde die Frage geprüft, ob die früher untersuchten spezifischen Hemmsubstanzen [1, 2, 3] bei Anwendung von Threonin und Arginin dieselbe Wirkungen wie bei Anwendung des Eiweisshydrolysates ausüben können. Abb. 1—3 zeigen die Ergebnisse, die bestätigen, dass Chloramphenicol,

Ribonuklease und p-Fluorphenylalanin die Amylasesynthese in diesem vereinfachten System ebenso hemmen, wie im früheren System, wo wir noch mit einem vollständigen Eiweisshydrolysat arbeiteten.

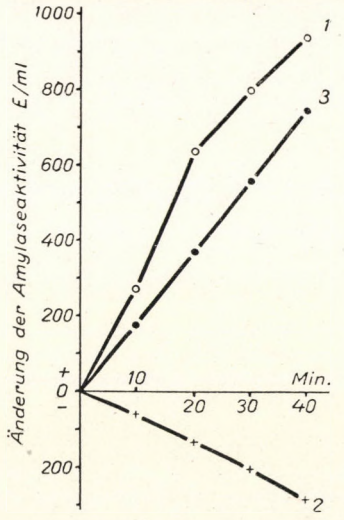


Abb. 1. Chloramphenicolhemmung der Amylasesynthese. Aminosäuren: DL-Threonin, $5 \cdot 10^{-3}$ *M* und L-Arginin. HCl, $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M*. Wasserextrakt aus Taubenpankreaspulver. *1:* Kontrolle, *2:* mit 1,0 µg/ml D(−)Threo-Chloramphenicol, *3:* mit 1,0 µg/ml L(+)Erythro-Chloramphenicol. Ausgangsaktivität 4150 E/ml

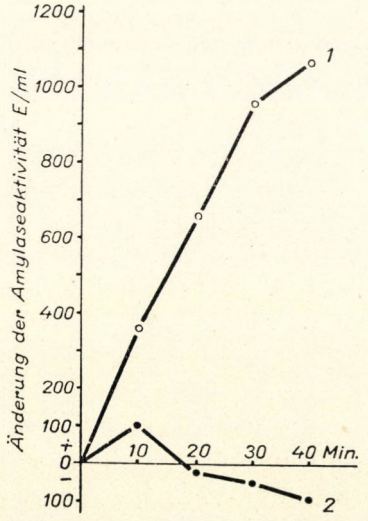


Abb. 2. Ribonukleasehemmung der Amylasesynthese. Aminosäuren: DL-Threonin, $5 \cdot 10^{-3}$ *M* und L-Arginin·HCl, $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M*. Wasserextrakt aus Taubenpankreaspulver. *1:* Kontrolle, *2:* mit 20 µg/ml Ribonuklease. Ausgangsaktivität: 4540 E/ml

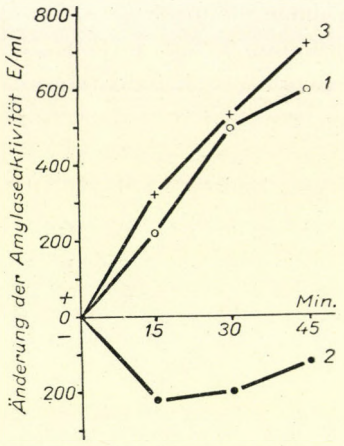


Abb. 3. p-Fluorphenylalaninhemmung der Amylasesynthese. Aminosäuren: DL-Threonin, $5 \cdot 10^{-3}$ *M* und L-Arginin·HCl, $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M*. Wasserextrakt aus Taubenpankreaspulver. *1:* Kontrolle, *2:* mit 0,1 mg/ml p-Fluor-DL-Phenylalanin, *3:* mit 0,1 mg/ml p-Fluor-DL-Phenylalanin und 1,0 mg/ml DL-Phenylalanin. Ausgangsaktivität: 3590 E/ml

Besprechung

Die Versuche zeigen, dass in Gegenwart einer »Mitochondrienfraktion«, oder eines Wasserextraktes des Azetontrockenpulvers aus Taubenpankreas, die Synthese der Amylase ATP, Threonin und Arginin benötigt. Die Zugabe weiterer Aminosäuren ist ohne Einfluss.

In unseren früheren Versuchen haben wir gefunden, dass in zellfreien Systemen die Synthese der Amylase durch Zugabe von Askorbinsäure wesentlich gefördert wird [1]. In den Versuchen, wo Threonin und Arginin die einzigen zugesetzten Aminosäuren waren, fanden wir keine Erhöhung der Synthese durch Zusatz von Askorbinsäure. Anscheinend enthält das lyophilisierte Eiweisshydrolysat hemmende Substanzen, deren Wirkung durch die Askorbinsäure teilweise aufgehoben wird. Dieser Auffassung entspricht unser Befund, dass in mehreren Fällen die Amylasesynthese grösser mit Threonin und Arginin, als mit dem vollständigen Eiweisshydrolysat war.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass im Pankreasgewebe die Amylase aus einem Proferment durch eine synthetische Reaktion ausgebildet wird. Die synthetische Natur der Reaktion folgt daraus, dass ATP für die Reaktion unentbehrlich ist, ferner daraus, dass Substanzen, die die Eiweisssynthese hemmen, die Ausbildung der Amylase ebenso verhindern. An Hand unserer Ergebnisse ist es noch nicht bewiesen, dass Threonin und Arginin in das Amylasemolekül eingebaut werden. Die Möglichkeit einer Transpeptidierung (nach Aktivieren der Aminosäuren mit ATP) wäre mit unseren Ergebnissen ebenso gut vereinbar, wie der Einbau der betreffenden Aminosäuren in die Mitte oder am Ende der Polypeptidkette des Proferments.

Theoretisch wäre es auch möglich, dass Threonin und Arginin für die Synthese irgendwelchen Stoffes nötig sind, dessen Ausbildung dann das Freiwerden einer maskierten Amylasefraktion verursacht. Gegen diese Annahme kann man einwenden, dass im Wasserextrakt des Azetontrockenpulvers mit den sonst üblichen Aufschliessungsverfahren (Behandlung mit Butanol oder mit Ribonuklease, oder Alkalisierung) kein gebundenes Ferment nachgewiesen werden kann.

In jedem Falle ist aber die Ausbildung des aktiven Ferments ein synthetischer Vorgang und in dieser Hinsicht prinzipiell verschieden von der Ausbildung der aktiven proteolytischen Fermente aus ihren Profermenten. Ein weiterer merkwürdiger Unterschied zwischen diesen Vorgängen ist die Teilnahme der Ribonukleinsäurefraktion in der Synthese der Amylase aus dem entsprechenden Proferment.

Es gibt bisher noch keine direkte Angabe dafür, dass die Ribonukleinsäuren in der Umformung von Eiweissstoffen teilnehmen. KORITZ und CHANTRENNE [5] haben den zeitlichen Verlauf der Inkorporation radioaktiver Aminosäuren, der Bildung von Ribonukleinsäuren und der Ausbildung von Fermenten in Retikulozyten *in vivo* verglichen, und aus ihren Ergebnissen die Hypothese entwickelt, dass die Ribonukleinsäuren vielmehr in der Differenzierung von Urproteinen, als in ihrer Entstehung teilnehmen. Sie zählen auch die früheren Arbeiten auf, in denen ähnliche Gedanken entwickelt wurden. Mit der Hypothese der zweistufigen Ausbildung der Eiweisskörper können vielleicht die Befunde von ANFINSEN und STEINBERG [6, 7] und VAUGHAN und ANFINSEN [8] eine neuartige Erklärung finden.

Für den Fall der Amylasesynthese sind besonders die Ergebnisse von MIRSKY und Mitarbeiter von grösstem Interesse. ALLFREY, DALY und MIRSKY [9] haben mit N^{15} eine schnelle Inkorporation in der Ribonukleoproteide der Mikrosomen gefunden. Die Geschwindigkeit der Erneuerung dieser Fraktion war aber eng mit der Phase der sekretorischen Funktion des Pankreas verbunden, so dass die Autoren den Schluss gezogen haben, dass die sekretorischen Fermente über Prekursoren gebildet werden. In einer anderen Arbeit fanden dieselben Autoren, dass die Markierung der gereinigten Proteasen immer höher war, als die Markierung der Fraktion, die den hypothetischen Prekursor enthält [10]. Sie bemerken, dass diese Ergebnisse die Annahme eines Proteinprekursors nicht unterstützen, obwohl sie ihn auch nicht ausschliessen, da ja die Markierung einer gereinigten Fraktion mit der eines Gemisches verglichen wurde und in dem letzteren die Markierung etwas steiler ansteigt.

Die Versuche von VAUGHAN und ANFINSEN [8] zeigten eine Inkorporation in Gewebeschnitten in das Molekül der Ribonuklease und nach BORSOOK [11] fand HOKIN eine ähnliche Inkorporation in das Amylasemolekül in Gewebeschnitten *in vitro*. Diese Befunde sprechen nicht gegen unsere Folgerungen. Wir konnten zeigen, dass die Synthese der Amylase in der »Mitochondrien-

fraktion« beendet wird. Diese Fraktion zeigt aber allein keine Inkorporation von Glyzin und Tyrosin [4]. In intakten Geweben tritt laut den heutigen Ansichten die Aminosäuremarkierung erst in die Mikrosomen ein [12, 13]. Die erwähnten Versuche von ALLFREY, DALY und MIRSKY [9] haben dies eben für die Pankreasmikrosomen gezeigt. Es ist also möglich anzunehmen, dass das Proferment in den Mikrosomen *de novo* aus Aminosäuren synthetisiert wird und dann zu den Mitochondrien wandert, wo schliesslich die Sekretionsfermente ausgebildet werden. Ein solcher Mechanismus wäre mit den zytophysiologischen Arbeiten von HIRSCH [14] gut vereinbar, gleich dem Befund von JUNQUEIRA, HIRSCH und ROTHSCHILD [15], dass *in vivo* die radioaktive Markierung, trotz der fortwährenden Sekretion, erst nach einer Stunde in den Sekretionsproteinen des Pankreas erscheint. Mit Hilfe von C^{14} markiertem Blutplasma haben diese Autoren bewiesen, dass die Plasmaproteine nicht zur Bildung der Sekretionsfermente verbraucht werden können. Demgemäss nehmen wir an, dass das Ferment im Pankreas selbst entsteht.

Mikrosomen	»Mitochondrien« (grössere Granülen)	Sekretionsgranülen
de novo Synthese aus Aminosäuren	ATP + Arginin + Threonin	
↓		
Proferment →	→ Amylase	→

In den Gewebeschnitten findet man in 2 Stunden eine 100%ige oder noch höhere Zunahme der Amylaseaktivität. Im Mitochondriensystem ist die Zunahme 20—50% und ist in 30—45 Minuten meistens beendet. Entweder sind die Mitochondrien derart labile Strukturen, dass sie in dieser Periode ihre Synthesefähigkeit verlieren, oder ist der Vorrat in Proferment in der Mitochondrienfraktion beschränkt. In den Gewebeschnitten besteht die Möglichkeit der weiteren Synthese von Proferment und dadurch eine grössere Zunahme der Amylaseaktivität, sowohl auch die Inkorporation der zugegebenen Markierung. Unserer Auffassung nach soll die Markierung der Amylase eine Latenzperiode aufweisen, wenn man sie mit der Markierung des Gesamteiweisses vergleicht.

ALLFREY, DALY und MIRSKY [9] zeigen in einem Präparat aus Rattenleber, dass die Kombination der Mitochondrien und Mikrosomen ein System darstellt, das die radioaktive Aminosäure inkorporiert. Die Vorbehandlung der Mikrosomen mit Ribonuklease verringert diese Inkorporation. Die Ribonukleasehemmung der Amylasesynthese ist ein ganz verschiedener Fall. Wir konnten diese Amylasesynthese (aus Proferment, Threonin und Arginin) allein auf die Mitochondrien lokalisieren, deshalb müssen wir annehmen, dass die Ribo-

nukleasehemmung im Wasserextrakt durch die Spaltung der aus Mitochondrien stammenden Ribonukleinsäuren zustande kommt. (Die Wirkung der Ribonuklease auf die Amylasesynthese in der Mitochondrienfraktion selbst konnte nicht untersucht werden, da in diesem System Ribonuklease eine beträchtliche Menge gebundener Amylase freisetzt.)

Die mit der Templat-Hypothese verknüpfte »*de novo*« Theorie der Eiweisssynthese nimmt spekulativ an, dass die aktivierten Aminosäuren auf der spezifisch gebauten Oberfläche der Nukleinsäuren in bestimmter Anordnung adsorbiert werden [16, 17]. Die hemmende Wirkung der Aminosäureanalogen (z. B. p-Fluorphenylalanin) und auch anderer Stoffe (wie Chloramphenicol, Diaminoakridinen) wird dadurch erklärt, dass diese Substanzen die Adsorption der Aminosäureradikalen an der Oberfläche verhindern [18, 19, 20].

Im Falle der Amylasesynthese aus Proferment, Threonin und Arginin, fanden wir mit Ribonuklease, Chloramphenicol, p-Fluorphenylalanin und 3,6-Diaminoakridin ebensolche Hemmungen, wie diejenigen, von denen man die obenerwähnte Theorie der »*de novo*« Synthese abgeleitet hat. Bleibt man in demselben Gedankenkreis, so muss man annehmen, dass mehrere Elemente des Mechanismus der »*de novo*« Synthese mit dem der Amylasesynthese identisch sind. Als eine eindeutige Beschreibung wäre anzunehmen, dass das Proferment an die Oberfläche der Ribonukleinsäure adsorbiert werden muss, um die aktivierten Threonin- und Argininmoleküle einbauen zu können.

Mit dieser Vorstellung wäre die hemmende Wirkung der genannten Substanzen erklärbar, obwohl die Deutung der Beseitigung der p-Fluorphenylalaninhemmung durch Phenylalanin einige Schwierigkeiten bietet.

Über die Komponenten des Systems, das die Amylasesynthese in der beschriebenen Weise verwirklicht, können wir heute noch nichts näheres sagen. Es ist aber möglich die Komponenten aus dem löslichen System zu isolieren und die Art der Teilnahme der Ribonukleinsäuren zu entscheiden. Es ist eine weitere Frage, wie weit diese Ergebnisse, die wir mit der Amylasesynthese erreicht haben, auf die Synthese anderer Sekretionsfermente im Pankreas und in anderen Drüsen, oder auf die Synthese anderer Eiweisskörper übertragbar sind. Offenbar bedeutet es eine Ökonomie für die Zelle und bietet die Möglichkeit der Änderung durch äusseren Einfluss, wenn nur eine beschränkte Zahl von primären, artspezifischen Eiweisskörpern »*de novo*« synthetisiert werden, aus welchen dann, durch kleine Veränderungen in der zweiten Phase, die Synthese der substratspezifischen Proteine abzweigen kann. Die analytischen Arbeiten von KEIL und ŠORM [21] gründen sich auf ähnliche Gedanken.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Mitochondrienfraktion und in einem Wasserextrakt aus Azetontrockenpulver des Pankreas, wird Amylase aus einem Proferment synthetisiert. Die Ausbildung der Amylase aus dem Proferment braucht Adenosintriphosphat, Threonin und Arginin.

Ribonuklease vernichtet diese Reaktion, und es wird angenommen, dass die Synthese der Amylase an der Oberfläche der Ribonukleinsäuremoleküle vor sich geht, das Proferment muss an dieser Oberfläche adsorbiert werden, um mit Threonin und Arginin reagieren zu können.

LITERATUR

1. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **8**, 279 (1955).
2. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **10**, 137 (1956).
3. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11**, 11 (1956).
4. Garzó, T., Perl, K., T.-Szabó, M., Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11**, 23 (1956).
5. Koritz, S. B., Chantrenne, H.: Biochim. Biophys. Acta **13**, 209 (1954).
6. Anfinsen, C. B., Steinberg, D.: J. Biol. Chem. **189**, 739 (1951).
7. Steinberg, D., Anfinsen, C. B.: J. Biol. Chem. **199**, 25 (1952).
8. Vaughan, M., Anfinsen, C. B.: J. Biol. Chem. **211**, 367 (1954).
9. Allfrey, V. G., Daly, M. M., Mirsky, A. E.: J. Gen. Physiol. **37**, 157 (1953).
10. Daly, M. M., Allfrey, V. G., Mirsky, A. E.: J. Gen. Physiol. **39**, 207 (1955).
11. Borsook, H.: Chemical Pathways of Metabolism. Academic Press, New York, (1954). Vol. II., p. 215.
12. Hultin, T.: Exp. Cell. Res. **1**, 376 (1950).
13. Borsook, H., Deasy, C. C., Haagen-Smit, A. J., Keighley, G., Lowy, P. H.: J. Biol. Chem. **187**, 839 (1950).
14. Hirsch, G. C.: Z. Zellforsch. Mikr. Anat. **15**, 36 (1932).
15. Junqueira, L. C. U., Hirsch, G. C., Rotschild, H. A.: Biochem. J. **61**, 275 (1955).
16. Dounce, A. L.: Enzymologia **15**, 251 (1952).
17. Lipmann, F.: Mechanism of Enzyme Action, The John Hopkins Press, Baltimore, (1954). p. 601.
18. Virtanen, A. I.: Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. AII, Chem. **36**, 3 (1949).
19. Wissemann, C. L., Smadel, J. E., Hahn, F. E., Hoppe, H. E.: J. Bacter. **67**, 662 (1954).
20. Dénes, G., Kramer, M., Polgár, L.: Acta Physiol. Hung., in the press.
21. Keil, B., Sorm, F.: Collection Czechoslov. Commun. **19**, 1018 (1954).

Physiologia

ESTERASE ACTIVITY OF SERUM PROTEIN FRACTIONS

By

I. PINTÉR

INSTITUTE OF PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, SZEGED

(Received January 16, 1956)

As it has been described in a preliminary report [6] paper electrophoresis has been combined with a histochemical method of esterase assay in order to study the relationship of serum proteins to serum esterase. It has been shown that in human serum the enzyme would separate into two, or eventually into three fractions.

Since biochemical estimations have shown that the esterases in the sera from different species differ in behaviour [10, 3, 8], in the experiments described in this paper sera from man, cat, dog, rat, horse and rabbit were studied to determine the esterolytic activity of the different protein fractions.

Materials and methods

The fundamental features of our method are that the fresh, haemolysis-free serum is run in the paper electrophoresis apparatus and that the serum thus broken up into fractions is subjected to an esterase reaction. As well known, the esterases in tissue (ali-esterase, cholin-esterase) can be localised histochemically on the basis of their ability to split β-naphtyl-acetate, when β-naphtol and acetic acid are released [2, 7]. The β-naphtol liberated by hydrolysis forms with α-naphtylamine an azo-dye insoluble in water and at the site of enzymic activity a purple colour appears. This procedure, which has been developed for tests on histological sections, is now employed for the demonstration of the enzymic activity of protein fractions separated on filter paper.

Exclusively male, normal, middle-aged animals were used as source of blood, which was obtained either by venipuncture, or, from smaller animals, by heart puncture. No anti-coagulant was used. After the blood had coagulated and the cake had retracted, the serum was centrifuged for 10 minutes, at medium speed. The undiluted, haemolysis-free serum was worked up within 12 hours and was stored in a refrigerator until use. The protein fractions of the sera thus obtained were separated by paper electrophoresis in a wet chamber. The volume of serum brought up on a single paper strip was 0,02 ml and electrophoresis was carried out for 20 hours with 3,5 V/cm, 0,3 mA/cm, at room temperature, using MICHAELIS' barbiturate buffer of an ionic strength of 0,1, and pH 8,4. After electrophoresis the 8 cm wide strips were halved longitudinally. One of the halves was fixed for 30 minutes at 110° C in an exsiccator then stained with 0,1 per cent acid fuchsin, by the usual technique. The other half was immediately incubated without fixing, for 6 minutes at room temperature in the following solution

β-naphtylacetate	0,01	g
acetone	0,5	ml
2 *M* NaCl solution	25	ml
phosphate buffer, pH 7,4	10	ml
distilled water	14,4	ml
diazoted α-naphtylamine	0,1	ml

In the second minute of incubation, single areas of the filter paper begin to show the purple colour characteristic of the enzymatic reaction. The colour then increased in intensity. After 6 minutes the reaction was interrupted and the strip of filter paper, after fixation in 10 per cent acetic acid for 10 minutes, was horizontally stretched and dried at room temperature.

In order to identify the cholinesterase fraction, inhibition with physostigmine was carried out in every experiment. The strips of filter paper containing the protein fractions were placed into a 3.10^{-5} molar solution of physostigmine salicylate for 2 minutes and the same concentration physostigmine was maintained also during the subsequent incubation. As a result of the blocking action of physostigmine, the cholinesterase strip fails to appear during incubation, while the activity of the ali-esterases remains unchanged.

It must be pointed out that even the fraction thus obtained cannot be considered to be cholinesterase in its total amount, since physostigmine may block other esterases, too. The term »cholinesterase fraction« used throughout this paper should therefore be understood to mean all the esterases blocked by physostigmine.

Results

We have succeeded in demonstrating esterolytic activity in all the sera from man and other species tested by means of the combined naphtylacetate-electrophoretic method.

The relations found in the single sera are summarized as follows.

Human serum (Fig. 1). As it has been described in detail in a previous paper [6], in the human serum the esterase activity appeared in two isolated strips, of which one (strip A) was identical in electrophoretic mobility with albumin and α_1 globulin, while the other (strip C) was localized to the α_2, as well as to the α_2 and β globulin areas. In many a case a diffuse staining occurred between strips A and C, that, however, could be accepted as being a third strip with reservation only (this »third strip« has been denoted as strip B in the preliminary report referred to). Under the influence of physostigmine, strip C did not appear at all, while strip A developed with an unchanged intensity. This seemed to suggest that strip C contained the cholinesterase fraction, while strip A, in all probability, the ali-esterase.

Dog serum (Fig. 2) yielded a pattern more or less similar that of human serum.

Two well-defined enzyme strips appeared, a more mobile extensive fraction, falling into the area of the α globulin, and a paler, thin second strip in the area of the β fraction.

Inhibition with physostigmine resulted in the disappearance of the less mobile second strip and in a considerable fading of the first fraction.

Horse serum (Fig. 3) also showed relations similar to those in human serum.

A very intensive strip with a protracted „base" in the α globulin, and a thin, pale strip in the β globulin area were found.

Treatment with physostigmine resulted in the disappearance of the pale strip, a loss in the intensity of the more mobile fraction, with the »base« remaining unchanged.

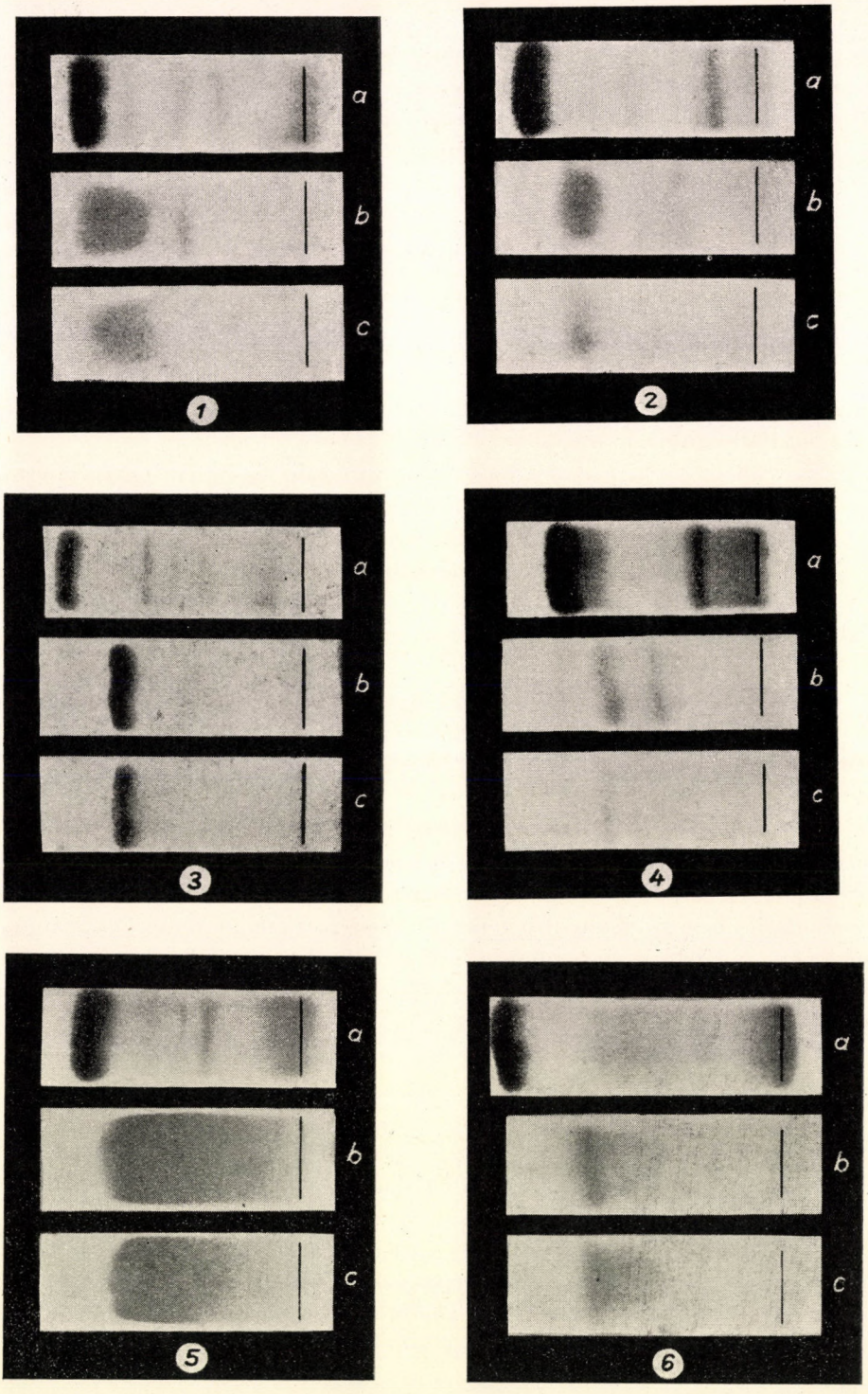


Fig. 1—6.

Rat serum (Fig. 4) displayed a characteristic trifractional pattern.

Each of the three strips was well-defined, with sharp outlines. In the order of increasing mobility there were a strip of medium strength, partly in the β globulin area, partly between β and α; an intensive strip in the α region, and, finally, a very pale strip in the albumin area.

Under the influence of physostigmine, the least mobile fraction failed to appear, the activity of the middle fraction was significantly decreased, while that of the most mobile fraction was unchanged.

Rabbit serum (Fig. 5) showed the highest enzymic activity.

An intensive, flattened strip appeared on the filter paper, extending from the baseline to the albumine fraction, which is almost attained. The first one-third of this esterase strip (up to α_1 globulin) was much more intensive, than the next part. It seems that the two strips (or the two elongated strips) were partially overlapping.

Treatment with physostigmine had practically no effect on the pattern.

Cat serum (Fig. 6) showed a pattern similar to that of rabbit serum.

Two, clearly overlapping strips were seen, one intensive, thin fraction in the area between albumin and α globulin, and a paler, elongated strip forming the base of the former strip, in the regions corresponding to albumin, α and β globulin, respectively.

Physostigmine had no appreciable inhibitory effect.

The relations described for the single species were identical in several experimental animals. The enzyme reaction has been carried out (under identical conditions) in 4 dogs, 4 horses, 8 rats, 6 rabbits and 6 cats. 20 men were tested.

A comparison of the results reveals that the patterns of dog, horse and, partially, of rat serum were similar to each other and to the pattern yielded by human serum. Rabbit and cat serum were similar to one another, with the similarity being obvious also in regard of physostigmine inhibition. In human, horse, rat and dog sera inhibition affected the least mobile enzyme fraction and, except in man, also the more mobile fractions lost some of their original intensity.

In contrast with this, the »overlapping« fractions of the rabbit and cat sera were practically unaffected by inhibition.

Discussion

The results of the experiments indicate that, as in the case also with human serum, the serum-esterase activity of the species tested is not uniform, but is composed of 2 or 3 fractions. The inhibition tests seem to indicate that, in some of the species tested, different enzymes bring about hydrolysis of the

cholinesters. Their relation to the serum proteins of the single enzyme fractions can precisely be located by comparison to adequate protein-duplicates. It often occurs that enzyme fractions do not coincide with well-defined protein fractions. It is conceivable that, since infinitely small amounts of enzyme take part in the reaction, the minute quantities of protein present in the areas mentioned represent the enzyme protein. Moreover, it is also possible that by virtue of their lipoprotein character, the enzyme proteins give but a faint colour reaction with fuchsin.

The intensity of the colour of the esterase stripes did not allow to draw definite conclusions as to the absolute quantity of enzyme, since the reaction was carried out at the same pH in every case, and that pH could not be optimal for each enzyme fraction. Yet, the identity of the experimental conditions offers a possibility to judge the changes in quantitative relations in pathological cases or under experimental conditions.

The method discribed illuminates, as precisely as conditions permit, the relation of serum esterases to the single plasma protein fractions. During the past two decades, the problem has been extensively elucidated by different methods. For example, VAHLQUIST, as well as EASSON and STEDMAN concluded from their cataphoretic studies that in serum the aliphatic and choline esters are hydrolysed by the same enzyme [10, 3, 8]. Our investigations suggest that, except in rabbit and cat sera, this view should be revised.

On the basis of studies with ammonium sulphate precipitation, numerous authors (MCMECKIN [5], FABER [4], AUGUSTINSSON [1], STRELITZ [9]) have arrived at the conclusion that serum cholinesterase activity is bound to albumin. A more precise separation of the plasma protein fractions has then revealed that esterase is linked to the α and β globulin fractions. It is known that precipitation by ammonium sulphate does not yield electrophoretically homogeneous fractions and thus it is obvious why these studies could not reflect the true enzyme-protein relations.

Since by manometric methods changes in serum esterase activity have been demonstrated in different pathological conditions (especially in diseases of the liver), there is reason to believe that our method will prove to be useful also under pathological conditions. Investigations are in progress to elucidate this point.

SUMMARY

A combined electrophoretic-histochemical method has been described for the examination of serum esterases in different species.

The enzyme-protein relations, as determined by our method in sera from man and different species of animal, has been discussed.

Our method has been compared with other procedures, the electrophoretic migration of protein fractions showing esterase activity has been discussed and the possibility raised that our method will be useful in the elucidation of some pathological problems.

Acknowledgements

The author is greatly indebted to Dr. B. Csillik and Dr. Gy. Sávay for their valuable aid in the investigations.

LITERATURE

1. Augustinsson, K. B.: Ark. Kemi. Mineral. Geol. **18**, 24 (1944).
2. Csillik, B., Sávay, Gy.: Kísérletes Orvostud. **5**, 206 (1953).
3. Easson, L. H., Stedman, E.: Biochem. J. **31**, 1723 (1937).
4. Faber, M.: Acta Med. Scand. **114**, 72 (1943).
5. Mc. Meckin, T. L.: J. Biol. Chem. **128**, 66 (1939).
6. Pintér, I., Sávay, Gy., Csillik, B.: Kísérletes Orvostud. **6**, 513 (1954).
7. Sávay, Gy., Csillik, B.: Kísérletes Orvostud. **5**, 81 (1953).
8. Stedman, E., Easson, L. H.: Biochem. J. **26**, 2056 (1932).
9. Strelitz, F.: Biochem. J. **38**, 86 (1944).
10. Vahlquist, H.: Scand. Arch. Physiol. **72**, 133 (1935).

STUDIES OF THE STATE OF INHIBITION FOLLOWING ELECTROSHOCK*

By

I. PATAKY, A. K. PFEIFER and O. RIBÁRI

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received February 8, 1956)

In the course of research concerned with new anticonvulsants it has been observed that rats subjected to electroshock developed a state in which no new maximum electroshock response could be elicited by exposure to threshold stimulus [1, 2]. We have endeavoured to study this phenomenon.

The physiological changes characterizing the period subsequent to electroshock have been dealt with already. In some of the works known to us the changes taking place immediately after convulsion are discussed, *i. e.* the period denoted in the Anglo-saxon literature by the term »recovery time«, suggested by SWINYARD and TOMAN [3]. There is in general agreement that the duration of recovery time varies from 3 to 4 minutes in normal animals and it is essentially understood to mean »recovery« from the convulsive state : thus, the release of the tonic extensor spasm, the resumption of normal posture, the recuperation from the obvious direct stress (muscle work) of convulsion and the normalisation of the loss of excitability due to exhaustion. This accounts for the fact that, for example, GERLICH has suggested that in the search for the convulsive threshold about 3 to 4 minutes should elapse between single electroshocks [4]. The postconvulsive depression in the electrocorticogramme is also of a similar duration [5, 6]. We have intentionally not referred to the numerous investigations into the biochemical changes taking place in this period, more precisely into the condition of the acetylcholine—cholinesterase and cholinacetylase systems, the quantitative relations of the macroenergic phosphate compounds and the carbohydrate (and more recently the protein) metabolism of the central nervous system.

Abundant evidence can be found especially in the clinical literature, concerning the more permanent changes, the late effects of electroshock.

For example, APTER and TSUKKER have found that for half a day or eventually for several days after electroshock the previously induced conditioned reflexes were temporarily impaired or abolished in the dog. A protective inhibition developing in the cortex as a result of electric shock has been sug-

* To the 70th anniversary of Academician B. ISSEKUTZ, SEN.

gested to explain this phenomenon [7]. The retrograde amnesia developing in man after electroshock has been ascribed by ALEXANDER to a permanent inhibition induced by convulsions. In general, the convulsions proper are believed to be of diencephalic origin (NYIRŐ [8]) and the vegetative phenomena usually following electroshock are explained on this basis. The excessive increase in permeability following electroshock studied by ALTSCHULE and TILLOTSON, and in this country by ZSOMBÓK [9], as well as the decrease of temperature observed earlier (FROMMEL [10]), seem to be related phenomena.

In this connection we must mention also the view that most of the sequelae to electroshock would be ascribable to microtrauma (bleeding) (RASSINE [11]).

In starting our investigations we have been stimulated by the observation that the loss or absence of excitability we had found does not seem to fit into the pattern of recovery time phenomena, since it lasts about 10 times as long. On the other hand, similar considerations prohibit one to list it among the late or permanent changes.

Experimental

Rats of the Wistar strain of our own breed, both males and females, weighing 160 to 190 g, were used. The electroshock apparatus was constructed by us, on the basis of the description given by GERLICH. We deviated from the original description in that constancy of stimulation time was ensured by using a metronome. The stimulation time was invariably 0,2 sec. A 50-period alternating current of 60 V and 16 to 21 mA was used. Since from these data the intensity actually acting on the animal cannot be calculated, changes in dermal resistance were recorded prior to, and at intervals after, electroshock treatment.

The experimental procedure was as follows. The animals, divided into groups of 20, were fasted for at least 12 hours prior to the experiment. Twentyfour hours earlier epilation by barium sulfide was carried out bilaterally in the preauricular area. Each epilated area measured 5 to 8 mm in diameter. »Pinch-electrodes« covered with gauze wetted in NaCl solution, were placed bitemporally in these areas. One or two minutes after the electrodes had been put in place the animals were quiet and motionless. At that point the so-called basal dermal resistance was determined and after determination the electroshock was applied without delay. While applying it, the animals were held in the hand of the experimenter. At intervals after the onset of shock dermal resistance was measured again, and it was determined whether or not the original intensity still produced convulsions. In some animals the rectal temperature was measured both before and during the experiment.

The intensity of the convulsions induced by electroshock has been denoted by the following signs. One cross (+) indicates that after cessation of stimulation clonic jerks were visible in the forelimbs of the animal. (The so-called psychomotor attack was not accepted as response.) Two crosses (++) mean that similar clonus occurred in all four limbs. Three crosses (+++) show that the convulsion was tonic in the fore, and clonic in the hind limbs. Finally, four crosses (++++) mean a tonic extensor spasm in all four limbs (maximum convulsion). In the experiments the »threshold stimulus« of the maximal electric shock, *i. e.* the smallest intensity producing a ++++ response in the overwhelming majority of the test animals, was applied. The animal giving no, or at the most a + or ++ response, to the second electroshock was considered to be in the state of inhibition.

The motility of the experimental animal was measured by the KOMLÓS method [12], the essentials of which are the following. The animal is placed into a cage, which rests on springs and is provided with a glass-pipe protruding from its base. The motions of the cage express water from an equilibrated system. Constant pressure is ensured by a MÜLLER valve. The motility of the animal is measured on grounds of the volume of water ejected from the system. The sensitivity and reliability of the method is further enhanced by the insertion of a cog-wheel screw for the precise setting of the outlet level and by developing a calibration technique for the control of the sensitivity of the system. These modifications have made it possible to work with one animal, instead of with groups.

Results

In the knowledge of the chronological data of recovery time, we wished to determine first of all whether the duration of the state of unresponsiveness after electroshock was comparable with the data presented by SWINYARD and TOMAN. Therefore in our groups of 20 rats each threshold of maximal electroshock was estimated. This proved to be 60 V, 19 mA. The animals with a different threshold were removed. Group 1 was shocked 2 minutes, group 2 ten, group 3 twenty and group 4 thirty minutes, after the first convulsion, always with the same intensity. According to the data in Table I, after 2 minutes

Table I

		Time in minutes			
		2	10	20	30
Percentage of animals in the state of inhibition	normal animals	95	85	80	25
	Thyroxin, 2× 0,05 mg/100 g	77	23		

ES in controls: 60 V, 19 mA.
ES in thyroxin-treated animals: 60 V, 17 mA.
In repeated tests the same amount of current was used.

95 per cent, after 10 minutes 85 per cent, after 20 minutes 80 per cent, and as late as after 30 minutes still as many as 25 per cent of the animals gave no response to the electroshock. A comparison of these data with those published by SWINYARD and TOMAN reveals that the shift in time is so great that eventual differences in experimental conditions can by no means explain it. The most plausible factor responsible for this is still the exhaustion, assuming that the tonic extensor spasm induced by the shock had so exhausted the skeletal muscle that a stimulus of the same intensity as the first one could not elicit any longer the maximum response. This assumption, however, has little support. It is known namely that, for example in strychnine convulsions, the periodicity of subsequent attacks is much faster, since the convulsions usually recur at 3 or 5, or, at the most, at 10 minutes intervals. Yet, even in the knowledge of this consideration it seemed desirable to exclude the possibility of exhaustion by experimental methods.

In the second series of experiments two groups of 30 animals each were involved. Group 1 was given subcutaneously 6 mg/100 g Metrazol from a 12 mg/ml solution, immediately after the maximum electroshock during the tonic convulsion, while the other group, which served as control, was given only Metrazol without previously subjecting the animals to electroshock. In both

groups, the time of onset and the intensity of the Metrazol convulsion, as well as the periodicity of the attacks of the convulsions were recorded. In Table II are presented the values yielded by 10 animals from each group. The signs

Table II

Shocked animals					Control			
Intensity of ES	Metrazol convulsions				Metrazol convulsions			
	I.	II.	III.	IV.	I.	II.	III.	IV.
++++	++ 10	+ 12	++ 18	+ 19	++ 10			
++++	++ 9				++ 6	++ 11	++ 18	+ 20
++++	+ 8	++ 12	++ 19		++ 20	++ 34		
++++	+++ 14	++ 21			++ 13	++ 14	+ 22	
++++	++ 7	+ 14			++ 21			
++++	+ 14	+ 32			+++ 10	++ 30		
++++	++ 9				+ 17			
++++	+ 12	++ 18	++ 21	++ 26	++ 13	++ 14	+ 22	
++	+ 12	++ 18	++ 21	++ 26	++ 13	++ 14	+ 22	
++	++ 8	+ 20			++ 9	++ 18		
+	+ 9				++ 10			

ES with 60 V 19 mA. During convulsion, 6 mg/100 g Metrazol subcutaneously.
The figures beside the crosses indicate the time in minutes after the administration of Metrazol.
The controls were given only Metrazol 6 mg/100 g.

(+, ++, +++ and ++++) should be interpreted as described above for electroshock. The figures alongside the signs mean the time of the onset of the convulsions in minutes. As seen, the two groups did not differ either in the time of onset, severity, or periodicity of convulsions. Thus, the electroshock brought about no substantial change in the absorption of Metrazol and

the shocked animals were just as sensitive to the chemical convulsant as were the members of the control group. In brief, the experiment has excluded the possibility of exhaustion. As the data for the controls reveal, the dose of Metrazol was the »limit dose«, there having been very few animals giving a ++++ response. Consequently, it cannot be claimed that, as a result of high dosage, the »exhaustion« still existent at the time of electric stimulation has been »broken through«.

On the basis of the above it could be assumed that the refractory state following the maximal electroshock could be traced back to a decrease in the excitability of the central nervous system. Further support

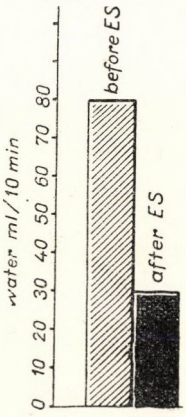


Fig. 1. Spontaneous motions before and after electroshock
ES with 60 V 19 mA in the experimental group. Measurements of spontaneous motility began 4 minutes after ES

to this view has been lent by the observations on the behaviour of the animals after convulsion. As well known, the tonic extensor spasm typical of maximal electroshock lasts for 15 to 20 sec., then with slight jerks it goes over into an increasing clonus. The latter period is rather variable in duration : it may last from 40 to 120 sec. After the convulsions have ceased, tachypnoea still exists for a few minutes ; after that, the animal relaxes, and resumes its normal posture. No abolition of progressive reflexes is observable, either. As compared with normal animals, some loss in spontaneity occurs. Motor activities are poor. When placed in a new environment, the animals do not show orientative tendencies and do not carry out washing motions. We have made attempts to support the validity of our observation also by numerical data.

Working with two groups of 20 animals each, the following experiment was carried out. The experimental group was placed into the suspended cage of the motion-registering apparatus 4 minutes after regular electroshock, when the periods of convulsion and tachypnoea were over, and the motions were registered over a period of 10 minutes. The motions this time were essentially those of orientation elicited by the new environment. The control group was

subjected to a similar procedure ; the animals were taken out of the cage, the wet electrodes were placed on the epilated preauricular regions, but no electric shock was given. After an interval of four days the groups were exchanged to obtain auto-control values for each animal.

As it is obvious from Fig. 1, we have succeeded in obtaining a numerical verification of our view. During the 10 minute period the animals of the control group ejected an average of 80 ml of water, as compared to the 30 ml recorded in the electroshocked group. With regard to the relatively small deviations, the more than 100 per cent difference is greatly significant.

Such a remarkable decrease in the orientation reaction actually suggests a change in central nervous functions. The question arose whether this change was actually functional. On grounds of the literary data already cited it can be assumed that as a result of electroshock gross anatomical lesions develop. The chronological course of the refractory period does not support this view. It is hardly conceivable that an anatomical lesion would completely disappear in one half hour's time. Apart from this negative proof, it would be a direct verification of the functional nature of the change, if it could be influenced by increasing the intensity of stimulation, or by pharmacological methods.

In 3 experimental groups electroshock was induced by applying the threshold stimulus (60 V, 19 mA). In each animal of group 1 attempts were made to induce electroshock with the same amount of current 10 minutes after the first shock. In the second group the intensity of the current was increased by 1 mA, in the third by 2 mA, *i. e.* the second shock was elicited with 20 and 21 mA, respectively. As it can be seen in Table III, the members of

Table III

Relationship between intensity of current and inhibition

Intensity of current in second ES	19 mA	20 mA	21 mA
Inhibited animals per cent	85	30	18

First ES in all three groups : 60 V, 19 mA.

the control group behaved as in the above experiments. 10 minutes after the first shock 85 per cent of the controls showed no response to electric stimulation. In group 2, where the second shock occurred with 60 V and 20 mA, only 35 per cent of the animals were refractory. In group 3, subjected to a second shock with 60 V and 21 mA, only 18 per cent of the animals developed no convulsions.

Thus, by increasing the intensity of current the state of unresponsiveness can be »broken through«.

For the purpose of pharmacological tests, thyroxin seemed to be the most suitable agent, partly because ISSEKUTZ SEN. and ISSEKUTZ JR. [13] have shown that thyroxin increases the sensitivity to convulsants and partly because the drug itself produces no convulsions. Its effect can satisfactorily be controlled by measuring the O_2-consumption of the animal. In a dosage of 2 × 0,05 mg/100 g daily in 3 days it makes basal metabolism rate to increase by 50 to 75 per cent.

After determining the basal O_2-consumption in each animal of an experimental group of 60 animals, using the ISSEKUTZ apparatus for this purpose [14], the animals were administered thyroxin in the above dosage over a period of 3 days. On the fourth day, O_2-consumption was measured again and, con-

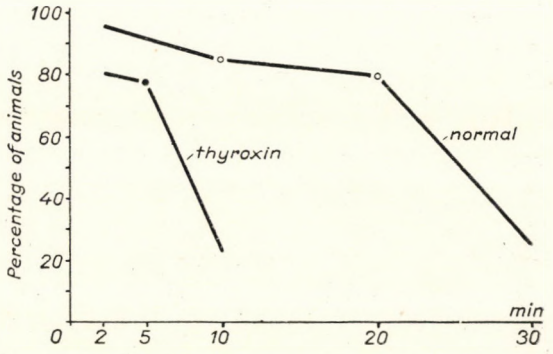


Fig. 2. Duration of the inhibition induced by electroshock
Normal: ES with 60 V, 19 mA. The same intensity used in second ES. Thyroxin: daily doses of 2×0,05 mg/100 g for 3 days. After control of basal metabolic rate, ES with 60 V, 17 mA. Same intensity of current used in second ES

tinuing the thyroxin administration, the threshold of maximum electroshock was determined on the fifth day. In the overwhelming majority of the test animals this proved to be 60 V 17 mA *i. e.* decreased, as it was also expected. When attempts were made at inducing a second shock with this lower threshold, it was found that 10 minutes after the first stimulation only 23 per cent were unresponsive, which is a considerable decrease, as compared with the 85 per cent value recorded among the animals not treated with thyroxin. That this did not mean the total disappearance of the refractory period, was proved by the data for the 5-minute group (Table I). As shown in Table I, when the second stimulation had followed the first after a 5-minute interval, as many as 77 per cent of the thyroxin-treated animals failed to develop shock. Thus, as a result of thyroxin treatment the post electroshock refractory state became significantly shorter in duration, but did not completely disappear.

It can therefore be stated that our experiments have offered proof that the state of unresponsiveness following electroshock treatment cannot be included into the pattern termed »recovery time« by SWINYARD and TOMAN, because it is considerably longer in duration than the latter.

It cannot be considered to be due to muscle exhaustion, either, because the sensitivity of the animals to chemical convulsants has remained uneffected.

It cannot be ascribed to any anatomical change secondary to electroshock, considering that it has characteristic time curve, and that the refractory state can be abolished (»broken through») by increasing the intensity of the second stimulation, and, further as the duration of the state of inhibition can be influenced pharmacologically, by use of thyroxin.

The fact, which we, too, have confirmed, that it is possible to elicit an extensor spasm with the same amount of current immediately following the first stimulation, *i. e.* in the period in which the extensor spasm induced by the first stimulus is about to disappear (electronarcosis), reduces to a minimum the significance of muscle fatigue and of the potential presence of anatomical changes. Thus, unresponsive state is one developing gradually during the period that follows the convulsion. However, the ascending branch of the time curve is remarkably steep and, in addition, falls into the phase of clonic convulsions, when it is very difficult to treat the animals. It is almost impossible to hold the electrodes precisely in place and this explains why we have failed to obtain reliable data concerning this period.

Nor can the refractory period be explained on grounds of the change in dermal resistance, which has been assumed to take place as a result of electroshock. We have measured dermal resistance in our experiments both before and after electroshock and found that while in the minority of animals it did not change at all in the majority it was markedly decreased. This finding confirms, rather than discredits, the view that the inhibitory period is central in origin.

Relying on the above considerations, we believe the state of unresponsiveness following electroshock to be the result of a functional change in the central nervous system, more precisely a form of inhibition. In addition to the above data, further support to this view is lent also by the observation that the orientation response undergoes demonstrable changes, as well as by the finding (WOODBURY et al. [15]) that the duration of the »postical recovery time« is prolonged by propylthiouracyl. The investigations by the latter authors stand near to ours ; the more so, since — although using the terminology suggested by SWINYARD and TOMAN — they have found the refractory state to be longer in duration, estimating its mean at 8 minutes.

As a remarkable peculiarity of this state, it can be pointed out that the elevation of the threshold of electric stimulation and the loss of some of the spontaneous motor activities are accompanied by obvious signs of mesen-

cephalic excitation, which, in our experiments, manifested themselves mainly in a decrease of body temperature and in chromodacryorrhoea. On the basis of the data so far obtained we are unable to show any relationship between the intensity and duration of these phenomena, on the one hand, and the intensity and duration of the inhibitory state, on the other. Some support might be found in the report by TSOBCALLO [16], in wich it is described that the sensitivity to convulsants decreased on the electric stimulation of the mesencephalon. However, this information can be applied to our cases with reservation only, because as it has been described above, during the state of inhibition after electroshock in our animals the sensitivity to chemical stimuli was unchanged. Another fact warranting caution is that the physiological response to stimulation described by TSOBCALLO makes one believe that this author stimulated mainly the groups of nuclei which in the sense of HESS' terminology are claimed to be centres of sympathetic character, while our animals showed the symptoms of parasympathetic excitation. On the same basis we feel bound to reject the explanation put forward by GELLHORN et al. [17] concerning the anticonvulsant action of adrenalin.

The temporary unresponsiveness and the elevation of threshold, respectively may be ascribed to the acidosis which follows convulsions. It is known that the sensitivity to Metrazol is significantly reduced in acidosis induced by ammonium chloride. However, HANDEY and DAWENPORT [18], while confirming this observation in the case of Metrazol, showed that at the same time the electroshock threshold remained uneffected.

We have endeavoured to present the chemical explanation of the inhibitory state in a previous work [19], in which a relationship was shown to exist between the duration of the post-electroshock refractory period and the quantitative relations of the acetylcholine antagonist described by us. It was assumed that the increase in the quantity of the acetylcholine antagonist was part of the general protective mechanism, a »primitive inhibition«, which played a role in the structurally not wholly developed nervous system (in the brain of animals merely a few days old), or, in the adult animal, especially in case the latter had been exposed to a supramaximal stimulus, such as electroshock.

Considering that symptoms of mesencephalic excitation occur simultaneously with the motor inhibition, this biochemical conception might explain the complete picture only in that sole case, when the quantitative distribution of the acetylcholine antagonist in the central nervous system corresponds to the physiological pattern. For this reason we intend to study the post-electroshock inhibitory period in animals with their cerebral cortex removed, as well as the quantitative relations of the acetylcholine antagonist in the levels of the cortex, subcortex and oblong medulla.

SUMMARY

1. Following maximum electroshock an unresponsive period, 20 to 30 minutes in duration, has been observed to occur.

2. Exhaustion cannot explain the phenomenon, because during that period the sensitivity of the animals to Metrazol, a chemical convulsant, is uneffected.

3. If, on repeating the electroshock, the intensity of the stimulus is increased by 1 or 2 mA, the refractory state can be abolished.

4. In animals treated with thyroxin, simultaneously with a significant increase in the basal metabolic rate, there is also unresponsiveness after electroshock treatment, but the duration of the refractory period becomes remarkably shortened.

5. During the state of inhibition, spontaneous motility is markedly diminished.

6. The possibility of a biochemical explanation of the inhibitory period has been discussed.

LITERATURE

1. Pataky, I., Pfeifer, A. K.: Acta Physiol. Hung. **2**, 199 (1951).
2. Pfeifer, A. K., Pataky, I., Hajdu, P.: Acta Physiol. Hung. **3**, 154 (1952).
3. Swinyard, E. A., Toman, E. P.: Am. J. Physiol. **154**, 207 (1948).
4. Gerlich, N.: Arch. exp. Path. Pharm. **210**, 311 (1950).
5. Torda, C. Wolff, H. G.: J. Pharm. Exper. Therap. **98**, 358 (1950).
6. van Harreweld, A., Stamm, I. S.: J. Neurophysiol. **18**, 505 (1954).
7. Apter, I. M., Tsukker, B. V. *(Аптер, И. М., Цуккер, Б. В.)*: Ж. Высш. Нервн. Деятел. **3**, 396 (1952).
8. Nyirő, Gy.: Magy. Belorv. Arch. **4**, 31 (1953).
9. Zsombók, Gy.: Magy. Belorv. Arch. **4**, 91 (1953).
10. Frommel, E., Raduco, C., Strassberger, L.: Helv. Physiol. Pharmacol. Acta **10**, 292 (1952).
11. Rasin, S. D. *(Расин, С. Д.)*: Мед. Ж. **14**, 25 (1954).
12. Komlós, E., Knoll, J., Tardos, L., Szász, V.: Acta Physiol. Hung. **4**, 373 (1953).
13. Issekutz, B. Sen., Dirner, Z.: Arch. exp. Path. Pharm. **185**, 685 (1937).
14. Issekutz, B. Sen., Issekutz, B. Jr.: Arch. exp. Path. Pharm. **199**, 305 (1942).
15. Woodbury D. M., Hurley, R. E. Lewis, N. G., Mc. Arthur, M. W. Copeland, W. W., Kirschvink, J. F., Goodman L. S.: J. Pharm. Exper. Therap. **106**, 331 (1952).
16. Tsobkallo, G. I. *(Цобкалло, Г. И.)*: Физиол. Ж. **6**, 711 (1950).
17. Gellhorn, E., Darrow C. W., Yesinick, L.: Arch. Neurol. Psychiat. **42**, 826 (1939).
18. Handey, C. D., Dawenport, H. W.: Am. J. Physiol. **153**, 580 (1948).
19. Pataky, I., Pfeifer, A. K.: Acta Physiol. Hung. **8**, 209 (1955).

CORONARY CIRCULATION IN HYPOXIC STATES

By

L. TAKÁCS

with the technical assistance of G. DUDÁS and P. HACKER

3rd DEPARTMENT OF MEDICINE, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received March 12, 1956)

BARCROFT [2, 3,] in the 1920-ies was the first to study in detail and classify hypoxic states into arterial (anoxic), anaemic, stagnant and histotoxic groups. This classification, although slightly modified, is still accepted.

We have experimentally studied coronary circulation in the following types of hypoxia: *a)* arterial hypoxia induced by the inhalation of a gas mixture poor in oxygen, *b)* stagnant hypoxia developing acutely within a few hours, *i. e.* in traumatic shock, and *c)* stagnant hypoxia developing in a matter of days, as induced by dehydration. The main feature to be elucidated was whether in the various conditions to which hypoxia is the common characteristic factor there would be a common circulatory change. As in arterial hypoxia blood volume is unchanged and minute volume increased, while in shock and dehydration both the circulating blood volume and the minute volume decrease, a direct comparison of coronary flow may be misleading. So as to eliminate this source of error the measurement of flow and resistance has been supplemented by the determination of the coronary fraction of the minute volume. According to our view (GÖMÖRI, KOVÁCH, TAKÁCS, FÖLDI, SZABÓ, NAGY, WILTNER [9]) the distribution of the minute volume among the individual organs may reliably indicate the improvement or deterioration of the circulation in the organ — as compared with that of the other organs, — even when the minute volume is reduced or increased. In support of this view is the fact that, according to data in the literature and to our investigations, a marked decrease in the renal fraction of the minute volume could be demonstrated to occur in arterial hypoxia [9, 10,] in shock [19, 25] and in dehydration [25].

Methods

62 dogs of either sex, weighing about 10 kg each, were involved in the experiments. *Measurement of coronary blood flow.* The animal anaesthetized with chloralose was placed in the supine position. The skin, and between ligations the pectoral and intercostal muscles were transected in the left 3rd intercostal space. The trachea was cannulated, the pleural cavity opened and artificial respiration was started. The intercostal muscle, then the sternum were transected, and the line of incision was lenghtened to reach the right side. The pericardium was opened and the left auricle was held by a fixing thread. The heart was thus held

n place, the ramus circumflexus of the left coronary artery was prepared. A Y-shaped cannula was inserted into the left carotid for recording blood pressure and rotametry. The animal was heparinized (5 mg/kg »Thromboliquin«, *Organon*), then the rotameter was filled from the animal. The blood volume was intravenously restituted at the same time. The carotid blood passed from the rotameter through a heating coil into a suitable glass cannula, which was inserted into the prepared ramus circumflex and fixed to the ribs. The chest wound was sprayed with coagulant thrombinfibrin powder (»Stasigen«, *Richter Gedeon* Budapest), the chest wound and the skin were closed in two layers. The pleural cavity was drained by means of 1 or 2 PEZZER catheters.

The operation being technically difficult, many animals were lost. Apart from the 9 animals used in preliminary trials, 53 were operated on and 30 survived operation. In many a case the heart stopped beating or began to fibrillate while the cannula was inserted ; a permanent fall in blood pressure often occurred.

Coronary blood flow was determined by means of a rotameter. The values given are calculated for 100 g heart weight. As determined in 17 cases the normal flow was 40 $\pm$ 2,2 ml (Table IV).

The minute volume was determined on the basis of the FICK principle. Oxygen consumption was measured by means of the KROGH apparatus. The A—V difference and the oxygen saturation were determined by the method of ISSEKUTZ JR., HETÉNYI, JR., and FEUER [18]. Arterial blood was obtained from the femoral artery, mixed venous blood from the right auricle. The volume of blood withdrawn was replaced by transfusion. The minute volume is given in ml/m^2/min. Surface was calculated by the formula $s = 0{,}107 \sqrt[3]{\text{kg}^2}$.

Total vascular and coronary resistance were calculated from the minute volume, coronary flow and blood pressure values, respectively. Vascular resistance is shown in the tables in terms of 10^3 dyn sec cm^{-5} and is related to the ramus circumflex flow calculated for 100 g heart weight and to the minute volume per 1 square metre (cardiac index), respectively.

Left ventricular work is to be understood to mean minute volume multiplied by blood pressure and divided by 1000.

The coronary fraction of the minute volume is given as the ramus circumflex flow expressed as percentage of the cardiac index. The normal values obtained in our experiments varied from 1,5 to 1,8 per cent and agreed well with the data in the literature (5 per cent, GREGG [12]) when re-calculated to the original minute volume and coronary flow.

Arterial hypoxia was induced by the inhalation for 30 minutes of a 8 to 10 per cent oxygen—nitrogen mixture, making determinations 15 and 30 minutes after the onset of hypoxia.

Shock was induced by crushing one hind limb by hammer blows. The experiment was continued for 3 hours after traumatisation, making estimations after ½, 1, 2 and 3 hours.

The hypoxic mixture was inhaled and trauma was inflicted after two control determinations had been made. No substantial changes in the coronary and systemic circulation were noted either in the interval between the two control tests (about 30 minutes in duration) or in the 3 control experiments lasting about 3 hours each (Table III).

Dehydration was induced by ligating the pylorus 72 hours prior to the experiment. In each dehydrated animal 2 or 3 parallel estimations were made, the means of which are presented in Table IV.

The significant difference was calculated by the one-sample »t« test in the auto-control shock and hypoxia experiments and by the two-sample »t« test in the dehydration experiments (see Fisher [8]).

Results

Arterial hypoxia. On inhaling the hypoxic gas mixture the mean arterial blood saturation, as determined in 8 experiments, sank to 63 per cent after 15 minutes and to 59 per cent after 30 minutes. The moderate elevation of blood pressure was accompanied by the known [9, 10] significant increase in minute volume. Correspondingly, systemic arterial resistance diminished considerably.

The blood flow in the ramus circumflex of the left coronary, as calculated for 100 g heart weight, averaged 41 to 43 ml. This value increased more than

twofold in hypoxia. In the area tested coronary resistance sank by about 50 per cent. The left ventricular work was highly increased.

A comparison of the changes in minute volume with those in coronary circulation reveals that the coronary circulation increased more markedly than the minute volume did, as indicated by the increase of the mean coronary fraction of minute volume from 1,7 per cent to 2,3 and 2,8 per cent. The changes proved to be reversible (Fig. 1, Table I).

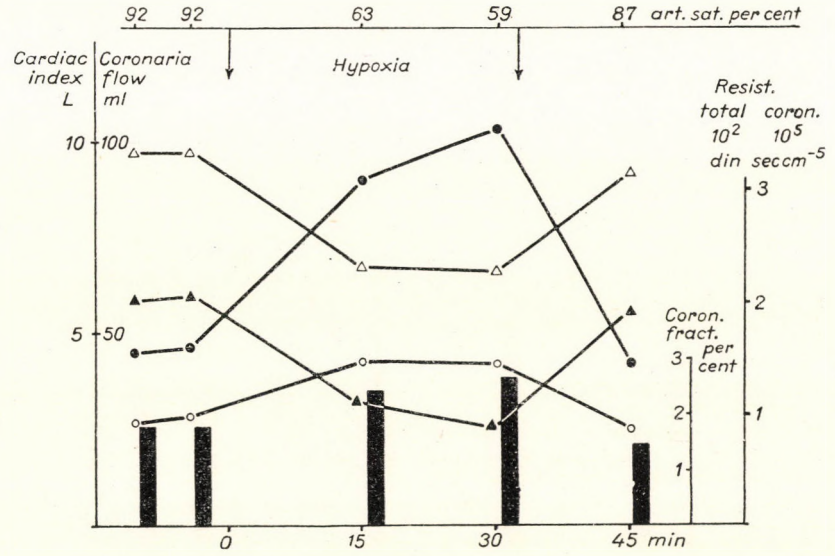


Fig. 1. Systemic and left ramus circumflex circulation in arterial hypoxia

○——○ minute volume
●——● coronary blood flow
△——△ systemic vascular resistance
▲——▲ coronary resistance

Traumatic shock. In 9 experiments one hind leg was crushed by 200 to 250 hammer blows after recording two preliminary periods. The determinations were made after ½, 1, 2 and 3 hours. Six animals survived for more than 3 hours after the injury.

Immediately after the injury the mean blood pressure decreased to around 70 mm Hg and was as low as 40 mm Hg after 3 hours. In the meantime, the mean minute volume was considerably reduced in about 30 minutes (from 3210 and 3380 ml) and after 3 hours it was not more than $^1/_4$ to $^1/_5$ of the control value. The mean systemic vascular resistance increased only as late as 2 or 3 hours.

Mean coronary flow was gradually, though not excessively reduced, from the 40 ml level and after 3 hours it was still as high as 70 to 80 per cent of the control value. Coronary resistance, as calculated from blood pressure

Table I

Systemic and left ramus circumflex circulation in arterial hypoxia

(The changes are related to the values of control period 2)

	Arterial saturation, per cent					Blood pressure, mm Hg					Cardiac index, ml/min/m²					Total resistance, 10^3 dyne sec cm^{-5}				
	contr.		change			contr.		change			contr.		change			contr.		change		
			hypoxia		regen.			hypoxia		regen.			hypoxia		regen.			hypoxia		regen.
Mean ..	92	92	—29	—31	—3	100	104	+15	+11	—10	2650	2990	+1280	+1140	—330	3,3	3,2	—1,0	—0,8	+0,3
±	2	2	3	3		4	4	3	2	5	555	411	262	556		0,67	0,44	0,20	0,20	0,42
n	6	8	8	8	6	6	8	8	8	7	5	8	8	8	5	5	8	8	8	5
t			11,42	9,87				5,27	5,04				4,87	2,05				5,00	4,40	
p, % ...			<1	<1				<1	<1				<1	<10				<1	<1	

Coronary

	Flow, ml/min/100 g					Resist., 10^3 dyne sec cm^{-5}					Fraction, per cent					Work of left ventricle				
	contr.		change			contr.		change			contr.		change			contr.		change		
			hypoxia		regen.			hypoxia		regen.			hypoxia		regen.			hypoxia		regen.
Mean ...	41	43	+47	+62	+1	200	205	—94	—115	—24	1,50	1,66	+0,68	+1,12	+0,04	290	330	+220	+210	+20
±	4	3	6	9	2	15	19	17	15	12	0,42	0,28	0,11	0,11	0,08	57	50	48	67	41
n	6	8	8	8	7	6	8	8	8	7	5	8	8	8	5	5	8	8	8	5
t			7,56	7,08				5,63	7,78				5,81	10,3				4,51	3,11	
p, %...			<1	<1				<1	<1				<1	<1				<1	<2	

and coronary flow, showed a definite decreasing tendency. Left ventricular work was reduced by 50 per cent initially, and by 90 per cent later.

As shock progressed, the mean heart fraction of the minute volume increased by 200 to 300 per cent (Fig. 2, Table II).

In 3 control experiments the preparation observed over a period of 3 hours exhibited no changes similar to those observed in shock (Table III).

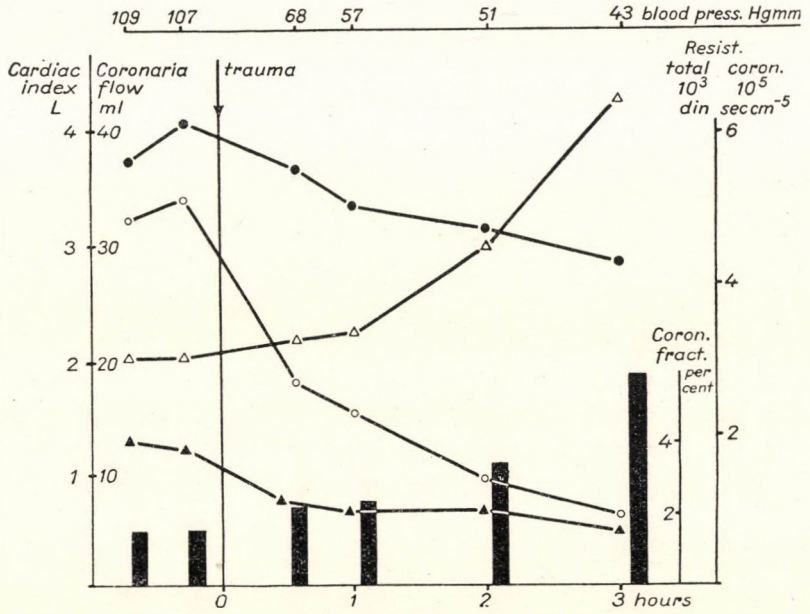


Fig. 2. Systemic and left ramus circumflex circulation in traumatic shock

○——○ minute volume
●——● coronary blood flow
△——△ systemic vascular resistance
▲——▲ coronary resistance

Dehydration. In the dehydration experiments the control points were supplied by the preliminary periods of the hypoxia and shock experiments (17 experiments).

The mean blood pressure of the 13 dehydrated animals was somewhat lower than that of the controls. Minute volume was much lower, 1170 ml, as compared to the mean control value of 2980. As the minute volume decreased much more markedly than blood pressure, resistance was very definitely increased ; it was 6,8, as compared to the control mean of 3,1.

Mean coronary flow was reduced from 40 ml to 30 ml. Coronary vascular resistance did not change significantly. Left ventricular work was only $^1/_3$ the control value.

Table II

Systemic and left ramus circumflex circulation in traumatic shock in the dog

(The changes are related to the values of control period 2)

	Blood pressure, mm Hg						Cardiac index, ml/min/m²						Total resistance, 10^3 dyne sec cm^{-5}					
	contr.		change after trauma hours				contr.		change after trauma hours				contr.		change after trauma hours			
			0,5	1	2	3			0,5	1	2	3			0,5	1	2	3
Mean	109	107	—37	—50	—57	—64	3210	3380	—1000	—1510	—2100	—2480	3,0	3,0	+0,1	+0,2	+2,2	+3,9
± ...	7	4	5	9	7	5	410	280	250	230	130	200	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	1,7
n	8	9	9	8	6	6	8	9	9	8	6	6	8	9	9	8	6	6
t			7,5	5,6	7,9	13,0			4,00	6,60	16,1	12,4			0,20	0,31	3,48	2,29
p, % ..			<1	<1	<1	<1			<1	<1	<1	<1			>50	>50	<5	<10

Coronary

	Flow, ml/min/100 g						Resist., 10^3 dyne sec cm^{-5}						Fraction, per cent						Work of left ventricle					
	contr.		change after trauma hours.				contr.		change after trauma hours				contr.		change after trauma hours				contr.		change after trauma hours			
			0,5	1	2	3			0,5	1	2	3			0,5	1	2	3			0,5	1	2	3
Mean	37	41	—5	—8	—8	—11	240	230	—81	—75	—99	—90	1,39	1,34	+0,84	+ 0,90	+2,15	+3,88	350	320	—180	—250	—290	—310
±	3	3	2	2	2	2	18	26	15	17	13	8	0,12	0,03	0,28	0,24	0,24	0,93	42	25	25	29	25	28
n	8	9	9	8	7	6	8	9	9	8	7	6	8	9	9	8	6	6	8	9	9	8	6	6
t			3,3	4,9	4,5	6,4			5,40	4,54	7,37	11,2			2,93	3,75	8,86	4,17			7,34	8,62	9,51	11,1
p, %			<1	<1	<1	<1			<1	<1	<1	<1			<2	<1	<1	<1			<1	<1	<1	<1

Table III

Systemic and left ramus circumflex circulation in the dog, in 3-hour control experiments

No.	Blood pressure, mm Hg					Cardiac index, ml/min/m²					Resist., 10^3 dyne sec cm^{-5}				
	contr.		after			contr.		after			contr.		after		
			1. hours	2. hours	3. hours			1. hours	2. hours	3. hours			1. hours	2. hours	3. hours
269.	100	110	110	105	100	4300	3800	2510	4200	2620	1,9	2,3	3,5	2,0	3,0
272.	110	100	—	110	100	2710	2620	—	2740	2190	3,2	3,0	—	3,2	3,7
286.	110	110	—	95	100	1950	2340	—	1920	2720	4,5	3,8	—	3,9	2,9

Coronary

No.	Flow, ml/min/100 g					Resist., 10^3 dyne sec cm^{-5}					Fraction, per cent					Work of left ventricle				
	contr.		after			contr.		after			contr.		after			contr.		after		
			1. hours	2. hours	3. hours			1. hours	2. hours	3. hours			1. hours	2. hours	3. hours			1. hours	2. hours	3. hours
269.	34	37	42	42	35	230	240	210	200	230	0,8	1,0	1,7	1,0	• 1,3	430	420	270	440	260
272.	36	36	—	35	37	240	220	—	250	220	1,3	1,4	—	1,3	1,7	300	260	—	300	220
286.	31	33	—	32	37	280	270	—	230	220	1,6	1,4	—	1,7	1,4	210	260	—	190	270

The mean value for the coronary fraction of the minute volume was 3,0 per cent, as compared to the 1,5 per cent for the controls (Table IV).

Table IV

Systemic and left ramus circumflex circulation in dehydrated dogs

	Cardiac index, ml/min/m²		Blood pressure, mm Hg		Total resistance, 10^3 dyne sec cm^{-5}		Coronary								NPN
							Flow, ml/min/m²		Resist., 10^3 dyne sec cm^{-5}		Fraction per cent		Work of left ventricle		
	C.	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	D
Mean	2980	1170	106	92	3,1	6,8	40	30	220	240	1,49	2,97	330	110	89
±	260	100	3	4	0,3	0,7	2	2	13	18	0,1	0,3	28	13	
n	17	13	17	13	17	13	17	13	17	13	17	13	17	13	13
t	5,79		3,12		5,45		3,09		0,87		4,00		6,61		
p, %	<1		<1		<1		<1		>20		<1		<1		

C: control; D: dehydrated.

Discussion

The behaviour of the coronary circulation in hypoxia had been studied also earlier. The first studies were made in the isolated heart or in the heart-lung preparation. Numerous authors [13, 16, 17, 20, 21] agree in that the coronary flow of the isolated heart was considerably increased during hypoxia.

According to the results obtained by GREEN and WEGRIA [11], in the dog with its chest open the coronary flow was enormously increased and blood pressure was slightly elevated on the inhalation of 5 per cent oxygen. Similar results were obtained by HACKEL, KLEINERMAN and GOODALE [14] by the N_2O method. ALLELA pointed out [1] that a 4 per cent change in arterial saturation suffices to increase coronary flow and emphasized that the increase of flow results not from a change in blood pressure, but from active vasodilatation. Similar results have been obtained for the fibrillating dog heart by BERNE, BLACKMON and GARDNER [4]. CASE et al. [5] found that coronary flow was increased in anaemic hypoxia, too.

We could partly corroborate the above findings. Coronary flow was markedly increased in arterial hypoxia. In our experiments, too, the diminution of vascular resistance was suggestion of vasodilatation. However, further analysis has shown that in hypoxia the increase in cardiac blood flow is not a function of the minute volume; the dilatation of cardiac blood vessels and the increase of coronary flow exceed in degree what might have been expected on the basis of changes in minute volume and systemic vascular resistance;

this has been proved by the increase of the coronary fraction of minute volume. Thus, in hypoxia part of the circulating blood volume flows to the heart at the expense of other organs.

It was only in the last ten years that the circulation of the heart in shock has been dealt with in the literature and all the published data concern haemorrhagic shock. In 1947, OPDYKE and FOREMAN [22] and, more recently, HACKEL and GOODALE [16] found in the dog with haemorrhagic shock that cardiac blood flow and resistance were diminished ; the latter two authors also demonstrated a marked increase in the coronary fraction of the minute volume. Also in the dog, EDWARDS, SIEGEL and BING [87] found that in the oligaemic phase of haemorrhagic blood shock, flow and coronary resistance were decreased, while the latter increased during the normovolaemic phase.

We have been unable to find data of this kind in the literature concerning traumatic shock. The slight diminution of flow and the marked active coronary distension observed in the above experiments compare well with what others have found in haemorrhagic shock. It is emphasized that, like in arterial hypoxia, in traumatic shock, too, a new circulatory distribution develops : a relatively greater part of the minute volume is directed to the heart, the cardiac fraction of minute volume increases. It is however probable that as shock progresses this compensatory mechanism fails, even though the work of the heart is declining. SARNOFF, CASE et al. [6, 23] have called attention to the fact that in haemorrhagic shock the improvement of coronary blood supply by means of the normal-pressure perfusion apparatus lessens the dilatation of the heart and the auricular pressure.

No data are available on the behaviour of cardiac circulation in dehydration, in which blood pressure is practically unaffected and cardiac blood flow is slightly reduced. There is no change in coronary resistance. A comparison of the changes in cardiac circulation with those in the systemic circulation and in the minute volume will reveal, however, that the slight reduction in coronary blood flow and the unchanged resistance develop when the minute volume is markedly reduced and systemic vascular resistance is increased. Thus, the systemic vasoconstriction spares the heart, in which blood flow, as compared to that in other organs is only slightly diminished and blood supply remains satisfactory. The cardiac fraction of minute volume increases in dehydration, too.

In conclusion it can be stated that both in arterial hypoxia and in the stagnant types of hypoxia (in shock and in dehydration) the distribution of the minute volume becomes changed. In all three cases the essential change is the increase in the heart fraction of the minute volume, the flow to the heart of a relatively greater proportion of the diminished or increased minute volume.

The increase in the cardiac fraction of the minute volume and the relatively better blood supply to the coronaries being features common to both the

arterial and stagnant types of hypoxia (shock and dehydration), it can be, assumed that the cause, notably hypoxia, is common too.

The increase of the coronary fraction of the minute volume occurred with high (arterial hypoxia) and low (shock and dehydration) minute volumes alike in our experiments. Thus, the view (Gregg [12]) that a change in the minute volume results in a change of opposite direction in the coronary fraction seems to be untenable.

It appears that in shock and arterial hypoxia the distension of the coronaries, and in dehydration the absence of coronary constriction are responsible for the relatively satisfactory heart function in these conditions. In the light of this evidence it will easily be understood why in severe shock the heart suffers only late [27]. As it has been reported (TAKÁCS, SZABÓ [26]), the severe metabolic disturbances of the striated muscles in shock develop in the heart muscle only in a negligible degree or not at all ; this finding, too, can be explained by the good blood supply of the heart.

SUMMARY

Comparative studies have been made of the coronary circulation vs. the systemic circulation in different types of hypoxia (arterial hypoxia, traumatic shock and dehydration).

1. In arterial hypoxia coronary blood flow increases more markedly than the minute volume and coronary resistance is diminished in a more marked degree than systemic resistance. Correspondingly, the coronary fraction of the minute volume increases.

2. In traumatic shock, the minute volume is markedly diminished, vascular resistance is increased and coronary blood flow is slightly reduced. Cardiac vascular resistance is diminished, the heart fraction is increased.

3. In dehydration there is a very pronounced increase in systemic vascular resistance and a marked diminution of the minute volume. Coronary blood flow is slightly diminished, resistance is unchanged. The cardiac fraction of the minute volume increases, here, too.

As the increase of the heart fraction of the minute volume is a feature common to all three types of hypoxia, it can be assumed that it can be traced back to a common cause : hypoxia.

LITERATURE

1. ALELLA, A. : Pflügers Arch. **259**, 422 (1954).
2. BARCROFT, J. : Lancet **2**, 485 (1920).
3. BARCROFT, J. : Nature **106**, 125 (1920—21).
4. BERNE, R. M., BLACKMON, J. R., GARDNER, T. H. : Federation Proc. **14**, 12 (1955).
5. CASE, R. B., BERGLUND, E., SARNOFF, S. J. : Federation Proc. **13**, 24 (1954).
6. CASE, R. B., SARNOFF, S. J. : Federation Proc. **12**, 24 (1953).
7. EDWARDS, W. S., SIEGEL, A., BING, R. J. : J. Clin. Invest. **33**, 1646 (1954).
8. FISHER, R. A. : Statistical Methods for Research Workers. Oliver and Boyd, London (1950).
9. GÖMÖRI, P., KOVÁCH, A., TAKÁCS, L., FÖLDI, M., SZABÓ, GY., NAGY, Z., WILTNER, W. : Magy. Belorv. Arch. **7**, 129 (1954); Orvosi Hetilap **95**, 255 (1954).
10. GÖMÖRI, P., TAKÁCS, L. : Z. ärzt. Fortbild. **50**, 286 (1956).
11. GREEN, H. D., WEGRIA, R. : Am. J. Physiol. **135**, 271 (1941).
12. GREGG, D. E. : Coronary Circulation. Lea a. Febiger, Philadelphia (1950) p. 88.
13. GREMELS, H., STARLING, E. H. : J. Physiol. **61**, 297 (1926).
14. HACKEL, D. B., KLEINERMAN, J., GOODALE, W. T. : Federation Proc. **12**, 59 (1953); Circulation Res. **2**, 169 (1954).

15. HACKEL, D. B., GOODALE, W. T. : Federation Proc. **13**, 64 (1954); Circulation **11**, 628 (1955).
16. HAMMOUDA, M., KINOSITA, R. : J. Physiol. **61**, 615 (1926).
17. HILTON, R., EICHOLTZ, F. : J. Physiol. **59**, 413 (1925).
18. ISSEKUTZ, B. JR., HETÉNYI, G. JR., FEUER, I. : J. Physiol. **108**, 9 (1949).
19. LAUSON, H. D., BRADLEY, S. E., COURNAND, A. : J. Clin. Invest. **23**, 381 (1944).
20. LORBER, V., EVANS, G. T. : Proc. Soc. exp. Biol. Med. **54**, 1 (1943).
21. MARKWALDER, J., STARLING, E. H. : J. Physiol. **47**, 275 (1913).
22. OPDYKE, D. F., FOREMAN, R. V. : Am. J. Physiol. **148**, 726 (1947).
23. SARNOFF, S. J., CASE, R. B., WAITHE, P. E., ISAACS, J. P. : Am. J. Physiol. **176**, 439 (1954).
24. STADIE, W. C. : J. Exp. Med. **30**, 215 (1919).
25. TAKÁCS, L. : Unpublished data.
26. TAKÁCS, L., SZABÓ, M. : Korányi Meeting 1955.
27. WIGGERS, C. J. : The Physiology of Shock. Harvard University Press, Cambridge. Mass. (1950).

ON THE MECHANISM OF THE METABOLIC CHANGES IN MUSCLE DURING SHOCK: A STUDY OF DEHYDRATION AND ARTERIAL HYPOXIA

By

L. TAKÁCS and M. T.-SZABÓ

with the technical assistance of V. HORVÁTH

3rd DEPARTMENT OF MEDICINE AND INSTITUTE OF CHEMISTRY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received May 10, 1956)

In the early phase of research on shock interest had been focussed mainly upon the changes of circulation and it was not until quite recently that the role of metabolic disturbances has been given well-deserved attention [18]. Shock is known to be associated with increased blood levels of glucose, inorganic phosphate and lactic acid and with a decrease of ATP and glycogen in the liver, the striated muscle and the other organs [18]. In investigations continued over years we have found that carbohydrate metabolism in muscle undergoes typical changes in shock. It has been shown that in ischaemic and traumatic shock glycogen breakdown is definitely increased in the crushed and normal muscle alike (KOVÁCH, TAKÁCS, KISS [8]). This breakdown is mainly hydrolytic and not phosphorolytic, as it is under normal conditions. The phenomenon can be observed even as late as 1 or 2 weeks after sublethal ischaemic shock. (TAKÁCS, KOVÁCH, T.- SZABÓ, KISS [16]). Within a few hours glycogen synthesis is also retarded as a result of a decrease in phosphorylase activity, first in the injured muscle and later in the other skeletal muscles [9]. Th ephosphorylase activity can be restituted *in vitro* by the use of adenylic acid or of cytidine phosphate [10]. It has been also shown that the activity of hexokinase is inhibited by a pituitary factor, which can be antagonized by insulin (KOVÁCH, TAKÁCS, ROHEIM, KISS, KOVÁCH [11]). As a result of this, the utilisation of the large amount of glucose produced by hydrolysis from glycogen is also interfered with. Our investigations have ultimately led to the recognition that in shock not only the energy reserves of the organism are depleted, but also the energy released by carbohydrate breakdown is inferior in quantity to the normal output. This indicates that the disturbance of metabolism in shock involves also a loss of energy output in the organism.

The afore-mentioned investigations elucidated some typical aspects of the metabolism in shock, but failed to shed light on the underlying causes and on the factor or factors responsible for the starting of the process. It is well-known that in shock circulation is slowed and as a result of this, the blood supply to organs is impaired [18]. Stagnant hypoxia develops, and the organs take up more of the oxygen of the blood. It has been assumed that the impairment

of circulation and and the hypoxia secondary to it may be the two factors responsible for the initiation of pathologic metabolic processes. In order to elucidate this point we have studied the changes of metabolism found to occur in shock, notably those affecting the ATP and glycogen content, the phosphorolytic and hydrolytic breakdown of glycogen in abdominal muscle and the glucose uptake of the diaphragm, in dehydration (which is similar to shock in that it involves an impairment of circulation and a stagnant hypoxia), as well as in artificially induced arterial hypoxia. The dehydration experiments have been found suitable for deciding whether the impairment of circulation and the secondary hypoxia may actually lead to changes in metabolism, while the experiments in hypoxia for showing the role of the latter, without any interference by circulation.

Methods

In the dehydration (and in the control shock) experiments 30 cats of either sex, and in the hypoxic experiments 50 rats of either sex from a home bred were used.

To induce dehydration the pylorus was ligated 4 days before the experiment.

At the time of the experiment the mean level of NPN was 202 mg per 100 ml. In a few cat experiments shock was induced by ligating the two hind legs for 4 hours and by crushing them. Muscle was obtained prior to ligation, then 3 hours after the release of ligation. Hypoxia was induced in the rats by keeping them in an exsiccator containing 8 to 10 per cent oxygen and 90 per cent nitrogen over a period of 2,5 hours. The oxygen consumed was continuously replaced and the CO_2 produced was absorbed on soda lime.

Abdominal muscle for chemical analysis was obtained under ether anaesthesia excising samples weighing a few grams. In the oxygen uptake tests the diaphragm used was taken out after decapitation and exsanguination. For estimating ATP, the sample of muscle was placed into 0° C acetone without delay, finely minced therein and dried. A measured amount of the acetonic dry powder was homogenized and the ATP extracted with water was estimated by the specific method described by KRÁMER, PETTKO and STRAUB [13]. The muscle specimen used for estimating glycogen was weighed on torsion scales and dropped into hot KOH without delay. Subsequent treatment was essentially identical with the procedure described by GOOD, KRAMER and SOMOGYI [4]. Phosphorolytic glycogen breakdown was estimated in the presence of excess glycogen and NaF by the THER and MUELLER method [17]. Inorganic phosphorus was estimated according to FISKE and SUBBAROW [2]. The total amount of glycogen broken down by muscle in a similar incubation mixture was determined as already described [8]. The amount of glycogen broken down by hydrolysis was computed from the difference between total glycogen loss and phosphorolytic breakdown. The glucose uptake of diaphragms was estimated by the method of GEMILL [3], KRAHL and CORI [12]. In statistical analysis the STUDENT „t" test was used (FISHER [1]). In the dehydration and in the hypoxia series the control and post-operative estimations were made in different animals, thus, these experiments were not auto-control ones. Only in the shock experiments could we use muscle from the same animal for making the two types of estimation.

In the Tables ATP-content is expressed as mg/g acetonic dry powder, glycogen as percentage of wet muscle weight. The amount of glycogen broken down by phosphorolysis is expressed as the μg of inorganic P/g muscle used up from the incubation mixture in 20 minutes, total glycogen loss as glycogen broken down in mg/g muscle, also in 20 minutes.

Results

As the experiments mentioned in the introduction had been carried out in rats, it was necessary to ascertain whether the changes developed in cats, too. As shown by 6 experiments each, in the muscle of the ligated and crushed

Table I

Phosphorolytic breakdown of glycogen and utilisation of total glycogen in the hind limb muscle of cats in ischaemic shock, 3 hours after the release of ligation

No.	Total glycogen consumption mg/g/20 min		Phosphorolytic breakdown of glycogen inorganic P µg/g/20 min	
	normal	shock	normal	shock
29.	1,70	3,00	—	—
30.	2,80	5,40	270	180
31.	2,60	3,10	390	200
38.	2,40	4,00	230	100
39.	2,52	3,20	240	180
40.	2,58	4,80	—	—
41.	—	—	350	210
43.	—	—	400	130
Mean :	2,43	3,91	312	166

Table II

Metabolic changes in the abdominal muscle of dehydrated cats

ATP mg/g		Glycogen per cent		Phosphorolytic glycogen breakdown P µg/g/20 min		Total glycogen consumption mg/g/20 min		NPN mg per 100 ml
N	D	N	D	N	D	N	D	D
14,1	11,5	0,63	0,13	300	270	3,40	5,00	195
6,7	8,6	0,46	0,94	210	80	2,20	3,10	192
12,2	15,4	0,39	0,35	180	130	3,08	3,38	168
7,8	12,2	0,46	0,26	150	440	3,30	2,44	225
9,5	10,5	0,75	0,83	210	140	1,40	1,00	199
7,5	12,0	0,38	0,39	470	240	1,52	2,04	174
6,1	11,4	0,30	0,28	240	240	1,80	3,40	246
8,6	6,9	0,54	0,12	240	140	4,00	3,58	154
8,7	8,0	0,67	0,11	100	100	2,88	3,76	246
		0,64	0,05	190	250	1,50		225
		0,31	0,14	100				
		0,68	0,10					
Mean 9,0	10,9	0,52	0,31	220	190	2,60	3,08	202
± 0,9	0,8	0,05	0,06	26	37	0,31	0,31	
n 9	9	12	12	11	10	10	9	
t 1,58		2,29		0,64		1,13		
P > 0,10		< 0,05		> 0,50		> 0,20		

(N = normal ; D = dehydrated.)

limb 3 hours after release the phosphorolytic breakdown of glycogen was found decreased and the total glycogen loss increased, indicating that here, too, the hydrolytic breakdown of glycogen had increased (Table I).

Table III

Metabolic changes in striated muscle of hypoxic rats

ATP mg/g		Glycogen per cent		Phosphorolytic glycogen breakdown P μg/g/20 min		Total glycogen consumption mg/g/20 min		Glucose uptake mg/g/hour	
N	H	N	H	N	H	N	H	N	H
13,0	8,7	0,45	0,24	250	180	1,52	4,79	1,84	1,94
7,5	7,1	0,31	0,08	270	210	2,30	2,03	2,86	2,06
11,4	4,6	0,65	0,31	290	280	2,81	1,40	2,27	1,45
12,4	3,9	0,44	0,42	320	310	2,80	3,00	2,92	2,29
13,4	7,6	0,42	0,29	400	340	4,10	3,00	4,94	3,80
17,3	13,0	0,43	0,20	260	300	3,40	2,30	1,78	3,74
18,0	17,6	0,53	0,17	370	200	1,30	3,40	3,06	4,83
17,9	12,2	0,42	0,26	220	280	2,64		2,72	2,20
13,2	12,0	0,58	0,21	410	260	2,32		3,73	
14,0	10,5	0,40	0,21	190		3,16			
9,4	13,0	0,65		150		2,48			
14,6		0,49		190		2,50			
8,3		0,64		210		2,40			
13,6		0,66		330		3,02			
11,0		0,52				3,00			
15,8		0,65							
12,1		0,64							
19,2		0,48							
11,0		0,89							
12,8		0,49							
13,4		0,40							
12,9		0,30							
Mean									
13,2	10,0	0,50	0,24	276	279	2,66	2,86	2,90	2,79
± 0,5	1,1	0,03	0,03	22	15	0,13	0,31	0,32	0,39
n 22	12	22	10	14	19	15	7	9	8
t 2,66		4,52		0,11		0,33		0,20	
P < 0,02		< 0,01		> 0,50		> 0,50		> 0,50	

(N = normal; H = hypoxic)

In dehydration the ATP content of abdominal muscle was found unchanged 4 days following the ligation of the pylorus ; it was 10,9 mg/g dry weight, as compared to the control value of 9,0 mg/g. The level of glycogen sank from 0,52 to 0,31 per 100 mg. The change is significant. Neither the phosphorolytic breakdown of glycogen, nor the total glycogen loss showed a significant deviation from normal. From this it follows that the difference between the two, the hydrolytic breakdown of glycogen, did not change either (Table II).

In the striated muscle from rats maintained in the hypoxic atmosphere, the ATP concentration decreased significantly, from the control mean of 13,2 mg/g to 10,0 mg/g. The level of glycogen changed in a similar manner ; it was 0,24 per 100 g in hypoxia, as compared to the normal control value of 0,50 per 100 g. The decrease was significant. There was no difference between the abdominal muscle from the normal rat and that from the hypoxic rat in the phosphorolytic breakdown of glycogen or in utilisation of total glycogen. Likewise, no difference was detected in the *in vitro* glucose uptake of the diaphragms from the two kinds of animal (Table III).

Discussion

The control tests showed that in shock the phosphorolytic breakdown of glycogen decreased and the hydrolytic breakdown of glycogen increased in the cat in the same way as it had been observed in the rat.

In further experiments evidence was obtained showing that in grave dehydration the glycogen content of striated muscle decreased, but the level of ATP remained unchanged. Likewise, no changes took place in the phosphorolytic breakdown of glycogen and in the total glycogen loss, indicating that no change had taken place in the amount of hydrolysed glycogen, either. The animals were undoubtedly suffering from a grave disturbance of circulation, as indicated by the mean NPN-value of 202 mg per 100 ml. Thus, the experiments showed that dehydration, a condition associated with a reduction in minute volume and with an impairment of circulations similar to what occur in shock, does not lead to a preponderance of amylase activity, to an exaggeration of hydrolytic glycogen breakdown, although it may produce changes in metabolism, such as *e. g.* a diminution of the glycogen content. For these reasons it seems that the changes found in shock cannot be ascribed without reserve to an impairment of circulation and to the stagnant hypoxia secondary to the latter.

In the rats with hypoxia the level of ATP and of glycogen in muscle decreased significantly. A decrease in ATP content, as determined by a non-specific method, has been reported to occur in the muscle of hypoxic rabbits by Marcotte-Boy and Cheymol [14]. Moreland [15] found a low level of glycogen in the skeletal muscle in tortoises kept in a nitrogen atmosphere.

We have found on differences in the phosphorolytic breakdown of glycogen and in the utilisation of total glycogen ; consequently, the difference between the two, the hydrolytic breakdown, did not change either. Since there was equally no difference between the control and hypoxic groups in the glucose uptake of the diaphragm, it can be assumed that in hypoxia the activity of hexokinase is normal. On the basis of our experimental results we believe that, like stagnant hypoxia, arterial hypoxia also causes a reduction in the energy reserve (ATP and glycogen), but, unlike in shock, it produces no changes in hexokinase activity and in the ratio of phosphorolytic to hydrolytic breakdown.

There being no method which would allow a direct quantitative comparison between arterial and stagnant hypoxia, caution is warranted when interpreting values for arterial hypoxia in terms of stagnant hypoxia. According to data in the literature [5, 6], the 8 to 10 per cent oxygen mixture we have used depresses arterial saturation to below 70 per cent, and thus produces typical changes in circulation. It is believed that these data, together with the decrease in ATP and glycogen found in our experiments, offer proof that the hypoxia we have employed was sufficiently grave. We therefore feel justified to claim that the changes which in our experiments did not develop, are not produced by hypoxia in shock (involving a high-grade stagnant hypoxia), either.

Thus, the conclusion drawn from our experiments is that the decrease of ATP and glycogen in shock can be ascribed to an impairment of circulation or to hypoxia, since these factors both occur in dehydration and arterial hypoxia alike. On the other hand, the severe disturbance of carbohydrate metabolism in shock, the increased hydrolytic and the decreased phosphorolytic glycogen breakdown, or the inhibition of hexokinase, are presumably not ascribable either to circulatory failure, or to hypoxia, since these do not occur either in dehydration, or in arterial hypoxia. It is possible that these changes are typical of shock only and are elicited by other factors. The problem is being studied at our department.

SUMMARY

Experimental evidence has been obtained showing that in the skeletal muscle of the dehydrated cat the glycogen content decreases, while the level of ATP, the phosphorolytic and hydrolytic breakdown of glycogen remain unchanged. In rats with arterial hypoxia induced by exposure to a 8 to 10 per cent oxygen—nitrogen atmosphere the level of ATP and glycogen decreased in the skeletal muscle, while the phosphorolytic and hydrolytic breakdown of glycogen remained unaffected.

The results seem to show that from among the changes in metabolism occurring in shock the diminution of phosphorylase and hexokinase activity, and the increase in the hydrolytic breakdown of glycogen cannot be explained either by an impairment of circulation, or by hypoxia.

LITERATURE

1. FISHER, R. A. : Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd, London (1950).
2. FISKE, H., SUBBAROW, S. : J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).
3. GEMILL, C. A. : Bull. John Hopkins Hosp. **66**, 232 (1940).

4. Good, C., Kramer, H., Somogyi, M.: J. Biol. Chem. **100**, 455 (1933).
5. Gömöri P., Kovách A., Takács L., Földi M., Szabó Gy., Nagy Z., Wiltner W.: Magy. Belorv. Arch. **7**, 129 (1954).
6. Hackel, D. B., Goodale, W. T., Kleinerman, J.: Circulation Res. **2**, 169 (1954).
7. Kerpel—Fronius, Ö.: Orvosok Lapja **3**, 1661 (1947).
8. Kovách, A. G. B., Takács, L., Kiss, S.: Acta Physiol. Hung. **10** 303, (1956).
9. Kovách A. G. B., Takács L., Menyhárt J., Irányi M., Kalmár, Zs.: Acta Physiol. Hung. **3**, 357 (1952).
10. Kovách A., Takács L., Roheim P.,: Kísérl. Orvostud. **8**, 201 (1956).
11. Kovách, A. G. B., Takács, L., Roheim, P., Kiss, S., Kovách, E.: Acta Physiol. Hung. **3**, 345 (1952).
12. Krahl, M. E., Cori, C. F.: J. Biol. Chem. **170**, 607 (1947).
13. Krámer M., Pettko E., Straub F. B.: Kísérletes. Orvostud. **1**, 114 (1949).
14. Marcotte-Boy, G., Cheymol, J.: Compt. rend. soc. biol. **144**, 63 (1950).
15. Moreland, F. B.: Federation Proc. **14**, 414 (1955).
16. Takács L., Kovách A., T.-Szabó M., Kiss S.: Kísérl. Orvostud. **8**, 276 (1956).
17. Ther, L., Mueller, M.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **209**, 194 (1950).
18. Wiggers, C. J.: Physiology of Shock. Harvard University Press, Cambridge. Mass. (1950).

RADIOACTIVE ISOTOPE STUDIES OF THE CONNECTION BETWEEN THE LYMPH CIRCULATION OF THE NASAL MUCOSA, THE CRANIAL CAVITY AND CEREBROSPINAL FLUID

By

Á. Orosz, I. Földes, Cs. Kósa and G. Tóth

INSTITUTE OF ANATOMY, HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, DEBRECEN, and INSTITUTE OF PHYSICAL CHEMISTRY, KOSSUTH LAJOS UNIVERSITY, DEBRECEN

(Received May 26, 1956)

In an earlier work it has been shown by dye techniques (China ink, trypane blue, methylene blue) that a lymphatic communication exists between the mucosa of the nasal septum and the cranial cavity, inasmuch as the lymph flowed from the middle and posterior thirds of the septal mucosa toward the cranial cavity. In that work evidence was obtained showing that the dye reached not only the subarachnoidal space, but also the hypothalamus and in this way contributed as yet undescribed information [1].

The existence of the connection having thus been established, a new quantitative method has been sought for and found in the use of radioactive isotopes.

The results obtained being closely identical, it seems that the chemical properties of the radioactive indicator did not interfere decisively with the reliability and accuracy of the method.

With regard to the above points of view, we have used Thorium B and P^{32}. Hevesy [2] detected substantial amounts of P^{32} in the cerebral cortex after intravenous injection. Tobias, Bertrand and Waine have shown the presence of Au^{198} in the cerebral cortex, in the wall of the lateral ventricle and in cerebral blood vessels after intravenous administration carried out under physiological conditions [3]. Bakay [4] studied the distribution of tracer elements in the central nervous system after intrathecal and intravenous injection. On the other hand, in the reports dealing with the fluid circulation of the nasal mucosa to our best knowledge no mention has been made of investigations involving the use of radioactive isotopes.

Materials and methods

In part of the experiments the lead isotope ThB has been used. A few tenths ml of 0,2 *N* $Pb(NO_3)_2$ added to the radioactive preparation have been used as carrier. The results of the ThB experiments needed no other correction than the deduction of the natural effect. The thin samples absorbed so little of beta rays that autoabsorption could be ignored. The results are given for weight unit.

In the P^{32} (built into H_3PO_4) studies the samples were adjusted to equal inactive material per surface unit and were prepared from the dry residue of single digested test substances.

Thus, autoabsorption was negligible. The amount of radioactive isotope introduced into the organism was 0,1 mC in rats and 0,2 mC in rabbits.

Measurements were made by means of an end-window counter tube, about 5 to 6 hours after injection. To ensure an equal geometrical distribution, the samples were placed into leaden drawers in the leaden cover of the tube.

Twenty adult male rabbits and 60 adult male rats were used in the experiments. The solution containing the radioactive isotope was injected into the middle third of the septal mucosa, as it had been done in the dye series. The pH of the injected solution was 6. The animals were sacrificed after 15, 30, 45, 60, 75, 90 and 120 minutes. The brain was divided into the following parts : olfactory lobe, frontal lobe, temporal lobe, occipital lobe, hypothalamus, hypophysis, cerebellum, pons and oblong medulla. In some cases centres in the basal ganglia, corpora quadrigemina were also examined for activity.

The controls were given 0,5 ml of the solution containing the radioactive isotope subcutaneously, intravenously, or intraperitoneally and were sacrificed at the same time as the experimental animals.

Results

In both the $ThB(NO_3)_2$ and the $H_3P^{32}O_4$ series the labelled ion reached its maximum concentration in the central nervous system 60 minutes following injection, in contrast with the intravenous experiments. This fact offers proof that the radioactive isotope injected into the nasal mucosa reached the central nervous system through another route and in shorter time than after intravenous administration.

As to distribution, it was remarkable that in our experiments the activity of the hypophysis was significantly lower than that of the hypothalamus. This is in sharp contrast with what HEVESY [2] has observed after intravenous administration, when 88 per cent of the injected radioactive isotope were demonstrated in the pituitary and corpus pineale. In this connection reference is made to the studies by BORELL and ÖRSTROM [5] in which considerable amounts of the intraperitoneally injected P^{32} accumulated in the choroid plexus and in the wall of the lateral ventricles. In our studies with ThB it was intended to elucidate eventual differences in total brain activity after administration through different routes. The results have been tabulated (Table I)

Table I

Distribution of $ThB(NO_3)_2$, *30 minutes after injection*

Route of administration	Brain	Liver + muscle	Number of rats
	discharges/min/g		
Intranasal	120,3	27,6	5
Subcutaneous	59,0	223,0	3
Intravenous	67,4	294,0	3
Intraperitoneal	48,0	1500,0	3

It is obvious from the data in Table I that ThB introduced into the middle third of the nasal mucosa reached in the central nervous system a concentration

twice as high as that attained by injection through either the intravenous, or the subcutaneous, or the intraperitoneal route. On the other hand in parenchymal organs and different tissues low levels resulted after intranasal administration and high levels with the latter methods. The results for liver and muscle, two organs richly supplied with blood and thus representative are presented in Table I. It should be added as explanation that the radioactive indicator injected into the nasal mucosa entered directly the CSF space. BAKAY [6] has reported that the radioactive isotope reaches the brain sooner and in higher concentration if injected intracysternally.

It has been also found (BAKAY [4]) that the isotope administered intracisternally is demonstrable after 30 minutes throughout the brain (except in the frontal lobe and the caudal cord). This shows that the route of the isotope after nasal injection is somewhat different from that administered intracysternally.

Table II

The distribution of intranasally injected thorium B in the brain

Animal, No.	Amount demonstrated				Discharge/gram	Discharge/minute
	1	2	3	4	total	gram
I.	29.80 / 0,3 g	8.00 / 0,259	1.55 / 0,014	58.96 / 0,307	98.31 / 0,880 g	111,7/g
II.	41.64 / 0,261	18.84 / 0,273	11.64 / 0,020	36.84 / 0,240	108.96 / 0,794	137,2/g
III.	8.2 / 0,257	5.4 / 0,200	1.2 / 0,016	6.6 / 0,347	21.4 / 0,820	25,8/g
IV.	28.4 / 0,233	15.4 / 0,261	14.4 / 0,025	22.0 / 0,328	80.2 / 0,837	95,8/g
V.	67.4 / 0.222	58.4 / 0,261	6.6 / 0,025	16.4 / 0,349	148.8 / 0,857	173.6/g
VI.	10.0 / 0,252	56.0 / 0,264	3.0 / 0,028	13.4 / 0,309	82.4 / 0,854	96,6/g
Total:	185.4 / 1,515	162.0 / 1,518	38.19 / 0,128	154.2 / 1,880		
E/min / gram	122.4	106.7	298.3	82.02		—

1. Left frontal lobe.
2. Right frontal lobe.
3. Hypothalamus.
4. Parietal, occipital lobes, cerebellum.

In our experiments the activity of the frontal lobe developed sooner and was higher, because the radioactive isotope reached the CSF space from the anterior scala. This is consistent with the statement made by BAKAY [6] that the parts of the brain adjacent to the CSF space develop a higher activity.

In our studies on the distribution of the tracer in various parts of the brain the following results were obtained. The highest number of discharges per gram weight was found in the hypothalamus. The frontal lobe exhibited about 1/3 of this activity, while the activity in other cerebral areas (as compared to that in the hypothalamus) was insignificant. In this case the animals were killed 20 minutes after injection (Table II).

To eliminate adsorption and radiocolloids, inactive lead was added to the solutions containing the radioactive isotope. In these experiments performed in 10 rats it was found that ThB accumulated in the hypothalamic region, but considerable amounts were detectable also in the basal ganglia. This time the measurements were made 30 minutes after injection (Table III).

Table III

Activity of different parts of the brain

Part of brain tested	Measured value	Discharges/minute/g
Frontal and olfactory lobes	367,5 / 0,472 g	778,7/g
Hypothalamus	57,5 / 0,022 g	2613,6/g
Basal ganglia	39,0 / 0,030 g	1300,0/g
Temporal lobe	124,2 / 0,313 g	396,8/g
Cerebellum, oblong medulla	84,0 / 1,250 g	64,7/g

In the course of the investigations the question arose, what changes occur after injection in the activities of CSF, blood and brain and how are these correlated during the period of observation? To elucidate this point, the above values were followed up over periods of from 15 to 120 minutes after injection (6 rabbits). The results are presented in Fig. 1.

Until 30 minutes after injection the activity of CSF increases steeply, showing no substantial alteration during the next 2 hours. This indicates that ThB passes slowly from the CSF into venous blood. The curve for total brain activity increases for 15 to 30 minutes, then runs parallel (at a lower level)

with CSF activity. The activity of blood showed no substantial changes during the 120-minute observation period.

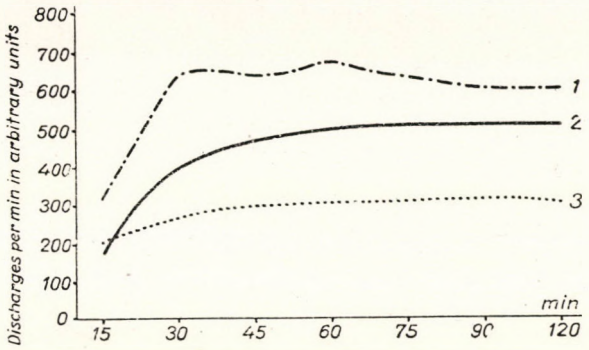


Fig. 1. Appearance of isotope ThB after injection into the nasal mucosa
1 : In CSF; 2 : in brain; 3 : in blood

To make longer observation possible, similar experiments have been carried out with P^{32}, with the difference that in these series the controls, too, were tested for activity in the CSF and the blood. The results are shown in Fig. 2.

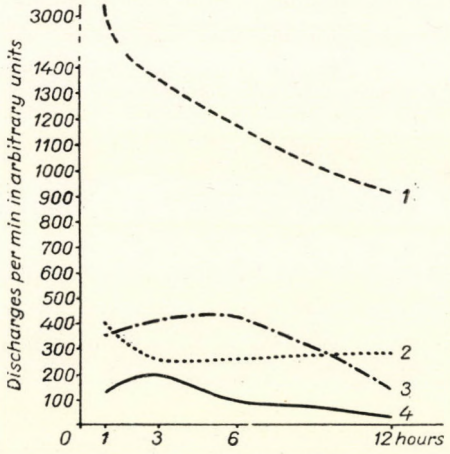


Fig. 2. 1 : After intravenous injection, in blood; 2 : after intranasal injection, in blood; 3 : after intranasal administration, in CSF; 4 : after intravenous administration, in CSF

It was found that, after intravenous injection, P^{32} reached a very high initial concentration in blood and after 12 hours, although it was substantially lower than the initial value, the level was about 3 times as high as that attained by using the nasal mucosa route. After rising for about 3 hours, the activity of CSF decreased, fast at first and slowly later.

After injection into the nasal mucosa the blood level remained low, while the activity of the CSF was still about twice as high as that observed after intravenous administration. After 12 hours the CSF activity curve began to decline, but it was still high above the curve of CSF activity in the controls.

Discussion

The radioactive isotope experiments have fully borne out the results obtained by dye techniques. It should, however, be noted that for certain isotopes blood-brain barrier does not exist.

It is known from the literature that only small amounts of parenterally introduced radioactive isotopes (Cu^{64}, I^{131}, Cl^{36}, S^{35} and Zn^{65}) were demonstrable in the brain [7, 8, 9, 10, 11].

In contrast with this, our tabulated data reveal that considerable proportions of the radioactive isotopes ThB and P^{32}, respectively, enter the brain when injected intranasally. The distribution in the brain of the radioactive isotope injected into the nasal mucosa is significantly different from that recovered after intravenous administration. In terms of the arbitrary activity units per gram weight the following differences were found in the brain ; ThB intranasally : 120,3, subcutaneously 59,0, intravenously 67,4 and intraperitoneally 48,0. Thus, the intranasal value was about twice as high. As regards the activities of liver and muscle, a similar comparison will show the intranasal inoculation to produce an activity not amounting to more than a mere one-tenth or one-sixtieth of that produced by administration by other parenteral routes.

Brain activity, as expressed in the above arbitrary units, reaches the peak after 30 to 60 minutes, and begins to decrease after 2 hours. The CSF curve shows an almost parallel course, while the activity in blood increases slowly. From this it follows that during the first 2 hours of examination the radioactive isotope content of the cerebral vessels may be ignored when evaluating the effect in the brain.

In his studies on the distribution in the central nervous system of intracysternally or intravenously injected P^{32}, BAKAY [4] found that on intravenous administration the highest activity was reached in the pituitary, while on intracysternal injection the radioactive isotope attained its highest concentration in tissues adjacent to the aqueduct and choroid plexus, with only very small amounts detectable in different parts of the brain. These results can be explained by the remarkably abundant vascularisation of the pituitary and compare interestingly with our results.

In our intranasal experiments the olfactory lobe, frontal lobe, tissues adjacent to the lateral ventricle and the hypothalamus exhibited a strong

activity. In connection with the hypothalamus it may be suggested that in it the relatively high concentration of radioactive isotope can be explained by the abundant vascular supply of that area and by absense of a blood-brain barrier. The high activity in the basal ganglia might have also been due to their favourable circulation. In earlier injvestigations made by injecting dye into the nasal mucosa we succeeded in following up by gross examination its course on the cerebral base to the hypothalamus.

In the present study we have succeeded again to prove that the blood-brain barrier can be by-passed in the way described earlier and to contribute quantitative data concerning the distribution in the central nervous system of the injected test substances. KROMPECHER et al. [12] have made use of these investigations in therapy, when they instilled insulin and streptomycin on the nasal mucosa.

SUMMARY

The quantitative distribution in the central nervous system of radioactive isotopes (ThB and P^{32}) injected into the nasal mucosa has been studied.

It has been found that:

1. The greatest proportion of the radioactive isotope thus introduced is accumulated in the hypothalamus, with considerable amounts present also in the basal ganglia, olfactory lobe and frontal lobe.

2. The peak of CSF and brain activity is attained 60 minutes following injection.

3. The radioactive isotope injected into the nasal mucosa is absorbed at a higher rate than that injected either subcutaneously or intravenously.

4. The activity reached in the brain after the intranasal administration surpassed in every case the activity measured after intravenous or subcutaneous injection. On the other hand, the parenchymal organs showed a considerably lower activity.

5. Observations continued over prolonged periods revealed that the concentration of radioactive P^{32} did not decrease in the CSF even as late as 6 hours after injection.

LITERATURE

1. KÓSA CS., FÖLDES I., OROSZ Á.: Az orrnyálkahártya nedvkeringésének a koponya-üreggel való kapcsolatai. In the press. (Acta Morph. Hung.)
2. HEVESY, G.: Radioactive Indicators. Interscience Publishers, New York, London. (1948).
3. TOBIAS, C. A., BERTRAND, J. J., WAINE, J.: Cit. Hevesy.
4. BAKAY, L.: Arch. Neurol. Psychiat. **66**, 419 (1951).
5. BORELL, U., ÖRSTROM: Cit. Hevesy.
6. BAKAY, L.: The Blood Brain Barrier. Thomas, Springfield (1955).
7. DZIEWIATKOWSKI, D. D.: J. Biol. Chem. **161**, 723 (1945).
8. MANERY, J. F.: Am. J. Physiol. **129**, 417 (1940).
9. REILMAN, I., CHAIKOFF, I. Z., NORTON, M. E.: J. Biol. Chem. **139**, 433 (1941).
10. SCHUBERT, G., VOGT, H., MAURER, K., RIEZLER, W.: Cit. Hevesy.
11. SHELINE, E., CHAIKOFF, I. L., JONES, H. B., MONTGOMERY, M. J.: J. Biol. Chem. **149**, 139 (1943).
12. KROMPECHER, ST., FORNET, B., FÖLDES, ST., HADHÁZY, CS., OROSZ, Á., KÓSA, CS., TÓTH, G., HANKISS, J., FILIPP, G., KÖVÉR, B., KECSKÉS, J.: Acta Physiol. Hung. Suppl. **6**, 56 (1954).
13. RUSZNYÁK I., FÖLDI M., SZABÓ GY.: A nyirokkeringés élet- és kórtana. Akadémiai Kiadó, Budapest. (1955).
14. SCHWIEGK, H.: Künstliche Radioactive Isotope. Springer, Berlin—Göttingen. (1953).

Pharmacologia

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE INTRAPLEURALE RESORPTION DER p-AMINOSALIZYLSÄURE

Von

O. SCHWEIGER, A. TOMCSÁNYI, F. KULKA, M. LEHOCKI und Frau A. TOMCSÁNYI

I. MEDIZINISCHE, BIOCHEMISCHE UND CHIRURGISCHE ABTEILUNG DES STAATLICHEN KORÁNYI TUBERKULOSE-INSTITUTS, BUDAPEST

(Eingegangen am 30. Juni 1955)

Die Bildung und die Resorption der in der Brusthöhle vorhandenen Flüssigkeit stehen normalerweise in Gleichgewicht. Unter pathologischen Verhältnissen tritt in diesem Gleichgewicht zu Lasten der Resorption eine Störung ein, und im Thoraxraum sammelt sich Flüssigkeit an. Der Resorptionsmechanismus der entstandenen Flüssigkeit stellt ein noch nicht völlig geklärtes Problem dar. Eine Klärung dieser Frage wäre jedoch in klinischer Hinsicht wichtig, denn man könnte sich vorstellen, dass es durch Erkennung des Mechanismus der Resorption möglich sein würde, neue therapeutische Lösungen zur Resorption des bei den Erkrankungen der Pleura entstandenen Exsudats zu finden.

Im Zusammenhang mit der Resorptionsfunktion der intakten Pleura behandeln die Literaturangaben vor allem die Frage, wie die physikalischen Faktoren auf die Resorption der in den Thoraxraum eingeführten verschiedenen Farbstoffe wirken (GROBER [1], DYBKOWSKY [2], NAEGELI [3], HERBERT [4], COURTICE[5], MEYERSTEIN[6], BITTORF und STEINER[7], PLATE[8], STARLING [9]).

Indessen finden sich nur wenige Angaben darüber, wie man die Resorption der Brusthöhle medikamentös zu beeinflussen vermag. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die medikamentöse Beeinflussung der intrathorakalen Resorption einer niedermolekulären Substanz, der p-Aminosalizylsäure (PAS).

Methodik

Die Untersuchungen wurden an 62, 2,5—3,5 kg schweren gesunden Kaninchen vorgenommen. Bei den Tieren legten wir mit der DENECKEschen Nadel, die (bei negativer Manometerdeviation) mit einem Wassermanometer verbunden wurde, einen Pneumothorax an. Hiernach führten wir durch dieselbe Nadel 1 ml 10%ige PAS-Natrium-Lösung in die Brusthöhle ein. Die Lösung wurde mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. 5 und 15 Minuten nach der PAS-Verabreichung entnahmen wir aus der Ohrvene des Kaninchens Blut und bestimmten dann aus dessen Serum die prozentuale PAS-Konzentration mit der photometrischen Methode von CURCI und FRANCISCIS [10]. Nach 2—3tägiger Pause gaben wir denselben Kaninchen zusammen mit PAS auch noch irgendein anderes Medikament in den Thoraxraum. Die Bestimmung der PAS-Serumkonzentration führten wir in ähnlicher Weise durch und verglichen die Ergebnisse der beiden Versuchsserien miteinander. Wir achteten sorgfältig darauf, dass PAS bzw. das gleichzeitig angewandte andere Medikament in jedem Falle wirklich in die Brusthöhle gegeben wurde. Bei jedem Medikament überzeugten wir uns auch davon, dass es die zum Nachweis der PAS benutzte Diazo-Reaktion nicht stört. Die angewandte

Methode vermag 5 μg/ml PAS im Serum mit ausreichender Genauigkeit (±5%))nachzuweisen. Nach unseren Erfahrungen beträgt die PAS-Konzentration im Serum 5 Minuten nach intrapleuraler Einführung von 1 ml 10%iger PAS-Lösung 40—50 μg/ml, was erheblich mehr ist als die untere Empfindlichkeitsgrenze der Methode. Vom chemischen Standpunkt verursacht daher die Untersuchung der Beeinflussung der PAS-Konzentration im Serum keinerlei Schwierigkeiten. Wir untersuchten die Wirkung folgender Pharmaka:

I. Hyaluronidase (Permease, *Cilag*, 12 Visc. - E/ml). — Streptokinase (*Welcome* 20 Christensen-E/ml).

II. Acetylcholin (*La Roche*, 10 mg/ml). — Diaphyllin (48 mg/ml). — Histamin (0,5 mg/ml). — Hydergin (0,3 mg/ml). — Äthansulfosaures Ergotoxin (Ergam, 0,2 g/ml). — Kalium rhodanatum (1 mg/ml). — Nikotinsäure (2 mg/ml). — Pilocarpin (0,1 mg/ml). — Prostigmin (*La Roche*, 0,2 mg/ml).

III. Adrenalin (Tonogen, 20 μg/ml).

IV. Atropin (1 mg/ml). — Methylhomatropin bromid (Novatropin, *Chinoin*, 0,5 mg/ml). — Tetraäthylammoniumbromid (TEAB, 100 mg/ml).

Von den erwähnten Medikamenten führten wir fallweise 1 ml in die Brusthöhle ein. Sofern wir ein Mittel in anderer Konzentration benutzten, wird dies an entsprechender Stelle erwähnt. In jedem Fall verwendeten wir 10%iges PAS-Natrium, von dem stets 1 ml intrapleural injiziert wurde.

Ergebnisse

Vor Beginn der Untersuchungen mussten wir uns davon überzeugen, ob die spontane Resorption aus dem Thoraxraum durch den mehrmaligen experimentellen Reiz später nicht verändert wird. Zu diesem Zweck führten wir bei denselben Kaninchen in Abständen von 2—3 Tagen mehrmals 1 ml 10%ige PAS in die Brusthöhle ein und bestimmten nach 5 und 15 Minuten die PAS-Konzentration im Serum. Die gewonnenen Werte wurden miteinander verglichen. Die Untersuchungen nahmen wir an 10 Kaninchen viermal nacheinander vor. Die Ergebnisse sind auf Abb. 1 zusammengefasst (die auf dieser und den anderen Abbildungen angeführte Bezeichnung inpl. bedeutet intrapleurale Verabreichung).

Die Säulen der Abbildung zeigen den Durchschnitt der PAS-Serumkonzentration der bei je einer Gelegenheit durchgeführten 10 Untersuchungen in mg%. Neben den Durchschnittswerten geben wir die quadratische Abweichung sowie die signifikante Differenz an. Die Werte der Blutentnahme nach 5 und 15 Minuten sind jeweils gesondert angeführt.

Wie aus den Angaben der Abb. 1 hervorgeht, besteht in der pleuralen Resorption der zu verschiedenen Zeitpunkten eingeführten PAS keine wesentliche Abweichung. Zwischen den einzelnen Werten liegt auch dann keine signifikante Differenz vor, wenn wir den kleinsten Durchschnittswert mit dem grössten vergleichen. Die Tatsache, dass die physiologischen Verhältnisse der Pleura auch durch mehrmalige Ausführung des Versuchs nicht wesentlich verändert werden, suchten wir auch dadurch zu bestätigen, dass wir eines der Tiere bei Beendigung der Versuchsserie töteten. Die Untersuchung ergab, dass nach mehrmaliger PAS-Verabreichung eine wesentliche pleurale Reaktion weder makroskopisch noch histologisch vorhanden war.

Nachdem die Befunde ergeben hatten, dass in der Resorption der zu verschiedenen Zeitpunkten eingeführten PAS keine Abweichung besteht, konn-

ten wir nunmehr die medikamentöse Beeinflussung der Resorption untersuchen. Auf Grund vorstehender Resultate konnten wir sicher sein, dass die festgestellte Veränderung auf die medikamentöse Wirkung und nicht auf die des mehrmals wiederholten Versuchs zurückzuführen sei.

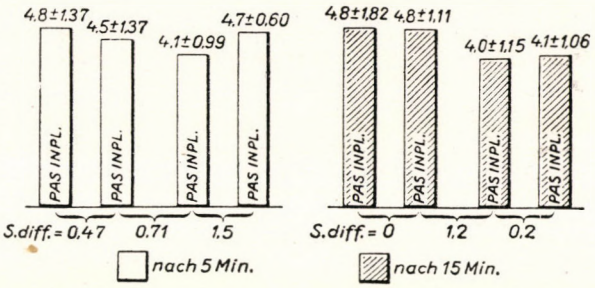


Abb. 1. Die intrapleurale PAS-Resorption nach 5 und 15 Minuten

Zuerst untersuchten wir die Hyaluronidase- und Streptokinase-Wirkung. Die Resultate gehen aus Abb. 2 hervor.

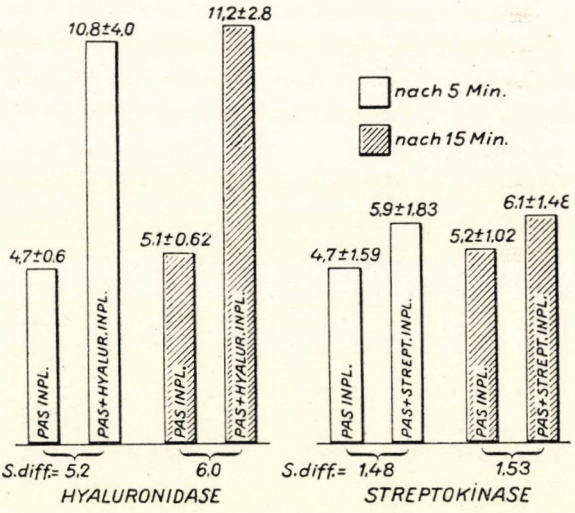


Abb. 2. Wirkung der intrapleural verabreichten Hyaluronidase und Streptokinase auf die intrapleurale PAS-Resorption

Die Bezeichnungen sind dieselben wie auf Abb. 1. Jede einzelne Säule zeigt hier, wie auch im weiteren den Durchschnitt der PAS-Serumkonzentration von 10 Versuchstieren in mg% an.

Wie ersichtlich, wurde die PAS-Resorption aus der Pleurahöhle durch Hyaluronidase hochgradig gesteigert, während Streptokinase in der im Versuch benutzten Menge auf die Resorption ohne Einfluss war.

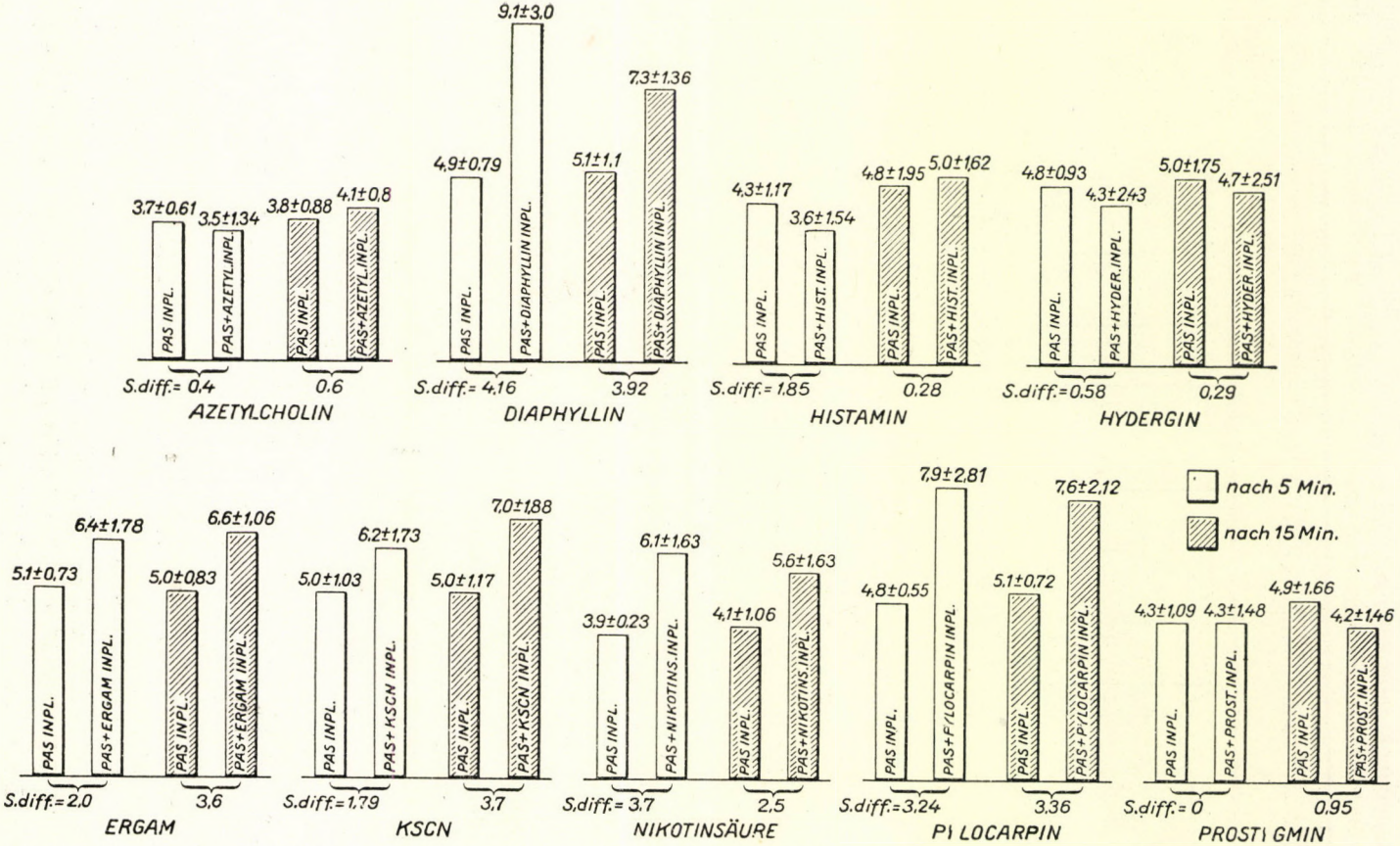


Abb. 3. Wirkung von intrapleural gegebenem Azetylcholin, Diaphyllin, Histamin, Hydergin, Ergam, Kaliumrhodanid, Nikotinsäure, Pilocarpin und Prostigmin auf die intrapleurale PAS—Resorption

Im weiteren untersuchten wir, auf welche Weise vasodilatatorisch wirkende Medikamente die intrapleurale Resorption beeinflussen. Die Untersuchungsergebnisse sind auf Abb. 3 veranschaulicht.

Wie die Resultate zeigen, wurde die intrathorakale PAS-Resorption bei intrapleuraler Verabreichung von Diaphyllin, Kaliumrhodanid, Nikotinsäure, Pilocarpin und Ergam gesteigert. Azetylcholin, Histamin, Hydergin und Prostigmin übten in der benutzten Konzentration keine ähnliche Wirkung aus.

Im Zusammenhang mit Diaphyllin untersuchten wir auch, ob die die pleurale Resorption steigernde Wirkung auch dann zur Geltung kommt, wenn

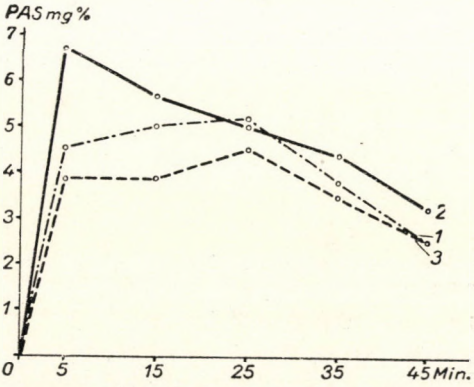


Abb. 4. Wirkung von intrapleural und intravenös verabfolgtem Diaphyllin auf die intrapleurale PAS-Resorption. 1: PAS inpl.; 2: PAS + DIAPH. inpl.; 3: PAS inpl., DIAPH. i.v.

PAS in die Brusthöhle, Diaphyllin aber intravenös gegeben wird. Die Ergebnisse sind auf Abb. 4 zusammengefasst.

Auf diesem und den anderen Diagrammen ist an der Abszisse die Zeit, an der Ordinate die PAS-Serumkonzentration in mg% angegeben. Die Kurven zeigen die Durchschnittswerte der an 5 Tieren vorgenommenen Untersuchungen. Die Blutentnahme wurde 5 Minuten nach der Verabreichung des Medikaments begonnen und alle 10 Minuten wiederholt. Wir bestimmten die PAS-Serumkonzentrationswerte, wenn in den Thoraxraum nur PAS (Kurve Nr. 1), wenn PAS und Diaphyllin (Kurve Nr. 2) intrapleural eingeführt und wenn PAS intrapleural, Diaphyllin jedoch intravenös gegeben wurde (Kurve Nr. 3).

Wie aus den Befunden ersichtlich, wurde die PAS-Resorption aus dem Thoraxraum durch Diaphyllin nur dann gesteigert, wenn letzteres intrapleural gegeben wurde. Bei intravenöser Verabreichung war Diaphyllin auf die intrathorakale Resorption ohne wesentlichen Einfluss.

Hiernach untersuchten wir, wie das vasokonstriktorisch wirkende Adrenalin die pleurale PAS-Resorption verändert. Die Ergebnisse sind Abb. 5 zu entnehmen.

Bei intrapleuraler Darreichung wurde die PAS-Resorption aus der Brusthöhle durch Adrenalin wesentlich herabgesetzt.

Im weiteren untersuchten wir, wie sich die PAS-Resorption gestaltet, wenn wir zusammen mit Adrenalin auch Diaphyllin bzw. Hydergin oder Ergam intrapleural verabfolgten. Die Untersuchungsresultate sind auf Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I

PAS+Adrenalin (20 µg/ml) + Diaphyllin inpl.				PAS+Adrenalin (20 µg/ml) +Ergam (0,2 g/ml) inpl.				PAS+Adrenalin (20 µg/ml) +Hydergin (0,2 mg/ml)			
nach 5 Min.		nach 15. Min.		nach 5 Min.		nach 15 Min.		nach 5 Min.		nach 15 Min.	
PAS mg% inpl.	PAS+ Tonogen+ Diaph. inpl.	PAS mg% inpl.	PAS+ Tonogen+ Diaph. inpl.	PAS mg% inpl.	PAS+ Ton. +Ergam inpl.	PAS mg% inpl.	PAS+ Ton. +Ergam inpl.	PAS mg% inpl.	PAS+ Ton. +Hyd. inpl.	PAS mg% inpl.	PAS+ Ton. +Hyd. inpl.
4,5	3,5	5,6	2,6	5,0	2,8	5,4	5,5	6,0	3,9	6,2	6,7
4,5	3,0	4,7	3,4	3,0	4,6	4,3	5,0	5,8	5,2	4,8	7,4
3,0	2,2	4,3	3,3	5,5	2,9	5,6	5,3	4,3	5,6	4,6	6,2
4,4	1,3	5,0	1,4	6,0	2,9	6,2	3,1	5,0	5,0	5,4	7,9
3,8	2,9	4,8	2,6	4,5	2,8	4,7	4,5	5,5	5,0	5,6	7,9
4,0	2,5	4,8	2,6	4,8	3,2	5,2	4,6	5,3	4,9	5,5	7,2

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, wurde die PAS-Serumkonzentration durch die von uns benutzte Adrenalinmenge nach 5 Minuten auf 0,6 mg% bzw. nach 15 Minuten auf 0,8 mg% — gegenüber dem Durchschnittswert von etwa 4 mg% — herabgesetzt. Nach den Angaben der Tabelle I beträgt hingegen bei gleichzeitiger Diaphyllingabe der auf Adrenalinwirkung gewonnene Durchschnittswert der PAS-Serumkonzentration 2,5 bzw. 2,6 mg%. Durch seine gefässerweiternde Wirkung vermag also Diaphyllin die durch Adrenalin verursachte Resorptionshemmung wenn auch nicht völlig, so doch in hohem Masse zu verhindern. Ergam und Hydergin antagonisieren die resorptionshemmende Wirkung des Adrenalins noch ausgeprägter, ja Hydergin, das allein die intrapleurale PAS-Resorption nicht beeinflusst, wirkt in dieser Hinsicht am stärksten.

Nach den vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Mitteln untersuchten wir die Wirkung von Atropin und Novatropin auf die intrathorakale Resorption. Die Ergebnisse sind Abb. 6 zu entnehmen.

Wie ersichtlich, wurde die PAS-Resorption aus dem Thoraxraum bei intrapleuraler Verabreichung oben genannter Medikamente herabgesetzt.

Im weiteren prüften wir die Gestaltung der PAS-Resorption aus dem Thoraxraum nach Darreichung von Adrenalin, Atropin, Novatropin und TEAB.

Abb. 7 gibt die Durchschnittswerte der an 5 Kaninchen vorgenommenen Untersuchungen wieder. Blut wurde zuerst 5 Minuten nach der Einführung des Medikaments entnommen, dann die Blutentnahme alle 10 Minuten wiederholt und hiernach die PAS-Serumkonzentration bestimmt.

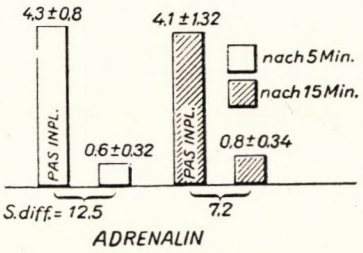


Abb. 5. Wirkung der intrapleuralen Adrenalingabe auf die intrapleurale PAS-Resorption

Die Zeitkurve der PAS-Resorption veränderte sich auf Wirkung sämtlicher vier untersuchten Pharmaka. Während jedoch die Resorptionskurven von TEAB, Atropin und Novatropin nur insoweit verändert wurden, dass

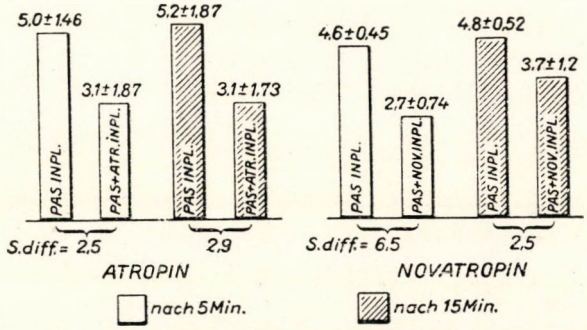


Abb. 6. Wirkung von intrapleural gegebenem Atropin, Novatropin und TEAB auf die intrapleurale PAS-Resorption

diese niedriger verliefen als die der Kontrollen, aber diesen ähnlich ihr Maximum innerhalb von 5—25 Minuten erreichten, und diese Werte nach 10—15 Minuten, bis zur Beendigung der Untersuchung, ständig sanken, wies die nach intrapleuraler Adrenalin Verabreichung entstandene Resorptionskurve einen ganz anderen Verlauf auf: der PAS-Konzentrationswert im Serum nahm während der ganzen Versuchsdauer bis zum Ende der Untersuchung ständig zu.

Hiernach untersuchten wir ähnlich wie bei Diaphyllin, ob bei der intrapleuralen PAS-Resorption eine Veränderung eintritt, wenn PAS in den Thoraxraum, Novatropin jedoch intravenös gegeben wird. Die Bestimmungen wurden an 5 Kaninchen ebenso wie bei den Versuchen mit Diaphyllin vorgenommen. In einer Versuchsserie gaben wir den Kaninchen 1 ml der 0,25%igen, in einer

anderen 1 ml der 0,025%igen Novatropin-Lösung. Die Versuchsergebnisse sind auf Abb. 8 veranschaulicht.

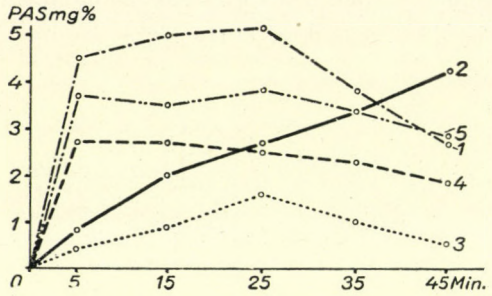


Abb. 7. Wirkung der intrapleuralen Verabreichung von Adrenalin, TEAB, Atropin und Novatropin auf die intrapleurale PAS-Resorption. 1: PAS inpl.; 2: PAS + Tonogen inpl.; 3: PAS + TEAB inpl.; 4: PAS + Atropin inpl.; 5: PAS + Novatropin inpl.

Die Kurve Nr. 2 der Abb. 8 stellt die Wirkung der zu gleicher Zeit mit PAS intravenös gegebenen grösseren Novatropin-Dosis auf die PAS-Resorption dar. Die so gewonnenen PAS-Werte sind höher als die der Kontrollen (Kurve

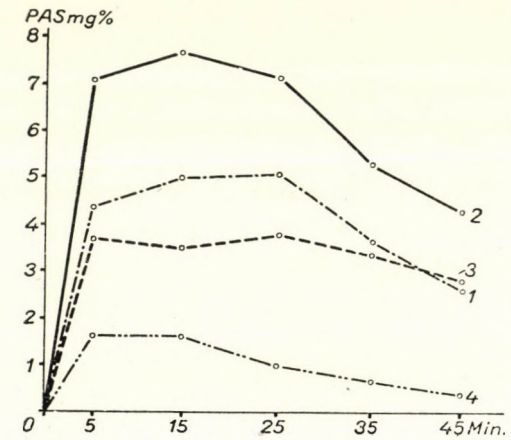


Abb. 8. Wirkung der intrapleuralen und intravenösen Novatropingabe auf die intrapleurale PAS-Resorption. 1: PAS inpl.; 2: PAS inpl., Novatropin i. v.; 3: PAS + Novatropin inpl.; 4: PAS inpl., Novatropin i. v.

Nr. 1). Die Kurve Nr. 4 der Abbildung jedoch zeigt, dass die intravenöse Einführung von 1/10 vorstehender Dosis entgegengesetzte Wirkung ausübt, d. h. die Resorption durch Novatropin in dieser Dosis herabgesetzt wird.

Ähnlicherweise untersuchten wir die Entwicklung der PAS-Resorption aus der Brusthöhle, wenn die TEAB-Injektion intravenös bzw. subkutan verabreicht wurde. (TEAB wurde in einer Menge von 100 mg/ml gegeben.) Abb. 9 enthält die Resultate.

Wie aus den Kurven ersichtlich, wurde die PAS-Resorption durch die intravenöse TEAB-Verabfolgung nicht verändert (Kurve Nr. 5). Gaben wir jedoch PAS intrapleural und gleichzeitig TEAB subkutan (Kurve Nr. 4), lagen die Werte unter denen der Kontrolle (Kurve Nr. 1). Kurve Nr. 3 zeigt die PAS-Werte, die wir erhielten, wenn wir vorstehende TEAB-Menge ebenfalls subkutan injizierten und 15 Minuten später PAS intrapleural verabreichten. Die Kurve beginnt mit hohen Werten und sinkt allmächlich, verläuft also ganz anders

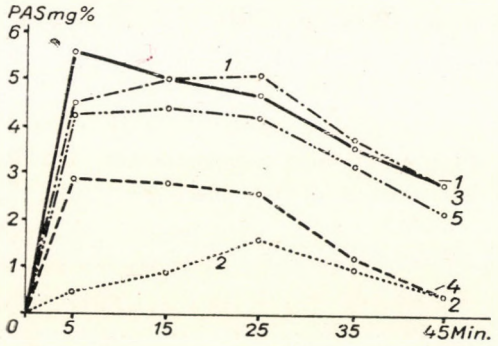


Abb. 9. Wirkung der intrapleuralen, intravenösen und subkutanen Anwendung von TEAB auf die intrapleurale PAS-Resorption. 1: PAS inpl.; 2: PAS + TEAB inpl.; 3: TEAB s. c. + PAS inpl.; 4: TEAB s. c. + PAS inpl.; 5: PAS inpl., TEAB i. v.

als nach der gleichzeitig gegebenen intrapleuralen PAS- und subkutanen TEAB-Injektion.

Aus vorstehenden Angaben geht demnach hervor, dass Novatropin und TEAB je nach der Anwendungsart bzw. Dosis die Resorption der intrapleural gegebenen PAS zu steigern bzw. herabzusetzen vermögen.

Besprechung

Zur Untersuchung der medikamentösen Beeinflussung der Resorption niedermolekulärer Substanzen im Thoraxraum wurde eine einfache, gut reproduzierbare Resultate ergebende Methode ausgearbeitet.

Wie die experimentellen Ergebnisse zeigen, lässt sich die PAS-Resorption unter den Untersuchungsbedingungen mit Hilfe verschiedener Medikamente herabsetzen oder steigern. Obwohl wir nur diese eine Substanz untersuchten, glauben wir doch, dass die Ergebnisse allgemein auch auf andere kristalloide Substanzen bezogen werden können, da nicht als wahrscheinlich anzunehmen ist, dass in der intrathorakalen Resorption der verschiedenen Kristalloidsubstanzen wesentliche Unterschiede bestehen.

Die intrathorakale Resorption von PAS wurde, wie zu erwarten war, durch Hyaluronidase bedeutend gesteigert. Bekanntlich wirkt Hyaluronidase

enzymatisch, sie depolymerisiert die im Bindegewebe anwesende Hyaluronsäure. In dem dadurch aufgelockerten Bindegewebe breiten sich die eingeführten Substanzen leichter aus. BARTA und POZSONYI [11] hatten die Hyaluronidasewirkung auf die Milch- und Ölresorption aus der Bauch- und Brusthöhle untersucht und festgestellt, dass Hyaluronidase die Ausbreitung der Öle in den Geweben fördert, die Resorption aber nicht beschleunigt. Nach den Untersuchungen von MAUER und KLEIN [12] wird die Resorption der peroral gegebenen PAS durch Hyaluronidase bedeutend gesteigert. H. V. LAGREZE [13] gelangte nach subkutaner PAS- und Hyaluronidase-Verabreichung zu einer ähnlichen Feststellung. Auch M. JOERT und ERTEL [14] teilten mit, dass Hyaluronidase die pleurale Resorption fördert.

Im Hinblick darauf, dass das Ausmass der Resorption bekanntlich stark von der Blutversorgung im Anwendungsgebiet des Medikaments bzw. vom Zustand des Kreislaufs abhängt, untersuchten wir im zweiten Teil unserer Versuche Substanzen, die über mehr oder minder ausgeprägte Gefässwirkung verfügen. Schon BIEVERT und STARLING [15] hatten festgestellt, dass die Resorption durch den Zustand des Kreislaufs in der Pleura beeinflusst wird. Nach Ansicht dieser Autoren wird die Resorption durch Vasodilatation erhöht. Auf Grund unserer Ergebnisse vermögen wir diese Tatsache nur in bezug auf eine Gruppe der Vasodilatatoren zu bestätigen. Zu dieser Gruppe gehören Diaphyllin, Kaliumrhodanid, Pilocarpin, Ergam und Nikotinsäure. Gleichzeitig wurde die PAS-Resorption bei unseren Versuchen von den als Vasodilatatoren bekannten Präparaten Azetylcholin, Histamin, Hydergin und Prostigmin nicht oder kaum beeinflusst.

Von den lokale Gefässverengerung verursachenden Substanzen untersuchten wir die Wirkung von Adrenalin auf die intrathorakale PAS-Resorption.

Nach unseren Untersuchungsergebnissen wird die pleurale PAS-Resorption durch Adrenalin herabgesetzt. Dies steht im Einklang mit den Versuchsergebnissen von DOUGLAS [16] über die pleurale Resorption von physiologischem Kochsalz. Unserer Ansicht nach nimmt Adrenalin unter allen Substanzen, welche die intrathorakale Resorption der PAS hemmen, einen besonderen Platz ein. Während nämlich die anderen resorptionshemmenden Substanzen (TEAB, Atropin, Novatropin in kleiner Dosis) die Zeitkurve der PAS-Resorption nur unwesentlich veränderten bzw. lediglich einen flacheren Kurvenverlauf ergaben, brachte die Adrenalinwirkung während der ganzen Untersuchungsperiode von 45 Minuten eine sich beinahe mit der Zeitdauer linear erhöhende, die Form einer Geraden aufweisende Resorptionskurve zustande. Dies kann nur darauf zurückzuführen sein, dass die vasokonstriktorische Wirkung des Adrenalins — vielleicht infolge des raschen Abbaus der Verbindung — nach kurzer Zeit abnimmt bzw. aufhört, und die im Laufe der Versuchsperiode beobachtete ständige Zunahme der Serumkonzentration im wesentlichen eine Folge des allmählichen Aufhörens der Adrenalinwirkung darstellt.

Mit der adrenosympathikolytischen Eigenschaft des Hydergins (EYBAND und KAPPERT [17]) erklären wir, dass Adrenalin seine resorptionsvermindernde Wirkung in Anwesenheit von Hydergin nicht ausübte (s. Tabelle I). Auf einem ähnlichen Mechanismus dürfte die der Hydergin-Wirkung gegenüber etwas schwächere Ergam-Wirkung beruhen.

Nach unseren experimentellen Ergebnissen wurde die pleurale Resorption, wie schon erwähnt, neben Adrenalin auch von den intrapleural gegebenen Mitteln Atropin und Novatropin herabgesetzt. Vom intravenös gegebenen Novatropin wurde die intrapleurale Resorption je nach der Konzentration entweder herabgesetzt oder erhöht.

Neueste Untersuchungen ergaben (DUTTA [18], GYERMEK [19, 20, 21]), dass die früher nur für Parasympathikolytika gehaltenen Tropeine in entsprechender Dosis auch als Ganglienblocker wirken können. Wie unsere Untersuchungen zeigten, wird die pleurale PAS-Resorption durch intravenöse Verabreichung von 2,5 mg/1 ml Novatropin wesentlich gesteigert. Diese erhöhte Resorption lässt sich vielleicht am besten mit den Folgen der durch die ganglienlähmende Wirkung des Novatropins zustande kommende Gefässerweiterung erklären. Durch 1/10 der vorigen Novatropin-Dosis wurde indessen bei intravenöser Gabe die PAS-Resorption herabgesetzt. Möglicherweise ist diese Resorptionshemmung darauf zurückzuführen, dass Novatropin in kleiner Dosis auf die Ganglien eine Reizwirkung ausübt und daher Gefässverengerung auslöst, wodurch vielleicht die verminderte Resorption herbeigeführt wird. Wir denken an die Möglichkeit, dass die resorptionsvermindernde Wirkung des intrapleural gegebenen Atropins und Novatropins auf einem ähnlichen Mechanismus beruht, d. h. ebenfalls als Folge der durch die Ganglienreizung entstandenen Vasokonstriktion zu betrachten ist. Diese Annahme, die noch weiterer experimenteller Beweise bedarf, findet eine gewisse Stütze in der Tatsache, dass nicht nur Nikotin, sondern auch das als typischer Ganglienblocker bekannte TEAB in kleiner Dosis ganglienreizend wirken kann (VEDENEVA [22]).

Die Wirkung von TEAB auf die pleurale Resorption dürfte der des Novatropins ähnlich sein. Verabreichten wir PAS intrapleural zu gleicher Zeit mit der subkutan gegebenen TEAB-Injektion, war die PAS-Resorption wesentlich herabgesetzt (Abb. 9, Kurve Nr. 4). Gaben wir nach der subkutanen TEAB-Injektion PAS nur 15 Minuten später intrapleural, kam die resorptionsvermindernde TEAB-Wirkung nicht zustande (Abb. 9, Kurve Nr. 3). Im ersteren Fall wurde von der TEAB-Injektion wahrscheinlich nur soviel resorbiert, dass Ganglienreizung und dadurch Gefässverengerung eintrat, weshalb die Resorption herabgesetzt war. Im zweiten Fall wurde nach 15 Minuten vermutlich eine grössere Menge resorbiert, so dass Ganglienlähmung und Gefässerweiterung zustande kamen. Auf diese doppelte TEAB-Wirkung, wonach die Ganglien zunächst gereizt und danach gelähmt werden, wurde von VEDENEVA [22] hingewiesen.

Vorstehende Ergebnisse beweisen, dass sich die Resorption der niedermolekulären Substanzen aus dem Pleuraraum medikamentös stark beeinflussen lässt. Künftig wollen wir uns auch mit der therapeutischen Bedeutung dieser Frage beschäftigen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Untersuchung der pleuralen PAS-Resorption wurde eine Methode ausgearbeitet, die auch zur Untersuchung der pleuralen Resorption aller anderen Kristalloide, die keine lokale Reizwirkung ausüben und sich chemisch nachweisen lassen, geeignet erscheint.

2. Die Resorption aus der Pleurahöhle lässt sich medikamentös beeinflussen.

3. Die intrapleurale Resorption wird durch Hyaluronidase gesteigert, durch Streptokinase jedoch nicht beeinflusst.

4. Von den vasodilatatorisch wirkenden Medikamenten wird die Resorption durch Diaphyllin, Kaliumrhodanid, Nikotinsäure, Pilocarpin und Ergam gesteigert, während Histamin, Hydergin, Prostigmin und Azetylcholin wirkungslos sind.

5. Durch Adrenalin wurde die Resorption aus der Brusthöhle herabgesetzt. Auf diese resorptionsvermindernde Wirkung des Adrenalins übt Diaphyllin in geringerem, Ergam bzw. Hydergin in stärkerem Masse eine antagonistische Wirkung aus.

6. Atropin, Novatropin und TEAB setzen bei intrapleuraler Verabreichung die intrapleurale PAS-Resorption herab. Bei intravenöser Gabe wird die pleurale Resorption von Novatropin je nach der Konzentration vermindert oder gesteigert.

7. Bei subkutaner Anwendung von TEAB wird die Resorption je nachdem, ob PAS gleichzeitig oder erst eine gewisse Zeit nach der subkutanen TEAB-Injektion intrapleural eingeführt wird, herabgesetzt bzw. gesteigert.

*

Auch an dieser Stelle danken wir N. KERTAY JR., F. MAURER und F. RÓKA für ihre technische Hilfe.

LITERATUR

1. GROBER, A.: Beitr. pathol. Anat. Pathol., **30**, 266 (1901).
2. DYBKOWSKY, R.: zit. GROBER., A.: Beitr. pathol. Anat. Pathol. **30**, 266 (1901).
3. NAEGELI, TH. A.: Z. ges. exp. Med., **1**, 2 (1913).
4. HERBERT, M.: J. Thoracic Surg., **8**, 283 (1939).
5. COURTICE, F. C., SIMMONDS, W. S.: J. Physiol. **109**, 11 (1949).
6. MEYERSTEIN, W.: Beitr. Klin. Tuberk. **24**, 19 (1922).
7. BITTORF, A., STEINER, L.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., **59**, 379 (1908).
8. PLATE, J.: Z. Tuberk., **3**, 3 (1909).
9. STARLING, E. H.: J. Physiol., **16**, 140 (1894).
10. CURCI, G., FRANCISCIS, V.: Arch. Tisiol. **4**, 1 (1949).
11. BARTA, L., POZSONYI, S.: Gyermekgyógy., **2**, 45 (1951).
12. MAUER, H., KLEIN, H.: Beitr. Klin. Tuberk. **109**, 478 (1953).
13. LANGREZE, H. W.: Arzneim. Forsch. **3**, 139 (1953).
14. JOERG, M., ERTL, W.: Wien. med. Wschr. **103**, 2, 35 (1953).
15. BIEVERT, F., STARLING F. H.: zit. BINET, L.: Presse Méd. **1**, 2, (1926).
16. DOUGLAS, S.: zit. BINET, L.: Presse Méd., **1**, 2 (1926).
17. EYBAND, S., KAPPERT A.: zit. ADLER, V., BARÁTH, I.: Acta Med. Hung. **3**, 378 (1952).
18. DUTTA, L.: zit. RÖGGLA, F., PREY, N.: Chirurg, **4**, 26 (1954).
19. GYERMEK, L.: Orvosi Hetilap **25**, 808 (1951).
20. GYERMEK, L.: Acta Physiol. Hung., **2**, 175 (1951).
21. GYERMEK, L., SZATNYIK, L.: Acta Physiol. Hung., **2**, 41 (1951).
22. VEDENEVA, Z. J. *(Веденева, З. Я.)*: Физиол. Ж. **37**, 734 (1951).

PHARMAKOLOGIE DER AMINOKETONE III. VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN MIT LARGACTIL (3-DIMETHYLAMINOPROPYL-3-CHLOR-10-PHENOTHIAZIN), PACATAL (N-METHYL-PIPERIDYL-3-METHYL-PHENOTHIAZIN) UND F—933 (1-PIPERIDINO-METHYL-BENZODIOXAN)[1,2]

Von

J. PÓRSZÁSZ, K. NÁDOR, K. GIBISZER-PÓRSZÁSZ und I. BACSÓ

PHARMAKOLOGISCHE ABTEILUNG DES FORSCHUNGSINSTITUTS FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, BUDAPEST, UND PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED

(Eingegangen am 10. April 1956)

Im Laufe der bisherigen Untersuchungen [1, 2, 3, 4] hatten wir festgestellt, dass bei den Aminoketonen 3 verschiedene pharmakologische Wirkungen unterschieden werden können: *a)* die Antinikotin-, *b)* die nikotinartige atmungssteigernde, *c)* die adrenolytische Aktivität. Die Formeln der charakteristischen Verbindungen mit diesen Eigenschaften sowie die zu den Versuchen benutzten Aminoketone sind auf Tabelle I angeführt.

Bei der Betrachtung der chemischen Formeln fällt auf, dass die Verbindung NA—86 mit F—933 eine gewisse Ähnlichkeit aufweist. BOVET und SIMON [5] hatten von letzterer festgestellt, dass sie bei Kaninchen die narkotische Paraldehydwirkung steigert. Anderseits verfügt das zur künstlichen Hypothermie benutzte Largactil, dessen potenzierende Wirkung bekannt ist [6], ebenfalls über starke adrenolytische Eigenschaften [7]. Mit unseren Untersuchungen wollten wir die folgenden Fragen beantworten:

1. Wie wirken die Aminoketone auf Körpertemperatur, Thermoregulation und Stoffwechsel?

2. Besteht zwischen den adrenolytischen und potenzierenden Wirkungen ein Zusammenhang (Äther, Analgetika)?

Methoden

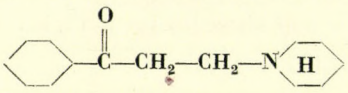
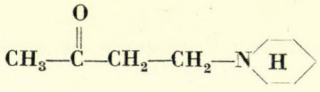
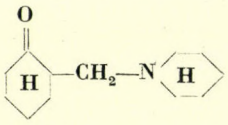
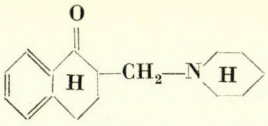
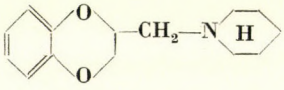
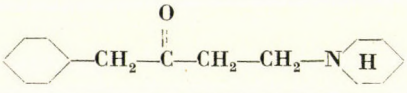
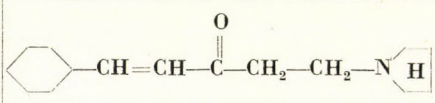
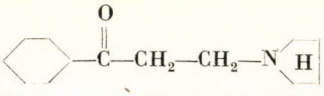
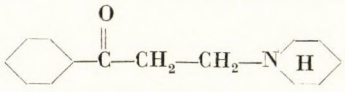
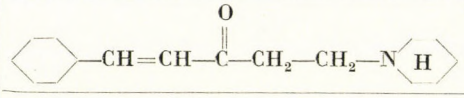
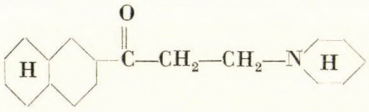
Bei den Versuchen verwendeten wir 18—25 g schwere weisse Mäuse und 150—200 g schwere weisse Ratten beiderlei Geschlechts. Die Körpertemperatur wurde mit Quecksilberthermometer 1 Minute lang im Rectum gemessen. Den O_2-Verbrauch bestimmten wir nach der manometrischen Methode von ISSEKUTZ [8] sowie mit dem NOYONSschen Diapherometer.

Die Potenzierung der narkotischen Ätherwirkung stellten wir folgendermassen fest: In einem verschlossenen 10 l-Exsiccator liessen wir bei verschiedenen Volumen% Äther verdampfen. Die bis zum Einschlafen verstrichene Zeit sowie der Zeitpunkt des Erwachens wur-

[1] Vortrag, gehalten im Juni 1955 auf dem XXI. Kongress der Ungarischen Physiologischen Gesellschaft in Szeged.

[2] B. ISSEKUTZ SEN. zum 70. Geburtstag gewidmet.

Tabelle I

Chemische Bezeichnung	Verbindung	DL_{100} bei der Maus sc.	Anti-nikotin-Aktivität bei d. Maus Parpanit 1	Charakteristischste pharmakologische Wirkung
NA—65		300	1	antinikotinisch
NA—73		200	0	nikotinartig, blut-drucksteigernd, atmungsteigernd
NA—66		400	0	nikotinartig, verur-sacht tonisch—klonische Krämpfe, corediolartig
NA—86		200		adrenolytisch
F—933		700		adrenolytisch
N—483		500	1	antinikotinisch
N—430		200	0,5	antinikotinisch
N—429		200	0,1	antinikotinisch
N—458		400	1	antinikotinisch
N—327		300	0,3	antinikotinisch
NA—90		200—300	2	antinikotinisch

den mit der Stoppuhr gemessen. Die Tiere liessen wir 20 Min. im Gefäss. Die Zeitdauer bis zum Einschlafen (als solche wurde die Zeit bis zum Aufhören der Korrektion der Körperstellung gerechnet) zeigt den Grad der potenzierenden Wirkung viel besser an als die Bestimmung der Erwachenszeit (die Zeitdauer zwischen der Herausnahme aus dem Exsikkator und dem Erscheinen der Korrektion der Körperlage). Diese Annahme glauben wir, durch folgende Überlegung bestärken zu können. Nehmen auf Wirkung einer Verbindung Anzahl und Minutenvolumen der Einatmungen ab, entfernt sich auch die in 20 Min. in den Organismus des Tieres gelangte Äthermenge langsamer, d. h. die narkotisierende Ätherwirkung verstärkt sich scheinbar. Bei der Messung der Einschlafzeit führen die Atemzahl und -volumen herabsetzenden Verbindungen gerade im Gegenteil zur Verlängerung der bis zum Einschlafen verstreichenden Zeit. Die Verkürzung der Einschlafzeit zeigt also unbedingt die potenzierende Wirkung an. Wir wählten diese Methode ferner, weil es sehr schwer ist, nur auf der Bestimmung der Narkosentiefe beruhende vergleichende Untersuchungen im geschlossenen Exsikkator auszuführen.

Die Routineuntersuchung der die Äthernarkose steigernden Wirkung der Aminoketone nahmen wir folgendermassen vor: Die Tiere wurden 20 Min. in Äthergas von 6,5 Vol. % gelegt, wonach wir die bis zum Einschlafen, dann bis zum Erwachen verstrichene Zeit bestimmten und den ganzen Versuch nach 1 Stunde wiederholten. Eine halbe Stunde vorher erhielten sie jedoch subkutan 25, 40 und 50 mg/kg einer antinikotinisch oder adrenolytisch wirkenden Verbindung. Die Verkürzung der Einschlafzeit und die Verlängerung der Erwachenszeit wurde in % festgestellt.

Die schmerzstillende Wirkung untersuchten wir an Mäusen mit unserer auf Kontaktwärme beruhenden Methode [9], und bei der Feststellung des Synergismusgrades berücksichtigten wir die in einer früheren Mitteilung angeführten Gesichtspunkte.

Die überwiegende Mehrzahl der Versuche wurde mit der über die aktivste Antinikotineigenschaft verfügenden Verbindung NA—65 und dem stark adrenolytischen NA—86 sowie mit F—933 durchgeführt.

Ergebnisse

I. *Wirkung auf die Körpertemperatur*

Es wurden die Verbindungen NA—65, NA—86, F—933 und Largactil untersucht. Auf Abb. 1 zeigt jede Linie die Veränderung der Temperatur von je 10 Mäusen im Mittelwert bei 22° C Zimmertemperatur an. Die stärkste Wirkung wies Largactil auf; die Verbindungen NA—86 und F—933 wirkten etwa 8mal schwächer. NA—86 und F—933 verursachen bei gleicher Dosis (100 mg/kg subcutan) eine Temperatursenkung von ungefähr gleicher Stärke und Dauer. NA—65 erwies sich am schwächsten. In der Dosis 50 mg/kg s.c. löste es eine starke, aber rasch vorübergehende Temperatursenkung aus. In höherer Dosis (100 mg/kg s.c.) untersuchten wir es deshalb nicht, weil es bereits Narkose herbeiführt. Das adrenolytisch wirkende N—73 [11] hatte jedoch in anderen Versuchen selbst in der Dosis 100 mg/kg die Körpertemperatur der Tiere nicht gesenkt.

II. *Thermoregulation*

Diese Versuche wurden an Ratten vorgenommen. Die Tiere brachten wir aus 22° C Zimmertemperatur in einen Eisschrank von +8° C. Eine halbe Stunde vorher hatten sie die zu untersuchenden Substanzen — Morphin, NA—65 und NA—86 — erhalten. Auf Abb. 2 zeigt jede Linie den Durchschnittswert

der Temperatur von je 6 Ratten an. Wie wir sehen, wird die Thermoregulation von 10 mg/kg Morphin s.c. und von 80 mg/kg per os gegebenem NA—65 (subcutan führt die Verbindung innerhalb von 4—5 Tagen zu Nekrose) bei gesonderter Verabreichung nicht gelähmt, obwohl eine geringe Temperatursenkung bereits beobachtet werden kann. Bei gleichzeitiger Anwendung der beiden Verbindun-

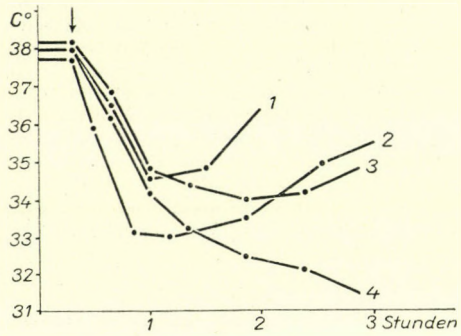


Abb. 1. Wirkung von NA—65, NA—86, F—933 und Largactil auf die Körpertemperatur von Mäusen bei 22° C
1 : 50 mg/kg A—65 ; 2 : 100 mg/kg F—933 ; 3 : 100 mg/kg A—86 ; 4 : 12,5 mg/kg Largactil

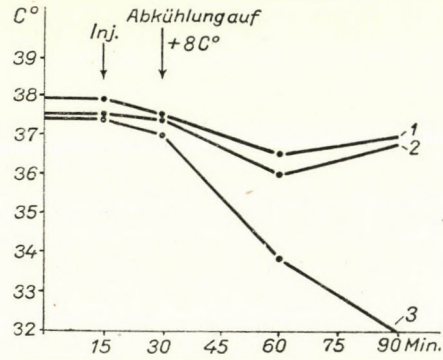


Abb. 2. Wirkung von Morphin und NA—65 auf die Körpertemperatur von Ratten in einer Umgebung von 8° C
1 : 10 mg/kg Morphin ; 2 : 80 mg/kg A—65 p. o. ; 3 : 10 mg/kg Morphin + 80 mg/kg A—65 p. o

gen kühlen jedoch die Tiere sehr stark ab, ihre Temperatur sinkt bis zur untersuchten 90ten Minute um 5° C. Ein ähnliches Resultat ergab auch die Verbindung NA—86.

Als wir diese Untersuchungen bei Zimmertemperatur durchführten, stellten wir fest, dass die Körpertemperatur der Tiere von Morphin und dem synthetischen Analgetikum Methadon erhöht wird. Dies wird wahrscheinlich durch die auf Wirkung von Morphin und Methadon auftretende motorische Unruhe verursacht. Abb. 3 veranschaulicht diese Versuche ; auf dieser zeigt jede Linie den Mittelwert der Temperaturveränderung von je 12 Ratten an.

Nach Methadon (2-Dimethylamino-4,4-diphenylheptan-5-on) steigt die Körpertemperatur von 38,2° C auf 39,6° C und erreicht das Maximum in der 90. Minute nach der Injektion. Geben wir gleichzeitig mit Methadon auch 50 mg/kg NA—65 s.c., steigt die Körpertemperatur von 37,4° C nur auf 37,8° C, so dass also NA—65

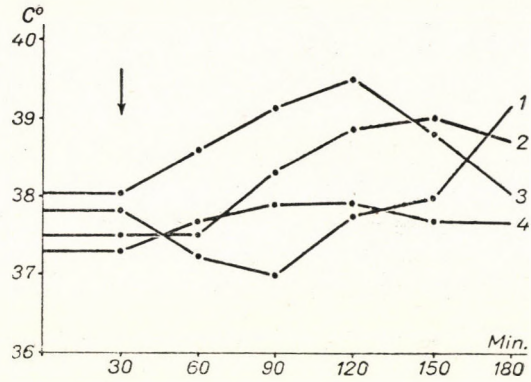


Abb. 3. Wirkung von Morphin, Methadon und NA—65 auf die Körpertemperatur von Ratten bei 22° C
1: Morphin + A—65, 50 mg/kg; 2: Morphin 10 mg/kg s. c.; 3: Methadon 5 mg. s. c.; 4: Methadon + A—65, 50 mg/kg

die Methadon-Wirkung praktisch hemmt. Mit Morphin ergeben sich ähnliche Resultate, doch ist festzustellen, dass die Körpertemperatur der nur mit Morphin behandelten Tiere viel dauerhafter steigt als die der nur mit Methadon behandelten. NA-65 vermag diese Hyperpyrexie 2 Stunden hindurch zu antagonisieren, danach aber kommt wegen seiner raschen Zersetzung [4] der Morphin-Effekt zur Geltung.

III. *Stoffwechselwirkungen*

Issekutz [12] wies nach, dass die durch Aktedron verursachte Stoffwechselerhöhung mit dem auf den Hypothalamus wirkenden Sevenal gehemmt werden kann, d. h. die Stoffwechselsteigerung auf der Erregung der sympathischen Kerngruppen des Hypothalamus beruht.

Von der körpertemperatursenkenden Wirkung der Aminoketone ausgehend, nahmen wir an, dass dies durch die Lähmung des hypothalamischen Thermoregulationszentrums eintreten kann. Um zu beweisen, dass die Verbindungen die Funktion dieser vegetativen Zentren zu lähmen vermögen, versuchten wir ferner, mit ihnen die durch Aktedron verursachte Stoffwechselerhöhung zu hemmen. Zu diesem Zweck nahmen wir mit einer unserer Verbindungen von stärkster sog. Antinikotinwirkung, dem NA—65, an 14 Tieren Untersuchungen vor. Nach den Ergebnissen (Abb. 4) wird der Stoffwechsel der Tiere in (neutraler) Umgebung von 29° C durch 3 mg/kg Aktedron um bei-

nahe 80% erhöht. Geben wir jedoch zusammen mit dem Aktedron i.p. 50 mg/kg NA—65, steigt der Stoffwechsel nur um 35%. Sevenal erwies sich in gleicher Dosis (14 Tiere) erheblich wirksamer als NA—65. Es vermag die Stoffwechsel-

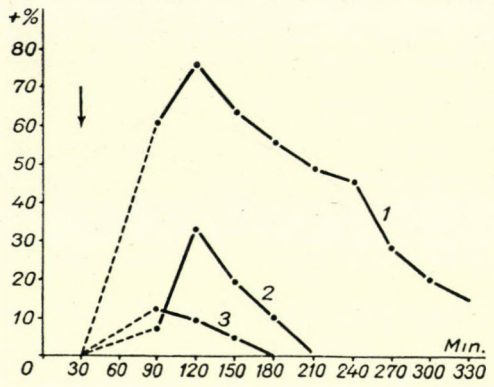


Abb. 4. Die stoffwechselsteigernde Aktedron-Wirkung und ihre Beeinflussung mit NA—65 und Sevenal
Ordinate: Stoffwechselsteigerung in %. 1 : 3 mg/kg Aktedron s. c.; 2 : 3 mg/kg Aktedron s. c. + 50 mg/kg A—65 i. p.; 3 : 3 mg/kg Aktedron + 50 mg/kg Sevenal i. p.

steigerung fast völlig zu hemmen. Wie die Versuche beweisen, lähmt NA—65 die Stoffwechselzentren des Hypothalamus, und es ist anzunehmen, dass auch andere Aminoketone von ähnlicher Struktur über diese Eigenschaft verfügen.

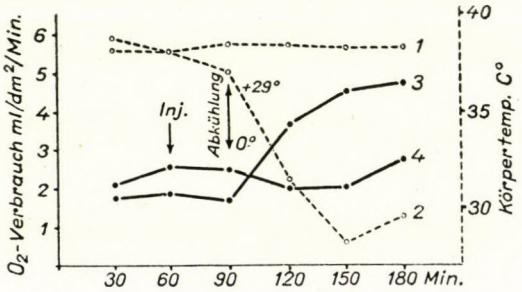


Abb. 5. Wirkung von NA—86 auf Körpertemperatur und Stoffwechsel von Ratten in einer Umgebung von 29 bzw. 0° C
Unterbrochene Linie: Körpertemperatur; 1: Kontrolle; 2: 50 mg/kg NA—86.
Ganze Linie: O_2-Verbrauch; 3: Kontrolle; 4: 50 mg/kg NA—86

IV. *Hemmung der nach Abkühlung eintretenden Stoffwechselerhöhung*

Es wird allgemein anerkannt, dass homoiotherme Tiere in kalter Umgebung ihren Organismus vor der Abkühlung durch gesteigerten Kohlenhydratstoffwechsel und Muskeltremor schützen. Ihre Temperatur können sie bei nicht

zu starker äusserer Kälteeinwirkung stundenlang unverändert aufrechterhalten, bis sich ihre Energiereserven erschöpfen.

Oben hatten wir erwähnt, dass sich die mit NA—65 und gleichzeitig mit Morphin behandelten Tiere in der Umgebung von +8° C sehr stark abkühlen. Es ist anzunehmen, dass wahrscheinlich parallel mit dieser Wirkung auch ihr Stoffwechsel nicht zunimmt. Laut MARQUARDT und SCHUMACHER [13] fördern die Sympatholytika durch Ausschaltung der auf Kältewirkung auftretenden Zitterreaktion — die nach ISSEKUTZ JR. und Mitarbeitern den grössten Teil der Stoffwechselerhöhung bewirkt [14] — die Abkühlung der Tiere. Wir führten daher zwecks Untersuchung der oben erwähnten Hypothese Versuche mit den adrenolytisch wirkenden NA—86, F—933 und Pacatal durch, wobei wir auch die Körpertemperatur und den O_2-Verbrauch feststellten.

Die bei Anwendung von NA—86 gewonnenen Versuchsergebnisse sind auf Abb. 5 dargestellt. Jede Linie gibt die durchschnittliche Körpertemperatur- bzw. Stoffwechselveränderung von je 5 Ratten wieder. Die ganzen (dicken) Linien geben den O_2-Verbrauch in ml/dm²/Min., die unterbrochenen Linien die Temperaturveränderung in C° an.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Körpertemperatur der unbehandelten Kontrolltiere bei der Abkühlung von 29° C auf 0° C unverändert bleibt, während ihr O_2-Verbrauch von 1,8 ml/dm²/Min. auf 4,5 ml/dm²/Min. steigt. Die Tiere vermochten demnach ihre Körpertemperatur nur durch beträchtliche O_2-Aufnahme auf konstantem Niveau zu halten. Demgegenüber sinkt die Körpertemperatur der mit 50 mg/kg NA—86 behandelten Ratten sehr stark, während ihr O_2-Verbrauch unverändert bleibt; erst 90 Min. nach der Injektion von NA—86 beginnt der Stoffwechsel und parallel damit die subnormale Körpertemperatur zu steigen.

Ähnlich wie NA—86 wirken 50 mg/kg F—933. Auch diese Verbindung hemmt die durch Abkühlung hervorgerufene Stoffwechselerhöhung und fördert die Abkühlung der Tiere. In bezug auf Pacatal können wir die Befunde von NIESCHULZ und POPENDIKER [15] bestätigen, wonach die auf Wirkung der Abkühlung eintretende Erhöhung des O_2-Verbrauchs von 200 mg/kg Pacatal stark gehemmt wird. Pacatal wirkt demnach schwächer als die Verbindungen NA—86 und F—933.

V. *Steigerung der narkotischen Ätherwirkung*

Je höher der Stoffwechsel ist, um so schwerer lässt sich laut GUEDEL [16] die Narkose herbeiführen. Zu Beginn der Narkose nimmt der Stoffwechsel infolge der allgemeinen motorischen Erregung besonders zu, ferner wird der Grundumsatz auch durch die Adrenalinmobilisierung gesteigert.

Es schien uns theoretisch interessant, die Frage zu untersuchen, ob die adrenalinhemmende Wirkung zur Steigerung der narkotischen Ätherwirkung

ausreicht oder ob diese davon unabhängig ist und von anderen Eigenschaften des Moleküls abhängt. Wir untersuchten NA—86, F—933, N—73 sowie Pacatal. Die Resultate finden sich auf Abb. 6, wo an der Abszisse der verwendete Äther in Volumen%, an der Ordinate die bis zum Narkoseeintritt verstrichene Zeit in Minuten angeführt ist. Wie ersichtlich, wird die narkotisierende Ätherwirkung am stärksten von der Verbindung NA—86 gesteigert. Die damit behandelten Tiere schliefen bereits nach Äther von 1,61 Vol.% in 4 Min. ein, während ohne Behandlung zur Erzielung einer ebenso raschen Narkose 4,03

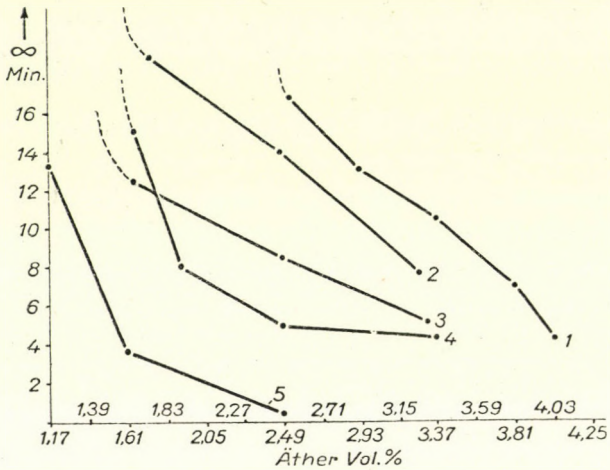


Abb. 6. Steigerung der narkotischen Ätherwirkung bei Mäusen
Ordinate: Einschlafzeit in Minuten. Je 1 Punkt der Kurven zeigt den Durchschnittswert von je 6 Mäusen an. 1: Äther; 2: 100 mg/kg N—73; 3: 100 mg/kg Pacatal; 4: 100 mg/kg F—933; 5: 50 mg/kg NA—86

Vol.%, d. h. rund 2,5mal soviel erforderlich waren. Überraschenderweise weist die stark adrenolytische Verbindung N—73 [15] mit Äther kaum synergistische Wirkung auf, und auch Pacatal ist von verhältnismässig schwacher Wirkung. Den Versuchen ist zu entnehmen, dass die Steigerung der narkotisierenden Ätherwirkung mit der adrenolytischen Eigenschaft nicht parallel verläuft. Auch die in der Therapie gebräuchlichen sog. »Basisnarkotika« bestätigen diese Feststellung.

Im weiteren untersuchten wir 7 Aminoketone in bezug auf die Steigerung der narkotisierenden Ätherwirkung, indem wir ihre Wirkung mit der von Largactil, Pacatal und F—933 verglichen. Die ausführlichen Ergebnisse sind auf Tabelle II zusammengefasst. Diese Aminoketone hemmen nicht die Vasopressoreigenschaft des Adrenalins, doch verfügen einige von ihnen über sehr starke Antinikotinaktivität. Auf Grund der Versuche haben fast sämtliche Verbindungen eine mehr oder minder intensive potenzierende Wirkung. Am stärksten wirkt Largactil, danach in der hier angegebenen Reihenfolge die

Verbindungen NA—86, N—453, N—430, NA—65 usw. F—933 und Pacatal wirken ebenfalls schwächer als NA—86.

Tabelle II

Beeinflussung der narkotischen Wirkung von Äther mit 6,5 Vol. % bei Mäusen

Verbindung Dosis mg/kg	Anzahl der Tiere	Unbehandelt		Auf Wirkung der Verbindung		Verminderung der Einschlafzeit in %	Verlängerung der Aufwachzeit in %
		Einschlaf-zeit	Aufwach-zeit	Einschlaf-zeit	Aufwach-zeit		
Largactil 25	10	3′ 32″	0′ 26″	1′ 15″	3′ 58″	64	814
NA—86 25	20	2′ 36″	0′ 47″	1′ 33″	4′ 57″	40	510
NA—86 50	30	2′ 54″	0′ 44″	0′ 52″	7′ 11″	70	879
N—483 25	20	2′ 42″	0′ 49″	2′ 23″	1′ 43″	11	110
N—483 40	20	2′ 52″	0′ 26″	2′ 06″	1′ 51″	26	326
N—430 50	10	3′ 05″	0′ 30″	2′ 24″	1′ 15″	22	350
N—429 50	20	2′ 25″	0′ 49″	1′ 34″	3′ 21″	33	310
N—458 25	10	2′ 35″	0′ 44″	2′ 11″	1′ 03″	14	43
N—458 50	10	2′ 46″	0′ 44″	1′ 40″	2′ 34″	39	250
N—327 100	10	2′ 34″	0′ 47″	2′ 15″	1′ 07″	12	170
N—327 50	10	2′ 41″	0′ 47″	1′ 47″	1′ 56″	33	146
Pacatal 25	35	2′ 57″	0′ 37″	2′ 32″	1′ 17″	14	109
Pacatal 50	10	3′ 11″	0′ 23″	2′ 52″	0′ 53″	10	130
F—933 50	10	2′ 58″	0′ 46″	2′ 28″	1′ 02″	17	35
NA—65 50	10	3′ 03″	0′ 59″	1′ 33″	4′ 02″	82	310
NA—90 50	10	2′ 36″	0′ 49″	2′ 16″	1′ 31″	13	85
Kontrollen	245	2′ 37″	0′ 41″				

Es ergab sich die Frage, worauf es zurückzuführen sei, dass die Verbindungen die narkotisierende Ätherwirkung erhöhen. Wir nehmen an, dass

hierbei vielleicht die Körpertemperatursenkung eine Rolle spielt. Es wird allgemein anerkannt, dass die Oxydations- (und andere detoxizierende) Prozesse bei niedriger Körpertemperatur viel langsamer vor sich gehen. Die Mehrzahl der untersuchten Verbindungen senkt die Körpertemperatur. Auf dieser Grundlage liesse sich z. B. auch die Unwirksamkeit von N—73 erklären, das — wie schon erwähnt — die Körpertemperatur selbst in der Dosis 100 mg/kg kaum beeinflusst. Zur Kontrolle nahmen wir daher auch mit Amidazophen Versuche vor. Es wurde festgestellt, dass 100 mg/kg Amidazophen, von dem die durchschnittliche Körpertemperatur von 37,6° C auf 33° C gesenkt wird, die Zeit bis zum Einschlafen nicht beschleunigt, sondern lediglich den Zeitpunkt des Erwachens etwas hinausschiebt. Sehr wahrscheinlich steigern daher die Aminoketone und Adrenolytika die narkotisierende Wirkung des Äthers nicht ausschliesslich proportional zu ihrer auf die Körpertemperatur ausgeübten Wirkung.

VI. *Steigerung der Analgetikawirkung*

Von schmerzstillenden Verbindungen wählten wir für unsere Versuche Morphin und Dolantin. Als synergistisch wirkende Verbindungen benutzten wir NA—65 und NA—86. Die Ergebnisse sind auf Tabelle III wiedergegeben.

Es wurde festgestellt, dass die Verbindungen NA—65 und auch NA—66 über schwache analgetische Wirkung verfügen. Die verwendeten Mengen stellen 1/4 der narkotischen Minimaldosis dar. NA—65 steigert die schmerzstillende Morphin-Wirkung synergistisch, während es sich bei der NA—86-Wirkung nur um Addition handelt.

Besprechung

Die Versuche mit den Aminoketonen in der hier beschriebenen Richtung wurden im Hinblick auf die Ähnlichkeit zwischen NA—86 und F—933 durchgeführt. Wie erwähnt, steigert F—933 die narkotische Paraldehydwirkung, ferner schalten laut MARQUARDT die Sympatholytika die Frostelreaktion, die auf Abkühlung eintritt und den wichtigsten Abwehrmechanismus gegen Abkühlung darstellt, aus.

Wie aus experimentellen Ergebnissen hervorgeht, lähmen die Aminoketone die Stoffwechsel- und Thermoregulationszentren des Hypothalamus. Dies ergibt sich aus folgenden Tatsachen:

1. In kalter Umgebung kühlen die mit Aminoketonen behandelten Tiere sehr stark ab, während gleichzeitig ihr Stoffwechsel zunimmt.

2. Die Aminoketone hemmen die durch Aktedron verursachte Stoffwechselerhöhung.

Tabelle III

Steigerung der schmerzstillenden Morphin- und Dolantin-Wirkung

Verbindung mg/kg subcutan	Anzahl der Tiere	Schmerzstillende Wirkung in %	Steigerung in %
NA—65 25	40	41,5	
Morphin 1	40	20,0	
Morphin 1 + NA—65 25	40	84	+ 23 S
Dolantin 10	20	19	
NA—86 25	60	41	
NA—86 25 + Dolantin 10	60	66	+ 6 A
NA—86 25 + Morphin 1	40	63	+ 3 A

S = Synergismus.
A = Addition.

3. In einer früheren Mitteilung hatten wir nachgewiesen, dass sie ebenso wie Sevenal die diuretische Wirkung von Leitungswasser fast völlig aufheben [1].

DONHOFFER und Mitarbeiter [17] stellten fest, dass der Stoffwechsel hypothalamusläderierter Tiere in kalter Umgebung nicht über den bei 29° C gemessenen Wert steigt. Sie bewiesen weiter [18], dass Aminothiazol seine temperatursenkende Wirkung verliert, wenn gewisse Kerngruppen des Hypothalamus zerstört werden. Wir halten es für wahrscheinlich, dass derartige Versuche mit Aminoketonen, insbesondere mit den Verbindungen NA—65 und NA—84, zu ähnlichem Resultat führen würden.

Die Verminderung der durch Aktedron verursachten Stoffwechselerhöhung stellt einen unbedingten Beweis für den hypothalamischen Angriffspunkt dar.

Die Hemmung der Wasserdiurese ist zur Bestätigung ihres Einflusses auf den Hypothalamus an und für sich noch nicht von genügender Beweis-

kraft, da dieser nur durch die Titrierung des ADH-Blutspiegels (antidiuretisches Hormon) entschieden werden könnte. Jedenfalls ist beachtenswert, dass F—933, das in seinen pharmakologischen Wirkungen mit NA—86 viel Ähnlichkeit aufweist [19], die Diurese hemmt, was der zentralen Wirkung der Adrenolytika zugeschrieben wird [20].

Die Deutung der Steigerung der narkotischen Äther- sowie der Analgetikawirkung ist noch eine offene Frage, insbesondere soweit es die nicht adrenolytischen Aminoketone betrifft. Möglicherweise spielen hierbei nicht nur die Körpertemperatur- und Stoffwechselsenkung, sondern auch die Ausschaltung anderer Abwehrmechanismen eine Rolle.

In früheren Untersuchungen hatten wir nachgewiesen, dass die Aminoketone die auf mehreren Synapsen beruhenden Rückenmarkreflexe (homolateraler Flexor und kontralateraler Extensor Reflex) stark hemmen[4]. Auf Grund unserer Befunde besteht auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Aminoketone die Nikotinkonvulsionen über einen höheren Angriffspunkt im Zentralnervensystem (Formatio reticularis) antagonisieren. Wir setzten voraus, dass die Aminoketone mit Antinikotinwirkung die Umschaltungsstellen nicht nur im Rückenmark, sondern auch im Zentralnervensystem hemmen und als zentralwirkende Ganglienblocker betrachtet werden können, ebenso wie Parpanit, Artan und Diparcol. Diese Untersuchungsergebnisse bestätigen unsere bisherigen Hypothesen, da sie die Reizübertragung auch in dem die vegetativen Funktionen regulierenden Hypothalamus zu hemmen vermögen.

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass die Lähmung der peripheren adrenergen Nervenendigungen bei der Ausschaltung der Abwehrmechanismen keinen primären Vorgang darstellt und hierbei die deprimierende Wirkung der Adrenolytika auf das Zentralnervensystem als das Wesentliche zu betrachten ist.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Aminoketone mit Antinikotinwirkung (NA—65), ferner die adrenolytisch wirkenden Verbindungen NA—86 und F—933 senken die Körpertemperatur. Hierbei erwies sich NA—86 8mal schwächer als Largactil.

2. Bei gleichzeitiger Verabreichung mit Morphin verursacht NA—65 in einer Umgebung von +8° C in Mengen, die gesondert an und für sich wirkungslos sind, die starke Abkühlung der Tiere.

3. Durch Morphin und Methadon wird in einer Umgebung von 22° C die Körpertemperatur der Ratten erhöht. Diese Erhöhung wird durch die Verbindung NA—65 verhindert.

4. Die durch Aktedron verursachte Stoffwechselerhöhung bei Ratten wird von NA—65 sehr stark herabgesetzt.

5. Die nach Abkühlung von +29° C auf 0° C eintretende Stoffwechselerhöhung wird von NA—86 und F—933 stärker gehemmt als von Pacatal; gleichzeitig kühlen die Tiere sehr stark ab.

6. Die narkotische Wirkung des Äthers wird von den Aminoketonen gesteigert. In dieser Hinsicht bleibt NA—86 hinter Largactil kaum zurück. Zwischen der antagonistischen Adrenalin- und ihrer die Äthernarkose steigernden Wirkung besteht kein Zusammenhang.

7. NA—65 synergisiert die schmerzstillende Morphinwirkung, während NA—86 nur additionell wirkt.

8. Die Aminoketone mit Antinikotinwirkung sind auf Grund der früher und jetzt durchgeführten Versuche als Zentrale—Ganglienblocker zu betrachten.

LITERATUR

1. Issekutz, B., Sen., Pórszász, J., Issekutz, I., Nádor, K.: Acta Physiol. Hung. **6**, 95 (1954).
2. Issekutz, L., Pórszász, J., Nádor, K.: Acta Pharmacol. Hung. **3**, 85 (1954).
3. Pórszász, J., Nádor, K., Gibiszer-Pórszász, K., Wieszt, T., Padányi, R.: Acta Physiol. Hung. **7**, 139 (1955).
4. Pórszász, J.: Dissertation. Budapest, 1955.
5. Bovet, D., Simon, A.: Compt. Rend. soc. Biol. **117**, 918 (1934).
6. Courvoisier, S., Fournel, J., Ducrot, R., Kolsky, I., Koetschet, P.: Arch. Int. Pharmacodyn. **92**, 305 (1953).
7. Huidobro, F.: Arch. Int. Pharmacodyn. **98**, 308 (1954).
8. Issekutz, B. sen.: Arch. Exp. Path. u. Pharmakol. **199**, 308 (1942).
9. Pórszász, J., Herr, F.: Kísérletes Orvostud. **2**, 292 (1950).
10. Pórszász, J., Knoll, J., Komlós, E.: Acta Physiol. Hung. **2**, 469 (1952).
11. Nádor, K., Kovatsits, M., Gyermek, L.: M. T. A. Kémiai Tud. Közl. **2**, 287 (1952).
12. Issekutz, B. Sen.: Arch. Exp. Path. u. Pharmakol. **201**, 346 (1943).
13. Marquardt, P., Schumacher, H.: Arzneimittelforsch. **4**, 223 (1954).
14. Issekutz, B. Jr., Hetényi, G. Jr., Nagy, H., Lung, M.: Hung. Acta Physiol. **2**, 93 (1949).
15. Nieschulz, O., Popendiker, K.: Arzneimittelforsch. **5**, 458, 680 (1955).
16. Guedel, A.: Inhalation Anesthesia, MacMillan. New York, (1937).
17. Balogh, L., Barka, I., Donhoffer, Sz., Jilly, P., Mestyán, Gy.: Acta Physiol. Hung. **2**, 343 (1951).
18. Balogh, L., Barka, I., Donhoffer, Sz., Jilly, P., Mestyán, Gy.: Kísérletes Orvostud. **3**, 1 (1952).
19. György, L.: Dissertation. Budapest 1956.
20. Buxton-Hopkin, D. A.: Lancet, **1**, 605 (1955).

ÜBER DIE PHARMAKOLOGISCHEN WIRKUNGEN VON BUTYLSYMPATON

Von

Z. DIRNER, K. THURÁNSZKY und G. SZEGHY

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED

(Eingegangen am 30. Mai 1956)

Die blutdrucksenkende Wirkung des Butylsympatols stellte als erster DUESBERG [1] am Menschen und Hund fest. Weitere pharmakologische Wirkungsanalysen wurden von FÖRSTER und KUSCHINSKY [2] vorgenommen. SPITZBARTH und HERTZ [3], MECHELKE und HEINZE [4], GRANER [5], KREUTZIGER und VEIT [6] sowie BECKER und KAISER [7] empfehlen seine Anwendung zur Behandlung von Hypertonien verschiedenen Typs und zu ihrer diagnostischen Differenzierung.

Im folgenden teilen wir unsere Untersuchungen mit Butylsympaton mit. Diese Verbindung ist ein dem Butylsympatol entsprechendes Keton (p-Oxy-ω-n-butylamino-azetophenon-hydrochlorid), das für unsere Versuche von Ö. KOVÁCS nach eigenem Originalverfahren hergestellt wurde [8]. Soweit uns bekannt, sind pharmakologische Untersuchungen mit dieser Verbindung noch nicht durchgeführt worden.

Experimenteller Teil

1. Den Blutdruck der mit Urethan narkotisierten Katze senken 6 mg/kg Butylsympaton (BON) i. v. verabreicht für die Dauer von etwa 20 Minuten um 30—40 mm Hg. 10—20 mg/kg führen zu etwa 60 mm Hg Blutdrucksenkung, die 2—3 Stunden bestehen bleibt (Abb. 1).

Während der Dauer der Blutdrucksenkung bleibt die Pulsfrequenz unverändert und auch die Leistungsfähigkeit des Herzens unbeeinflusst. Zu Beginn der Blutdrucksenkung wird die Atmung vorübergehend langsamer, aber tiefer. Die Ursache der Blutdrucksenkung ist der verminderte Tonus des Gefässsystems, was mit Hilfe nachfolgender Versuchsanordnung bewiesen werden kann.

In die Aorta abdominalis einer narkotisierten und heparinisierten Katze binden wir unter der Abzweigung der Nierenarterien eine Kanüle, die mit einer waagerecht angebrachten Bürette zu 50 ml verbunden wird. Vom Gummi-Verbindungsrohr führt eine Abzweigung zu der mit einer starken Gummimembran versehenen MAREYschen Kapsel zwecks Registrierung der Herzbewegungen. Die Bürette ist mit einem mit 2 Bohrlöchern versehenen Stöpsel verschlossen. Durch eine Öffnung wird von einem Luftkompressor — unter Einschaltung eines Windkessels — ständig Luft eingeblasen, die sich durch die andere, mit einer Klammer regu-

lierbare Öffnung entfernt. Mit Hilfe der Klammer kann der Druck in der Bürette auf konstantem Niveau gehalten bzw. reguliert und mit einem Quecksilbermanometer gemessen werden. Die MAREYsche Kapsel und die Rohrleitung sind vollständig, die Bürette zur Hälfte mit dem heparinisierten Blut einer anderen Katze gefüllt. Der in der Carotis herrschende Blutdruck wird mittels Quecksilbermanometer registriert (Abb. 2).

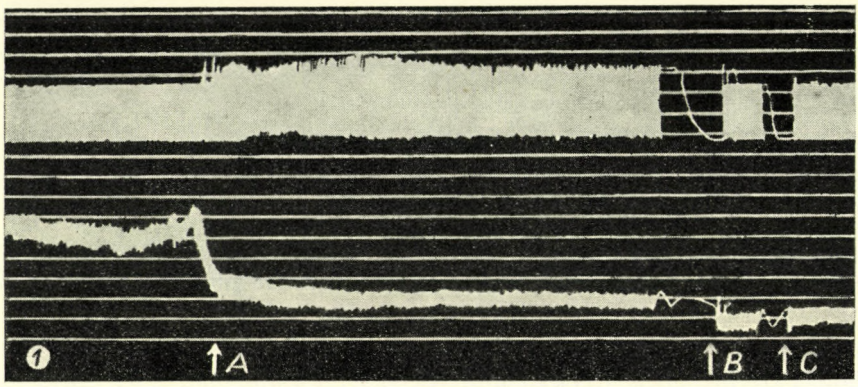


Abb. 1. Katze. Urethan-Narkose. Oben: Atmung, unten: Blutdruck.
A: Wirkung von i. v. 10 mg/kg BON; B: 30 Minuten später; C: 60 Minuten später

Gang des Versuches. Man stellt den Druck in der Bürette auf den dem Carotisdruck entsprechenden Wert ein und öffnet dann die Verbindung zwischen der Aorta und dem Apparat. Nach geringen Schwankungen zeigen die Manometer der Aorta und des Apparats übereinstimmende Werte. Die MAREYsche Kapsel registriert die Systolen und Diastolen des Herzens am Kymographion.

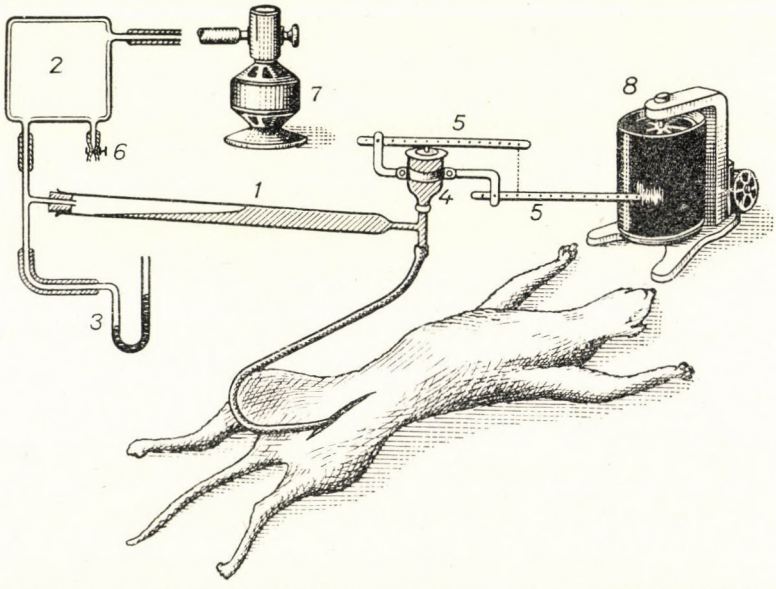


Abb. 2. Einrichtung zur Blutdruckstabilisierung. *1:* Bürette mit heparinisiertem Blut; *2:* Windkessel; *3:* Quecksilbermanometer; *4:* MAREYsche Kapsel; *5:* Registriereinrichtung; *6:* Druckregulierklammer; *7:* Luftkompressor; *8:* Kymographion

Nach Einspritzung von 10 mg/kg BON in die Vena jugularis fliessen aus der Bürette etwa 1 Minute hindurch 30 ml Blut in die Aorta, ohne dass jedoch das Manometer der Bürette eine Veränderung anzeigen würde. An der die Heztätigkeit anzeigenden MAREYschen Kapsel bleibt sowohl der systolische wie der diastolische Ausschlag unverändert, gegebenenfalls nehmen beide ohne Veränderung der Pulsfrequenz etwas zu (Abb. 3). Die BON-Menge, die den Blutdruck des Tieres um ungefähr 40 mm Hg zu senken pflegt, übt also keine

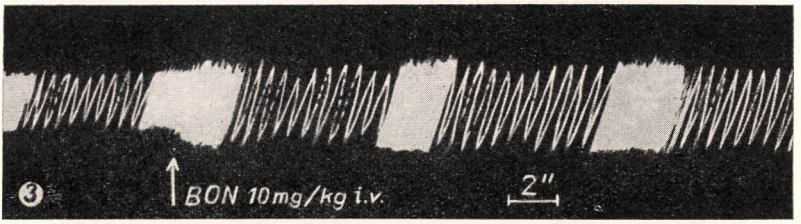


Abb. 3. Katze. Urethan-Narkose. Konstanter Blutdruck. Herztätigkeit bei langsamer und schneller Drehungsgeschwindigkeit des Kymographions. BON i. v. 10 mg/kg

unmittelbar schädigende Wirkung auf das Herz aus, ja erhöht sogar eher noch den Pulsvolumen und bringt so die Blutdrucksenkung durch Erweiterung der Gefässe (Blutspeicher) zustande. Es ist jedoch hervorzuheben, dass die dekapitierte Katze auf BON mit Blutdruckerhöhung reagiert. Auf dieses Phänomen werden wir in der Besprechung noch zurückkommen. Die nachfolgenden Versuche wurden in Urethan- oder Urethan-Chloralose-Narkose vorgenommen. Schon zu Beginn der Versuche fiel auf, dass die BON-bedingte Blutdrucksenkung weder von Tachykardie noch von Atmungssteigerung begleitet war. Diese Feststellung legte den Gedanken nahe, BON schalte die Blutkreislauf und Atmung regulierenden Mechanismen aus. Dieser Annahme wurde durch die mit Carotisabklemmung und Erstickung durchgeführten Versuche bestätigt: nach diesen Eingriffen war bei Anwendung von BON die Blutdrucksenkung nicht einmal annähernd so gross wie vorher.

Auf elektrische Reizung des zervikalen Nervus vagus-Stammes trat nach BON-Anwendung kaum eine geringe Bradykardie auf, und auch die Blutdrucksenkung war erheblich geringer als üblich (Abb. 4).

Diese lähmende BON-Wirkung kommt auch am sympathischen Apparat zum Ausdruck: nach intravenöser BON-Einspritzung reagiert die Katzennickhaut auf Reizung der präganglionären oder (1 Fall) postganglionären Fasern des Ggl. cervicale superius oder auf i. v. Adrenalin-Injektion mit erheblich geringeren Kontraktionen als vorher. (Die Reaktion kann sich sogar auf 1/10 vermindern.) Die die Novocainwirkung übersteigende BON-Wirkung ist auf Abb. 5 dargestellt. Die Kontraktionsverminderung ist offenbar nicht

eine Folge der Blutdrucksenkung, da sie auch am Tier mit konstantem Blutdruck herbeigeführt werden kann.

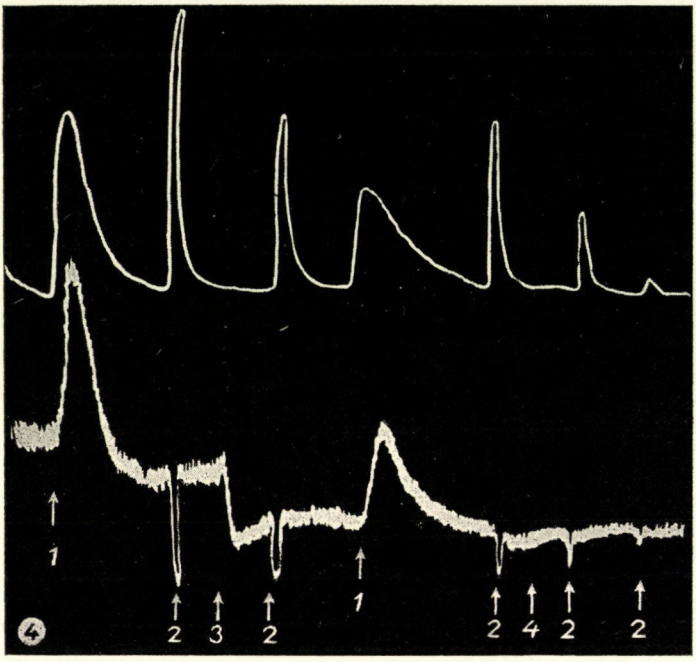


Abb. 4. Katze. Urethan-Narkose. Oben: Nickhautkontraktionen, unten: Blutdruck. 1: Adrenalin i. v. 10 μg/kg; 2: Reizung der präganglionären Fasern des Ggl. cervic. sup. und des zervikalen Vagus; 3: BON i. v. 5 mg/kg; 4: Behandlung der präganglionären Fasern des Ggl. cervic. sup. mit 1%iger, des Vagus mit 5%iger BON-Lösung

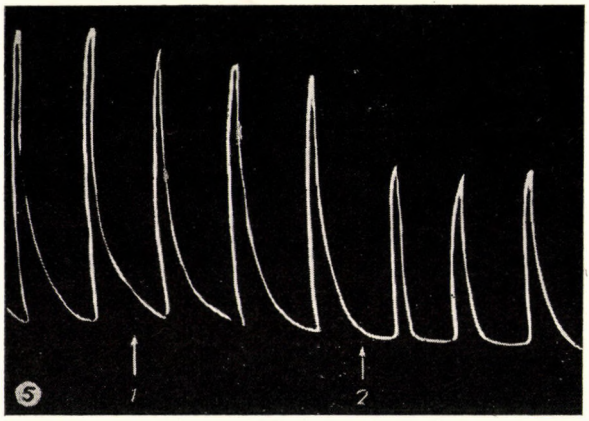


Abb. 5. Katze. Urethan-Narkose. Nickhautkontraktionen nach Reizung der präganglionären Fasern des Ggl. cervic. sup. 1: 10 mg/kg Novocain i. v.; 2: 10 mg/kg BON i. v.

Bei dem mit BON behandelten Tier nimmt auch die blutdrucksenkende Wirkung von Adrenalin ab, hält aber wesentlich länger als gewöhnlich an (Abb. 4). Die Verminderung der Adrenalinwirkung kommt auch am dekapitierten Tier zustande.

2. Unsere weiteren Untersuchungen beruhten auf der Beobachtung, dass die Kontraktion der Nickhaut auf etwa 40% ihres ursprünglichen Wertes abnimmt, wenn die präganglionären Fasern des Ggl. cervicale superius mit 1%iger BON-Lösung bepinselt und sodann unter der Bepinselungsstelle gereizt werden. Nach dem Abwaschen der BON-Lösung wurden die Kontraktionen wieder stärker und erreichten beinahe den Ausgangswert. Diese Erscheinung deutet darauf hin, dass BON auch über eine die Reizleitung unterbrechende lokalanästhetische Wirkung verfügt. Die lokale BON-Wirkung untersuchten wir deshalb eingehender.

Die lokalen BON-Wirkungen

a) Die Wirkung auf die präganglionären Fasern des Ggl. cervicale superius wurde oben bereits beschrieben (Abb. 4).

b) Die Leitungsunterbrechung am zervikalen Vagus erfordert bereits eine konzentriertere Lösung. Durch Auflegen von mit 5%iger Lösung durchtränkter Watte wird die Wirkung der elektrischen Reizung vollständig gehemmt (Abb. 5).

c) Durch Bepinselung des N. ischiadicus mit 2%iger BON-Lösung wird am Froschnerv-Muskelpräparat die Leitung fast völlig aufgehoben.

d) Nach Bepinselung des N. ischiadicus des narkotisierten Kaninchens mit BON nimmt das Ergebnis der zentralwärts von der behandelten Stelle vorgenommenen Reizungen allmählich ab, während die Reizung des distalwärts gelegenen Nervenabschnitts noch zu vollwertigen Kontraktionen führt.

e) An der isolierten, künstlich durchströmten unteren Katzenextremität übt BON — wie zu erwarten war — auf das tonuslose Gefässsystem keine gefässerweiternde Wirkung aus, vermag aber die gefässverengernde Wirkung der den Durchfluss auf 1/3 vermindernden Adrenalinmengen vollständig zu hemmen.

f) Am LÄWEN-TRENDELENBURGschen Froschextremitätenpräparat vermag dieselbe Adrenalinkonzentration, welche die Tropfenzahl von 34 auf 7 herabsetzt, die Tropfenzahl im BON-haltigen Medium nur auf 22 zu reduzieren.

3. Am isolierten Meerschweinchendünndarm lässt sich in der TRENDELENBURGschen Anordnung nach Anwendung von BON in der Konzentration 1 : 500 000 die Darmautomatie durch Druckerhöhung über die frühere Reizschwelle noch in Gang setzen; die Konzentration 1 : 50 000 lähmt jedoch den Peristaltikreflex vollständig, während muskulotropes Histamin die myogene Kontraktion der Längsmuskulatur auch dann noch hervorzurufen vermag.

Diese automatielähmende BON-Wirkung ist nach Abwaschen reversibel (Abb. 6).

4. Nach den bisher mitgeteilten Untersuchungsergebnissen wirkt BON auf die sympathischen, parasympathischen und motorischen Elemente des peripheren Nervensystems in gleicher Weise hemmend. Über die BON-Wirkungen auf den peripheren sensorischen Apparat unterrichten nachfolgende Versuche.

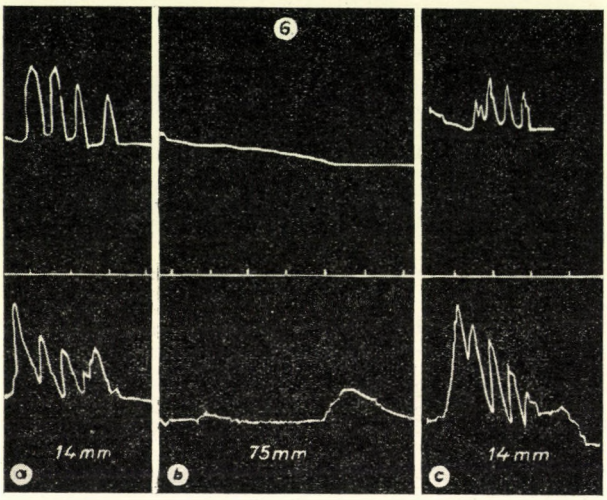


Abb. 6. Isolierter Meerschweinchendarm. Oben: Zirkuläre, unten: longitudinale Muskulatur. A: Schwellenwert 14 mm; zwischen A und B 0,25 mg BON ad 50 ml; B: der Peristaltikreflex lässt sich auch mit 75 mm Druck nicht auslösen; zwischen B und C wiederholtes Waschen; C: der Schwellenwert erneut 14 mm

Am Menschen entwickelt sich nach intrakutaner Einspritzung von 0,1 ml einer 1%igen BON-Lösung eine etwa 15 Minuten anhaltende, über das infiltrierte Gebiet nur wenig hinausreichende vollständige Anästhesie, der kein Schmerz vorangeht.

Die Injektion verursacht keine Lokalreaktion, was wir auch bei den Tierversuchen feststellen konnten. Nach Infiltration der Schwanzwurzel einer Ratte mit 5%iger BON-Lösung reagierte das Tier 20 Minuten lang nicht auf Brennschmerz am Schwanz. Im Anschluss an s. c. Einspritzung von 0,25 ml 5%iger BON-Lösung in eine Seite des Meerschweinchens zeigte das Tier auf Reizung der Injektionsstelle mit Induktionsstrom oder Hitze etwa 30 Minuten lang keine Schmerzen an. (Die Empfindlichkeit des symmetrischen Gebietes der anderen Seite blieb inzwischen unverändert.) Zur Untersuchung der lokalanästhetischen BON-Wirkung an Tieren arbeiteten wir auch eine neue Methode aus. Die Haut von Meerschweinchen wurde auf zwei symmetrischen Stellen mit Bariumsulfidbrei enthaart und dann in Narkose mit grobem Schmirgeltuch so lange gerieben, bis die Hautoberfläche gleichmässig hellrot wurde. Nach

vollständigem Aufhören der Narkosewirkung wurden die Meerschweinchen in ein grösseres rundes Gefäss gelegt. Auf unmerkliche, drucklose Berührung des enthaarten Gebietes mit konzentrierter Salzsäure auf einem stecknadelkopfgrossen Punkt reagieren die Tiere ausnahmslos mit ungewöhnlich lebhafter Bewegung: sie laufen rasch im Kreise herum und versuchen aus dem Gefäss zu springen oder die schmerzhafte Stelle mit dem Hinterbein zu kratzen. Diese ausserordentlich heftige Bewegungsreaktion ist jedoch selten von Lautgebung begleitet. Wurde der gleiche Versuch am Ohrlappen von Katze vorgenommen, kratzten diese die schmerzhafte Stelle stark mit den Beinen, doch war diese Reaktion ebenfalls nicht von Miauen begleitet! Bei Ratten ist die Methode nicht anwendbar, weil diese die Berührung mit Salzsäure möglicherweise ohne jede Reaktion tolerieren.

Nach Bepinselung des enthaarten Gebietes mit BON-Lösung während 5 Minuten und nachfolgender Berührung des getrockneten Bereichs mit konz. Salzsäure ist 0,25%ige BON-Lösung noch wirkungslos. 0,5%ige Lösung bewirkt partielle Anästhesie, die innerhalb von 10 Minuten aufhört. Die vollkommene anästhetische Wirkung der 1%igen Lösung hält etwa 15 Minuten an; nach Verlauf von 20 Minuten reagiert das Tier wieder normal. Ebenfalls 5 Minuten hindurch erfolgte Bepinselung mit 1%iger Procain.HCl-Lösung verursacht Anästhesie von gleicher Dauer wie 1%ige BON-Lösung.

Bei subkutaner Anwendung sind im enthaarten Gebiet auch schwächere BON-Lösungen wirksam: die 0,25%ige bewirkt vollständige Anästhesie, auch nach 20 Minuten zeigt das enthaarte Gebiet verminderte Empfindlichkeit.

Es sei bemerkt, dass die Anästhesie über das infiltrierte Gebiet nicht hinausreicht, was auf die geringe Diffusionsfähigkeit des BON hinweist. An Schleimhäuten (an der Kaninchen- und noch empfindlicheren Meerschweinchen-Cornea) liess sich mit BON Anästhesie nicht herbeiführen.

5. Die den Adrenalineffekt hemmende BON-Wirkung am durchströmten und *in vivo*-Gefässsystem wurde oben bereits beschrieben. Am Meerschweinchen-Samenblasenpräparat, wo auch Adrenalin Kontraktionen auslöst, kommt die antagonistische BON-Wirkung ebenfalls zur Geltung. An überlebenden Organen, die auf Adrenalin durch Relaxation reagieren, wird jedoch die Adrenalinwirkung von BON nicht gehemmt, sondern sogar, wenn auch nicht in Intensität verstärkt, so doch zeitlich wahrnehmbar verlängert. Diese Erscheinungen konnten wir auch am Kaninchendarm, Meerschweinchendarm und am Rattenuterus beobachten.

Auf diese überlebenden Organe ist BON in niedrigen Konzentrationen (1 : 1 Million) wirkungslos oder wirkt leicht tonussteigernd, während es in höheren Konzentrationen (1 : 80 000—120 000) die Automatie herabsetzt. Ein derartiger, in seiner Automatie völlig oder überwiegend gehemmter Kaninchendarm reagiert jedoch auf Azetylcholin mit genau so grosser Kontraktion, als ob BON in der Tyrode-Lösung nicht anwesend wäre.

6. Die Histaminwirkung auf den Meerschweinchendarm lässt sich (im MAGNUSschen Apparat) nur mit sehr grossen BON-Mengen — und auch damit nicht vollständig — hemmen. BON hebt also die Automatie auf, übt aber auf die Muskelkontraktionen hervorrufende Histamin- oder Azetylcholinwirkung kaum Einfluss aus.

7. Histamin-Aerosol gegenüber ist BON praktisch wirkungslos. Der Bronchialkrampf der in 0,4%iges Histamin-Aerosol verbrachten Meerschweinchen konnte durch parenteral (i. p.) verabreichtes BON (20 mg/kg) nicht abgewehrt werden. Wurde BON lokal in der Weise verabfolgt, dass wir aus 5%iger BON-Lösung hergestelltes Aerosol inhalieren liessen, unmittelbar danach aber Histamin-Aerosol, liess sich der Zeitpunkt des Krampfanfalls ein wenig, etwa um die Hälfte verzögern. Bei gleicher Anwendung von BON gegen den durch Azetylcholin (4%iges Aerosol) verursachten Bronchialkrampf erwies es sich etwas wirksamer, indem es die Zeitspanne bis zum Auftreten des Krampfes auf mehr als das Doppelte verlängerte.

8. Die antagonistische Wirkung von BON Adrenalin gegenüber lässt sich jedoch auch an lebenden Tieren nachweisen. Aus 32 Ratten stellten wir auf Grund gleichen Gewichts und Geschlechts Paare zusammen. Sämtliche Tiere erhielten intraperitoneal 3 mg/kg Adrenalin. 10 Minuten vorher hatten wir von jedem Paar einem Tier 20—100 mg/kg BON subkutan und dem Kontrolltier eine entsprechende Menge Ringer-Lösung verabreicht. Von den Kontrollen gingen 15 = 94%, von den mit BON behandelten Tieren jedoch nur 4 = 25% zugrunde. Zu bemerken wäre noch, dass die Kontrolltiere überwiegend bereits in der ersten halben Stunde, die mit BON behandelten aber grösstenteils erst nach Stunden oder am nächsten Tage eingingen. Auf Grund der Dyspnoe der Tiere und des Sektionsbefundes dürfte Lungenödem die Todesursache gewesen sein.

9. In einigen Versuchen (2 Ratten, 1 Meerschweinchen) wollten wir uns über die BON-Wirkung auf den Gasaustausch orientieren. Nach s. c. Injektion von 50 mg/kg sank der Gasaustausch um etwa 10—15%, stieg aber später etwas über den Ausgangswert. Die Senkung hängt unserer Ansicht nach mit der Blutdrucksenkung und der Relaxation der Muskulatur zusammen, während die spätere Gasaustauscherhöhung als kompensatorisch zu betrachten ist.

10. Die Angaben über die Toxizität von BON gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

An Mäusen und Ratten entwickeln sich die toxischen Symptome in folgender Reihenfolge: Exzitation, Mydriases, Exophthalmus, Vasodilatation am Ohr, Ataxie, Dyspnoe, Cyanose, Temperatursenkung, Spasmen, Atemlähmung. Zur Zeit der Atemlähmung ist die Herztätigkeit auf Grund der Autopsie noch als zufriedenstellend zu bezeichnen.

Bei der Katze dominiert Muskelschwäche: ihre Mandibula hängt herab, sie ist stark ataxisch, in Begleitung leichter Myose schiebt sich die Nickhaut

vor. In diesem Zustand ist ihr Bewusstsein intakt, auf Ruf reagiert sie usw. Bei letalem Ausgang ist die Todesursache auch bei der Katze Atemlähmung (mit künstlicher Beatmung kann man die Tiere am Leben erhalten).

DL g/kg von Butylsympaton

	i. v.	i. p.	s. c.	per os
Maus	0,06—0,08	0,09—0,12	0,08—0,11	0,3—0,4
Ratte.....	0,07—0,1	0,12—0,15	0,08—0,11	0,5—0,7
Meerschweinchen...		0,2 —0,35	0,35—0,45	
Katze	0,05—0,06	0,06—0,08	0,1 —0,13	
Kaninchen	0,06—0,07			
Frosch			0,4 —0,5 (in den abdominalen Lymphsack)	

Bei Meerschweinchen stehen eher Erregungserscheinungen im Vordergrund. Der Exitus tritt bei den Versuchstieren gewöhnlich nach ¼—½ Stunde ein, ausgenommen die Meerschweinchen, die möglicherweise erst nach Stunden oder am andern Tage eingehen.

BON wird aus dem Verdauungskanal ziemlich gut resorbiert, der i.v./per os Applikationsquotient beträgt bei Mäusen und Ratten etwa 1 : 5 — 1 : 7.

Besprechung

Die ausserordentlich reichhaltige Literatur über die Phenylalkylamine enthält verhältnismässig wenige Angaben über die aromatischen Aminoketone, obwohl SUBENKO [9] Phenylaminoketon bereits 1893 herstellte und SOKOLOVSKI und SMURLO [10] das Piperidoazetobrenzkatechin sowie STOLZ 1904 eine ganze Reihe von Alkylaminoketonen synthetisierten [11]. Von diesen Verbindungen gewann allein Stryphnon als parenteral wirksames Blutstillmittel therapeutische Bedeutung. Der Mechanismus dieser Wirkung wurde von STURM und Mitarbeitern [12] geklärt (s. auch die Mitteilungen von SÜMEGI und HEINTZ [13] sowie KOLLERT und REYCK [14]). MERCIER und Mitarbeiter [15] stellten die adrenolytische und blutdrucksenkende Wirkung von p-Methoxyephedron und p-Diäthylamino-propiophenon fest.

Nach LUDWIGS und SCHNEIDER [16] wird die Wirkung der Grundverbindungen von der Oxogruppe im allgemeinen nur quantitativ beeinflusst. Der positive oder negative Effekt auf den Blutdruck, die broncholytische und adrenolytische Wirkung pflegen infolge Substitution des Alkoholradikals durch die Oxogruppe abzunehmen, obwohl es auch vorkommt, dass der Ketoncharakter sonst wirkungslosen Verbindungen eine broncholytische Wirkung verleiht.

Von einigen Phenylalkylaminen ist bekannt, dass sie über eine gewisse lokalanästhetische Wirkung verfügen [17, 18]. Über eine ähnliche Wirkung der Phenylaminoketone standen uns jedoch ausser den Angaben MARSHALLS [19], die hinsichtlich ihrer chemischen Struktur von BON ziemlich fernstehen, Literaturangaben nicht zur Verfügung.

HUNECKE [20] sowie KONRADI und TSCHERNIGOWSKI [1] aus der BIKOWschen Schule hatten den Begriff der Novocain-Endoanästhesie eingeführt, der dann in seinen experimentellen und klinischen Beziehungen hauptsächlich von ZIPF und MIESTERECK, FLECKENSTEIN, RYZEWSKI, BABITSCHEV und verschiedenen anderen ausgearbeitet wurde [22—27].

Auf Grund seiner ausgeprägten lokalanästhetischen Wirkung ist BON unserer Auffassung nach als ein dem Novocain ähnlich wirkendes Endoanästhetikum zu betrachten : durch Lähmung der Interorezeptoren des Gefässsystems schaltet es die die Blutkreislaufreflexe herbeiführenden Afferentationen aus, und indem es gleichzeitig auf den efferenten Apparat des Nervensystems ähnlich wirkt, verhindert es, dass die Impulse der Blutkreislaufzentren zu den effektorischen glatten bzw. Herzmuskelzellen gelangen. Nach diesem Gedankengang würde die BON-Wirkung einer gewissen Denervation des Kreislaufsystems entsprechen.

Es ist indessen eine paradoxe Erscheinung, dass BON den Blutdruck am dekapitierten Tier nicht senkt, sondern im Gegenteil erhöht. Hinsichtlich der Erklärung dieses Phänomens können wir uns nur auf Vermutungen beschränken. Da BON die Herzleistung nicht besonders steigert und keine Vasokonstriktion verursacht, müssen wir annehmen, dass in der Aufrechterhaltung des nach der Dekapitierung des Tieres entstandenen neuen Kreislaufgleichgewichts noch immer irgendein funktionsfähig gebliebener neuraler Faktor mitwirkt, der in Depressorrichtung wirkt, und dass BON durch Ausschaltung dieses Faktors Blutdruckerhöhung herbeiführt. Wir denken hierbei an den spinalen Depressorapparat. Das Vorhandensein spinaler Nerven ist heute bereits als erwiesen anzusehen. Über die Zentren dieser Nerven wissen wir jedoch vorläufig nichts Sicheres. Es ist eine offene Frage, ob sie auf die über die afferente Reflexbahn zu ihnen gelangenden Impulse selbständig zu reagieren imstande sind oder ob sie ähnlich wie die spinalen sympathischen Zellen vom vasomotorischen Zentrum gesteuert werden. Im Zusammenhang mit BON ist es indifferent, ob der gefässerweiternde Apparat adrenergisch oder cholinergisch ist, ferner ob sich die Wirkung der am Endapparat freiwerdenden Substanz mit Atropin hemmen lässt oder nicht. Das Wesentliche der Frage besteht darin, ob nach der Dekapitierung ein spinales Depressorzentrum in funktionsfähigem Zustand erhalten bleibt und ob diesem in der Ausgestaltung des neuen Kreislaufstatus nach der Dekapitierung eine Rolle zufällt. Denn wenn dies der Fall ist, muss das als allgemeines Endoanästhetikum wirkende BON durch Blockierung der Endapparate notwendigerweise zu Blutdruckerhöhung führen.

Unter identischen experimentellen Bedingungen ist die blutdrucksenkende Wirkung des BON wesentlich dauerhafter als die des Butylsympatols. Dies kann teilweise vielleicht darauf zurückgeführt werden, dass Butylsympatol auf Grund seiner chemischen Struktur als ein Substrat der Aminooxydase zu betrachten ist, während BON, da es am Kohlenatom Nr. 1 keinen Wasserstoff enthält, von der Aminooxydase nicht angegriffen werden kann, d. h. längere Zeit unzersetzt im Blut zu kreisen vermag.

Die Verminderung der Adrenalinwirkung bringt BON offensichtlich nicht durch Beschleunigung des Adrenalinabbaus zustande, da es zwar den Adrenalineffekt herabsetzt, gleichzeitig aber auch prolongiert. Diese Prolongation kommt sogar am isolierten Kaninchendarm zum Ausdruck, wo die Gegenregulation keine Rolle spielen kann. Als Erklärung dürfte der kompetitive Antagonismus am wahrscheinlichsten sein, obwohl in diesem Fall angenommen werden muss, dass dieser Antagonismus nur an denjenigen Wirkungsstellen in Erscheinung tritt, wo Adrenalin Tonussteigerung herbeiführt (am Kaninchendarm hemmt BON z. B. nicht die Relaxationswirkung des Adrenalins).

BON setzt zwar die Adrenalinwirkungen *in vivo* und auch *in vitro* herab, ist aber gleichzeitig imstande, sie auch zu konservieren. Als Ursache der Wirkungsprolongation besteht die Möglichkeit, dass BON — wie dies auch von Ephedrin behauptet wird — einen Teil der Aminooxydase bindet und dadurch den Adrenalinabbau hemmt. *In vivo* kann auch noch die Ausschaltung der kompensatorischen Regulation zur Prolongation der Adrenalin-Pressorwirkung beitragen. Im übrigen ist die den Adrenalineffekt hemmende, aber gleichzeitig prolongierende Wirkung einzelner Substanzen in der Pharmakologie keine unbekannte Erscheinung (Hämatoxylin-Gruppe, meriquinone, [28, 29]).

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen am Meerschweinchendarm wollen wir in der umstrittenen Frage, ob die Bewegung der longitudinalen Muskulatur myogenen oder neurogenen Charakters sei (FELDBERG [30] kontra SCHUMANN [31]), nicht Stellung nehmen. Aus der Beobachtung jedoch, dass die longitudinale Muskulatur des Meerschweinchendarms unter BON-Wirkung noch kontraktionsfähig bleibt, obwohl der peristaltische Reflex nicht mehr funktioniert, kann als wahrscheinlich gefolgert werden, dass die lähmende BON-Wirkung nicht in erster Linie auf die Muskelzellen, sondern auf den Nervenapparat gerichtet ist. Das beweisen auch die am isolierten Kaninchendarm gewonnenen Resultate: obwohl BON die Peristaltik aufhob, reagierte der Darm auf Azetylcholin noch immer mit unverändert starken Kontraktionen.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei intravenöser Verabreichung bewirkt Butylsympaton dauerhafte Blutdrucksenkung; während ihrer Dauer treten die durch Carotisabklemmung oder Erstickung auslösbaren Kreislaufreflexe mit verminderter Intensität in Erscheinung, doch nehmen auch die durch Reizung der präganglionären Fasern des Ganglion cervicale sup. auslösbare Blutdrucksenkung bzw. Nickhautkontraktion ab.

Die blutdruckerhöhende Adrenalinwirkung wird von Butylsympaton herabgesetzt gleichzeitig aber auch prolongiert. Der Adrenalineffekt wird nur in den Organen gehemmt, deren glatte Muskulatur auf Adrenalin durch Kontraktionen reagiert.

Auf das periphere Nervensystem wirkt es lähmend. Bei lokaler Anwendung wird die Leitung im zervikalen Vagus, in den präganglionären Fasern des Ganglion cervicale sup., in den motorischen Nerven unterbrochen und auch der periphere sensorische Apparat gelähmt. Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass es das Gefässsystem auf chemischem Wege denerviert und daher als dessen Endoanästhetikum wirkt.

Eine geeignete Methode zur Untersuchung seiner ausgeprägten lokalanästhetischen Wirkung ist die Berührung der enthaarten Meerschweinchenhaut mit Salzsäure.

Wesentliche Antihistaminwirkung zeigt Butylsympaton weder an überlebenden Organen noch *in vivo*. Den Gasaustausch setzt es nur in sehr geringem Masse sekundär (durch Senkung des Blutkreislaufs und Muskeltonus) herab.

LITERATUR

1. Duesberg, R.: Dtsch. Med. Wschr. **74**, 17 (1949).
2. Förster, H., Kuschinsky, G.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **210**, 23 (1950).
3. Spitzbarth, H., Hertz, O.: Dtsch. Med. Wschr. **75**, 615 (1950).
4. Mechelke, K., Heinzel, F.: Z. ges. exp. Med. **116**, 193 (1950).
5. Graner, W.: Dtsch. Med. Wschr. **75**, 315 (1950).
6. Kreutziger, H., Veit, E.: Neue Med. Welt 1950, S. 921.
7. Becker, K., Maiser, F.: Med. Klin. 1951, S. 640.
8. Kovács, Ö.: Pharmazeut. Zentralhalle, **92**, 193 (1953).
9. Schubenko, G.: Dissertation, Petersburg, 1893, zit. Löwy u. Meyer Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **53**, 213 (1905).
10. Sokolowski, P., Smurlo, F.: zit. Löwy u. Meyer: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **53**, 214. (1950).
11. Stolz, F.: Ber. chem. Ges. **37**, 4149 (1904).
12. Sturm, A., Gietz, I., Kempte, K.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **183**, 363 (1936).
13. Sümegi S., Haintz, E.: Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **144**, 164 (1929).
14. Kollert, V., Rezek, N.: Med. Klin. **21**, 962. (1925)
15. Mercier, F., Sestier, M. R.: Compt. rend. soc. biol. (Paris) **147**, 443 (1953).
16. Ludwigs, N., Schneider, M.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **218**, 432 (1953).
17. Lands, A. M.: Pharm. Rev. **1**, 279 (1949).
18. Orzechovszki, G.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **202**, 79 (1944).
    Kiessig, H. J., Orzechovszki, G.: Arch. exp. Path. Pharmakol. **197**, 391 (1941).
19. Marshall, P. B.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 85 (1952).
20. Hunecke, F.: Monographia, Köln, (1947) zit. Zipf, H. F.: Dtsch. Med. Wschr. **78**, 1587 (1953).
21. zit. Hazanov, N. A., Melamed, R. I.: Orv. Hetil. 1952, S. 1168.
22. Zipf, H. F.: Klin. Wschr. **31**, 97. (1953),
23. Zipf, H. F., Mietereck, H.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **217**, 456, 472 (1953).
24. Fleckenstein, A.: Klin. Wschr. **27**, 360. (1949).
25. Fleckenstein, A., Muschaweck, A., Bohlinger, R.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **211**, 132 (1952).
26. Ryzewski, J.: Act. phys. Pln. **4**, 85 (1953); Ber. ges. Phys. **165**, 51. (1954).
27. Babicev, V. A. *(Бабичев, В. А.)*: Фармакол. и Токсикол. **17**, 24 (1954). Ber. ges. Phys. **174**, 369. (1955).
28. Gábor, M., Horváth, B., Kiss, L., Dirner, Z.: Acta Physiol. Hung. **3**, 585 (1952).
29. Charlier, R., Dallemagne, M. I., Philippot, E.: Arch. intern. Pharmacodyn. **100**, 127 (1954).
30. Feldberg, W.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 33 (1949).
31. Schumann, O.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **217**, 360 (1953).

Communicatio brevis

LOCAL INHIBITION OF THE TESTICULAR EXTRACT INDUCED OEDEMA OF THE RAT'S HIND-PAW

By

E. KELEMEN

1st DEPARTMENT OF MEDICINE, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, SZEGED, HUNGARY

(Received March 25, 1956)

In the last years we have published several observations on the acute inhibition [1] of a permeability response of the rat's hind-paw, as well as on its protracted suppression [2]. We induced oedema by injecting at the plantar surface 0,3 to 0,8 mg of bull testicle extract *(Richter Gedeon*, Budapest) dissolved in 0,11 ml of physiological saline. Details of estimating the degree of the developing oedema have been given [3]. The inhibition of oedema is regarded as »good«, if no remarkable oedema has developed around the tibia. All these experiments have dealt with some possibilities of a systemic influence.[1]

The present experiments, made on 99 rats[2] ranging in weight from 125 g to 175 g, consisted in dissolving different materials in the saline containing the testicular extract, and injecting these mixtures immediately, by the technique described. Observations were continued for 20 minutes.

The results are given in the Table. It seemed of interest to attach some of our previous data on systemic inhibition. In these instances the materials had been injected subcutaneously 3 to 4 hours before the experiment.

As it is shown, adrenalin, nor-adrenalin and chlorpromazine (Largactil) were the most effective agents under the specified conditions of local application. The antihistamine preparation (Neoantergan) was less effective ; comparing it with adrenalin (μg to μg), its effect was weaker by nearly two orders of magnitude. The interest of this observation may lie in the fact that this type of oedema is also connected with local histamine release [2].

In fact, these acute oedema fluids contain as much as 2 to 10 μg histamine activity per ml, as determined by us on the guinea-pig ileum, regardless of whether local oedema was induced by testicular extract, by dextran, or by the so-called histamine liberator 48/80.[3] Further, as it has been demonstrated,

[1] As the preparations contain known and unknown biologically active materials other than hyaluronidase, we have repeatedly emphasized that the term protection against oedema indicates a partial, or complete, absence of the phenomena described [4].

[2] Untreated controls are not encountered.

[3] Direct bio-assay on guinea-pig ileum also measures 5-hydroxytryptamine activity. This substance *(Upjohn)* evokes similar oedema, if 0,75 to 2,50 μg base in 0,11 ml saline are injected by our technique. This material was also counteracted by adrenalin and chlorpromazine. Earlier observations in this field originate from BENDITT and ROWLEY [5].

Table

Local inhibition of testicular extract induced oedema in the rat's hind-paw

Material present in the injected testicular extract	Number of trials	Amount of material producing »good« inhibition (present in 0,1 ml) in μg	Amount of ineffective material in μg	Remarks	Possibility of systemic inhibition in previous experiments (with dosage), applying materials 3—4 hours before
Adrenalin—HCl *Richter*	15	0,10—0,50	Less than 0,05	Marked vasoconstriction Mol. wt. 185	Yes 50 μg and above subcut. in the presence of the adrenals
Nor-adrenalin *Jenapharm*	14	0,50—1,00	Less than 0,50	Marked vasoconstriction	No. Up to 150 μg subcutaneously
Neoantergan—HCl *Specia*	11	7,50—20,00	Less than 5,00	Mol. wt. 300	No. Excluding severe intoxication
Novocain Pantocain	3 2		500,00 100,00		
Hexamethonium	5		125,00		
Atropine-sulphate Antrenyl *Ciba*	5 3	5,00 7,50	1,00	Mol. wt. 385.	
Largactil *Specia*	10	0,88	0,44	No vasoconstriction Mol. wt. 330.	Prof. G. PETRI and Á. BOTOS, to be published
Soybean Trypsin-inhibitor (Labor. of Prof. A. A. MILES)	4		30,00—40,00		
Na-Salicylate	7		50,00—100,00		Yes 550 mg per kg and above, subcutaneously in the presence of the adrenals
Hydrocortisone (free) *Organon*	8		50,00		No. Up to 50 mg subcutaneously
Cortrophine *Organon*	12	200,00—500,00	10,00—50,00		

Neoantergan is capable of inhibiting oedema formation, if administered topically, although only in remarkably high concentrations. It is probable that some action other than antihistamine plays an important role in this effect. The causal relationship of histamine to the developing oedema, therefore, awaits further proof. The order of magnitude of histamine release was the same if we had produced a swelling seemingly identical in degree by injecting into the hind-paw 0,4 to 0,5 ml of physiological saline. This observation does not contradict the assumption that histamine release is a »participating« consequence, and not the primary cause, of the acute oedema.[4]

Anaesthetics and hexamethonium were hardly effective in our test. A type of higher effectivity was connected with the vasoconstrictor activity. The exact explanation of this seemingly well understandable action is, however, uncertain. It is true that the marked vasoconstriction makes evaluation difficult. The fact, therefore, is of some interest that although nor-adrenalin is a stronger vasoconstrictor than adrenalin, more nor-adrenalin *(Jenapharm)* than adrenalin was necessary to inhibit this type of oedema. This observation does not contradict the possibility of a role of another, undefined, factor in this adrenalin action.

The case of chlorpromazine demonstrates that visible vasoconstriction is not a prerequisite for local inhibition. As seen, in terms of μg to μg, Largactil was at least as potent as nor-adrenalin. Considering molecular weights, however, its potency was near to that of adrenalin.

Anti-cholinergic substances, as atropine and Antrenyl, *Ciba* (phenyl-cyclohexyl-oxyacetic acid-diethylaminoethyl-brommethylate) were less effective (μg to μg). Their effect, however, surpassed that of the potent antihistamine preparation.

Soybean trypsin-inhibitor in the highest concentration still compatible with specific action (kindly supplied by Prof. A. A. MILES) remained ineffective against the testicular extract induced oedema.

Salicylate, cortisone and hydrocortisone also failed to act in the experimental arrangement used. In this relation we emphasize that results of systemic versus local inhibition may diverge in both senses. Salicylate, for example, is only effective on systemic administration. On the other hand, nor-adrenalin, being effective topically, hardly influenced this type of oedema if doses up to 150 μg had been administred subcutaneously some hours before. Finally, we emphasize the lack of acute inhibitory action of locally applied free hydrocortisone, in contrast with the topical action of heavy adrenocorticotropine doses. This latter observation seems to agree with some experiments recently summarized by MENKIN [6]. However, this observation seems to have little importance as regards biological possibilities. It has been demonstrated by

[4] Details will be published with G. BIKICH.

us that the manyfold hypercorticotropinaemia of adrenalectomized rats — if it exists — does not significantly influence oedema formation.

SUMMARY

The possibility of a local inhibition of the testicular extract induced oedema of the rat's hind-paw has been investigated. Adrenalin was the most effective from the materials tested. Nor-adrenalin *(Jenapharm)*, though a stronger vaso-constrictor, was somewhat less potent. Chlorpromazine (Largactil, *Specia)* was found very active, demonstrating that visible vaso-constriction is not a prerequisite for the action examined. Although less effective than chlorpromazine, anti-cholinergic substances were at least as potent as Neoantergan *(Specia)*. Hydrocortisone, salicylate, soybean trypsin-inhibitor, hexamethonium, and local anaesthetics did not inhibit oedema in the experimental arrangement used. There was a divergence noted between some systemic and local inhibitory actions.

LITERATURE

1. KELEMEN, E.: Naturwiss. **43**, 257 (1956).
2. KELEMEN, E., TANOS, B., HAJDU, L., FORGÁCS, P.: Nature **175**, 122 (1955).
3. KELEMEN, E.: Acta Med. Hung. **9**, 125 (1956).
4. TANOS, B., KELEMEN, E., SOLTÉSZ, R.: Acta Med. Hung. **4**, 419 (1953).
5. BENDITT, E. P. and ROWLEY, D. A.: Science **123**, 24 (1956).
6. MENKIN, V.: Science **123**, 527 (1956).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1956. VIII. 27. — Terjedelem: 11 (A/5) ív, 47 ábra

40509/56 — Akadémiai Nyomda — Felelős vezető: Puskás Ferenc

The *Acta Physiologica* publish papers on experimental medical science in English, French, German and Russian.

The *Acta Physiologica* appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be addressed to:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Physiologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with „Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. — Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les *Acta Physiologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des mémoires du domaine des sciences médico-expérimentales.

Les *Acta Physiologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction à l'adresse suivante:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forint par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. — Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«*Acta Physiologica*» публикуют трактаты из области экспериментальной медицинской науки на русском, английском, немецком и французском языках.

«*Acta Physiologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «*Acta Physiologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «*Kultura*» (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

32,— Ft

INDEX

BIOCHEMIA

Feuer, Gy.: Die Wirkung der Muskeltonusveränderung auf den Kreatinphosphat- und Adenosintriphosphatgehalt 1

Ullmann, Á., Straub, F. B.: Amylasesynthese in einem löslichen System aus Pankreas 11

Garzó, T., Perl, K., T.-Szabó, M., Ullmann Á., Straub, F. B.: Inkorporation radioaktiver Aminosäuren und Amylasesynthese im Pankreasgewebe *in vitro* 23

Ullmann, Á., Straub, F. B.: Über den Mechanismus der Amylasesynthese *in vitro* .. 31

PHYSIOLOGIA

Pintér, I.: Esterase Activity of Serum Protein Fractions 39

Pataky, I., Pfeifer, A. K., Ribári, O.: Studies of the State of Inhibition Following Electroshock 45

Takács, L., T-Szabó, M. : On the Mechanism of the Metabolic Changes in Muscle During Shock : A Study of Dehydration and Arterial Hypoxia 67

Takács, L. : Coronary Circulation in Hypoxic States 55

Orosz, Á., Földes, I., Kósa, Cs., Tóth, G.: Radioactive Isotope Studies of the Connection between the Lymph Circulation of the Nasal Mucosa, the Cranial Cavity and Cerebrospinal Fluid 177

PHARMACOLOGIA

Schweiger, O., Tomcsányi, A., Kulka, F., Lehocki, M., Frau Tomcsányi, A.: Experimentelle Untersuchungen über die intrapleurale Resorption der p-Aminosalizylsäure 83

Pórszász, J., Nádor, K., Gibiszer-Pórszász, K., Bacsó, I.: Pharmakologie der Aminoketone III. Vergleichende Untersuchungen mit Largactil (3-Dimethylaminopropyl-3-chlor-10-phenothiazin), Pacatal (N-Methyl-piperidyl-3-methyl-phenothiazin) und F-933 (1-Piperidinomethyl-benzodioxan) 95

Dirner, Z., Thuránszky, K., Szeghy, G.: Über die pharmakologischen Wirkungen von Butylsympaton 109

COMMUNICATIO BREVIS

Kelemen, E. : Local Inhibition of the Testicular Extract Induced Oedema of the Rat's Hind-Paw 121

ACTA PHYSIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

E. ERNST, B. ISSEKUTZ SEN., N. JANCSÓ, K. LISSÁK,
E. T. SZÖRÉNYI, I. WENT

REDIGIT

F. B. STRAUB

TOMUS XI FASCICULUS 2

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1957

ACTA PHYSIOL. HUNG.

ACTA PHYSIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÍSÉRLETES ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG ÉS KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Az *Acta Physiologica* német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a kísérletes orvostudományok köréből.

Az *Acta Physiologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg: több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Physiologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 forint, külföldre 110 forint. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), külföld számára pedig

a „Kultúra" Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál

(Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankszámla 43-790-057-181 sz.), vagy külföldi képviseleteinél, bizományosainál.

Die *Acta Physiologica* veröffentlichten Abhandlungen aus dem Gebiete der experimentellen medizinischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Physiologica* erscheint in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion und den Verlag bestimmte Korrespondenz zu senden.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

Biochemia

INDUCED PENICILLINASE FORMATION IN RESTING BACTERIAL CELLS

I. THE CHARACTERISTIC DIFFERENCES OF THE FORMATION OF PENICILLINASE IN PRESENCE AND IN ABSENCE OF FREE PENICILLIN, IN CELLS OF B. CEREUS NRRL-B-569

By

M. KRAMER

INSTITUTE OF CHEMISTRY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received July 30, 1956)

The occurrence and properties of penicillinase were studied by many authors and we owe it to M. R. POLLOCK [1, 2, 3, 4] that the kinetics and the phases of penicillinase formation, and the role of the specific binding of penicillin are known in detail. POLLOCK and his associates have compared the physico-chemical and immunological properties of the penicillinase produced by induced strains of *B. cereus* NRRL-B-569 (in the following: 569) with that contained in the mutant 569/H, the latter being a constitutive penicillinase producing strain [5, 6, 7].

According to POLLOCK [1, 2, 3], short contact with a small amount of penicillin (0,2—1,0 O.U./ml) suffices to induce logarithmic phase cells of the 569 strain to produce penicillinase. Enzyme production starts after a short latency period. The amount of enzyme increases linearly through several cell generations, while cell growth is not affected at all. On the other hand, if excess penicillin is added to resting cells suspended in glucose containing phosphate buffer, enzyme production starts after 60—80 minutes. The rate of enzyme production follows a sigmoidal curve in this case, like the rate of production of other induced enzymes, when free substrate is present.

In our work the formation of penicillinase was studied as a model of the biosynthesis of proteins. At this stage of the work it seemed advantageous to exclude the interference of genetic factors which come into play when the cells are allowed to divide and therefore we worked mostly with resting cells. In the present paper we describe that not only the kinetics of enzyme production, but the necessary conditions and especially the energy requirements, are different if penicillinase is produced in resting cells in presence or absence of the free substrate, penicillin.

Methods

Cells from the 10—12 hour old cultures of the 569 strain were washed and suspended in 0,9% NaCl. 100 ml medium were inoculated with 0,1 ml of a spore suspension (10^5—10^6 viable cell count/ml). The cells were grown in the medium described by KNIGHT [8] and IVÁNOVICS [9] modified to the extent that it contained no glucose and only 1% of casein hydrolysate. The cells were grown at 35° C without shaking and aeration but in a shallow layer of medium with large surface. The change in the dry weight of the microorganism was measured nephelometrically in a PULFRICH nephelometer, this was calibrated to the optical density. During the experimental period no cell growth was detected by this method.

The method of HENRY and HOUSEWRIGHT [10] was used in some cases for the determination of penicillinase activity; the culture was cooled to 0° C, treated with 1 O. U./ml penicillin for 5 minutes, the cells were centrifuged at 0°C, washed and auspended in the reaction mixture at 37°C. At the desired time, an aliquot or the whole sample was treated with D-threo-chloramphenicol (15 μg/ml). This sample was used for the manometric determination of penicillinase in the WARBURG apparatus at 37° C. The activity is thus measured in Q-penicillinase units: μl CO_2/hour/mg dry weight.

In cases where penicillinase formation proceeded in presence of penicillin, it was easier to follow the activity of the enzyme in a continuous way. The suspension of the 569 cells was brought into the main compartment of a WARBURG manometer vessel, and 0,5 ml of a penicillin solution (50 000 O. U.) were pipetted into the side arm. After equilibration, penicillin was added to the reaction mixture (total volume, 3,0 ml). In such cases a control manometer contained the same ingredients and, in addition, 15 μg/ml chloramphenicol. The change of pressure in the first manometer is the resultant of the sum of carbon dioxide produced from penicilloic acid formation and respiration, minus oxygen consumption. In the second manometer respiratory changes only occur, as no penicillinase is formed. Control experiments have shown that the difference of the two readings really corresponds to penicillinase activity, and that the splitting of penicillin up to 90 per cent does not change the kinetic and energetic properties of penicillinase formation.

If this second type of experiment was performed, the result was recorded, plotting against time the net rate of carbon dioxide liberation due to penicilloic acid formation in 10 minutes intervals. The reaction mixture was

1,0 ml cell suspension
0,5 ml 0,26 *M* $NaHCO_3$
1,0 ml 0,15 *M* phosphate buffer pH 7,0 containing other ingredients
0,5 ml penicillin (50 000 O. U.).

Sodium or potassium benzylpenicillin or N-ethyl-piperidine salts were used. The protein hydrolysate was made either from casein or from fibrin, and was complemented with 0,5 per cent D,L-tryptophane.

Experimental results

a) *Optimum reaction mixture for the production of induced penicillinase.* Fig. 1 illustrates the effect of several reaction mixtures on the production of penicillinase in absence of free penicillin. A mixture of amino acids, glucose and sucrose are needed in this case. (In some instances there is enzyme production even in the absence of sucrose, in others it is completely absent or much less is produced than in sucrose containing media. Sucrose appears to have and indirect effect, stabilising the cells; it does not enter their metabolism. No sucrose is needed when penicillin is present in excess.)

As seen from Fig. 2, the situation is quite different when penicillin is present during enzyme production. The amino acid mixture alone suffices to start enzyme synthesis after a somewhat longer latency period. It is very significant that the presence or absence of glucose has no influence on the rate of enzyme production in the "active phase".

b) *Influence of anaerobiosis.* The reaction mixture and the gas phase of the WARBURG manometer were flushed with oxygen-free N_2—5% CO_2. Working with excess penicillin, anaerobiosis was established before induction. Working in absence of free penicillin, oxygen was removed only after the removal of penicillin, in some experiments only 20—30 minutes later.

Fig. 3 shows that anaerobiosis (from 0—45 minutes) completely prevents the formation of penicillinase when penicillin is removed after induction. The

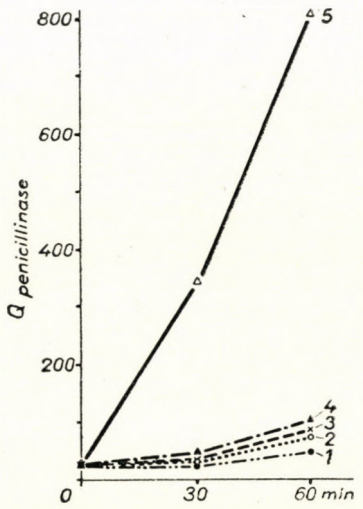


Fig. 1. Effect of several reaction mixtures on the production of penicillinase in the absence of free penicillin

1 : PO_4-buffer, 0,05 *M*, pH 7,0. — 2 : PO_4-buffer + glucose 0,05 *M*. — 3 : PO_4-buffer + glucose + sucrose 0,2 *M*. — 4 : PO_4-buffer + glucose + casein hydrolysate 0,5%. — 5 : PO_4-buffer + glucose + sucrose + casein hydrolysate. Incubation in air, at 37° C

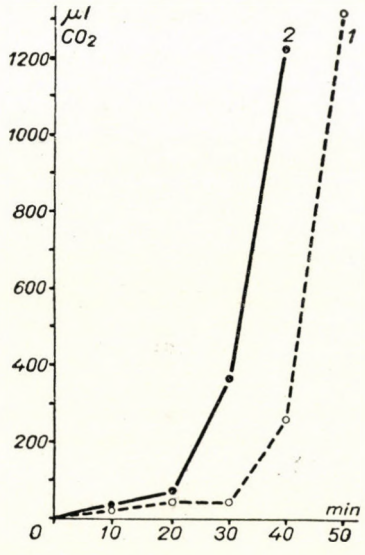


Fig. 2. Effect of glucose on the production of penicillinase in the presence of free penicillin.

1 : fibrin hydrolysate, 0,5% in PO_4 buffer. — 2 : fibrin hydrolysate + glucose 0,05 *M* in PO_4-buffer. Induction with 17000 O. U./ml penicillin in WARBURG vessel. Gas phase : air + 5% CO_2

effect is, however, reversible. On introducing oxygen, after a corresponding latency period, enzyme production starts at the same rate as in the completely aerobic sample. Anaerobiosis, if it was applied 20 or 30 minutes after the induction, had no influence on the rate of the active phase of enzyme production (Fig. 4). Figs 5 and 6 show the effect of anaerobiosis on the production of penicillinase in the presence of excess penicillin. In this case penicillinase is produced even anaerobically if glucose is present in the reaction mixture. In absence of glucose the result is essentially similar to the effect of anaerobiosis in the absence of penicillin ; it is only the latency period, which is prolonged. The

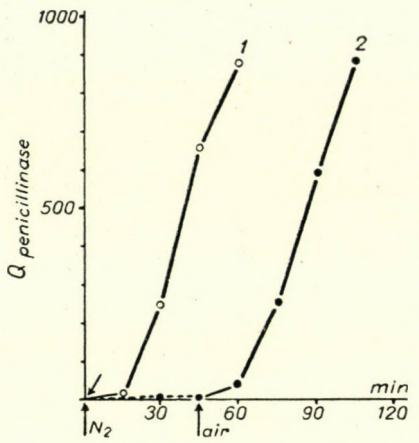


Fig. 3. Effect of anaerobiosis on the early phase of induction, in the absence of free penicillin.

1 : control (aerobic). — 2 : anaerobiosis from 0 to 45 minute (N_2). Reaction mixture : PO_4-buffer + glucose + sucrose + casein hydrolysate

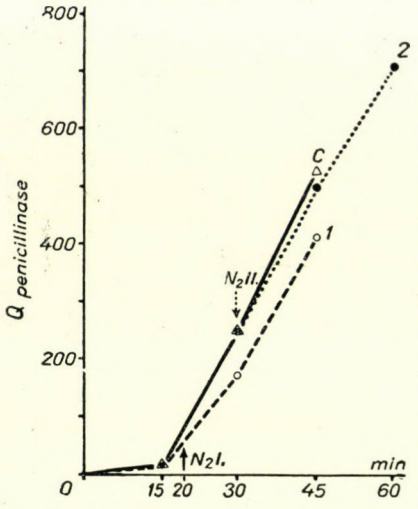


Fig. 4. Effect of anaerobiosis on the later phase of induction, in the absence of free penicillin.

C : aerobic control. — 1 : N_2 bubbled from 20th min. — 2 : N_2 bubbled from 30th min. Reaction mixture : see *Fig. 3*

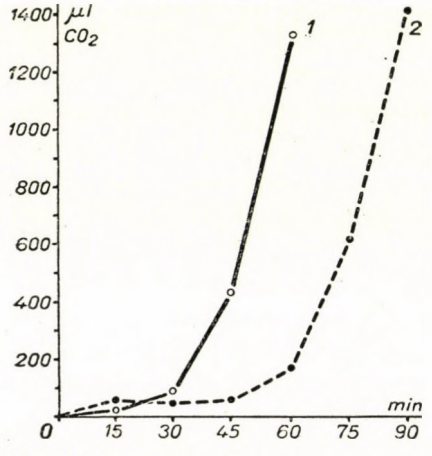


Fig. 5. Effect of anaerobiosis on the production of penicillinase in the presence of free penicillin and of glucose

1 : aerobic control (air + CO_2). — 2 : anaerobiosis (N_2 + CO_2). Induction with 17 000 O. U./ml penicillin in WARBURG vessel. Reaction mixture : fibrin hydrolysate, 0,5% + glucose 0,05 *M* in PO_4 buffer

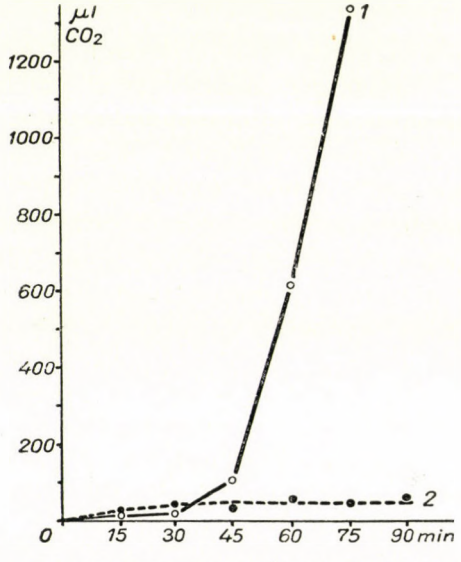


Fig. 6. Effect of anaerobiosis on the production of penicillinase in the presence of penicillin, without glucose.

1 : aerobic control (air + CO_2). — 2 : anaerobiosis (N_2+CO_2). Induction : see *Fig. 5.* Reaction mixture: fibrin hydrolysate, 0,5%, in PO_4 buffer

Table I

The influence of metabolic poisons on the inductive penicillinase production of B. cereus *NRRL—B—569 cells*

(Pretreatment, reaction mixture, see text)

Gas phase	Name and concentration of metabolic poison	Inhibition in per cent of control	
		In absence of free penicillin	In presence of free penicillin
air	NaN_3 $3 \cdot 10^{-3}$ *M*	100	0
air	NaN_3 $5 \cdot 10^{-3}$ *M*	100	8
air	DNP $3 \cdot 10^{-4}$ *M*	100	0
air	DNP $5 \cdot 10^{-3}$ *M*	100	0
air	NaF $1 \cdot 10^{-2}$ *M*	100	5
air	DNP $5 \cdot 10^{-3}$ *M* + NaF $1 \cdot 10^{-2}$ *M*	100	5
N_2	—	100	0
N_2	NaF $2 \cdot 10^{-2}$ *M*	—	100

subsequent rate of enzyme synthesis is unaffected by anaerobiosis. Chloramphenicol (5 μg/ml); aureomycin (0,6 μg/ml); terramycin (5 μg/ml); proflavine (2,6-diaminoacridine) completely inhibit penicillinase production, both in absence and in presence of penicillin.

There are, however, great differences between the two cases when the influence of 2,4-dinitrophenol (DNP), NaF and NaN_3 are studied.

As shown in Table I, these substances do not inhibit penicillinase production under aerobic conditions, when excess penicillin is present. The same metabolic poisons, however, completely inhibit the formation of penicillinase, when penicillin is removed after induction. Anaerobically (in the presence of glucose) the formation of penicillinase (excess penicillin) is inhibited by 0,02 *M* fluoride.

Discussion

Comparing the formation of penicillinase after a short contact of the cells with penicillin with that obtained in the presence of excess penicillin, there is an obvious difference in kinetics. Whereas in the former case the rate of penicillinase production is constant, the process shows an autocatalytic time-curve in the presence of excess penicillin.

A short contact of a small amount of penicillin with the cells has no influence on cell growth [2, 3]. Naturally, there is no cell growth in the presence of a large excess of penicillin. It has to be supposed, therefore, that there are many synthetic processes (preliminary to growth) that are taking place in the

first type of experiment, which in the second type are to a great extent inhibited by the presence of penicillin.

We explain the above results by a competition between self-reproduction and penicillinase formation. The effect of the excess penicillin is explained so that it makes the synthetic resources of the cell more accessible to penicillinase formation by inhibiting normally competing vital endergonic processes.

The observed differences in energy requirement between the two sets of experiments are in accord with this hypothesis. The observations suggest that the presence of penicillin renders the cells less exacting as far as the energy needs for penicillinase formation are concerned. In the absence of free penicillin penicillinase is synthesised only in the presence of glucose and amino acids; the process is inhibited by DNP, azide or anaerobiosis during the latency period. In presence of penicillin, however, no glucose is needed under aerobic conditions, neither do the above-mentioned metabolic poisons inhibit aerobic penicillinase production. Moreover, anaerobic glycolysis is capable of supporting penicillinase formation.

In other words, intact carbohydrate oxydation is needed for penicillinase production in the absence of penicillin, whereas the energy derived from the direct oxidation of amino acids (which is not inhibited by azide and DNP) suffices for enzyme synthesis in the presence of excess substrate. 569 cells oxidize amino acids, especially the dicarboxylic and the hydroxyamino acids, alanine, glycine, valine and leucine, at a high rate (Q_{O_2} 100—300).

In the terms of this competition theory, penicillinase production requires only a small part of the energy available to the cells, but if energy production is inhibited, penicillinase production is among the first to suffer. It will not suffer, however, if the other energy consuming processes are inhibited.

RICKENBERG and LESTER [11] observed the "preferential synthesis" of β-galactosidase in *E. coli* under conditions where cell growth depended on the inductor as substrate. In such cases β-galactosidase activity rapidly increases up to a 100 fold, while the total protein is practically unchanged. One may point out the teleological analogy between this finding and penicillinase synthesis in the presence of penicillin, as in both cases synthesis of the corresponding enzyme is the only means by which the cells can grow and "therefore" these are preferred. Instead of such reasoning, the competition hypothesis explains the preferential synthesis of penicillinase by assuming a lesser sensitivity of this process to penicillin. The level at which penicillinase production competes with other biosynthetic processes is indicated by the observation that it is the latency period of the three phases discriminated in POLLOCK's scheme, which is the most vulnerable. Once it has started, the rate of enzyme synthesis is not influenced by metabolic poisons, whereas the latency period increases under all adverse conditions. Even in the absence of penicillin, the rate of enzyme synthesis is not influenced by anaerobiosis, if the latency period was spent aerobically.

There are already some indications that the process taking place during the latency period, is the synthesis of ribonucleic acids. ROTMANN and SPIEGELMAN [12] and HOGNESS, COHN and MONOD [13] have established that β-galactosidase is synthesised from free amino acids and not from a precursor protein. On the other hand, the experiments of GALE [14], CHANTRENNE [15, 16], PARDEE [17, 18] and others [19—23] lend support to the hypothesis that the synthesis of ribonucleic acids is a prerequisite of induced enzyme synthesis. It seems, therefore, probable that the synthesis of ribonucleic acid and not that of a precursor protein is taking place during the latency period. The point of competition may therefore be the substrate pool and/or the energy needed for the synthesis of the specific new ribonucleic acid (KRAMER and STRAUB [24]).

SUMMARY

1. A method has been described for the study of penicillinase formation in the presence of excess penicillin.

2. The kinetics of penicillinase production in induced cells of *B. cereus* NRRL-B-569 are different, according to whether penicillin is removed after induction or is present in excess during enzyme production. It is linear in the first case and exponential in the second.

3. In the absence of free penicillin, the enzyme is produced only in the presence of glucose and amino acids and it is inhibited by azide, fluoride and DNP. Anaerobiosis is inhibitory if applied during the latency period.

4. In the presence of excess free penicillin, only amino acids are needed under aerobic conditions. Enzyme production starts also anaerobically if amino acids and glucose are present. Even high concentrations of azide, fluoride and DNP do not inhibit aerobic enzyme production. Anaerobic penicillinase formation is inhibited by fluoride.

5. In the presence of excess free penicillin, the inhibition of penicillinase formation comes into effect through the inhibition of the processes taking place in the latency period, as the phase of active enzyme production itself is not influenced.

LITERATURE

1. POLLOCK, M. R.: Brit. J. Exp. Pathol. **31,** 739 (1950).
2. POLLOCK, M. R., PERRET C. J.: Brit. J. Exp. Path. **32,** 387 (1951).
3. POLLOCK, M. R.: Brit. J. Exp. Path. **33,** 587 (1952).
4. POLLOCK, M. R.: Brit. J. Exp. Path. **34,** 251 (1953).
5. POLLOCK, M. R.: J. Gen. Microbiol. **14,** 90 (1956).
6. POLLOCK, M. R., TORRIANI, A., TRIDGELL, E. J.: Biochem. J. **62,** 387 (1956).
7. KOGUT, M., POLLOCK, M., R. TRIDGELL, E. J.: ibid **62,** 391 (1956).
8. KNIGHT, J.: ibid **31,** 731 (1937).
9. IVÁNOVICS, G.: Z. Immunforsch. **101,** 58 (1941).
10. HENRY, R. J. HOUSEWRIGHT, R. D.; J. Biol. Chem. **167,** 559 (1947).
11. RICKENBERG, H. V., LESTER, G.; J. Gen. Microbiol. **13,** 279 (1956).
12. ROTMAN, B., SPIEGELMAN, S.; J. Bact. **68,** 419 (1954).
13. HOGNESS, D. S., COHN, M., MONOD, J.; Biochim. Biophys. Acta **16,** 99 (1955).
14. GALE, E. F.: Amino Acid Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore (1955), p. 171.
15. CHANTRENNE, H.: Biochim. Biophys. Acta. **16,** 410 (1955).
16. CHANTRENNE, H.: Nature **177,** 579 (1956).
17. PARDEE, A. B.: J. Bacteriol. **69,** 233 (1955).
18. PARDEE, A. B.: Proc. Nat. Acad. Sci. **40,** 263 (1954).
19. CREASER, E. H.: Nature **176,** 556 (1955).
20. CREASER, E. H.: J. Gen. Microbiol. **12,** 288 (1955).
21. CREASER, E. H.: J. Gen. Microbiol. **14,** XI, (1956).
22. COHEN, S. S., BARNER, H.: J. Bacteriol. **69,** 59 (1955).
23. HALVORSON, H. O., JACKSON, L.: J. Gen. Microbiol. **14,** 26 (1956).
24. KRAMER, M., STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11,** 133 (1957).

INDUCED PENICILLINASE FORMATION IN RESTING BACTERIAL CELLS

II. ON THE NATURE OF THE LATENCY PERIOD OF PENICILLINASE FORMATION IN CELLS OF B. CEREUS NRRL-B-569

by

M. KRAMER and F. B. STRAUB

INSTITUTE OF CHEMISTRY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received July 30, 1956)

The process of penicillinase formation shows three distinct phases when *B. cereus* NRRL-B-569 (in the following 569) cells are treated with penicillin, viz. 1. the binding of penicillinase at specific points; 2. the latency period during which no active enzyme can yet be detected; and 3. the production of active enzyme [1, 2]. The latency period is very sensitive to changes in environment and to metabolic poisons [1, 2, 3]. The experiments to be described in the present paper were devised to study the nature of the processes taking place during the latency period.

Methods

The culture medium, determination of dry material and penicillinase activity were described in the preceding communication [3]. In the present experiments we used 6—8 hours old cells. These were washed with 0,9% saline and then incubated before induction. Controls were preincubated with 0,9% saline at 37° for the time indicated in the text, while other samples were preincubated under similar conditions in a pH 7,0 KREBS-saline buffer containing 0,5% casein hydrolysate as amino acid source and 0,05 *M* glucose (KAG). After preincubation, the cells were washed at 0° with 0,9 % saline and suspended in saline. Then they were introduced into the side arm of a WARBURG vessel, the main compartment of which contained 50 000 O. U. penicillin, KAG mixture and other ingredients. The total volume of fluid in the WARBURG manometer was 3 ml. After temperature equilibration the cells were mixed with the reaction mixture and the formation of penicillinase was followed by measuring the rate of carbon dioxide formation [3]. Crystalline ribonuclease was prepared according to the method of KUNITZ [4] modified by MCDONALD [5], to remove traces of proteolytic activity.

Experimental results

a) *Effect of preincubation in an amino acid mixture on induced penicillinase production.* Preincubation in KAG medium up to the point when the cell count is just beginning to increase evidently leads to the reproduction of cell proteins and this process may use up the precursors of nucleic acids, too. Induction of penicillinase formation at this time finds therefore such cells in a functional state different from that of the control cells which were preincubated in saline only. Fig. 1 shows that cells preincubated in the rich medium of KAG need an

essentially *longer* latency period than the controls, before they can start the synthesis of penicillinase.

The prolonged latency period is, however, reduced to normal, if at the moment of induction to the KAG-preincubated cells a mixture of one μM each of adenine, guanine, cytosine and uracil, i. e. of the purine and pyrimidine bases of ribonucleic acids is added (Fig. 2).

It is worth mentioning that the addition of thymine to the above-mentioned four bases leads again to a protraction of the latency period. This might be an

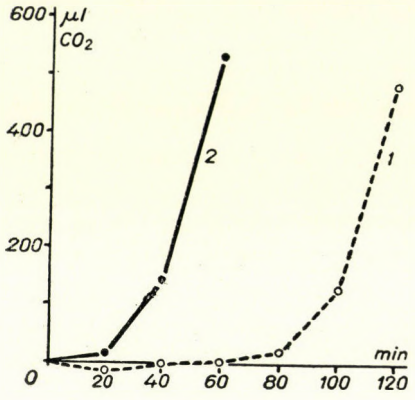


Fig. 1. Effect of preincubation in amino acid mixture

1: preincubated in KAG at 37° C for 70 min. — 2: preincubated in 0,9% NaCl at 37° C for 70 min. — Induction and synthesis in WARBURG vessel. Reaction mixture: KAG + 17 000 O. U./ml penicillin, at 37° C. Gas phase: air + CO_2. Total volume: 3 ml

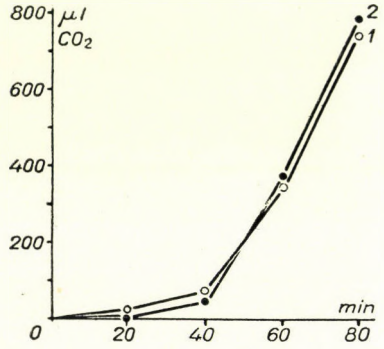


Fig. 2. Effect of purine-pyrimidine bases on the synthesis of preincubated cells

Preincubation: 1 and 2: as in *Fig. 1*, but 90 min. Induction and synthesis: KAG + 17 000 O. U./ml penicillin + adenine, guanine, cytosine, uracil 1—1 μM

indication that desoxyribonucleic acid is not directly involved in the production of penicillinase (Fig. 3).

b) *Action of crystalline ribonuclease on penicillinase formation.* The inhibitory action of ribonuclease on the incorporation of radioactive amino acids has been established by several investigations [6, 7, 8]. First we studied the effect of added ribonuclease on the penicillinase production of intact cells. The ribonuclease was added about 20 minutes before the induction and was present during the whole period of observation. As shown in Fig. 4, the presence of 10 μg/ml ribonuclease completely prevents penicillinase production. — Next we investigated the reversibility of this inhibition. Cells were incubated in 0,9% saline with 25 μg crystalline ribonuclease per ml at 37° for one hour (controls without ribonuclease). After this period the cells were washed at 0° C and then induced to penicillinase production. As seen from the experiment presented in Fig. 5, penicillinase is produced in these cells pretreated with ribonuclease. Accordingly, the inhibitory effect of this enzyme is reversible. It is very interesting to

observe that the latency period of penicillinase production is much shorter in the ribonuclease-pretreated cells than in the untreated ones. Table I shows the results of some experiments in which the conditions of this ribonuclease-pretreatment were varied. The last two columns give in terms of $Q_{penicillinase}$ the penicillinase activity after 15, resp. 30 minutes after induction. The differences give a clear picture of the shortening of the latency period observed when the cells have been pretreated with ribonuclease.

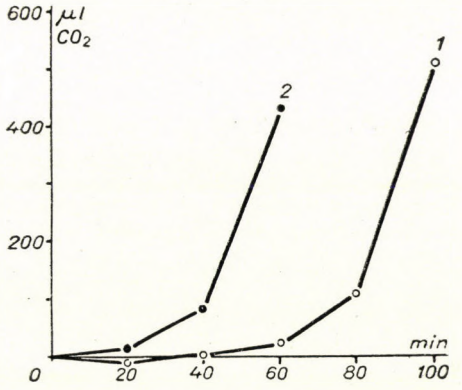


Fig. 3. Effect of thymine

Preincubation in KAG, 90 min. Induction and synthesis : 1 : KAG + 17 000 O. U./ml penicillin + adenine, guanine, cytosine, uracil, thymine, 1—1 μM. — 2 : KAG + 17 000 O. U./ml penicillin + adenine, guanine, cytosine, uracil but *no* thymine

Table I

Effect on induced penicillinase production of varying conditions during ribonuclease pretreatment

Pretreatment at 37°			Penicillinase activity	
NaCl conc. *M*	Time hours	Ribonuclease µg/ml	µl CO_2/mg dry weight/hour	
			15′	30′
0,15	1	—	8	45
0,15	1	25	45	280
0,15	1	50	75	410
0,15	1,5	—	6	28
0,15	1,5	25	94	475
0,15	1,5	50	70	445
1,0	1	—	10	55
1,0	1	25	115	510
1,0	1	50	65	470

Up to a point, the length of the latency period is inversely proportional to the action of ribonuclease ; the longer the time of pretreatment and the higher the concentration of ribonuclease, the shorter becomes the latency period. Higher concentrations of NaCl promote the effect of the enzyme treatment.

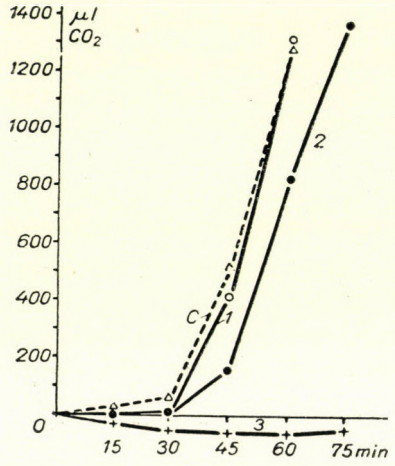


Fig. 4. Effect of ribonuclease during inductive synthesis

Induction and synthesis in KAG + 17 000 O. U./ml penicillin + crystalline ribonuclease. 1 : 1 µg/ml ribonuclease. — 2 : 2 µg/ml ribonuclease. — 3 : 10 µg/ml ribonuclease. — C : control (without ribonuclease)

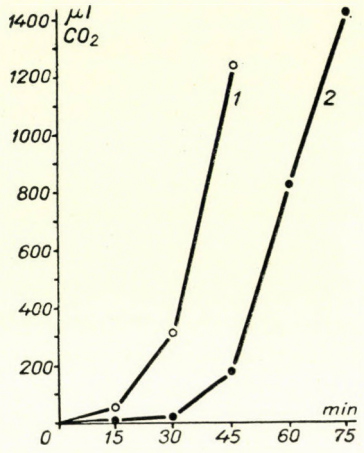


Fig. 5. Effect of preincubation with ribonuclease

1 : preincubation in 0,9% NaCl + 25 µg/ml crystalline ribonuclease 60 min. — 2 : preincubation in 0,9% NaCl. — Induction and synthesis : see *Fig. 1*

Discussion

Pretreatment of *B. cereus* cells in a rich medium containing amino acid and glucose (KAG) before enzyme induction is an experiment we devised to the analogy of the "nucleotide depletion" experiments of SPIEGELMAN, HALVORSON and BEN ISHAI [9]. In both cases the cells are depleted of nucleic acid precursors at the time of enzyme induction. The results are similar ; SPIEGELMAN et al. found that the latency period of β-galactosidase formation in induced *E. coli* is lengthened in cells which are in the phase of beginning rapid growth. It was possible to reduce the latency period by adding a mixture of purine and pyrimidine bases. The explanation the mentioned authors offered is that cells preparing for rapid growth use the easily available nonpolymerised precursors for nucleic acid sysnthesis. Our experiments in a different system yielded in the sense of the biological effect the same results.

Pretreatment with ribonuclease may be regarded as the opposite of pretreatment with amino acids. Whereas in a rich amino acid mixture the

cells are preparing for growth and building into polymers all nucleic acid precursors, ribonuclease pretreatment splits the high molecular weight nucleic acids of the cell surface and in this way provides a greater supply of building blocks for the synthesis of any demanded new nucleic acid polymer. The present experiments clearly support the view that the nucleic acid to be synthesized as a prerequisite of penicillinase formation is a ribonucleic acid. Ribonuclease inactivates, when present during induction, but promotes enzyme formation when cells are pretreated with it. Moreover, thymine is inhibitory, showing that the synthesis of DNA interferes with penicillinase formation.

Pretreatment with amino acid mixture or with ribonuclease does not influence the *rate* of penicillinase formation ; all the effects manifest themselves with variations of the latency period. The observed changes are in agreement with the hypothesis that the latency period is the time required for the synthesis of a new ribonucleic acid and not for a protein precursor.

The results of our previous experiments [3] and those described in this paper lead to the conclusion that the reproduction of the cells' own proteins and the production of penicillinase compete for the substrates of ribonucleic acid synthesis. The reaction mixture used for enzyme induction is rich in amino acids, C and N sources ; yet, the latency period is lengthened by amino acid mixture pretreatment and is shortened by adding a mixture of the purine and pyrimidine bases of ribonucleic acids. On the other hand, much smaller amounts of ribonuclease than that, which in a pretreatment would accelerate penicillinase production, when present during the latency period, completely abolish the effect of induction.

It is obvious that the cell membrane is intimately involved in the synthesis of the new specific ribonucleic acid. It seems unlikely that ribonuclease (MW 13 000) would pass through the cell membrane and would easily be washed out. The importance of the cell membrane in the metabolism and especially in the synthetic activity of Gram positive cells is underlined by the present experiments. It is worth mentioning in this respect that formerly we found [10] that the intact cell membrane is absolutely necessary for the phenomenon of induction ; protoplasts obtained from 569 cells were able to produce penicillinase if during induction had previously been ruptured. Similar conclusions may be drawn from the experiment of SALTON and MCQUILLEN [10], and BRENNER and STENT [11]. These authors observed phage synthesis in protoplasts of *B. megaterium* if the infection, resp. the induction occurred while the cells were still intact but not afterwards.

SUMMARY

1. Pretreatment of logarithmic phase *B. cereus* NRRL-B-569 cells with a buffered, glucose containing amino acid mixture at 37° C lengthens the latency period of the induced penicillinase synthesis, as compared with controls preincubated in saline alone.

2. The lengthened latency period described above can be reduced to or below normal, if a mixture of adenine, guanine, cytosine and uracil is added at the time of enzyme induction. The addition of thymine is inhibitory in this respect.

3. Ribonuclease (10 μg/ml), if present during the induction period, completely prevents penicillinase formation in intact cells.

4. Ribonuclease (25—50 μg/ml), if present during a pretreatment period, and is removed before induction with penicillin, accelerates penicillinase formation by shortening the latency period to values significantly below normal. The length of the latency period is inversely proportional to the action of ribonuclease.

5. Pretreatment with amino acid mixture or with ribonuclease influences only the length of the latency period and does not influence the rate of enzyme production once this has started.

6. The latency period of induced enzyme synthesis is the time required for the synthesis of a new, specific ribonucleic acid. Reproduction of the cells' own proteins and production of induced enzyme compete for the common precursors of ribonucleic acid synthesis.

LITERATURE

1. POLLOCK, M. R.: Brit. J. Exp. Pathol. **33,** 587 (1952).
2. POLLOCK, M. R.: Adaptation in Micro-organisms. University Press, Cambridge (1953), p. 150.
3. KRAMER, M.: Acta Physiol. Hung. **11,** 125 (1957).
4. KUNITZ, M.: J. Gen. Physiol. **24,** 15 (1940).
5. MCDONALD, M. R.: J. Gen. Physiol. **32** (1948).
6. ALLFREY, V. DALY, M. M., MIRSKY, A. E.: J. Gen. Physiol. **37,** 157 (1953).
7. BRACHET, J.: Nature **174,** 876 (1954).
8. GROTH, D. P.: III. International Congress of Biochemistry, Bruxelles (1955), Sec. 8/21.
9. SPIEGELMAN, S., HALVORSON, H. O., BEN ISHAI, R.: Amino Acid Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore (1955).
10. KRAMER, M., STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Hung. **7,** 167 (1955).
11. SALTON M. R. J. MC. QUILLEN K.: Biochim. Biophys. Acta **17,** 465 (1955).
12. BRENNER, S., STENT, G. S.: Biochim. Biophys. Acta **17,** 473 (1955).

INDUCED PENICILLINASE FORMATION IN RESTING BACTERIAL CELLS

III. INDUCTION OF PENICILLINASE FORMATION BY EXTRACTS OF B. CEREUS NRRL-B-569/H CELLS WITHOUT PENICILLIN

By

M. KRAMER and F. B. STRAUB

INSTITUTE OF CHEMISTRY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received July 30, 1956)

Preparations containing nucleic acids obtained from bacterial cells producing some inducible enzymes, when added to freshly induced cells, were shown to increase the rate of induced enzyme formation. GALE [1], studying β-galactosidase formation in *Staphylococcus aureus*, REINER and GOODMAN [2] with the gluconokinase of *E. coli*, and HUNTER and BUTLER [3] with the β-galactosidase of *B. megaterium*, have obtained such experimental evidence. In preliminary experiments one of us [4] has observed similar effects in the case of induced penicillinase formation by *B. cereus* NRRL-B-569 (in the following , 569) cells. From induced 569 cells an extract was prepared with 1 *M* NaCl. Fresh uninduced 569 cells were frozen and thawn several times, to increase the permeability of the cell membrane, and then induced by addition of penicillin. If the above mentioned 1 *M* NaCl extract was added at the same time, the rate of penicillinase production was increased and the length of the latency period was decreased. The effect seems specific, as an extract of uninduced cells, or a solution of yeast ribonucleic acid or thymus desoxyribonucleic acid was inactive. Nevertheless, the effect was not very intensive, since it reduced the latency period only to 40—50 per cent of the control.

In the following we shall describe experiments in which we investigated the effect of extracts containing ribonucleic acid from penicillinase producing strains on the penicillinase production of *ribonuclease pretreated* [4, 5] uninduced cells. The results were so impressive that we attempted and succeeded to obtain penicillinase production in uninduced cells, without even the addition of penicillin.

Methods

The culture medium, determination of penicillinase and ribonuclease pretreatment of the cells have been described in a previous communication [5]. The ribonuclease pretreated cells were washed with saline at 0° C and then mixed in a WARBURG vessel with a KREBS-saline buffer, containing casein hydrolysate as amino acid mixture, and glucose. No penicillin was added, but at the beginning, and at other desired times a sample of the reaction mixture was mixed with chloramphenicol (final concentration 15 μg/ml) and used for penicillinase assay according to the method of HENRY and HOUSEWRIGHT (7).

The "specific cell-extract" was prepared from the NRRL-B-569/H strain, a mutant of 569. This 569/H strain contains a constitutive penicillinase without any treatment with penicillin. In this way we were certain that no penicillin was introduced into the system. Penicillin-induced 569 cells contain the same suspected specific nucleic acid and yield similar "specific cell extracts", yet in this case the admixture of an active penicillin residue, bound to the cells, cannot be rigorously excluded, as it is known that very small amounts of penicillin may induce penicillinase formation [8]. Although the same results were obtained with "specific cell-extracts" from induced 569 cells, all the experiments to be described were performed with extracts fron 569/H cells.

"*Specific cell extract*". Cells from a 24-hour culture of the strain 569/H were washed twice with distilled water. The centrifuged mass of cells was suspended in 2—3 volumes of *M* NaCl (neutral) and then heated in a boiling water bath for 25 minutes. The mixture was then incubated for another hour at 37° C. The cell debris were centrifuged at 10 000 g for 15 minutes; the clear, cell-free supernatant was either used as such, or after dialysis as "specific cell extract". As penicillinase is somewhat heat stable [9], the penicillinase activity of the extract was controlled before use, but no detectable activity was found. The extract shows absorption in the UV, the maximum is at 265 mμ.

Experimental results

The effect of the "specific cell extract" on the penicillinase production of uninduced, ribonuclease pretreated 569 cells is shown in Fig. 1. One of the

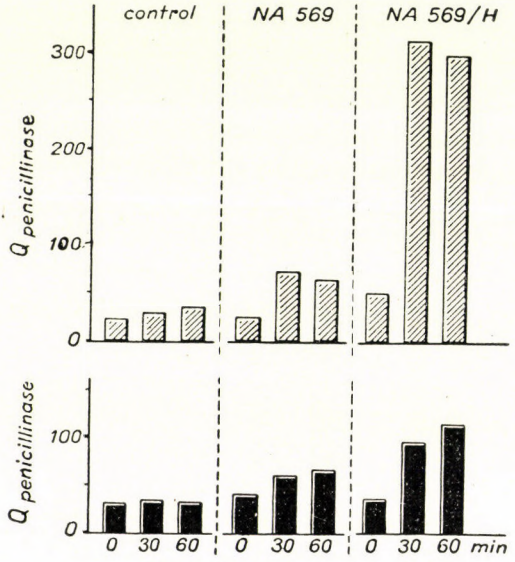


Fig. 1. Effect of the "specific cell-extract" on the penicillinase production of uninduced 569 cells

Upper line: Cells preincubated in *M* NaCl with 50 μg/ml ribonuclease at 37° C, 60 min. — Lower line: cells preincubated in *M* NaCl at 37° C, 60 min. — "Induction" and synthesis in KAG. Total volume: 3 ml. — Control = *M* NaCl added. — NA (569) = extract from uninduced 569 cells added. — NA (569/H) = extract from 569/H cells added ("specific cell extract"). — Extracts and *M* NaCl: 0,3—0,3 ml

controls shows the effect of a *M* NaCl solution instead of the "specific cell extract". The other shows that the "specific cell extract" has only little effect

on cells wich were pretreated *without* ribonuclease. The ribonuclease pretreatment was performed with 50 μg crystalline enzyme/ml for one hour at 37° C.

In comparison with the controls, the effect of the specific cell extract

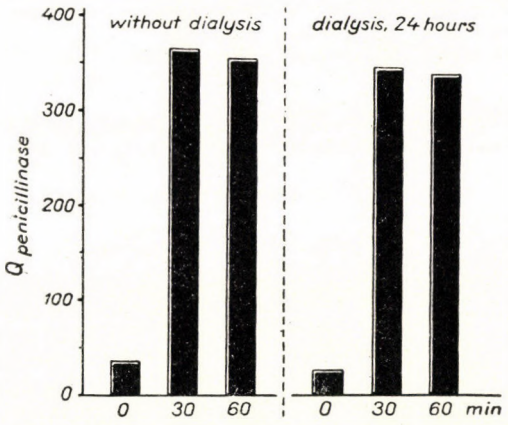


Fig. 2. Effect of dialysis on activity of "specific cell extract". Preincubation in *M* NaCl with 25 μg/ml ribonuclease at 37° C, 75 min. "Induction" and synthesis in KAG. Total volume 3 ml, extract 0,3 ml. — Dialysis : 24 hour in distilled water at room temperature

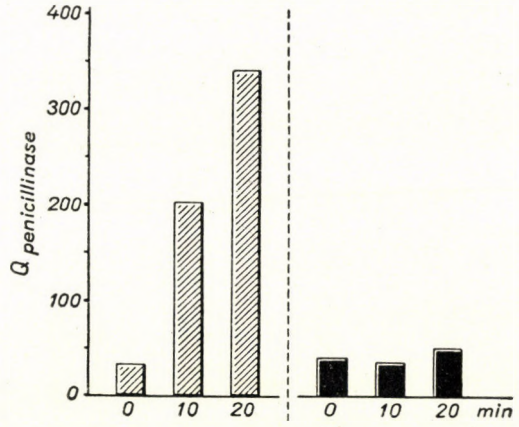


Fig. 3. Effect of ribonuclease-treatment on activity of dialysed "specific cell-extract" Preincubation in *M* NaCl with 25 μg/ml ribonuclease, 37° C, 90 min. "Induction" and synthesis : see Fig 2. — Left : "induction" with untreated extract. — Right : "induction" with extract treated with 2 μg/ml ribonuclease at 37° C, 10 min., then boiled for 15 min

is obvious ; it increases the penicillinase activity to fivefold within 30 minutes. In several experiments we observed a 3 to 10-fold increase. Neither an extract of uninduced 569 cells, nor a solution of yeast ribonucleic acid, or thymus desoxyribonucleic acid produced any such effect.

Dialysis does not diminish the ability of the "specific cell extract" to induce penicillinase formation in absence of penicillin (Fig. 2).

The "specific cell extract" was treated for 10 minutes at neutral pH with 2 μg/ml crystalline ribonuclease at 37° C. The mixture was then boiled for 16 minutes. (We found that this treatment reduces the activity of ribonuclease by 50—60%, and in a previous work [5] we found that 1 μg/ml ribonuclease has already no detectable effect on penicillinase production in our system.) Fig. 3 shows that ribonuclease treatment in the manner described above abolishes the potency of the "specific cell extract". The production of penicillinase after addition of "specific cell extract" to uninduced, ribonuclease pretreated cells

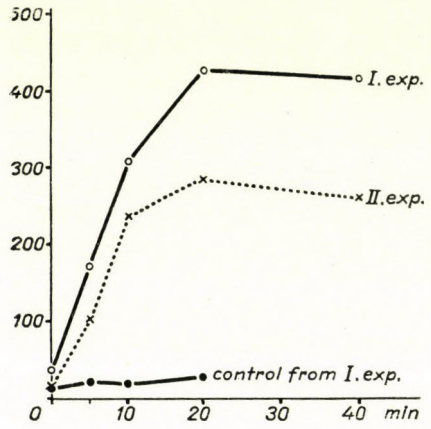


Fig. 4. Rate of penicillinase production after treatment with "specific cell-extract". Preincubation in *M* NaCl with 25 μg/ml ribonuclease, 37° C, 75 min. "Induction" and synthesis in KAG, see text

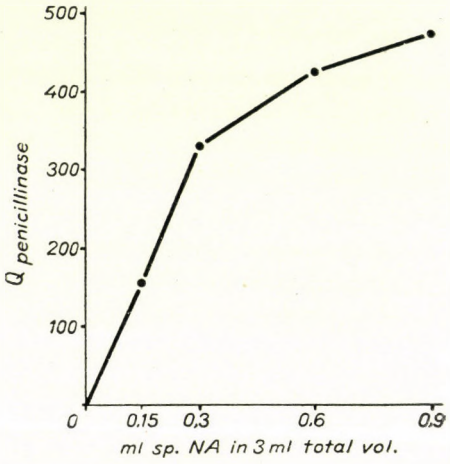


Fig. 5. Effect of varying amounts of "specific cell-extract". Preincubation in *M* NaCl with 50 μg/ml ribonuclease, 37° C, 60 min. "Induction" and synthesis in KAG. Abscissa: ml of „specific cell-extract" in 3 ml total volume. Ordinate: $Q_{penicillinase}$ after 20-minute incubation with the extract

is a rapid process which comes very soon to a standstill. The rate of penicillinase production is illustrated in Fig. 4, which shows the result of two separate experiments. (The negative control of only one of them is shown. This is a control where an extract of uninduced 569 cells was added to ribonuclease pretreated cells.)

In all the above experiments, 0,3 ml of the "specific cell extract" was used, in a total volume of 3 ml. Fig. 5 shows the effect of varying amounts of extract on the penicillinase activity found 20 minutes after its addition to inducible, ribonuclease pretreated, 569 cells.

Discussion

We were able to observe penicillinase formation in inducible *B. cereus* cells, without induction by penicillin, simply by adding an extract of penicillinase forming cells to the inducible ones. The effect is specific insofar as it is obtained only with extracts of penicillinase forming cells and it is due to a high molecular substance, which is destroyed by ribonuclease, presumably a specific RNA.

Although this "specific cell extract" is able to elicit penicillinase formation, its effect is not identical with that of the inductor. While induced penicillinase formation starts always after a latency period, the "specific cell extract" elicits immediate penicillinase formation without any latency period. Another difference is that after penicillin treatment penicillinase is formed for a long time, whereas the effect of the "specific cell extract" is a transient formation of the enzyme. These results, together with our former observations [5, 6] lead to the following conclusions.

If the 569 cells are induced with penicillin, there follows, during the latency period, the synthesis of a specific ribonucleic acid. The length of the latency period depends on the availability of the precursors needed for the synthesis of the RNA. The latency period is therefore eliminated if we add the preformed, specific polymerised RNA to ribonuclease pretreated cells. This RNA is a necessary intermediary in the complex process of induced enzyme synthesis. It is not identical with the inductor, and not identical with the supposed inductor-receptor complex or with the receptor either. It is, probably, the primary product of the inductor-receptor complex, which is constantly renewed in the normal process of induction. It is in itself sufficient to cause the synthesis of a number of penicillinase molecules, but as it is not constantly replaced, owing to the lack of the inductor-receptor complex, its effect is transitory. The added specific RNA is very probably decomposed by hydrolytic enzymes. It may even be assumed that it is obligatorily decomposed during the formation of the penicillinase protein. In this way, the active principle of the "specific cell extract" is thought to be a specific RNA, the template of the penicillinase molecule [10—13]. If it has the chance to be built into the surface of the cell (ribonuclease pretreatment seems to favour this process), it immediately starts to turn out complete penicillinase molecules. These experiments show that the synthesis of the protein molecule itself is much faster than the synthesis of the specific ribonucleic acid, the latter being the limiting factor in the time-course of induced enzyme synthesis [5].

In another respect, the experimental results of this work support the "unitarian" theory of enzyme synthesis [14, 45]. We were able to elicit the formation of an inducible enzyme with the tools extracted from a strain which contains the same enzyme as a constitutive one. The physicochemical and immunological identity of induced and constitutive penicillinase has been shown by POLLOCK et al. [16, 17, 18] in their recent work.

We want to express our thanks to Dr. M. R. POLLOCK, for the *B. cereus* strains, and for his advice and criticism at an early phase of this work.

SUMMARY

1. From the constitutive penicillinase producing strain of *B. cereus* NRRL-B-569/H an extract may be prepared, which elicits the formation of penicillinase in inducible but uninduced 569 cells, if the latter are first pretreated with ribonuclease. Penicillinase is produced in this case without the cells having had any contact with penicillin.

2. The active principle is non-dialysable and its potency is destroyed by crystalline ribonuclease. It is specific, as it is found only in cells which produce penicillinase. It is suggested that it is a specific RNA.

3. Specific RNA initiates immediate protein synthesis without any latency period. Its effect lasts only for about 20 minutes ; the intensity of the effect depends on the amount added.

LITERATURE

1. GALE, E. F.: Amino Acid Metabolism, Johns Hopkins Press, Baltimore (1955), p. 171.
2. REINER, J. M., GOODMAN, F.: Arch. Biochim. Biophys. **57,** 475 (1955).
3. HUNTER, G. D., BUTLER, J. A. V.: Biochim. Biophys. Acta **20,** 405 (1956).
4. KRAMER, M., STRAUB, F. B.: Biochim. Biophys. Acta **21,** 401 (1956).
5. KRAMER, M., STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11,** 133 (1957).
6. KRAMER, M.: Acta Physiol. Hung. **11,** 125 (1957).
7. HENRY, R. J., HOUSEWRIGHT, R. D.: J. Biol. Chem. **167,** 559 (1947).
8. POLLOCK, M. R.: Brit. J. Exp. Pathol. **22,** 387 (1951).
9. MANSON, E. E. D., POLLOCK, M. R.: J. Gen. Microbiol. **8,** 163 (1953).
10. HAUROWITZ, F.: Chemistry and Biology of Proteins, Academic Press, New York (1950).
11. DOUNCE, A. L.: Enzymologia **15,** 251 (1952).
12. GALE, E. F.: Advances in Protein Chemistry **8,** 285 (1953).
13. BORSOOK, H.: III. International Congress of Biochemistry, Bruxelles, (1955), Rapports p. 54.
14. COHN, M. MONOD, J.: Adaptation in Micro-organism. University Press, Cambridge (1953), p. 132. p. 150.
15. POLLOCK, M. R.: Ibid.
16. POLLOCK, M. R.: J. Gen. Microbiol. **14,** 90 (1956).
17. POLLOCK, M. R., TORRIANI, A., TRIDGELL, E. J.: Biochim. J. **62,** 387 (1956).
18. KOGUT, M., POLLOCK, M. R., TRIDGELL, E. J.: Biochim. J. **62,** 391 (1956).

ÜBER DEN ZUSTAND DES AKTINS IM MUSKEL

Von

M. BÁRÁNY, K. BÁRÁNY, F. GUBA, GY. KÖTELES und E. NAGY

BIOCHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST
UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ABTEILUNG DES INSTITUTS FÜR MESSTECHNIK
UND INSTRUMENTENWESEN DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, BUDAPEST

(Eingegangen am 17. Mai 1956)

Seitdem STRAUB die zwei Formen des Aktins, das globuläre und fibrilläre Aktin entdeckt hat [1], ist es eine offene Frage, ob die Polymerisation im Prozess der Muskelkontraktion eine Rolle spielt oder nicht. Nun ist die Isolierung des globulären Aktins als eines der Zwischenprodukte der Kontraktionsphase mit grossen methodischen Schwierigkeiten verbunden. Da nämlich das Aktin eines der am schwersten löslichen Eiweisse der Muskelstruktur ist, müssen zur Extraktion des globulären Aktins sämtliche im Muskel enthaltenen Eiweisse gleichzeitig ausgelöst werden, darunter naturgemäss auch das Myosin, was aber nur bei Anwendung einer grossen Ionenstärke möglich ist. Bei Zugabe von Salzen polymerisiert jedoch das globuläre Aktin, wobei diese Reaktion noch dazu durch das Myosin katalisiert wird [2]*. Zur physiologischen Untersuchung der Polymerisation bedarf man also einer Methode zur Herstellung von Aktin, bei der man das Myosin nicht vorher aus dem Muskel auszulösen braucht.

In der vorliegenden Arbeit soll nun auf Grund der Versuche von DUBUISSON [3] nachgewiesen werden, dass sich natives Aktin auch ohne die vorherige Extraktion von Myosin herstellen lässt. Ferner sei auf Grund der verschiedenen Reaktionsfähigkeit des globulären und fibrillären Aktins gegenüber Salyrgan [4, 5] eine Methode ausgearbeitet, mit der man die zwei Formen des Aktins im Muskel in Gegenwart von Myosin gut voneinander trennen kann.

Methodik

Aktin wurde nach vorheriger Extraktion des Myosins mit dem in unserem Laboratorium üblichen Trockenpulver-Herstellungsverfahren [6, 7] und *Myosin* nach der Methode von MIHÁLYI dargestellt [8].

Die Messung der *Aktomyosinbildung* erfolgte mit 1 mg/ml Myosin, 0,3 mg/ml fibrillärem Aktin in einer Lösung von 0,5 *M* KCl, 0,02 *M* Phosphatpuffer (pH 7,0) und 0,001 *M* $MgSO_4$. Die Viskosität wurde mit Hilfe eines modifizierten OSTWALD-Viskosimeters bei 0° C während einer konstanten Durchlaufszeit von $\pm 0{,}2$ sec gemessen. Zur Dissoziation des Aktomyosins fand 1 Tropfen 20 mg/ml neutrale Adenosintriphosphat- (ATP-) Lösung Verwendung. Die zu untersuchende Aktinlösungen, die 0,3 *M* KJ, 0,02 *M* Phosphatpuffer (pH 7,0) und 5×10^{-4} *M* ATP (im weiteren 0,3 *M* KJ + ATP-Auszug) enthielten, wurden vor der Messung der Aktomyosin-

* Obwohl SZENT-GYÖRGYI diese Katalyse nur bei 0,1—0,2 *M* KCl-Konzentration beschrieb, tritt sie unserer Erfahrung nach — gleichfalls bei Zimmertemperatur — selbst über 0,5 *M* KCl ein.

bildung 48 Stunden lang gegen das 2 × 100fache Volum einer Lösung dialysiert, deren Zusammensetzung 0,1 *M* KCl, 0,001 *M* $MgSO_4$ und 0,016% $NaHCO_3$ lautete (im weiteren 48stündige Dialyse).

Die Aktomyosinbildungsfähigkeit des Aktins wird auf Grund der Formel

$$\frac{\log \eta_{rel} \text{ vor ATP} - \log \eta_{rel} \text{ nach ATP}}{\text{Aktin mg}} 1000$$

ausgedrückt [6]. Mit dem mit dest. Wasser bereiteten, 48 Stunden dialysierten Auszug des auf die übliche Weise hergestellten Aktintrockenpulvers [7] betrug dieser Wert durchschnittlich 120. In unseren Versuchen wurde dieser rohe Aktinauszug als Kontrolle benutzt; die Aktomyosinbildung der Kontrolle wurde als 100 betrachtet und die Aktomyosinbildung der untersuchten Aktinproben in Prozenten der Kontrolle ausgedrückt.

ATP wurde mit der Methode von KRAMER, PETTKÓ und STRAUB gemessen [9]. Die Aktinlösungen wurden mit Trichloressigsäure in einer Endkonzentration von 4% bei 0° C enteiweisst, bei 0° zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit mit festem $NaHCO_3$ neutralisiert. Auch die Kalibrierung erfolgte mit ATP, das in 4%iger neutraler Trichloressigsäure gelöst war. Das ATP war ein Präparat der Firma *Richter*, Budapest; es wurde mit Myosin analysiert.

Die *Bestimmung der SH-Gruppen* wurde nach der Methode von EDELHOCH und Mitarbeitern bei Titrierung mit 0,001 *M* Salyrgan durchgeführt [10].

Das verwendete *Salyrgan* (komplexe Hg-Verbindung des Salizylallyl-amid-essigsauren Na) war ein theophyllinhaltiges Präparat der Firma *Bayer*; es wurde komplexometrisch analysiert [11].

Eiweiss wurde mit der Biuretmethode bestimmt [12].

Die *elektrophoretischen Versuche* erfolgten im TISELIUS-Apparat mit einer PHILPOT-SVENSON-Optik bei 3° C. Die Lösungen wurden zuvor 48 Stunden bei derselben Temperatur gegen 0,25 *M* KCl, 0,048 *M* Na_2HPO_4, 0,06 *M* KH_2PO_4-Pufferlösung von pH 7,4 (Ionenstärke 0,4) dialysiert.

Ergebnisse

I. Herstellung von Aktin ohne Extraktion von Myosin

1. Untersuchung des Verfahrens

DUBUISSON beobachtete als erster, dass aus dem unmittelbar mit Azeton getrockneten Muskelpulver mit 1 *M* KCl Aktin in grosser Menge ausgelöst werden kann [3]. Laut Analysen von HASSELBACH und SCHNEIDER enthält der Kaninchenmuskel 28% Myogen, 38% Myosin, 14% Aktin und 20% Stromaeiweiss [13], während sich nach BAILEY in der Myosinfraktion 4—5% Tropomyosin befindet [14]. Es wird allgemein anerkannt, dass das im Muskel befindliche Myosin infolge der Azetonbehandlung unlöslich wird, andererseits lösen sich naturgemäss auch die mit Azeton behandelten Stromaeiweisse nicht. Die prozentuale Verteilung der aus dem azetongetrockneten Muskel extrahierbaren Eiweisse dürfte sich also — vorausgesetzt, dass sich das Tropomyosin in 1 *M* KCl vollständig auslöst — folgendermassen gestalten:

myogene Eiweisse:	Aktin:	Tropomyosin:
64%	32%	4%

Die elektrophoretischen Kurven von DUBUISSON [3] bekräftigen gut — wie hier gezeigt wurde — die Richtigkeit dieser Berechnung:

myogene Eiweisse:	Aktin:	Tropomyosin:
69%	29%	2%

Der Versuch von DUBUISSON wurde von uns wiederholt, wobei sich eine Abweichung von nur 1% ergab (Durchschnittswerte aus den Abbildungen 1a, 1b und 2). Aus dem mit Azeton getrockneten Muskel werden also das Aktin und die myogenen Eiweisse im gleichen prozentualen Verhältnis extrahiert, in dem sie im frischen Muskel vorhanden sind. Die Ursache hierfür besteht offenbar darin, dass sich infolge der grossen Ionenstärke beide Eiweissfraktionen quantitativ auslösen.

Nach der Feststellung von DUBUISSON wandelt sich aber das so hergestellte

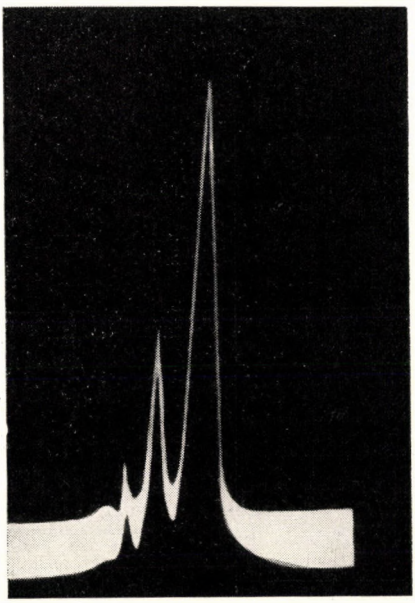


Abb. 1a. Elektrophoretisches Bild des mit 1 *M* KCl hergestellten Extraktes (1,3% Eiweiss) eines mit dem 10fachen und dann mit dem 5fachen Volum Azeton getrockneten frischen Muskelbreis in der 170. Minute des Versuchs bei einem Spannungsabfall von 2,3 V/cm

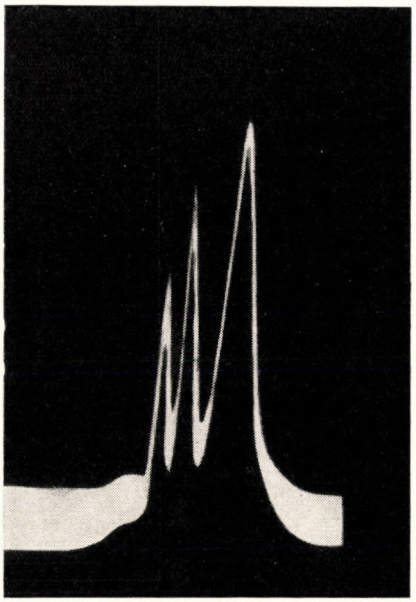


Abb. 1b. Elektrophoretisches Bild des mit einer 0,3 *M* KJ, 0,02 *M* Phosphatpuffer (pH 7,0) und 5×10^{-4} *M* ATP enthaltenden Lösung bereiteten Extraktes (1% Eiweiss) eines mit dem 10fachen und dann mit dem 5fachen Volum Azeton getrockneten frischen Muskelbreis in der 120. Minute des Versuchs bei einem Spannungsabfall von 2,3 V/cm

Die Komponenten* in der Richtung (←) der zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeit sind: Myogen, globuläres Aktin, fibrilläres Aktin, Tropomyosin.

globuläre Aktin nicht zu fibrillärem Aktin um. Seine Konklusion lautet: »Wenn wir das Myosin nicht vorher extrahieren, polymerisiert das erhaltene globuläre

* In den Trockenmuskelpulver-Extrakten wurden die Aktinkomponenten mit der Methode von DUBUISSON [16] auf Grund der Wanderungsgeschwindigkeit eines mit 0,5 *M* KJ bereiteten Gemisches von globulärem und fibrillärem Aktin identifiziert. Die 4. Komponente wurde auf Grund ihrer prozentualen Konzentrationswerte, die mit den Angaben von DUBUISSON [3] übereinstimmten, als Tropomyosin angesehen, ohne dass dies direkt bewiesen worden wäre

Aktin nicht« [3]. Das Schema der Aktindarstellung nach DUBUISSON ist überaus einfach :

Zerkleinerung des Muskels ——→ Trocknung des Breis mit Azeton
——→ Auslösung des Aktins

Da die Annahme berechtigt ist, dass sich das Aktin im Muskelbrei im nativen Zustand befindet, kann die Denaturierung nur während zweier Phasen

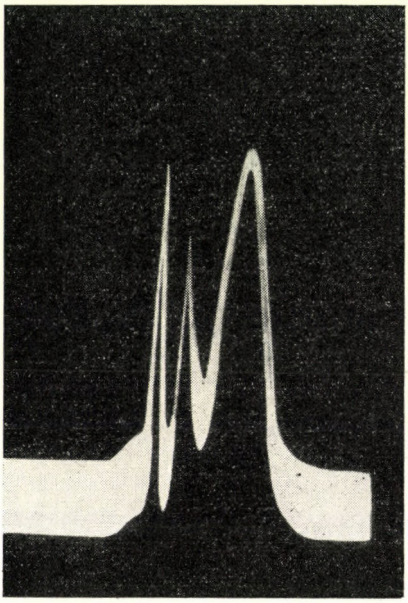


Abb. 2. Elektrophoretisches Bild des mit einer 0,3 *M* KJ, 0,02 *M* Phosphatpuffer (pH 7,0) und 5×10^{-4} *M* ATP enthaltenden Lösung bereiteten Extraktes (0,7% Eiweiss) eines frischen Muskelbreis, der 96 Stunden hindurch bei 0° gegen 4 × 200faches Volum 0,1%ige $NaHCO_3$-Lösung dialysiert und dann mit dem 10- und 5fachen Volum Azeton getrocknet wurde, in der 200. Minute des Versuches bei einem Spannungsabfall von 1,2 V/cm. Die Komponenten in der Richtung der zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeit (←) sind : Myogen, globuläres Aktin, fibrilläres Aktin, Tropomyosin

eintreten, nämlich entweder während der Azetonbehandlung oder während der Extraktion. Es wurde von uns nachgewiesen, dass die Ursache für die Denaturierung schon teils in dem zur Extraktion bezutzten Lösungsmittel zu suchen ist. Wird nämlich das Aktin auf die übliche Weise, d. h. aus dem nach vorheriger Entfernung des Myosins bereiteten Trockenmuskelpulver mit 1 *M* KCl extrahiert, so denaturiert sich auch dieses Aktin zum grössten Teil. Vollwertiges, natives Aktin lässt sich dagegen dann herstellen, wenn man zur Extraktion an Stelle von 1 *M* KCl eine Lösung von 0,3 *M* KJ verwendet, das 5×10^{-4} *M* ATP und 0,02 *M* Phosphatpuffer (pH 7,0) enthält (auf Grund von [15]).

In dem mit 1 *M* KCl bereiteten Auszug des mit Azeton getrockneten Muskels erscheint nur eine kleine, für fibrilläres Aktin charakteristische Komponente in den elektrophoretischen Kurven, während das zur Polymerisation unfähige globuläre Aktin die Hauptmasse des Aktins ausmacht. Das fibrilläre Aktin wird aber gut beobachtbar, wenn man dasselbe Muskelpulver mit einer 0,3 *M* KJ (pH 7,0) und 5×10^{-4} *M* ATP enthaltenden Lösung extrahiert (Abb. 1a und 1b).

DUBUISSON wies nach, dass das fibrilläre Aktin im TISELIUS-Apparat schneller wandert als das denaturierte globuläre Aktin [16]; auf diese Weise lässt sich die Polymerisationsfähigkeit des Aktins durch die Analyse der elektrophoretischen Kurven gut verfolgen. In Abb. 1a beträgt das Verhältnis zwischen globulärem und fibrillärem Aktin in dem mit 1 *M* KCl bereiteten Auszug 4,0 : 1, wogegen dieses Verhältnis in Abb. 1 b, in dem mit 0,3 *M* KJ bereiteten Extrakt weit geringer ist, nämlich 1,9 : 1. Aus Abb. 2 ist ersichtlich, dass die Dialyse des Muskelbreis vor der Azetonbehandlung dieses Verhältnis zu Gunsten des fibrillären Aktins verschiebt, indem man hier einen Wert von 0,9 : 1 erhält.

Zur Herstellung von nativem Aktin ist also nicht nur das Trockenmuskelpulver entsprechend zu extrahieren, sondern man muss auch etwas aus dem Muskel noch vor der Azetonbehandlung entfernen. Es wurde von uns festgestellt, dass dieser dialysierbare Faktor aus den im Muskel befindlichen Erdalkalimetallionen besteht, in deren Gegenwart das Azeton das in der Struktur befindliche Aktin zum Teil denaturiert (Tabelle I).

Tabelle I

Denaturierende Wirkung der Erdalkalimetalle auf das in der Struktur befindliche Aktin im Laufe der Aktinherstellung

Behandlung des Muskelbreis	Aktomyosinbildung in % der Kontrolle	μM Erdalkalimetall/g Trockenmuskel	mM Erdalkalimetall/1000 g Frischmuskel
1. unmittelbare Azetonbehandlung	50	66,5	14,0
2. Waschung : $MgCl_2 + NaHCO_3$	52	113,5	13,6
3. Waschung : $CaCl_2 + NaHCO_3$	40	166,0	19,9
4. Waschung : EDTA + $NaHCO_3$	96	6,3	0,7
5. Waschung : $NaHCO_3$	95	23,4	2,8
6. Kontrolle (Aktin)	100	24,2	2,3

In unseren Versuchen wurde der Muskelbrei 1. unmittelbar mit dem 10fachen, dann mit dem 5fachen Volum Azeton behandelt bzw. vor der Azetonbehandlung mit dem 2×10-fachen Volum Lösung von den folgenden Zusammensetzungen 15 Min. bei Zimmertemperatur vermischt: 2 : 0,01 *M* $MgCl_2$ + 0,4% $NaHCO_3$; 3 : 0,01 *M* $CaCl_2$ + 0,1% $NaHCO_3$ (es wurde weniger $NaHCO_3$ wegen der schlechteren Löslichkeit des $Ca(HCO_3)_2$ benutzt): 4 : 0,01 *M* neutralisierte Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) + 0,4% $NaHCO_3$; 5 : 0,4% $NaHCO_3$; dann wurde der von der überstehenden Flüssigkeit sorgfältig getrennte Rückstand mit dem

15fachen Volum dest. Wasser ebenfalls 15 Min. hindurch gewaschen; schliesslich wurde der so behandelte Muskelbrei nach Zugabe eines 5- bzw. 2fachen Volums Azeton getrocknet. Als Kontrolle (Versuch Nr. 6) wurde Aktin auf die übliche Weise hergestellt [7]. Die Untersuchung der Aktomyosinbildung erfolgte in den Auszügen der Trockenmuskelpulver (15faches Volum 0,3 *M* KJ + ATP-Lösung) nach 48stündiger Dialyse. (Im Falle des unmittelbar mit Azeton behandelten Präparates wurde 30% des Gesamteiweisses als Aktin angesehen.)

Bei der Bestimmung des Gehaltes an Erdalkalimetallionen wurde das Trockenmuskelpulver mit dem 10fachen Volum 5%iger Trichloressigsäure 30 Min. bei Zimmertemperatur extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde 2—4 ml Extrakt mit 0,01 *M* EDTA titriert.

Bei der Umrechnung auf frisches Muskelgewicht wurde in Betracht gezogen, dass man aus je 50 g Muskelbrei 10,5 g Trockenmuskelpulver isolieren konnte, wenn der Muskelbrei unmittelbar mit Azeton behandelt wurde (Versuch Nr. 1), je 6 g, wenn das Myosin nicht vorhergehend extrahiert wurde (Versuch Nr. 2—5), und 4,7 g, wenn man das Aktin auf die übliche Weise herstellte (Versuch Nr. 6).

Wie aus Tabelle I hervorgeht, ist die Denaturierung der Hälfte des Aktins (die etwa 50%ige Verminderung der Aktomyosinbildung) eine Folge der von den während der Azetonbehandlung anwesenden Erdalkalimetallen ausgeübten Wirkung (Versuche Nr. 1*, 2, 3). Die Denaturation bleibt jedoch aus, wenn man die Erdalkalimetalle im Laufe des Waschens mit Hilfe von EDTA entfernt (Versuch Nr. 4). Da 0,4% $NaHCO_3$ schon allein einen grossen Teil der Erdalkalimetalle auslöst, konnte keine Denaturierung beobachtet werden (Versuch Nr. 5). Die Bindung des Erdalkalimetallkations ist im Wesen unabhängig davon, ob man das Myosin zuvor extrahiert (Versuch Nr. 6) oder nicht (Versuch Nr. 5). Unsere analytische Bestimmung stimmt beim Kontrollaktin mit dem Ergebnis von FEUER, MOLNÁR, PETTKÓ und STRAUB überein [17]; wenn man nämlich die Angaben dieser Forscher umrechnet, erhält man 26,8 μM Erdalkalimetall je g Trockenmuskel. Gleichfalls im Einklang steht unser Ergebnis mit den Angaben DUBUISSONS, laut derer 1000 g frischer Rattenmuskel 16,3 m*M* Erdalkalimetallionen enthält [18].

Es wurde von uns schon früher nachgewiesen, dass sich aus dem Muskelbrei durch Waschen mit Wasser wegen des DONNAN-Effekts nur ein kleiner Bruchteil der Erdalkalimetallionen entfernen lässt [19]. Demnach bedeutet das bei der Herstellung von Aktin regelmässig angewandte Waschen mit $NaHCO_3$ nichts anderes als den Austausch des im Muskel befindlichen — wahrscheinlich grösstenteils an die Struktur gebunednen — Mg^{++} und Ca^{++} gegen Na^+.

Es wurde festgestellt, dass unter den von uns gewählten Versuchsverhältnissen Myosin überhaupt nicht in Lösung geht. Dies wird durch Abb. 3 bewiesen.

Der frische Muskelbrei wurde mit 2×10fachem Volum einer 0,1—3,2%igen $NaHCO_3$-Lösung jeweils 15 Minuten bei Zimmertemperatur gewaschen; beim dritten Waschen wurde dem Muskelrückstand soviel dest. Wasser zugegeben, dass die Endkonzentration des $NaHCO_3$ infolge der Verdünnung 0,04% betrug. Die Trocknung des Rückstands erfolgte zuerst mit dem

* Das aus dem unmittelbar mit Azeton behandelten Muskel extrahierte Aktin bildet besseres Aktomyosin als man auf Grund der elektrophoretischen Kurve in Abb. 1b erwartet hätte; die Ursache dieses Unterschiedes besteht darin, dass das Aktin bei Dialyse gegen eine Ionenstärke von 0,1 besser polymerisiert als gegen eine Ionenstärke von 0,4.

5fachen und dann mit dem 2fachen Volum Azeton. Aus dem Trockenmuskelpulver wurde das Aktin mit dem 15fachen Volum 0,3 *M* KJ + ATP-Lösung extrahiert und die Aktomyosinbildung (Kurve Nr. 1) nach 48stündiger Dialyse untersucht. Im Laufe des Versuches wurde auch die Gesamtmenge des während der Waschung ausgelösten Eiweisses (Kurve Nr. 2) und die Viskosität des mit der ersten $NaHCO_3$-Waschung erhaltenen Auszugs (Kurve Nr. 3) gemessen.

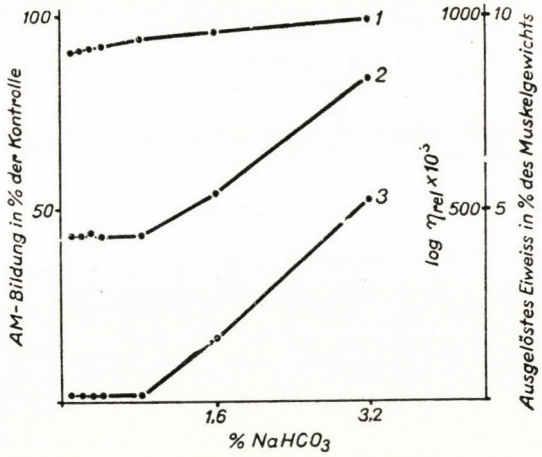


Abb. 3. Herstellung von nativem Aktin ohne und mit Extraktion von Myosin
Kurve Nr. 1: Aktomyosinbildung in % der Kontrolle. Kurve Nr. 2: Während der Waschung ausgelöste Gesamteiweissmenge in % des Frischmuskelgewichts. Kurve Nr. 3: Viskosität des ersten, mit $NaHCO_3$ hergestellten Auszugs in Gegenwart von ATP

Wie aus Abb. 3 hervorgeht ist die ausgelöste Eiweissmenge bis zu einer 0,8%igen $NaHCO_3$-Konzentration konstant, während bis zum gleichen Punkt die Viskosität der ersten Auszüge vernachlässigbar ist. Oberhalb dieser $NaHCO_3$-Konzentration nimmt jedoch die ausgelöste Eiweissmenge zu und gleichzeitig mit ihr auch die Viskosität, was darauf hindeutet, dass Myosin extrahiert wurde. Die Aktomyosinbildungsfähigkeit der Aktinlösungen ist aber von der $NaHCO_3$-Konzentration praktisch unabhängig; dadurch ist also bewiesen, dass natives Aktin ohne vorherige Extraktion von Myosin gewonnen werden kann.

2. *Herstellung von Aktin aus Muskelbrei, aus natürlichem Aktomyosin und aus glyzerinextrahierten Muskelfasern*

Das Ausgangsmaterial (frischer Muskelbrei, Aktomyosinsuspension, mit dem WARING-Blendor in 20%igem Glyzerin homogenisierte Psoas- und Rückenmuskeln) wird zweimal mit dem 5—10fachen Volum 0,4% $NaHCO_3$, dann einmal mit dem 10—15fachen Volum dest. Wasser gewaschen und danach mit dem 5- bzw. 2fachen Volum Azeton bei Zimmertemperatur getrocknet. Aus dem Trockenpulver wird das Aktin bei Zimmertemperatur durch 1stündiges mecha-

nisches Rühren mit einer Lösung extrahiert, die ein 15faches Volum 0,25—0,30 *M* KJ, 0,02 *M* Phosphatpuffer (pH 7,0) und 5×10^{-4} *M* ATP enthält. Das gelöste Eiweiss wird 15—30 Min. mit 20 000 U/Min. zentrifugiert und so vom Stroma getrennt. Aus Muskelbrei lässt sich 5—6 mg/ml, aus Aktomyosin und Muskelfasern 8—10 mg/ml eiweisshaltige, grösstenteils polymerisierte Aktinlösung herstellen. Das aus Muskeln dargestellte Aktin wurde mit Mg^{++} mit dem von uns modifizierten Verfahren gereinigt [7]. (Die Aktinlösung wurde vorher gegen 2×10^{-3} *M* $MgSO_4$ von pH 7,0 dialysiert.)

Charakterisierung:

Aktin aus Muskelbrei: Die Aktomyosinbildungsfähigkeit des rohen Auszugs beträgt im Durchschnitt 95% des mit dest. Wasser bereiteten Auszugs aus dem durch Extraktion von Myosin hergestellten Aktintrockenmuskelpulver (vgl. Abb. 3 und Tabelle I und IV). Dieses Aktin superpräzipitiert mit Myosin in Gegenwart von ATP bei kleiner Ionenstärke und steigert inzwischen die ATPase-Aktivität des Myosins [20] im Einklang mit dem Kontrollaktin (Tabelle II).

Tabelle II

Die aktivierende Wirkung des ohne Extraktion von Myosin hergestellten Aktins auf die ATPase des Myosins

	Abgespaltener Phosphor μM/Min./g Myosin	Superpräzipitation
Myosin	0,05	—
Myosin + Aktin	0,29	+
Myosin + Aktin (Kontrolle)	0,33	+

Versuchsbedingungen: 1 mg Myosin, 0,4 mg fibrilläres Aktin, 0,04 *M* KCl, 1×10^{-3} *M* $MgSO_4$ $1{,}5 \times 10^{-3}$ *M* ATP (pH 6,9). Inkubation bei Zimmertemperatur während 10 Minuten. Die Aktinlösungen (Auszug mit 0,3 *M* KJ + ATP bzw. dest. Wasser) wurden vorhergehend 48 Stunden hindurch dialysiert. Die Superpräzipitation wurde gesondert mit der Methode von KUSCHINSKY und TURBA untersucht [21].

Elektrophoretisch kann dieses Aktin nur nach Depolymerisation mit 0,6 *M* KJ geprüft werden; es enthält durchschnittlich 15% myogenes Eiweiss; dieses lässt sich allerdings zum grössten Teil entfernen, wenn man den Muskelbrei im ersten Schritt der Aktindarstellung mit dem 10fachen Volum 0,4%igem $NaHO_3$ 2 Minuten im WARING-Blendor homogenisiert. Die Aktomyosinbildungsfähigkeit des 0,3 *M* KJ + ATP-Auszugs erreicht in diesem Falle 100%.

Auch mit dest. Wasser kann man das Aktin aus dem Trockenmuskel extrahieren. Bei Verdünnung mit dem 12fachen Volum Wasser erhält man nach 30minütigem Stehen bei Zimmertemperatur, nach zeitweisem Rühren und nach Filtrierung durch einen Büchnertrichter 7—8 ml kaum viskose Lösung mit

einem Eiweissgehalt von rund 3 mg/ml. Nach Hinzufügung von 1/10 Volum eines Salzgemisches von 1 *M* KCl + 0,01 *M* $MgSO_4$ nimmt bei Zimmertemperatur die Viskosität rasch zu, während unterdessen das ATP verschwindet und das polymerisierte Aktin mit Myosin ein vollwertiges Aktomyosin gibt. Dies geht aus Tabelle III hervor.

Tabelle III

Untersuchung der Eigenschaften des mit dest. Wasser extrahierten Aktins

Aktinherstellung	η spec		Abgespaltetes ATP µg/mg Eiweiss	Viskosität des Aktomyosins log η_{rel}	
	vor	nach		vor	nach
	Zugabe von Salzlösung			ATP	
Ohne vorherige Extraktion von Myosin	0,74	3,10	6,15	0,317	0,175
Mit vorheriger Extraktion von Myosin	0,50	3,60	7,20	0,340	0,176

Die Viskositätswerte des Aktins und die abgespaltene ATP-Menge wurden in den Lösungen von 3,4 mg/ml Eiweisshegalt nach 1 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur bestimmt, wobei die Strukturviskosität unberücksichtigt blieb.

Aktin aus natürlichem Aktomyosin und glyzerinextrahierten Muskelfasern: Die Aktomyosinbildungsfähigkeit der 0,3 *M* KJ + ATP-Extrakte beträgt 110—115% (Tabelle IV). Auch hier kann das Aktin mit dest. Wasser ausgelöst werden, doch sind die Lösungen mit einem Eiweissgehalt von rund 4 mg/ml zum grössten Teil polymerisiert.

Aus den obigen Ausführungen geht hervor, dass die Herstellung des Aktins ohne Extraktion von Myosin nicht durch den strukturellen Zustand des Aktomyosins beeinflusst wird. Mit der gleichen Methode lässt sich nämlich natives Aktin sowohl aus den stark organisierten Zellen des Muskelbreis als auch aus den zum Teil desintegrierten, glyzerinextrahierten Muskelfasern als auch aus der völlig unorientierten Aktomyosinsuspension herstellen.

II. Der Zustand des Aktins im Muskel

1. Die Differenzierung des globulären vom fibrillären Aktin

Die Frage, ob das Aktin im Muskel in globulärer oder in fibrillärer Form vorhanden ist, lässt sich auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsfähigkeit des globulären und fibrillären Aktins gegenüber Salyrgan experimentell untersuchen. Wie nämlich von uns neuerdings nachgewiesen wurde, reagiert das Salyrgan in 57 000 g Aktin bei Zimmertemperatur im globulären Aktin mit 4 *M* SH, dagegen im fibrillären Aktin mit nur 2 *M* SH [4, 5]. Andererseits ist

KUSCHINSKY und TURBA die Feststellung zu verdanken, dass das mit Salyrgan behandelte globuläre Aktin die Viskosität der Myosinlösungen nicht erhöht, während das mit Salyrgan behandelte fibrilläre Aktin vollwertiges Aktomyosin bildet [22]. Die Richtigkeit dieser Feststellung wurde auch von uns bestätigt. Mit Salyrgan lässt sich demnach die Form des Aktins im Muskel »fixieren« und nach der Isolierung des Eiweisses die globuläre oder fibrilläre Form durch Bestimmung der Zahl der SH-Gruppen bzw. der Aktomyosinbildungsfähigkeit ermitteln.

In unseren Versuchen wurde der frische Muskelbrei mit dem 10fachen Volum einer 1×10^{-3} *M* Salyrgan und 0,4% $NaHCO_3$ enthaltenden Lösung zweimal bei Zimmertemperatur 15 Minuten hindurch gewaschen (10 *M* Salyrgan/10^5 g Muskeleiweiss) bzw. die in 0,05 *M* KCl befindliche natürliche Aktomyosinsuspension mit 1×10^{-3} *M* Salyrgan 30 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt (10 *M* Salyrgan/10^5 g Eiweiss). Der Salyrganüberschuss wurde mit 2×10-fachem Volum dest. Wasser sowohl aus dem Muskel als auch aus dem Aktomyosin entfernt und der Rückstand mit Azeton getrocknet. In den Kontrollversuchen wurde alles genau so ausgeführt, mit dem Unterschied, dass kein Salyrgan dem System zugefügt wurde. Der SH-Gehalt und die Aktomyosinbildung des isolierten Aktins geht aus Tabelle IV hervor.

Tabelle IV

Untersuchung der Form des Aktins im frischen Muskelbrei und im natürlichen Aktomyosin

	M SH/57 000 g Eiweiss	Aktomyosinbildung in % der Kontrolle
Muskel, unbehandelt	4,01	96
Muskel + Salyrgan	2,28	95
Aktomyosin, unbehandelt	4,22	114
Aktomyosin + Salyrgan	2,05	112

Zur SH-Bestimmung wurde der getrocknete Muskel bzw. das Aktomyosin mit dem 25fachen Volum einer 0,3 *M* KJ und 2×10^{-4} *M* ATP enthaltenden Lösung extrahiert; der Auszug wurde mit dem 10fachen Volum kalten glasdest. Wasser verdünnt und das Aktin mit Azetatpuffer (pH 4,7) bei einer Endkonzentration von 0,01 *M* gefällt. Das Aktin gelangte dann in die Zentrifuge, wo es 15 Min. mit 15 000 U/Min. bei 0° zentrifugiert und der Rückstand mit 1 *M* $NaHCO_3$ gelöst wurde. Die Einmessung der 50—60 mg/ml Eiweiss enthaltenden Lösungen zum Zweck der SH- und Eiweissbestimmungen erfolgte nach Gewicht.

Interessanterweise konnte, wenn das am isoelektrischen Punkt gefällte und gelöste Aktin auch noch mit Mg^{++} gefällt wurde, nach Lösung des Präzipitats mit EDTA ebensoviel SH in dem mit Salyrgan behandelten Aktin gefunden werden wie in der Kontrolle. Infolge der Wirkung des Mg^{++} wurden also die in Merkaptidbindung befindlichen Aktin-SH-Gruppen freigesetzt.

Bei der Ausführung dieser Versuche stand keine präparative Ultrazentrifuge zur Verfügung, so dass man bei dem aus dem Muskel bereiteten und nur durch Umfällung am isoelektrischen Punkt gereinigten Aktin mit einer Verunreinigung durch eventuell isoliertes myogenes Eiweiss rechnen muss.

Zur Aktomyosinbildung wurde das Aktin aus Trockenmuskelpräparaten mit dem 15-fachen Volum 0,3 *M* KJ und ATP-Lösung extrahiert und seine Bindung mit Myosin nach 48-stündiger Dialyse untersucht.

Aus Tabelle IV lässt sich feststellen, dass das Aktin im frischen Muskelbrei im fibrillären Zustand anwesend ist. Das aus dem mit Salyrgan gewaschenen Muskel isolierte Aktin enthält nämlich nur ungefähr halb soviel SH wie die Kontrolle, während die Aktomyosinbildung in beiden Fällen gleich ist. Im Aktomyosin kommt das Aktin in fibrillärer Form vor. Das aus dem mit Salyrgan gewaschenen Aktomyosin hergestellte Aktin verhält sich vollständig wie das aus Muskeln isolierte. Jene Feststellung, dass im frischen Muskelbrei fibrilläres Aktin vorhanden ist, darf somit als eine berechtigte Behauptung angesehen werden.

STRAUB und FEUER fanden in dem zur Aktinextraktion vorbereiteten Trockenmuskelpulver kein ATP und folgerten daraus, dass sich dort das Aktin im polymerisierten Zustand befindet [23]. Nach ihrer Meinung tritt die Depolymerisation, d. h. die Entstehung des globulären Aktins im Laufe der wässerigen Extraktion ein. Wie in Tabelle III nachgewiesen wurde, enthält auch der wässerige Auszug des ohne vorhergehende Extraktion von Myosin isolierten Aktins globuläres Aktin. Dies trifft auch dann zu, wenn man den Muskel vor der Azetonbehandlung mit Salyrgan wäscht. (In der 4 mg/ml Eiweiss enthaltenden Lösung ist vor der Zugabe von 1/10 Volum 1 *M* KCl + 0,01 *M* $MgSO_4$ $\eta_{spec} = 0{,}94$, eine Stunde nach Zugabe dieser Salzlösung dagegen 3,50.) Es wurde aber schon erwähnt, dass sich aus dem mit Azeton getrockneten Aktomyosin mit wässeriger Extraktion grösstenteils polymerisiertes Aktin auslöst. Es ist also vorstellbar, dass nur das im Muskel — in der Struktur — befindliche dehydrierte fibrilläre Aktin im Laufe der Auflösung zu Globuli zerfällt, das im Aktomyosin befindliche — zufallsweise angeordnete — fibrilläre Aktin dagegen nicht. Dieser Fall lag jedoch nicht vor, wie dies durch unseren folgenden Versuch bewiesen wird.

Mit Salyrgan behandeltes, getrocknetes Aktomyosinpulver, das unter den Versuchsverhältnissen laut Tabelle IV hergestellt worden war, wurde in dem einen Fall mit dem 15fachen Volum 0,3 *M* KJ + ATP-Lösung, im anderen Fall ausserdem noch mit $6{,}7 \times 10^{-3}$ *M* Salyrgan (100 μM Salyrgan/g getrocknetes Aktomyosin) extrahiert. Die Zahl der im Aktin befindlichen SH-Gruppen und die Aktomyosinbildungsfähigkeit ist — bei gleicher Bestimmung wie oben — aus Tabelle V ersichtlich.

Tabelle V

Depolymerisation des Aktins in dem mit Salyrgan behandelten und dann getrockneten Aktomyosin im Laufe der Extraktion

Extraktionsmittel	*M* SH/57 000 g Eiweiss	Aktomyosinbildung in % der Kontrolle
K + ATP	2,01	111
K + ATP + Salyrgan	0,15	10

In dem in Gegenwart von Salyrgan extrahierten Aktin sank also die Zahl der zur Polymerisation notwendigen SH-Gruppen unter 10%, und damit hörte

die Verbindung mit dem Myosin sozusagen auf. Dieses Ergebnis zeigt demnach, dass der Entstehung des fibrillären Aktins — obwohl aus dem mit Azeton getrockneten Aktomyosin in üblicher Weise fibrilläres Aktin extrahiert wurde — Depolymerisation vorangeht, weil sonst das bei der Extraktion hinzugefügte neuerliche Salyrgan nicht imstande wäre, mit den verbliebenen zwei SH-Gruppen eine Reaktion einzugehen [4, 5].

Dieses Ergebnis bedeutet aber auch gleichzeitig, dass sich mit unserer Methode das entstehende globuläre Aktinintermediär mit Sicherheit nachweisen lässt.

2. *Über die Aktin—Myosin-Bindung*

Die Tatsache, dass das Aktin aus Aktomyosin und glyzerinbehandelten Myofibrillen nach Trocknung mit Azeton extrahiert werden kann, lässt sich am einfachsten in der Weise deuten, dass infolge der Denaturation des Myosins die spezifische Aktin-Myosin-Bindung aufhört (vgl. z. B. [24]) und dass das Aktin auch in Lösungsmitteln wie KJ, dest. Wasser löslich wird, in denen das native Aktomyosin nicht in zwei Komponenten getrennt werden kann. Es sind zahlreiche Substanzen bekannt, die das Aktomyosin in Lösung dissoziieren (vgl. z. B. [24]), doch gibt es unseres Wissens keine einzige, die das Aktomyosingel zu Aktin und Myosin spaltet. Im Gegenteil, das ATP, das bei grosser Ionenstärke eine dissoziierende Wirkung ausübt, führt bei kleiner Ionenstärke Assoziation herbei, d. h. es superpräzipitiert [25]. Es schien daher von Interesse zu untersuchen, ob sich das Aktin auch nach der drastischen kolloidalen Zustandsänderung, die auf Wirkung von ATP eintritt, durch Trocknung mit Azeton dargestellt werden kann.

In unserem Versuch wurde das 0,05 *M* KCl und 1×10^{-3} *M* $MgSO_4$ enthaltende natürliche Aktomyosingel mit 0,5—1 $\times$ 10^{-3} *M* ATP bzw. die 0,10—0,16 *M* KCl und 2 $\times$ 10^{-3} *M* $MgSO_4$ enthaltende Muskelfasernsuspension mit 2—6 $\times$ 10^{-3} *M* ATP bei Zimmertemperatur zum Kontrahieren gebracht. Nach 20 Min. Stehen, während dem eine im Vergleich zu der kein ATP enthaltenden Kontrolle starke Sedimentation auftrat, wurde das Gel bzw. die Suspension mit 3000 U/Min. bei Zimmertemperatur zentrifugiert; danach wurde der Niederschlag mit 1 $\times$ 10fachem Volum dest. Wasser gleichfalls bei Zimmertemperatur gewaschen und schliesslich mit dem 5- bzw. 2fachen Volum Azeton getrocknet.

Mit KJ + ATP-Lösung lässt sich aus dem Trockenpulver des kontrahierten Aktomyosins bzw. der kontrahierten Muskelfasern ein qualitativ und quantitativ vollwertiges Aktin herstellen, ebenso wie aus den nicht mit ATP behandelten Kontrollen. Diese unsere Feststellung bedeutet also, dass sich der chemische Charakter der Aktin-Myosin-Bindung weder im unorientierten Aktomyosingel noch in dem orientierten Aktomyosingel der Muskelfasern infolge der Kontraktionswirkung des ATP grundlegend ändert, weil das Aktomyosin mit Azeton gleicherweise »dissoziiert« werden kann, ob das ATP vor der Trocknung anwesend war oder nicht.

Es gelang uns jedoch eine Verbindung im Aktomyosin zustande zu bringen, die sich als irreversibel erwies.

In einer früheren Arbeit wurde von uns darauf hingewiesen, dass das gelöste Myosin auf Wirkung von Formalin zu einem Gel von pH 8,0 erstarrt, wogegen das Aktin unter ähnlichen Umständen reversibel depolymerisiert [5]. Fügt man zu 0,05 *M* KCl und 0,4% $NaHCO_3$ enthaltender, stabiler Aktomyosinsuspension (6,7 mg/ml) 1/10 Volum 36%iges neutrales Formalin bei Zimmertemperatur hinzu, so entsteht in kurzer Zeit massiver Niederschlag. Die nach dem Zentrifugieren überstehende Flüssigkeit enthält praktisch kein Eiweiss,

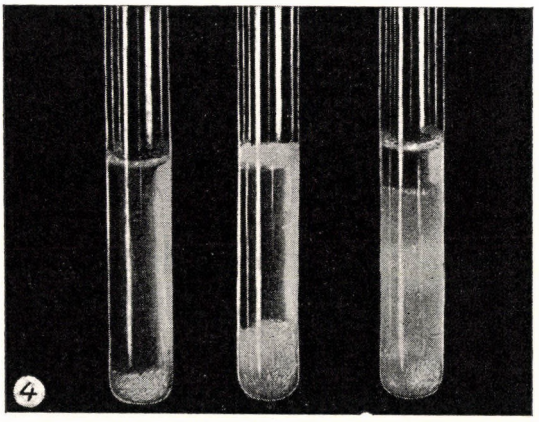


Abb. 4. Aggregation des natürlichen Aktomyosins auf Wirkung von Formalin

Reaktionsgemisch: 3,5 mg/ml Aktomyosin, 0,05 *M* KCl, 10^{-3} *M* $MgSO_4$ (pH 6,5). 1. Reagenzglas: $+5 \times 10^{-4}$ *M* ATP. — 2. Reagenzglas: +3% Formalin*. — 3. Reagenzglas: Kontrolle. Sofort nach Zusetzung des ATP bzw. Formalins 1minutiges Zentrifugieren bei 3000 U/Min.

ebenso wie die kein Formalin enthaltende Kontrolle. Das Formalin wurde aus dem Rückstand durch zweimaliges Waschen mit dem 10fachen Volum dest. Wasser entfernt, dann dieser mit Azeton getrocknet; aus dem so erhaltenen Trockenpulver lässt sich mit 0,3 *M* KJ + ATP-Lösung se bst während 5 Stunden keinerlei Eiweiss extrahieren. All dies weist darauf hin, dass das Formalin zwischen dem Aktin und dem Myosin eine intermolekulare, primäre chemische Bindung zustande bringt. Aus den Arbeiten von FRAENKEL-CONRAT ist bekannt, dass solche Methylenbrücken auf Wirkung von Formalin in den Eiweissen innerhalb eines breiten pH-Intervalls zustande kommen und dass sich das Molekulargewicht der Eiweisse infolge der Aggregation erhöht [26]. Diese Feststellung trifft auch für das Aktomyosin zu: die bei einem pH-Wert von

* Im Fall von Formalin schliesst die Gelstruktur soviel Luft ein, dass sich ein kleiner Teil des Niederschlags oben befinden wird; drückt man jedoch diese Luft mit einem Glasstäbchen aus, so setzt sich der Niederschlag bereits spontan.

6,5 eintretende Ausfä lung erinnert an die Superpräzipitation, wie dies in Abb. 4 zu sehen ist.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit Formalin behandelten Muskelfasern ist eine charakteristische quergestreifte »Super«-Struktur zu sehen (Abb. 5), die ähnlicherweise auch auf den Bildern von DRAPER und HODGE [27] sowie von RÓZSA, SZENT-GYÖRGYI und WYCKOFF [28] wahrnehmbar ist.

In unseren Versuchen konnte, wenn der Muskelbrei mit einer 3% Formalin und 0,4% $NaHCO_3$ enthaltenden Lösung und danach mit Wasser gewaschen

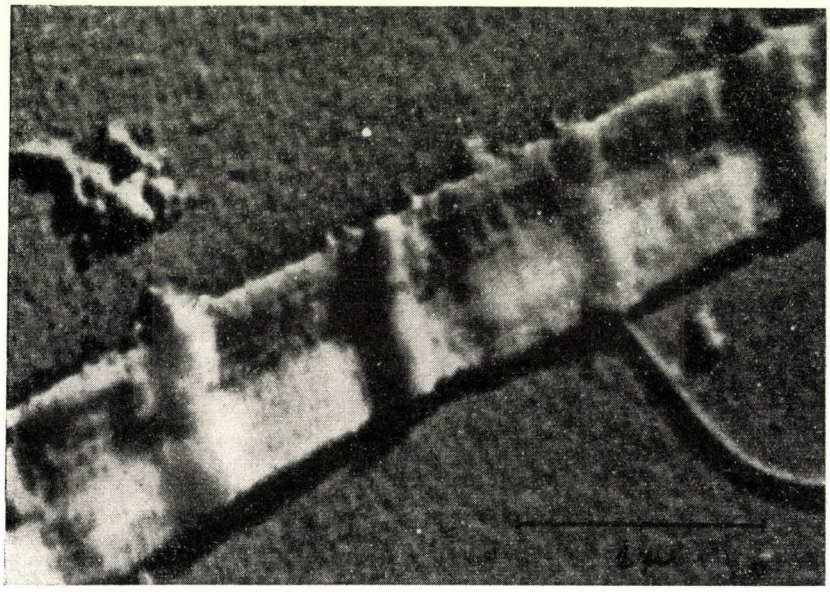


Abb. 5. Mit 4%iger, neutraler Formalinlösung fixierte, vor der Untersuchung mit Wasser gewaschene Muskelfaser aus dem M. psoas. Schräg mit Gold bedampft

wurde, aus dem azetongetrockneten Muskelpräparat ebenso kein Aktin, selbst in Spuren nicht, extrahiert werden wie zuvor aus dem Aktomyosin. Auf Wirkung von Formalin kommt also sowohl im Aktomyosin als auch im Muskelbrei eine *a*spezifische Bindung zwischen Aktin und Myosin zustande, als deren Ergebnis die beiden Eiweisse nicht mehr mit Azeton »dissoziiert« werden können.

Das Azeton spielt bei der Herstellung des Aktins eine doppelte Rolle: es denaturiert das Myosin und macht infolge der Dehydrierung des Muskelstromas das Aktin löslich. Diese zwei Wirkungen lassen sich durch Lyophilisierung, die weder das Aktomyosin noch das reine Myosin denaturiert, voneinander trennen [29].

Lyophilisiert man frischen Muskelbrei, so wird aus dem Trockenpulver mit 0,3 *M* KJ + ATP-Lösung Aktomyosin in sehr grosser Konzentration extrahiert. Dagegen löst sich weder Aktomyosin noch Aktin aus, wenn das bereits durch Lyophilisierung getrocknete Trockenmuskelpulver auch noch mit Azeton behandelt wird. (Es lässt sich selbst mit 10 mg aus dem Extrakt stammendem Eiweiss keine Aktomyosinbildung nachweisen.) Als Ergebnis der Lyophilisierung aggregieren sich naturgemäss das im Muskel befindliche Aktin und Myosin ; es scheint also, dass dieses Aggregat vom Azeton ebensowenig in zwei Teile zerlegt werden kann wie die im obigen im Aktomyosin durch Formalin zustande gebrachte Methylenbrücke.

Im Abschnitt I/2 ist nachgewiesen worden, dass ein Teil des Aktins auch mit dest. Wasser aus dem mit $NaHCO_3$ gewaschenen und mit Azeton getrockneten Muskel extrahiert werden kann. Dagegen kann kein Aktin ausgelöst werden, wenn man den Muskelbrei unmittelbar mit Azeton trocknet oder ihn vor der Azetonbehandlung in Gegenwart von $NaHCO_3$ mit $MgCl_2$ bzw. $CaCl_2$ wäscht. Dies wird in Tabelle VI demonstriert.

Tabelle VI

Extrahierbarkeit von Aktin aus dem unmittelbar mit Azeton behandelten bzw. vor der Trocknung mit Erdalkalimetall gewaschenen Trockenmuskelpulver mit KJ und dest. Wasser

Behandlung des Muskelbreis	Extrahiertes Eiweiss mg/ml		Mit Wasser extrahiertes Eiweiss in % des mit KJ extrahierten Eiweisses	Polymerisationsfähigkeit im wässerigen Extrakt
	KJ	Wasser		
1. Unmittelbare Azetonbehandlung	16,6	11,6	70	—
2. Waschung : $MgCl_2$ + $NaHCO_3$	7,6	1,2	16	—
3. Waschung : $CaCl_2$ + $NaHCO_3$	5,9	1,0	17	—
4. Waschung : EDTA+ $NaHCO_3$	8,5	5,0	59	+
5. Waschung : $NaHCO_3$	9,5	5,6	59	+
6. Kontrolle (Aktin)	6,6	3,5	53	+

Die Trockenmuskelpräparate sind die gleichen wie in Tabelle I. Sie wurden mit dem 10fachen Volum 0,3 *M* KJ + ATP-Lösung bzw. mit dem 10fachen Volum dest. Wasser (beim Kontrollaktin mit dem 20fachen Volum) eine Stunde hindurch bei Zimmertemperatur extrahiert. Die mit KJ extrahierten Auszüge wurden mit 20 000 U/Min. eine Stunde hindurch zentrifugiert, während die Isolierung der mit dest. Wasser hergestellten Auszüge nach Filtrierung durch einen Büchnertrichter erfolgte. Die Polymerisationsfähigkeit wurde in den mit dest. Wasser hergestellten Auszügen nach Zugabe von 1/10 Volum 1 *M* KCl + 0,01 *M* $MgSO_4$-Lösung nach einer Stunde Stehen bei Zimmertemperatur viskosimetrisch gemessen. Bei den Auszügen aus den Präparaten Nr. 1, 2 und 3 schwankte der Wert von η_{spec} zwischen 0,01 und 0,03 und erhöhte sich auch nicht nach Zugabe von Salzlösung.

Laut Angaben der Tabelle VI (Versuche Nr. 1, 2 und 3) lässt sich Aktin mit dest. Wasser weder aus dem unmittelbar mit Azeton getrockneten noch

aus dem vor der Trocknung mit Erdalkalimetallen gewaschenen Muskel extrahieren. (Das ausgelöste Eiweiss ist myogenen Ursprungs.*)

Dagegen kann das Aktin aus diesen Präparaten mit KJ extrahiert werden. (Die Aktomyosinbildung der mit KJ hergestellten Auszüge ist in Tabelle I angegeben.) Doch lässt sich ein Teil des Aktins auch mit dest. Wasser auslösen, wenn man die Erdalkalimetalle vor der Azetonbehandlung mit EDTA (Versuch Nr. 4) oder infolge von Waschung mit $NaHCO_3$ (Versuch Nr. 5) grösstenteils entfernt, ganz ähnlich wie bei Kontrollaktin (Versuch Nr. 6). (Der Erdalkalimetallgehalt der Trockenmuskelpräparate ist ebenfalls aus Tabelle I ersichtlich.) In dem mit Azeton getrockneten Muskelpräparat werden also das Aktin und das Myosin durch Erdalkalimetalle aneinandergebunden. Diese Bindung wird vom dest. Wasser naturgemäss nicht gelöst, vom KJ dagegen ja.

Im vorstehenden wurde darauf hingewiesen, dass das an das Myosin gebundene Aktin im Aktomyosingel oder in den im Rigor befindlichen Muskelfasern infolge der Myosin denaturierenden Wirkung des Azetons frei wird. Es erscheint demnach überraschend, dass dieses denaturierte Myosin das Aktin im Trockenmuskelpulver dennoch bindet, wenn Erdalkalimetallionen zugegen sind. Die Fähigkeit des nativen Myosins bzw. Aktomyosins und des nativen Aktins, Erdalkalimetallionen zu binden, ist schon in mehreren Arbeiten erörtert worden (vgl. z. B. [30, 31]); besonders bekannt unter diesen Kationen ist die bedeutende Rolle des Mg^{++} in den verschiedenen, infolge von ATP eintretenden Reaktionen des Aktomyosins bzw. der Muskelfasern (vgl. z. B. [32]). Die Bindung des Mg^{++} und Ca^{++} an die Struktureiweisse kann so auch im Muskel nicht zweifelhaft sein. Es ist also die Annahme berechtigt, dass die Verbindung des Aktins und Myosins durch Erdalkalimetallionen nicht nur in dem durch Azeton dehydrierten, sondern auch im lebenden Muskel von Bedeutung ist.

Besprechung der Ergebnisse

Zur physiologischen Untersuchung der Polymerisation wurde von uns ein neues Verfahren für die Darstellung des Aktins ausgearbeitet, bei dem es nicht nötig ist, das Myosin zuvor aus dem Muskel zu extrahieren. Die Eigenschaften des so präparierten Aktins stimmen völlig mit den bisher bekannten charakteristischen Eigenschaften des Aktins überein: es polymerisiert infolge der Wirkung von Salzen, wobei inzwischen ATP abgespalten wird (Tabelle III); bei grosser Ionenstärke erhöht es die Viskosität der Myosinlösungen (Abb. 3, Tabelle I, III und IV); bei geringer Ionenstärke superpräzipitiert es mit Myosin, wobei es die ATPase-Aktivität des Myosins steigert (Tabelle II); es kann mit KJ depolymerisiert und mit $MgCl_2$ gereinigt werden.

* Untersucht man den wässerigen Auszug des unmittelbar mit Azeton getrockneten Präparats mit Hilfe der Elektrophorese unter den Versuchsbedingungen der Abb. 1 und 2, so erscheint auf dem Bild zu 95% die Myogenfraktion.

Unser Herstellungsverfahren für Trockenmuskelpulver weicht nur insofern von der bisher üblichen Methode [6, 7] ab, als der zur teilweisen Auslösung von Myosin dienende erste Schritt weggelassen wird. Diese Modifikation wird verständlich, wenn man bedenkt, dass sich mit der Extraktionslösung nach GUBA und STRAUB nur etwa 40 mg Myosin je g Muskel auslöst [33], d. i. nicht mehr als die Hälfte des Gesamtmyosins. Es wurde gleichzeitig darauf hingewiesen, dass zur Herstellung von nativem Aktin nicht das im Muskel befindliche Myosin zu extrahieren ist, sondern lediglich die Erdalkalimetallionen, die das Aktin während der Azetonbehandlung oder gegebenenfalls im Laufe der Extraktion zum Teil denaturieren (Tabelle I).

Aus dem unmittelbar mit Azeton getrockneten Muskel lässt sich das Aktin mit dest. Wasser nicht extrahieren, nur mit grosser Ionenstärke. Da das von DUBUISSON benutzte 1 *M* KCl denaturiert, wurde statt dessen die ATP-haltige, neutrale 0,3 *M* KJ-Lösung herangezogen, die sich gut bewährt hat (Abb. 1a und 1b). Das Aktin kann aber auch mit dest. Wasser ausgelöst werden, wenn man die Erdalkalimetalle vor der Azetonbehandlung aus dem Muskel auswäscht, in gleicher Weise wie bei der üblichen Herstellung des Aktins, d. h. wenn man das Myosin vor der Trocknung entfernt (Tabelle VI). All dies bedeutet also, dass in dem mit Azeton getrockneten Muskel das Aktin wie folgt an das Myosin gebunden ist:

Aktin — Erdalkalimetall — Myosin*

Diese Bindung kann naturgemäss nicht durch dest. Wasser, sondern nur durch eine Salzlösung gelöst werden, die einwertige Kationen enthält (KJ, KCl).

Natives Aktin wurde aus natürlichem Aktomyosin und glyzerinextrahierten Muskelfasern hergestellt. Es liess sich kein Unterschied feststellen, wenn die Muskelmodelle — vor der Trocknung — mit ATP kontrahiert wurden. Aus all dem darf gefolgert werden, dass im Aktomyosingel sowohl in Gegenwart von ATP als auch ohne dieses nur sekundäre chemische Bindungen die spezifische Verbindung zwischen Aktin und Myosin herstellen, Bindungen, die mit Azeton »dissoziiert« werden können. Wird jedoch mit Formalin eine Methylenbrücke zwischen Aktin und Myosin (Abb. 4 und 5) nach dem Schema (laut [34])

$$\text{Eiweiss}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}-\text{Eiweiss} \longrightarrow \text{Eiweiss}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Eiweiss} + \text{H}_2\text{O}$$

hergestellt, so kann das Aktin aus dem azetongetrockneten Aktomyosin oder aus dem Muskel schon nicht mehr extrahiert werden. In ähnlicher Weise lässt sich das Aktin auch dann nicht extrahieren, wenn man den Muskel lyophilisiert und danach noch mit Azeton behandelt. In der spezifischen Aktin-Myosin-

* Eigentlich könnte man sich auch vorstellen, dass das Erdalkalimetallion nicht das Aktin und das Myosin, sondern die Aktinmoleküle selbst miteinander verbindet; gegen diese Annahme spricht jedoch einesteils, dass sowohl das Aktin wie auch das Myosin bzw. Aktomyosin eine grosse Affinität zu den Erdalkalimetallen zeigen [30, 31], während anderenteils schon seit langem bekannt ist, dass zur Stabilisierung der Aktin-Myosin-Bindung Mg^{++} notwendig ist [30, S. 26].

Bindung ist jedoch den Erdalkalimetallen eine bedeutende Rolle zuzuschreiben, worauf hier schon früher, auf Grund der Tabelle VI hingewiesen wurde. Aus Tabelle I geht noch hervor, dass der Muskelrückstand imstande ist, die Erdalkalimetalle zu binden. Die Kationmenge des gebundenen Erdalkalimetalls entspricht ungefähr der physiologischen Konzentration. Es erscheint demnach als völlig berechtigt, hieraus den Schluss zu ziehen, dass die Erdalkalimetalle (oder vielleicht nur das Mg^{++}) auch physiologisch eine grosse Rolle in der Ausgestaltung der Verbindung zwischen Aktin und Myosin spielen.

Bisher war es nicht möglich, experimentell zu untersuchen, ob im Laufe der Muskelfunktion die G → F-Transformation zustande kommt oder nicht. Wie in der vorliegenden Arbeit darauf hingewiesen wurde, lässt sich die Form des Aktins im Muskel mit Salyrgan »fixieren«, wobei diese Form auf Grund der Zahl der SH-Gruppen und der Aktomyosinbildungsfähigkeit bestimmt werden kann. Es wurde nachgewiesen, dass das Aktin im frischen Muskelbrei in fibrillärer Form zugegen ist, ebenso wie im natürlichen Aktomyosin (Tabelle IV). Die Depolymerisation erfolgt sowohl im Muskel als auch im Aktomyosin im Laufe der Extraktion des azetongetrockneten Aktins (Tabelle V). Es wäre jedoch unrichtig, hieraus die Folgerung zu ziehen, dass man physiologisch nicht mit der G → F-Transformation zu rechnen braucht. PARRISH und MOMMAERTS wiesen als erste darauf hin, dass das Aktin nicht nur durch Trocknung mit Azeton, sondern auch durch Lyophilisierung depolymerisiert werden kann [35]; dieser Versuch wurde auch von uns wiederholt. Eine starke Dehydrierung bedeutet indessen auch die Superpräzipitation des Aktomyosingels [25], deren physiologische Bedeutung auf Grund der aus den Muskelfasern gezogenen Folgerungen kaum bezweifelt werden kann [24]. Neuerdings ziehen auch HANSON und HUXLEY die Möglichkeit der G → F-Transformation im Mechanismus der Kontraktion in Betracht [36]. Dieses globuläre Aktinintermediär lässt sich mit unserer Methode mit Sicherheit nachweisen (Tabelle V).

Es ist vorstellbar, dass es möglich ist, mit Salyrgan auch das im kontrahierten oder relaxierten Muskel befindliche Myosin zu »fixieren«; dann werden sich nach Isolierung dieses Eiweisses durch Verfolgung der ATPase-Aktivität und der Aktomyosinbildung auch die in den »aktiven Zentren« eventuell eintretenden Veränderungen untersuchen lassen.

Die Darstellung von Aktin ohne Extraktion von Myosin bedeutet ferner auch eine neue Methode für die morphologische Untersuchung der Struktureiwisse des Muskels. Eines der wichtigsten Ergebnisse der Muskelbiochemie in der letzten Zeit ist die Lokalisation des Myosins im A-Segment [37, 38, 39], eine Feststellung, die durch die selektive Myosinextraktion mit einer Lösung nach GUBA und STRAUB [33] bzw. nach HASSELBACH und SCHNEIDER [13] ermöglicht wurde. Bis heute ist jedoch kein Verfahren bekannt, das eine selektive Extraktion des Aktins aus den Muskelfasern so gestatten würde, dass das ganze Myosin in den Fasern verbleibe. Die Darstellung von Aktin ohne Extraktion

von Myosin eröffnet nun die Möglichkeit zur Ausarbeitung eines solchen Verfahrens.

Die Darstellung von Aktin ohne Extraktion von Myosin gibt uns also eine neue Methode in die Hand, die Veränderungen der Struktureiweisse im Laufe der Muskelfunktion von der morphologischen und chemischen Seite zu erhellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Trennung des globulären und fibrillären Aktins im Muskel wurde von uns ein neues Aktinherstellungsverfahren ausgearbeitet, bei dem es nicht notwendig ist, vorher das Myosin zu extrahieren.

Die Herstellung von nativem Aktin ohne Extraktion von Myosin ist an zwei Bedingungen gebunden: an die Auswaschung der im Muskel befindlichen Erdalkalimetalle und an eine entsprechende Extraktion des Trockenmuskels. Zur Auswaschung wurde 0,4% $NaHCO_3$ benutzt, während die Extraktion mit einer Lösung erfolgte, die 0,3 *M* KJ (pH 7,0) und 5×10^{-4} *M* ATP enthielt.

Aus dem mit $NaHCO_3$ gewaschenen Muskel lässt sich das Aktin durch dest. Wasser auslösen, dagegen kann es überhaupt nicht extrahiert werden, wenn man den Muskel unmittelbar mit Azeton trocknet oder vorher mit $MgCl_2$ bzw. $CaCl_2$ wäscht. Aus dieser Tatsache wurde von uns gefolgert, dass das Aktin und Myosin in dem mit Azeton getrockneten Muskel durch Erdalkalimetallionen miteinander verbunden sind.

Die Eigenschaften des ohne Extraktion von Myosin hergestellten Aktins stimmen in allem mit den bisher bekannten charakteristischen Eigenschaften des Aktins überein: es polymerisiert auf Wirkung von Salzen, wobei ATP abgespaltet wird; es erhöht bei grosser Ionenstärke die Viskosität der Myosinlösungen; es superpräzipitiert bei kleinen Ionenstärken mit Myosin und erhöht gleichzeitig die ATPase-Aktivität des Myosins; es kann mit KJ depolymerisiert und mit $MgCl_2$ gereinigt werden.

Das Aktin lässt sich auch aus natürlichem Aktomyosin und aus glyzerinextrahierten Muskelfasern herstellen. Es wurde auch dann kein Unterschied gefunden, wenn man die Muskelmodelle vor der Trocknung mit ATP kontrahieren liess.

Aus dem mit Formalin behandelten Aktomyosin oder Muskelbrei nach Azetontrocknung ist es nicht möglich, Aktin zu extrahieren; zu demselben negativen Resultat gelangt man, wenn der Muskel lyophilisiert und danach mit Azeton behandelt wird.

Aus dem mit Salyrgan versetzten Muskelbrei oder natürlichen Aktomyosin lässt sich fibrilläres Aktin extrahieren, das ein vollwertiges Aktomyosin gibt, aber nur die halbe Anzahl SH-Gruppen enthält. Aus all dem wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass das Aktin im frischen Muskelbrei in fibrillärer Form anwesend ist. Im Laufe der Extraktion des mit Salyrgan behandelten Trockenmuskels oder Aktomyosins depolymerisiert das Aktin.

Die Darstellung von Aktin ohne vorherige Extraktion von Myosin stellt eine neue Methode für die morphologische Untersuchung der Muskelstruktur und für die — im Zusammenhang mit der Funktion durchgeführte — chemische Untersuchung der Struktureiweisse dar.

*

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Ungarischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt. Es sei auch hier Frau Professor VILMA SZ.-HERMANN für ihr anspornendes Interesse im Laufe dieser Arbeit bestens gedankt.

LITERATUR

1. STRAUB, F. B.: Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged **3,** 23 (1943).
2. SZENT-GYÖRGYI, A.: Chemistry of Muscular Contraction 1951. Academic Press, New York, S. 81.
3. DUBUISSON, M.: Experientia **6,** 269 (1950).
4. BÁRÁNY, M.: Biochim. Biophys. Acta **19,** 560 (1956).
5. BÁRÁNY, M., SPIRÓ, J., KÖTELES, GY., NAGY, E.: Acta Physiol. Hung. **10,** 145 (1956).

6. BÁRÁNY, M., BIRÓ, N. A., MOLNÁR, J., STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Hung. **5**, 369 (1954).
7. BÁRÁNY, M., KÖTELES, GY., NAGY, E., SPIRÓ, J.: Kísérl. Orvostud. **8**, 491 (1956).
8. MIHÁLYI, E.: Enzymologia **14**, 224 (1950).
9. KRAMER, M., PETTKÓ, E., STRAUB, F. B.: Kísérl. Orvostud. **1**, 114 (1950).
10. EDELHOCH, H., KATCHALSKI, E., MAYBURRY, R. H., HUGHES, W. L. JR., EDSALL, J. T.: J. Am. Chem. Soc. **75**, 5058 (1953).
11. FLASCHKA, H.: Scient. Pharmac. **21**, 126 (1953).
12. BIRÓ, N. A., in KOVÁCH, A.: A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. Akadémiai Kiadó, Budapest, Bd. 2. 438 (1954).
13. HASSELBACH, W., SCHNEIDER, G.: Biochem. Z. **321**, 462 (1951).
14. BAILEY, K.: Biochem. J. **43**, 271 (1948).
15. SZENT-GYÖRGYI, A. G.: Arch. Biochem. Biophys. **31**, 97 (1951).
16. DUBUISSON, M.: Biochim. Biophys. Acta **5**, 426 (1950).
17. FEUER, G., MOLNÁR, E., PETTKÓ, E., STRAUB, F. B.: Hung. Acta Physiol. **1**, 150 (1948).
18. DUBUISSON, M.: Muscular Contraction 1954, Thomas, Springfield.
19. BÁRÁNY, M., HARSÁNYI, GY., SPIRÓ, J., HOÓS, E.: XX. Kongress der Ungarischen Physiologischen Gesellschaft, Budapest 1954.
20. BIRÓ, N. A., SZENT-GYÖRGYI, A. G.: Hung. Acta Physiol. **2**, 1 (1949).
21. KUSCHINSKY, G., TURBA, F.: Biochem. Z. **321**, 39 (1950).
22. KUSCHINSKY, G.,TURBA, F.: Biochim. Biophys. Acta **6**, 426 (1951).
23. STRAUB, F. B., FEUER, G.: Biochim. Biophys. Acta **4**, 455 (1950).
24. WEBER, H. H., PORTZEHL, H.: Adv. Protein Chem. **7**, 161 (1952).
25. SZENT-GYÖRGYI, A.: Acta Physiol. Scand. **9**, Suppl. XXVI. 45 (1945).
26. FRAENKEL-CONRAT, H., MECHAM, D. K.: J. Biol. Chem. **177**, 477 (1949).
27. DRAPER, M. H., HODGE, A. J.: Austral. J. Exp. Biol. Med. Sc. **27**, 465 (1949).
28. RÓZSA, G., SZENT-GYÖRGYI, A., WYCKOFF, R. W. G.: Exp. Cell Res. **1**, 194 (1950).
29. SPICER, S. S.: Arch. Biochem. **25**, 369 (1950).
30. SZENT-GYÖRGYI, A.: Chemistry of Muscular Contraction. Academic Press, New York 1947.
31. HARSÁNYI, G., BÁRÁNY, M., SPIRÓ, J.: Acta Physiol. Hung. Suppl. **6**, 71 (1955).
32. WEBER, H. H.: Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry, Brussels (1955) p. 356.
33. GUBA, F., STRAUB, F. B.: Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged **3**, 46 (1943).
34. FRAENKEL-CONRAT, H. in GREENBERG, D. M.: Amino Acids and Proteins 532. Thomas, Springfield 1951.
35. PARRISH, R. G., MOMMAERTS, W. F. H. M.: Arch. Biochem. **31**, 459 (1951).
36. HANSON, J., HUXLEY, H. E.: Symp. Soc. Exper. Biol. **9**, 228 (1955).
37. HANSON, J., HUXLEY, H. E.: Nature **172**, 530 (1953).
38. HASSELBACH, W.: Z. Naturforschung **8/b**, 449 (1953).
39. GUBA, F.: Dissertation, Budapest, 1954.

DIE ENTSTEHUNG VON FLUORAZETYL-COENZYM A UND FLUORAZETYLCHOLIN AUS FLUORESSIGSÄURE UND FLUORZITRONENSÄURE IN GEHIRNEXTRAKTEN

Von

M. WOLLEMANN und G. FEUER

STAATLICHES INSTITUT FÜR NEUROCHIRURGIE, BUDAPEST, UND BIOCHEMISCHES INSTITUT DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, BUDAPEST

(Eingegangen am 24. Juli 1956)

Die Fluoressigsäure ist in der Literatur als Fermentgift bekannt. Aus den Untersuchungen von PETERS und BUFFA [1, 2] weiss man, dass sie im KREBSschen Zyklus die Synthese von Zitronensäure hemmt und dass aus ihr laut nachstehenden Reaktionsmechanismus Fluorzitronensäure entsteht:

$$\text{F-Essigsäure} + \text{Oxalessigsäure} \rightleftharpoons \text{F-Zitronensäure}$$

Die so entstandene F-Zitronensäure vermag im Laufe der weiteren Prozesse nicht, sich umzuwandeln, und hemmt kompetitiv die Akonitaseaktivität [3].

Nach den neuesten Angaben von BRADY [4, 5], ELLIOTT und MARCUS [6, 7] war das synthetisch hergestellte Fluorazetyl-Coenzym A (F-Azetyl-CoA) imstande, das Azetyl-CoA in den folgenden Reaktionen zu ersetzen: Phospho- und Thioltransazetylierung, Arylaminazetylierung, Azetoazetataktivierung, Zitronensäurekondensierung, Azetylierung von p-Nitroanilin. In einem Teil der Reaktionen hemmen das F-Azetyl-CoA und das Azetyl-CoA, wenn sie zusammen gegeben werden, kompetitiv den Ablauf der Reaktion.

In eigenen Experimenten [8] wurde zur gleichen Zeit mit den neuesten Untersuchungen der anderen Forscher [4—7] zu klären versucht, ob die Fluoressigsäure und die Fluorzitronensäure in Gegenwart des aus dem Rindergehirn isolierten Fermentes an der Synthese des Azetyl-CoA bzw. des Azetylcholins teilnehmen oder ob sie diese Prozesse hemmen.

Methoden

Präparation der Substrate: Fluorzitronensäure wurde nach der Methode von PETERS, WAKELIN und BUFFA [1] mit Hilfe des aus der Hundeniere präparierten Ferments aus Fluorazetat und Fumarsäure hergestellt. Das entstehende Produkt wurde gereinigt und an einem Ionenaustauscher (Amberlite IR-4B) fraktioniert. In der Fluorzitronensäure enthaltenden Fraktion war nach unseren Untersuchungsergebnissen weder freie Zitronensäure noch Fluorazetat vorhanden. Die Reinheit des erhaltenen Produkts wurde auch papierchromatographisch kontrolliert, und zwar in einem Lösungsmittel aus Propanol-NH_3-Wasser im Verhältnis 6 : 1 : 3 auf Filtrierpapier Schleicher-Schüll Nr. 2043/a. Nach der Wanderung wurden die Säuren mit Phenolrotindikator entwickelt. Die Ergebnisse waren: F-Zitronensäure $R_f = 0{,}85$, Zitronensäure $R_f = 0{,}45$ und F-Azetat $R_f = 0{,}57$.

Die Fluoressigsäure wurde uns freundlicherweise von GY. OLÁH und A. PAVLÁTH vom Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität, Budapest überlassen, wofür auch hier gedankt sei.

CoA wurde teils nach der Methode von BEINERT und Mitarbeitern [9] aus Schweineleber isoliert und teils das Präparat der Firma Light & Co. benutzt. Die Herstellung von Azetyl-CoA erfolgte nach der Methode von WILSON [10].

Das von uns verwendete Adenosintriphosphat- (ATP-) Na war ein Präparat der Firma Richter, Budapest, das Diisopropylfluorphosphat (DFP) ein solches der Firma Východočeské Chemické Závody (Neoglaucit).

Bestimmungen: Die gebundene Azetylgruppe wurde in Form von Azethydroxamsäure nach der Methode von LIPMANN und TUTTLE [11] gemessen.

Die Bestimmung von Azetylcholin erfolgte nach der von FELDBERG [12] modifizierten Methode von CHANG und GADDUM [13] am M. rectus abdominis des Frosches.

Die papierchromatographische Bestimmung der Azetylderivate geschah nach der Methode von WHITTAKER und WIJESUNDERA [14]. Es wurde so vorgegangen, dass die Fermentaktivität durch Fällung des Reaktionsgemisches mit dem 3fachen Volum sauren Äthanol (pH 4,5) abgestellt und das enteiweisste Filtrat im Vakuum bei 40° C eingedampft wurde. Mit den Lösungen wurden aufsteigende Chromatogramme angefertigt, indem sie auf Filtrierpapier Schleicher-Schüll Nr. 2043/b bei Zimmertemperatur in einem Lösungsmittel von n-Propanol-Ameisensäure-Wasser im Verhältnis 8 : 1 : 1 wandern gelassen wurden. Die Entwicklung erfolgte mit in Äthylalkohol gelöstem alkalischem Hydroxylamin und mit in Äther gelöstem saurem Ferrichlorid. Bei der quantitativen Azetylcholinbestimmung fand die Extraktion aus dem unentwickelten Papier mit eserinhaltiger Ringerlösung (pH 4,5) statt, und zwar entsprechend dem Ort des Kontrollflecks.

Extraktion und Isolierung des Ferments: Die zu dem Versuch benötigten Fermente wurden aus Rindergehirn bereitet. Das Rindergehirn stammte unmittelbar vom Schlachthof, wurde in Eis geliefert und eine Stunde nach dem Eintreten des Todes aufgearbeitet.

Die aus dem Rindergehirn hergestellten Fermente wurden nach unserer eigenen Methode [15] extrahiert und isoliert. Diese Methode ist im Wesen eine Modifikation des Verfahrens von NACHMANSOHN [16]. Bei der von Azetat bzw. Fluorazetat ausgehenden Synthese wurden die mit 35—60%igem Ammoniumsulfat umgefällten Fraktionen, bei der von Zitrat bzw. Fluorzitrat ausgehenden Synthese die mit 0—35%igem Ammoniumsulfat umgefällten Fraktionen benutzt.

Ergebnisse

I. Die Entstehung von F-Azetyl-CoA und F-Azetylcholin in Gegenwart von Fluorazetat

LIPTON und BARRON [17] beschrieben schon im Jahre 1946, dass Fluoressigsäure in einer Endkonzentration von 0,02 *M* die auf Wirkung von Ferment aus Rattengehirn vor sich gehende Azetylcholinsynthese in Gegenwart von Glukose und Brenztraubensäure nicht hemmte, sondern eher steigerte.

Diese Beobachtung konnte auch in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Es wurde der Extrakt eines azetongetrockneten Rindergehirnpulvers mit Ammoniumsulfat fraktionert. Die Untersuchung der verschiedenen Fraktionen in Gegenwart von Azetat bzw. Zitrat ergab, dass die Fluoressigsäure bzw. die Fluorzitronensäure die Synthese von Azetyl-CoA und Azetylcholin nicht hinderte, sondern steigerte. Wurde die Fluoressigsäure bzw. die Fluorzitronensäure allein hinzugefügt, so waren diese Verbindungen auch allein imstande, in Gegenwart von ATP und CoA sowie auf Wirkung des Fermentes Azetyl-CoA bzw. Azetylcholin zu bilden.

In der Tabelle I sind die Angaben der Bildung von Azetyl-CoA in Gegenwart von 0,02 *M* Fluorazetat auf Wirkung von aus Rindergehirn isoliertem Ferment zusammengestellt. Der Versuch zeigt, dass im Falle des vollständigen Reaktionsgemisches das zum System hinzugefügte Fluorazetat die Wirksamkeit

des azetataktivierenden Fermentes auf etwa das Doppelte steigert. Unter den angegebenen Versuchsverhältnissen sättigt die verwendete Azetatmenge von 20 μM das System, während eine weitere Erhöhung der Azetatmenge keine Zunahme der Azethydroxamsäure zur Folge hat. Wenn dem System von aussen kein Azetat zugegeben wird, lässt sich dennoch eine Steigerung auf mehr als das Doppelte im Vergleich zum Kontrollwert beobachten.

Tabelle I

Die Bildung von Azetyl-CoA in Gegenwart von Fluorazetat mit Hilfe des aus Rindergehirn mit Ammoniumsulfat fraktionierten Fermentsystems

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches: 10 μM ATP, 0,4 μM CoA, 100 μM Phosphatpuffer (pH 7,4), 20 μM Cystein, 200 μM Hydroxylamin, 10 μM $MgSO_4$, 20 μM Azetat, 1 ml einer mit 35—60%-igem Ammoniumsulfat gesättigten Fraktion (16 mg/ml Eiweiss) in einem Gesamtvolumen von 2 ml, 45 Minuten inkubiert bei 37° C.

	Azetat aktivierende Fermentaktivität μM Azethydroxamsäure/mg Eiweiss [9]	
	—	+ 20 μM F-Azetat-Na
1. Vollständiges Reaktionsgemisch	0,087	0,175
2. Ohne Azetat	0,035	0,205
3. Ohne ATP und CoA	0,0	0,0

Auf Grund des Versuches ist die Annahme berechtigt — da sich die Fluoressigsäure im System nicht spaltet —, dass sich die Fluoressigsäure infolge der Wirkung des im gereinigten Gehirnextrakt befindlichen Fermentes unmittelbar an das CoA bindet, so dass anstatt Azetyl-CoA nun F-Azetyl-CoA entsteht.

Diese Annahme wird von den papierchromatographischen Versuchen unterstützt. Wird das im vorigen Versuch verwendete vollständige Reaktionsgemisch auf die oben beschriebene Weise behandelt und nach der Methode von WHITTAKER [14] papierchromatographisch untersucht, so beträgt der R_f-Wert des entstandenen Flecks 0,323, was dem R_f-Wert von 0,317 des als Kontrolle gewanderten Azetyl-CoA entspricht. Wenn dem Gemisch Fluorazetat an Stelle von Azetat zugegeben wurde, verändert sich der R_f-Wert auf 0,522. Das CoA allein bildet keinen Fleck.

Der R_f-Wert des vermuteten Fluorazetyl-CoA konnte in Ermangelung eines entsprechend reinen Präparates nicht kontrolliert werden.

Zu ganz ähnlichen Ergebnissen gelangte man bei der von uns durchgeführten Untersuchung der Azetylcholinbildung. Aus Tabelle II ist ersichtlich, dass sich im Falle des vollständigen Reaktionsgemisches in Gegenwart von Fluorazetat die doppelte Menge Azetylcholin synthetisiert. Wird nämlich dem System kein Azetat zugefügt, sondern nur 0,02 M Fluoressigsäure, so bildet sich im Vergleich zur Kontrolle doppelt soviel Azetylcholin.

Aus diesem Versuch darf der Schluss gezogen werden, dass sich das Fluorazetat auf Wirkung des Fermentes nicht nur an das CoA zu binden vermag, sondern dass im Laufe der weiteren Umwandlung wahrscheinlich Fluorazetylcholin entsteht. Da das Azetylcholin und das Fluorazetylcholin eine sehr ähnliche chemische Struktur aufweisen, lässt sich mit der angewandten Bestim-

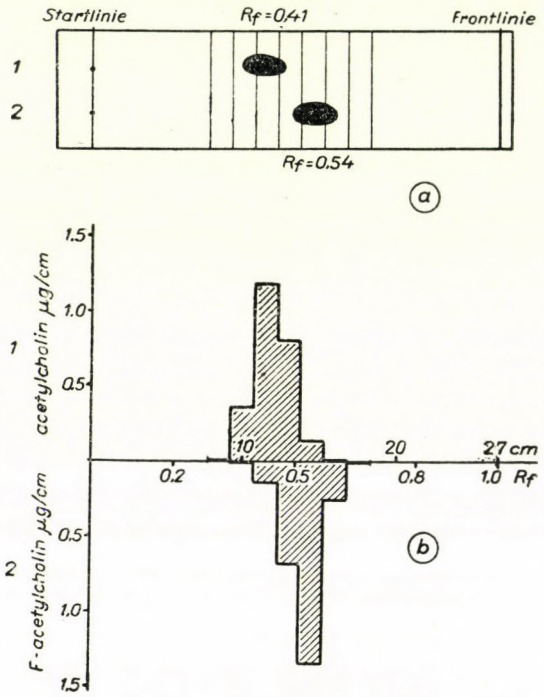


Abb. 1. Die Entstehung von Azetylcholin und Fluorazetylcholin auf Wirkung des aus Gehirngewebe isoliertem Fermentsystems in Gegenwart von Azetat bzw. Fluorazetat. Zusammensetzung des Reaktionsgemisches s. Tabelle II

a) Chromatogramm. — 1: Azetylcholin entsprechender Fleck. — 2: F-Azetylcholin entsprechender Fleck
Auf Grund der Methode von WHITTAKER und WIJESUNDERA (14)

b) Bestimmung — Verteilung der Cholinester auf dem Chromatogramm, gemessen im biologischen Test nach der Methode von CHANG und GADDUM (13)
1: Azetylcholin. — 2: F-Azetylcholin

mungsmethode am M. rectus abdominis des Frosches kein Unterschied zwischen ihnen nachweisen.

Die mit dem obigen Reaktionsgemisch in analoger Weise ausgeführten papierchromatographischen Versuche [12] führten zu den nachstehenden Ergebnissen: Der R_f-Wert des Fleckens des im Reaktionsgemisch entstandenen Azetylcholins beträgt 0,462, im Vergleich zum Standardwert des Azetylcholins von 0,47. Wurde dem Reaktionsgemisch Fluorazetat statt Azetat zugegeben,

so machte der R_f-Wert 0,582 aus, und wenn Azetylcholin zusammen mit Fluoressigsäure wandern gelassen wurde, ergab sich ein etwas höherer R_f-Wert für Azetylcholin, nämlich 0,498.

Da die Unterschiede im R_f-Wert hier nicht so gross sind wie beim Azetyl-CoA, wurden die Flecken in kleinere Felder unterteilt, die unentwickelten

Tabelle II

Die Synthese von Azetylcholin in Gegenwart von Fluorazetat mit Hilfe des aus Rindergehirn mit Ammoniumsulfat fraktionierten Fermentsystems

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches: 30 μM Phosphatpuffer (pH 7,4), 20 μM Cystein, 20 μM $MgSO_4$, 20 μM Na-Azetat, 5 μM ATP, 0,4 μM CoA, 2,5 μM Cholinchlorid, 0,1 μM DFP in 1 ml + 1 ml einer mit 35—60 %igem Ammoniumsulfat gesättigten Fraktion (16 mg Eiweiss/ml), 1 Stunde inkubiert bei 37° C. Reaktionsgemisch mit 0,4 ml 20%iger Trichloressigsäure gefällt, zentrifugiert, das Filtrat mit dem 3fachen Volum Äther zur Entfernung der Trichloressigsäure ausgeschüttelt, vor der Bestimmung neutralisiert.

	Cholinazetylaseaktivität μM Azetylcholin/mg Eiweiss [11]	
	—	+ 20 μM F-Azetat-Na
1. Vollständiges Reaktionsgemisch	0,0183	0,0366
2. Ohne Azetat	0,0061	0,0325
3. Ohne ATP und CoA	0,0032	0,0061

Teile der Papierstreifen mit 4 ml saurer, eserinhaltiger Ringerlösung 20 Min. bei Zimmertemperatur extrahiert und dann nach Neutralisation die Azetylcholinmenge am M. rectus abdominis des Frosches bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 1 veranschaulicht.

Auch dieses Versuchsergebnis unterstützt die Annahme, dass sich aus Fluorazetat über Fluorazetyl-CoA Fluorazetylcholin bildet.

II. Die Bildung von F-Azetyl-CoA und F-Azetylcholin in Gegenwart von Fluorzitrat

Im anderen Teil unserer Versuche wurde untersucht, ob das Fluorzitrat, wenn man es an Stelle von Zitrat in dem zitrataktivierenden Fermentsystem benutzt, die Reaktion hemmt oder steigert bzw. ob es imstande ist, das Zitrat zu ersetzen.

In der Tabelle III sind die Daten eines Versuches angegeben, aus dem die Bildung von Azetyl-CoA auf Wirkung von Zitrat und dem von uns auf fermentativem Wege hergestellten und isolierten Fluorzitrat [1] ersichtlich ist.

In dem in der nächsten Tabelle vorgeführten Versuch wurde die Synthese von Azetylcholin aus Fluorzitrat in Gegenwart von ATP, CoA und Cholin ähnlich wie bei dem Versuch mit Fluorazetat untersucht.

Tabelle III

Die Bildung von Azetyl-CoA in Gegenwart von Fluorzitrat mit Hilfe des aus Rindergehirn mit Ammoniumsulfat fraktionierten Fermentsystems

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches: wie in Tabelle I, doch statt Azetat 20 μM Zitrat + 1 ml einer mit 0—35%igem Ammoniumsulfat gesättigten Fraktion (14 mg/ml Eiweiss)

	Zitrat aktivierende Fermentaktivität μM Azethydroxamsäure/mg Eiweiss [9]	
	—	+ ca. 100 E F-Zitrat
1. Vollständiges Reaktionsgemisch	0,18	0,2
2. Ohne Zitrat	0,068	0,14
3. Ohne ATP und CoA	0,0	0,0

Auf Grund der in den Tabellen III und IV beschriebenen zwei Versuche ist also anzunehmen, dass sich das Fluorazetat reversibel zu Fluorazetyl-CoA

Tabelle IV

Die Synthese von Azetylcholin in Gegenwart von Fluorzitrat mit Hilfe des aus Rindergehirn mit Ammoniumsulfat fraktionierten Fermentsystems

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches: wie in Tabelle II, doch statt Azetat 20 μM Zitrat + 1 ml einer mit 0—35%igem Ammoniumsulfat gesättigten Fraktion (14 mg/ml Eiweiss)

	Cholinazetylaseaktivität μM Azetylcholin/mg Eiweiss [11]	
	—	+ ca. 100 E F-Zitrat
1. Vollständiges Reaktionsgemisch	0,044	0,048
2. Ohne Zitrat	0,014	0,047
3. Ohne ATP und CoA	0,002	0,003

umwandelt und dass sich aus ihm in Gegenwart von Cholin Fluorazetylcholin bildet. Leider konnten diese Versuche nicht mit synthetischer Fluorzitronensäure wiederholt werden, da diese Verbindung nicht zur Verfügung stand.

Besprechung

Mit Hilfe eines aus Rindergehirn isolierten Fermentsystems wurde die Synthese von Azetyl-CoA bzw. Azetylcholin untersucht, indem dem System an Stelle von Azetat bzw. Zitrat Fluorazetat bzw. Fluorzitrat zugegeben wurde. Es konnte beobachtet werden, dass keine dieser Verbindungen die Bildung von Azetyl-CoA bzw. Azetylcholin hemmt und dass aus ihnen, auch wenn sie nur allein gegeben werden, Azetyl-CoA und Azetylcholinabkömmlinge entstehen.

Mit Hilfe der papierchromatographischen Untersuchung wurde nachgewiesen, dass die R_f-Werte der so erhaltenen Produkte nicht denen des Azetyl-

CoA bzw. Azetylcholins gleich waren. Schon auf Grund dieser Abweichungen darf auf eine Bildung der entsprechenden Fluorderivate geschlossen werden. Der endgültige Beweis dafür hätte allerdings dann erbracht werden können, wenn synthetisches Fluorazetylcholin, Fluorazetyl-CoA bzw. Fluorzitronensäure zur Verfügung gestanden hätte.

Die Ergebnisse unserer Versuche stimmen zum Teil mit den gleichzeitig mit unserer Arbeit [8] erschienenen Literaturangaben überein. So beschrieb BRADY [4, 5] die Präparation von F-Azetyl-CoA und stellte dabei fest, dass diese Verbindung metabolisch aktiv ist und in Gegenwart der aus verschiedenen Geweben isolierten Transazetylasen leicht reagiert, sowie dass aus ihr auf Wirkung eines kondensierenden Fermentes in Gegenwart von Oxalessigsäure Fluorzitronensäure entsteht. MARCUS und ELLIOTT [6, 7] fanden in Gegenwart von azetylierendem Ferment aus Taubenleber, dass die F-Essigsäure auch im Falle von Aminazetylierung und Zitratsynthese enzymatisch aktiv ist. Auch diese Angaben beweisen die Verwendung des synthetisch hergestellten Fluorazetyl-CoA in verschiedenen Fermentsystemen [4, 5, 6, 7].

Unsere Versuche mit Fermenten aus Gehirngeweben deuten darauf hin, dass die Aktivität der Azetyl-CoA und Azetylcholin synthetisierenden Fermente nicht streng spezifisch für das Substrat ist. Diese Folgerung wird auch durch die Ergebnisse bei anderen von uns durchgeführten Untersuchungen unterstützt [18].

Unsere Ergebnisse stehen mit den Folgerungen im Einklang, zu denen BUFFA, PETERS und WAKELIN [1] auf Grund ihrer Untersuchungen gelangten. In Verbindung damit ist vielleicht zu erwägen, ob die Vergiftungssymptome des Nervensystems und der in vivo Wirkungsmechanismus der Fluoressigsäurevergiftung mit der in vitro nachgewiesenen Anreicherung von Fluorabkömmlingen und infolgedessen mit der Hemmung des KREBSschen Zyklus zusammenhängt. Es erscheint als wahrscheinlich, dass die Entstehung des Fluorazetyl-CoA bzw. des Fluorazetylcholins als Antimetabolite für einen Teil der Vergiftungssymptome verantwortlich ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Wirkung von Fermenten aus Rindergehirngewebe bilden sich aus Fluoressigsäure und Fluorzitronensäure in Gegenwart von CoA, ATP und cholin azetyl-CoA- und azetylcholinähnliche Verbindungen. Nach unserer Annahme sind diese Verbindungen wahrscheinlich mit den entsprechenden Fluorderivaten identisch.

LITERATUR

1. BUFFA, P., PETERS, R. A., WAKELIN, R. W.: Biochem. J. **48,** 467 (1951).
2. PETERS, R. A., WAKELIN, R. W., THOMAS, L. C.: Proc. Roy. Soc. Lond. B. **140,** 497 (1952).
3. MORRISON, J. F., PETERS, R. A.: Biochem. J. **58,** 473 (1954).
4. BRADY, R. O.: Fed. Proc. **14,** 186 (1955).
5. BRADY, R. O.: J. Biol. Chem. **217,** 213 (1955).
6. ELLIOT, W. B., MARCUS, A.: Fed. Proc. **14,** 207 (1955).

7. MARCUS, A., ELLIOT, W. B.: J. Biol. Chem. **218,** 823 (1956).
8. WOLLEMANN, M.: Acta Physiol. Hung. 9. Suppl. 13, 1956. Vorgetragen am XXI. Kongress der Ungarischen Physiologischen Gesellschaft Szeged 30. Juni — 2. Juli 1955.
9. BEINERT, H., VON KORFF, R. W., GREEN, D. E., BUYSKE D. E., HANDSCHUMACHER, R. E., HIGGINS, H., STRONG, F. M.: J. Am. Chem. Soc. **74,** 854 (1952).
10. WILSON, I. B.: J. Am. Chem. Soc. **74,** 3204 (1952).
11. LIPMANN, F., TUTTLE, L. C.: J. Biol. Chem. **159,** 21 (1955).
12. FELDBERG, W.: J. Physiol. **103,** 367 (1945).
13. CHANG, H. C., GADDUM, J. N.: J. Physiol. **79,** 225 (1933).
14. WHITTAKER, V. P., WIJESUNDERA, S.: Bioch. J. **51,** 348 (1952).
15. WOLLEMANN, M., FEUER, GY.: Acta Physiol. Hung. **7,** 329 (1955).
16. BERMAN, N., WILSON, I. B., NAHMANSON, D.: Biochim. et Biophys. Acta **12,** 315 (1953).
17. LIPTON, M. A., GUZMAN-BARRON, E. S.: J. Biol. Chem. **166,** 367 (1946).
18. WOLLEMANN, M., FEUER, G.: Acta Physiol. Hung. **10,** 445 (1956).

Physiologia

OXYGEN AND GLUCOSE CONSUMPTION AND HEXOKINASE ACTIVITY IN VITRO OF BRAIN TISSUE OF RATS IN TRAUMATIC SHOCK*

By

A. G. B. Kovách, A. Fonyó, T. Vittay and G. Pogátsa

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received April 20, 1956)

Present research on shock attributes considerable significance to the biochemical changes taking place in the tissues. Equally grave changes can be shown to occur in the oxygen consumption and in the carbohydrate, phosphorus and protein metabolism [1, 2]. These investigations dealt primarily with the blood, the muscle and the liver ; we have much scantier data on the metabolism of the central nervous system.

It is known, however, that in shock changes do occur in the functioning of the central nervous system. The higher nervous activity tends to be inhibited [3, 4], increased activity of the sympathetic nervous system sets in [5], and reflex deficiencies appear which finally, through suspension of breathing, lead to death [6]. The question is whether it can be shown that cerebral metabolism suffers parallel with those functional derangements.

Earlier studies have raised the possibility that in the terminal stages of shock a decrease in the ATP and phosphocreatine P content of the brain might be demonstrable [7, 8, 9]. From the literary data on cerebral O_2 consumption no integrated opinion can be formed.

Kovách, Takács, Roheim, Kiss and E. Kovách [10], when investigating the carbohydrate metabolism of muscle, showed that there is an inhibition in the glucose uptake *in vitro* of the diaphragm of rats in traumatic shock. In muscle extract, the hexokinase activity in some cases also showed an inhibition. It was found that this inhibition of glucose uptake could be counteracted with insulin.

In the present work, studying cerebral carbohydrate metabolism, we undertook to clarify whether the biochemical changes which occur in muscle and liver may also be demonstrable in nerve tissue.

* Lecture held at the 1954 Meeting of the Hungarian Physiological Society [32].

Methods

The experiments were made on 109 of our own inbred female adult rats. The weight of the animals used in the hexokinase tests was 200 to 300 g; in the other experiments rats weighing between 130 and 180 g were used.

Traumatic shock was induced by freezing with liquid air both hind legs of the animals, under light ether anaesthesia [11]. The animals were killed and worked up not at a fixed time after the trauma but according to their condition: after severe adynamia when coma had set in. In most cases we waited for the last respiratory phase (gasping).

Anoxic anoxia was induced in a low pressure chamber. The animals were put into an exsiccator in which the pressure varied between 160 and 180 Hg mm, and where the air was constantly changed. The animals were kept for 120 minutes in the exsiccator. Most of them survived the anoxia, though some died while still shut up. These we did not work on. In the exsiccator the animals produced the symptoms usual to severe anoxia (cyanosis, dispnoe).

Hexokinase activity was determined in an aqueous extract of the entire cerebrum in the presence of NaF, ATP and glucose in an atmosphere of 5% CO_2 —95% N_2, as described by COLOWICK, CORI and SLEIN [12]. The activity was deduced from the amount of glucose consumed, as our experiments confirmed the opinion of the above authors that manometric determination does not give results that can be evaluated quantitatively Glucose was determined after precipitation with $Ba(OH)_2$ — $ZnSO_4$, by SOMOGYI's method [13]. In every case the experiment was completed within 35 to 40 minutes after killing the animal.

The oxygen consumption of the cortical slices was determined in a KREBS–HENSELEIT (14) phosphate buffer solution in a 100% O_2 atmosphere. To know the glucose concentration before the incubation and at the end of the experiment, we calculated the quantity of disappeared glucose. With the slices the measurements were continued for 40 minutes and were ended within 70 minutes after killing the animal.

The aerobic glucose consumption of the whole brain homogenate was measured in air atmosphere in ELLIOT's solution [15]. Homogenation was performed in this same medium with a POTTER—ELVEHJEM homogenator [16].

All our results are given in terms of initial moist weight, inasmuch as there is no difference in the water content of the brains of normal animals and those in shock [11].

Statistical evaluation of the results was made by the STUDENT „t" test [17].

Results

a) *Oxygen and glucose consumption of the cortex, in vitro*

The oxygen consumption of slices prepared from the brains of normal animals had a mean value of 108,0 $\pm$ 2,8 μ mol/g/hr (2,42 μl/mg/hr). Glucose disappeared at a rate of 28,7 $\pm$ 0,71 μ mol/g/hr. The consumption falling to 1 μ mol glucose disappearance was expressed by the O_2/glucose quotient. This, in the normal case, gave a result of 3,68 $\pm$ 0,16 (Table I).

In animals in shock the oxygen consumption had a mean value of 118,1 $\pm$ $\pm$ 2,2 μ mol/g/hr (2,65 μl/mg/hr), which was higher than the values in the normal series. The difference is statistically significant; $p < 0{,}02$. The mean value for glucose disappearance in these animals was 31,3 $\pm$ 1,23 μ mol/g/hr, also more than the normal. Evaluated statistically, the difference did not reach the limits of significance: $0{,}10 > p > 0{,}05$. The O_2/glucose quotient was 3,86 $\pm$ 0,16, *i. e.* it corresponded to that of the control group (Table I).

Investigating the cerebral glucose consumption in the homogenate, the normal rats (8 cases) consumed 4,02 $\pm$ 0,40 μ mol glucose in 30 minutes; 8,64 $\pm$ 0,40 in 60 min; and 12,0 $\pm$ 0,54 μ mol in 90 min. The corresponding

values for the animals in shock (7 cases) were : 3,71 ± 38 in 30 min ; 7,85 ± 0,62 in 60 min ; and 11,5 ± 1,0 μ mol in 90 minutes. The statistical evaluation showed no difference, the p value in both cases was above 0,5 (Table II).

Table I

Oxygen and glucose consumption of cortical slices

Normal			Shock		
μM/g/hr			μM/g/hr		
O_2	Glucose	$\frac{O_2}{\text{Glucose}}$	O_2	Glucose	$\frac{O_2}{\text{Glucose}}$
106,5	30,7	3,46	115,5	31,8	3,62
118,0	—	—	114,5	31,6	3,62
114,5	30,8	3,72	114,0	—	—
112,0	27,3	4,10	—	36,8	—
—	27,3	—	126,0	34,0	3,70
96,5	27,2	3,55	—	28,7	—
106,5	27,0	3,94	121,0	28,7	4,21
102,0	30,6	3,33	122,5	—	—
			115,0	27,4	4,20
			109,0	—	—
			126,0	—	—
108,0	28,7	3,68	118,1	31,3	3,86
± 2,8	± 0,71	± 0,16	± 2,2	± 1,23	± 0,16

b) *Hexokinase activity of the brain*

In our first series of experiments the hexokinase activity of normal rat brain as expressed in disappearance of glucose was 3,34 ± 0,08 mg/g brain

Table II

Glucose consumption of brain homogenate

Normal			Shock		
μM/g			μM/g		
30′	60′	90′	30′	60′	90′
4,02	8,64	12,00	3,71	7,85	11,50
± 0,40	± 0,40	± 0,54	± 0,38	± 0,62	± 1,00

5 min. The cerebral hexokinase activity of shock animals tested at the same time was higher : 4,05 ± 0,08 mg/g brain. (The difference between the two groups is significant : $p < 0,01$.) Insulin did not affect consumption either in the normal animal or those in shock (see Table III).

Table III

Hexokinase activity of aqueous extract in shock

Normal		Shock	
mg glucose/g brain/5′		mg glucose/g brain/5′	
3,47	3,00	4,20	3,50
3,40	4,60	4,87	4,40
4,14	3,27	4,44	
2,97	2,95	4,04	
3,60	2,19	3,97	
3,13	2,20	4,09	
3,37	4,13	2,97	
3,30	3,34	3,60	
3,65	3,17	4,20	
3,45	3,37	4,05	
3,15	3,40	4,65	
3,30	3,70	3,90	
3,34 ± 0,08		4,05 ± 0,08	

In succeeding experiments we also determined the cerebral activity of animals in an early stage of shock. It was found that, as against the normal

Table IV

Hexokinase activity of aqueous brain extract in early shock

Normal	Early shock
mg glucose/g brain/5′	mg glucose/g brain/5′
3,33	3,40
3,49	3,64
3,51	3,66
3,53	4,34
3,53	4,48
3,54	4,82
3,58	4,99
3,70	5,10
	5,13
	5,16
3,53 ± 0,3	4,47 ± 2,1

3,53 ± 0,03 mg glucose per g brain per 5 minutes, the brains of the rats in shock consumed 4,47 ± 0,21 mg in five minutes. The difference is statistically significant : $p < 0,01$ (See Table IV).

In arterial anoxia the cerebral hexokinase activity was found to fall from the normal value of 3,94 $\pm$ 0,09 to 2,73 $\pm$ 0,12 mg per g brain per 5 minutes. This decrease is statistically highly significant : $p < 0{,}001$ (See Table V).

Table V

Hexokinase activity of aqueous brain extract in anoxia

Normal	Anoxia
mg glucose/g brain/5′	mg glucose/g brain/5′
3,84	2,85
3,60	2,60
4,37	2,34
3,58	2,77
4,01	2,73
4,16	2,49
3,80	3,36
4,12	
3,94$\pm$0,9	2,73$\pm$1,2

Discussion

We found that in traumatic shock the glucose consumption of brain tissue, as tested on slices, increases to a slight degree (not, however, statistically significant) ; in a homogenate it remains unchanged. The hexokinase activity of brain extract increases *in vitro*. A similar rise can be shown in cerebral oxygen consumption in the final stages of shock.

According to our present findings, therefore — and differing from those on muscle — a decrease in glucose uptake of the brain tissue cannot be demonstrated in the animal in shock. KOVÁCH et al. [10] have shown that the decrease in glucose absorption in the muscle is due to hormonal factors, hormones liberated from the pituitary and suprarenal glands, for after extirpation of either the decline in uptake ceases. This pituitary hormone may be either the factor described by CORI et al.[18] in diabetes, or is perhaps identical with the growth hormone itself, as the latter also has an inhibitory effect on glucose absorption [19]. According to our experiments, this substance does not exert an influence on brain tissue in shock. This agrees with the fact that the diabetic brain also shows no decrease in glucose utilization, either *in vivo* or *in vitro* [20], while there is inhibition of glucose uptake in the muscle in diabetes, similar to that found in shock. Neither can the inhibitory factor be demonstrated in diabetic brain extract, though the substance added to the extract is effective *in vitro*

[21]. The hexokinase activity of the brain in shock — similar to that in diabetes — was not inhibited, in fact, according to the statistical evaluation of our results, there was some augmentation.

As an explanation of the difference observed between the brain and the muscle, the possibility suggests itself that the factor which creates the inhibition in the muscle on the periphery cannot cross the haemato-encephalic barrier. It may be a question of a regulating phenomenon of a kind that protects the metabolism of brain tissue, rendering it independent of the effects of hormones, of substances liberated in the organism and influencing metabolism in general.

In these experiments we found an augmented hexokinase activity in shock. What can be the explanation for this? It may be that there is an increase in some activating substance, or, that in shock, because of injury to the structure, part of the bound hexokinase turns into a soluble form [28], and, as in our experiments it was in the supernatant that we determined the activity, that is the reason why the activity was found higher in shock. As evidence against this, in anoxia, where it may be supposed that the structural damage is similar according to PALLADIN [23], cerebral hexokinase activity does not increase, but on the contrary, diminishes. In the investigations we made along these lines we obtained similar results, not only in ischaemic anoxia studied by PALLADIN, but also in arterial hypoxia. That is to say, we confirmed the finding that hexokinase activity is inhibited in anoxia. Though hypothetically there is less of a decrease in cerebral circulation due to circulatory reflexes than in the other organs, in the final stages of shock pronounced anoxia occurs also in the brain, and at the same time hexokinase activity is greater. These findings raise the possibility that in our shock experiments we measure the resultant of conflicting effects and perhaps must reckon with stronger activating factors than the anoxia-decreasing effect.

We are familiar with various works in the literature which show that preliminary anoxia damages the oxidative processes of the tissues. SCHMIDT [24] and SCHMIDT et al. [25] have shown that in dogs and monkeys prolonged cerebral anaemia irreversibly lowers oxygen consumption. According to FUHRMANN et al. [26], acute anoxia does not diminish cerebral oxygen consumption.

Studying brain slices *in vitro*, WILHELMI et al. [27] found that in anoxia oxygen consumption is reduced. As it is known that in shock there is on the one hand anoxia, and, further, that there is also a lowering of the organism's metabolism and oxygen consumption, it is a very important consideration whether the reduction is brought about merely by an impairment of the circulation, or whether, in addition to this, there is impairment in the oxygen consumption and requirement of the tissues.

In the literature there are ample data on cerebral oxygen consumption in shock, bearing on both *in vivo* and *in vitro* experiments, but opinion on the subject is not uniform. Concerning *in vivo* experiments, reference must be

made to BLALOCK [28], who described that the arterio-venous oxygen difference is greatly increased in shock, but he did not measure directly the cerebral circulation simultaneously with the arterio-venous oxygen determination, so that no conclusions can be drawn from his experiments concerning cerebral oxygen consumption. KOVÁCH, ROHEIM, IRÁNYI, KISS, GOSZTONYI and E. KOVÁCH found experiments *in vivo* that in ischaemic shock the greater arterio-venous difference is primarily due to an impaired circulation, though in addition to this an increase in O_2 consumption is also suspected [29]. The experiments *in vitro* reported in the literature refer to haemorrhagic shock. We are familiar with no works on traumatic shock in this respect. BEECHER and CRAIG [31], working on cats, found no change in oxygen consumption either in the cortex or in the kidney, liver and heart muscle, but their observations refer to acute haemorrhage rather than grave, irreversible shock. ROSENTHAL et al. [31], also working on cats, did not register a change in oxygen consumption in the brain tissue homogenate of animals in severe haemorrhagic shock. WILHELMI et al. [27] noted a diminution of oxygen consumption in some of the rats in haemorrhagic shock in the final stages, but the values obtained for the rest of the animals were normal, while at the same time in the liver a great reduction in oxygen consumption occurred.

Our own results in traumatic shock indicate that a decrease in O_2 consumption cannot be found, even in the final stages. In fact, a certain degree of rise may be observed. We do not consider the difference to be sufficiently great (though statistically it was significant) when taking into consideration the limitation of the WARBURG method for any far-reaching conclusions to be drawn from it. On the other hand, our observation supports the findings *in vivo* [29]. At all events, our results suggest that in traumatic shock the oxygen need of the brain tissue is not decreased. But neither may we leave out of consideration the possibility that the fundamental difference between measurements *in vivo* and *in vitro* also comes into play. *In vitro* the medium changes and the eventually present active substances are so diluted that they change the results obtained *in vivo*.

As oxygen consumption diminishes in anoxia, and as in shock, particularly in its final stages, there is also pronounced stagnating anoxia in the brain, the question must be raised as to what causes the difference between the shocked and the purely anoxic brain. The difference is the more suggestive as divergences of a similar trend also occur in glucose consumption and hexokinase activity. It is obvious that the biochemical changes occurring in the brain in shock are not exclusively consequences of anoxia ; other factors also come into play.

SUMMARY

Investigating cerebral carbohydrate metabolism in traumatic shock induced by freezing with liquid air, it has been found that

(i) there is no difference in glucose consumption of slices or homogenate of the cortex.

(ii) in shock there is a marked increase in hexokinase activity. In anoxia – confirming PALLADIN's investigations — we found a decrease in hexokinase activity.

(iii) O_2 consumption of cortical slices from rats in shock rises to a statistically significant degree in the final stages of shock.

LITERATURE

1. WIGGERS, C. J.: Physiology of shock. Commonwealth Fund. New York (1950).
2. KOVÁCH, A. G. B.: Z. ärztl. Fortbild. **49,** 679 (1955).
3. GZGZYAN, P. M.: *(Гзгзян, П. М.):* Физиол. Ж. **40,** 396 (1954).
4. BIRÓ, J., BÜKI, B., KOVÁCH, A.: Acta Physiol. Hung. **8,** (1956).
5. CANNON, W. B.: Traumatic shock. Appleton. New York. (1923).
6. DAVIS, H. A.: Shock and allied forms of failure of the circulation, Grune and Stratton New York, (1949).
7. LE PAGE, G. A.: Am. J. Physiol. **147,** 446. (1946).
8. KOVÁCH, A. G. B., BAGDY, D. BALÁZS, R., ANTONI, F., GERGELY, J., MENYHÁRT, J., IRÁNYI, M., KOVÁCH, E.: Acta Physiol. Hung. **3,** 331 (1952).
9. STONER, H. B., THRELFALL, C. J.: Biochem. J. **58,** 115 (1954).
10. KOVÁCH, A. G. B., TAKÁCS, L., ROHEIM, P., KISS, S., KOVÁCH, E.: Acta Physiol. Hung. **3,** 357 (1952).
11. KOVÁCH, A. G. B., CSÁKI. T. Z.: Arch. Biol. Hung. **18,** 390 (1948).
12. COLOWICK, S. P., CORI, C. C., SLEIN, M. W.: J. Biol. Chem. **168,** 583 (1947).
13. SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem. **160,** 61 (1945).
14. KREBS, H. A., HENSELEIT, K.: Z. physiol. Chem. **210,** 3 (1932).
15. ELLIOT, K. A. C., LIBET, B.: J. Biol. Chem. **143,** 227 (1942).
16. POTTER, V. R., ELVEHJEM, C. A.: J. Biol. Chem. **114,** 495 (1936).
17. HETÉNYI, G. JUN.: Statisztikai módszerek, in Kovách : A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. Vol. 2, Akadémiai Kiadó, Budapest (1954).
18. KRAHL, M. E., CORI, C. F.: J. Biol. Chem. **170,** 607 (1947).
19. PARK, C. R., KRAHL, M. E.: J. Biol. Chem. **181,** 247 (1949).
20. HIMWICH, H. E.: Brain metabolism and cerebral disorders. Williams and Wilkins, Baltimore (1951).
21. PRICE, W. H., CORI, C. F., COLOWICK, S. P.: J. Biol. Chem. **160,** 633 (1945).
22. CRANE, R. K., SOLS, A.: J. Biol. Chem. **203,** 273 (1953).
23. PALLADIN, A. V. *(Палладин, А. В.):* Доклады Акад. Наук СССР. **91,** 347 (1953).
24. SCHMIDT, C. F.: Am. J. Physiol. **84,** 223 (1928).
25. SCHMIDT, C. F., KETY, S. S., PENNES, H. H.: Am. J. Physiol. **143,** 33 (1945).
26. FUHRMAN, F. A., FUHRMAN, G. J., FIELD, J.: Am. J. Physiol. **144,** 87, (1945).
27. WILHELMI, A. E., RUSSEL, J. A., LONG, C. N. H.: Am. J. Physiol. **144,** 683 (1945).
28. BLALOCK, A.: Arch. Surg. **49,** 164 (1944).
29. KOVÁCH, A. G. B., ROHEIM, P., IRÁNYI, M. KISS, S., GOSZTONYI, G., KOVÁCH, E.: Acta Physiol. Hung. Suppl. **6.** 26 (1954).
30. BEECHER, H. K., CRAIG, F. N.: J. Biol. Chem. **148,** 383 (1943).
31. ROSENTHAL, O., SHENKIN, H., DRABKIN, P. L.: Am. J. Physiol. **144,** 334 (1945).
32. FONYÓ, A., KOVÁCH, A. G. B., VITTAY, T., POGÁTSA, G.: Acta Physiol. Hung. Suppl. **6.** 25 (1954).

EFFECT OF METABOLISM-INCREASING OR -DECREASING SUBSTANCES ON THE SUSCEPTIBILITY OF RATS TO SHOCK*

By

A. G. B. KOVÁCH, L. TAKÁCS, A. MOHÁCSI, V. KÁLDOR and Z. KALMÁR

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY AND THIRD DEPARTMENT OF MEDICINE, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received May 16, 1956)

HENDERSON was the first to take up the question of oxygen consumption in shock [2] and since then it has been generally accepted that the oxygen consumption of the organism in shock presents a dual alteration : in the beginning it increases, then later sharply declines [3, 4]. The acceleration in metabolism lasts only for a short time and is considered to be in relation to a heightened activity of the respiratory muscles [5]. The decrease in metabolic rate develops parallel with the gravity of the shock. As to its cause which has never been precisely clarified, impaired circulation, drop in body temperature, or an injury to oxidative ferments [4, 6] have been supposed.

Aside from the altered metabolism on the effect of shock, the literature has dealt very little with the action excercised on the progress of shock by a rise or drop in oxygen consumption. Among the pertaining data we refer first of all to those dealing with the influence of ambiant temperature on survival time in shock [7, 8, 9]. To clear up the question, experiments were carried out to study the effect of thyroxin, dinitrophenol and adrenaline upon the survival of rats in shock.

Methods

The experiments were carried out on 288 of our own inbred rats, weighing from 130 to 190 g. As in our previous work, shock was induced by freezing a hind leg with liquid air, the animal being bled at the same time. Blood 0,6 to 1,2 ml/100 g was withdrawn in addition to the freezing, to influence the gravity of the shock. Each experimental group consisted of from 8 to 19 animals and, together with theirs, the survival time of control animals was also recorded. In the latter shock was induced by freezing and withdrawal of the same amount of blood as from the animal in shock but the controls were subjected to no pretreatment.

Thyroxin *(Hoffmann La Roche)* was given subcutaneously for three days before the induction of shock, 100 μg per animal. Dinitrophenol, 1 to 2 mg/100 g body weight and adrenaline *(Richter Gedeon*, Budapest) — 20 and 200 μg/100 g — were given subcutaneously immediately before induction of shock. The control group received a corresponding quantity of physiological saline subcutaneously. In other experiments, powdered thyroid gland *(Richter Gedeon*, Budapest) was mixed in the animals' food 0,2 to 0,4 per cent for one to three weeks. Likewise in their food, to other animals methylthiouracil *(Richter Gedeon*, Budapest) was given

* Based on an address delivered before the 1953 Meeting of the Hungarian Physiological Society (1).

for 3 weeks, in 0,2 per cent quantities. Sevenal (12 mg/100 g) subcutaneously was administered 45 to 60 minutes before beginning the experiment.

Adrenalectomy was performed 10 days before the experiments, from retroperitoneal approach. Thereafter the animals each received 0,7 mg of desoxicorticosterone (Organon) every second day.

In evaluating the results we took into account the time when the animals died, on the other hand, the number of animals that succombed. In the graphs, therefore, the abscissa shows the time elapsing after shock; the ordinate the percentage of deaths.

For the statistical evaluation we preferred to analyse the logarithms of survival times since the logarithmic values follow the normal distribution better than the reciprocal metameters. As duration of life in the surviving animal, the maximum time registered in the experiments was invariably taken. The evaluations were made by the STUDENT „t" test [11, 12].*

Results

a) *Acceleration of metabolism by means of thyroxin and powdered thyroid gland*

The results are shown in Fig. 1 to 3. From Fig. 1 it is clear that survival was shortened in the animals pretreated with thyroxin. They died within an

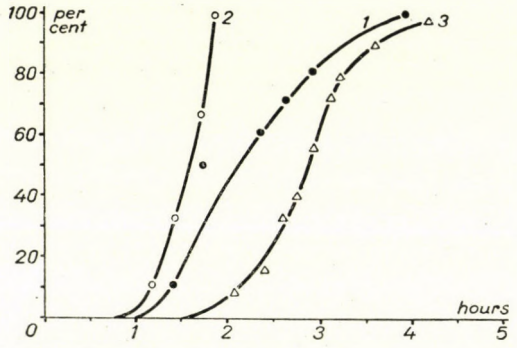


Fig. 1. Susceptibility to shock in control rats (10) and rats pretreated with thyroxin (9) and methylthiouracil (12). Ordinate: mortality rate in per cent. Abscissa: survival time, in hrs. 1: control, 2: thyroxin-treated, 3: uracil-treated animals

average of 100 minutes. The control animals subjected to shock at the same time survived for 140 minutes, mean value. The difference between the two groups is significant ($p < 0{,}02$). Similar results were obtained in the animals treated with powdered thyroid gland (Fig. 2): the animals thus treated for three weeks all died inside six and a half hours and all (*i. e.* 100 per cent) of those treated for one week in 15 hours, whereas 20 hours after induction of shock 20 per cent of the control animals were still alive. The difference is significant in both cases ($p < 0{,}05$ and $< 0{,}01$). As shown in Fig. 3, the animals

* Thanks for the statistical working-up of the material are due to DR. IRENEUS JUVANCZ, Leader of the Section of Medical Statistics of the Mathematical Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, and to MRS. ANDRÁS CSUKÁS, Scientific Assistant.

treated for three weeks with thyroid powder all died in 5½ hours, 20 per cent of the corresponding controls during the same time and 77 per cent of the latter

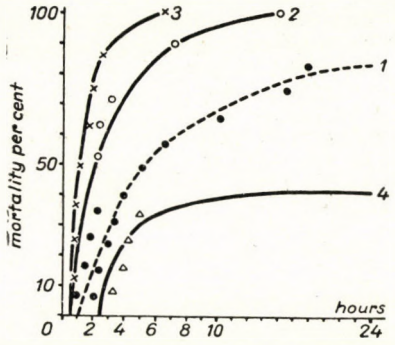


Fig. 2. Susceptibility to shock of control rats (12), rats treated for 1 week with powdered thyroid gland (11); for 3 weeks (8); and with methylthiouracil (12). Ordinate : mortality rate, in per cent. Abscissa : survival time, in hrs. 1 : controls, 2 : 1-week thyroid powder treatment, 3 : 3-weeks thyroid powder treatment, 4 : group treated with uracil

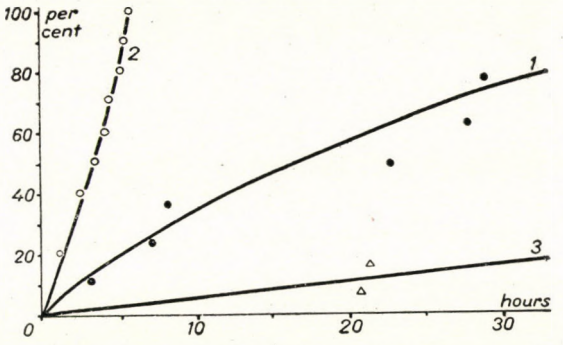


Fig. 3. Susceptibility to shock of control rats (8) and rats treated for 3 weeks with thyroid gland powder (10), and with this uracil (12). Ordinate : mortality rate in per cent. Abscissa : survival time, in hrs. 1 : controls, 2 : group treated with thyroid gland powder, 3 : group treated with uracil

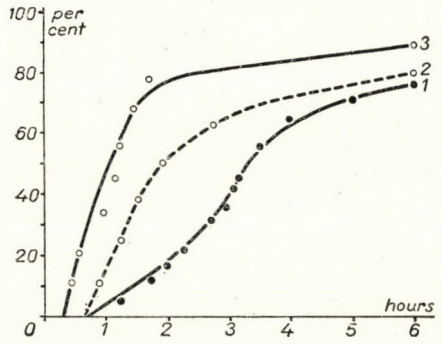


Fig. 4. Susceptibility to shock of control rats (13) and rats treated with dinitrophenol (17). Ordinate : mortality rate, in per cent. Abscissa : survival time, in hrs. 1 : control group, 2 : group treated with 1 mg dinitrophenol, 3 : with 2 mg dinitrophenol

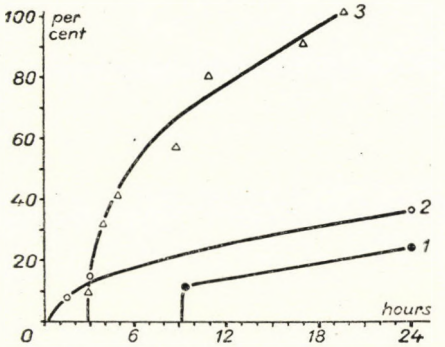


Fig. 5. Susceptibility to shock of control rats (10) and rats treated with adrenaline (24). Ordinate : mortality rate in per cent. Abscissa : survival time, in hrs. 1 : controls, 2 : 20 μg adrenaline, 3 : 200 μg adrenaline

within 30 hours. The difference is highly significant ($p < 0{,}001$). The effect of the thyroid powder on survival may also be seen in Fig. 7.

b) *Acceleration of metabolism by means of dinitrophenol*

Fig. 4 shows the effect of 1 and 2 mg of dinitrophenol. The lethal curve for the pretreated animals drops more steeply than that for the controls,

depending on the dosage. For example, in the second hour after induction of shock, 19 per cent of the control group died, 55 per cent of the group treated with 1 mg of dinitrophenol, and 80 per cent of the 2 mg group. Mean survival time was 210 minutes for the control group. There is a significant difference between the controls and the 2 mg group ($p < 0{,}01$).

c) *Acceleration of metabolism by means of adrenaline*

The effect of adrenaline in raising mortality in shock was very marked. It may be seen in Fig. 5 that 20 per cent of the untreated control group died

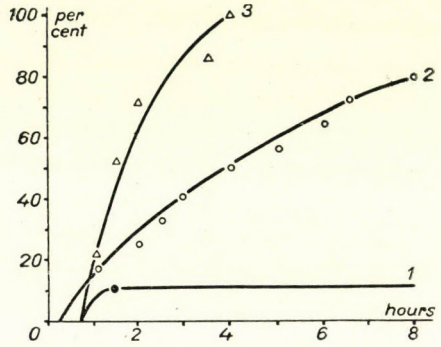


Fig. 6. Susceptibility to shock of control rats (11), adrenalectomized rats (13) and rats subjected to pretreatment with thyroid gland powder and adrenalectomy (15). Ordinate : mortality rate, in per cent. Abscissa : survival time, in hrs. 1 : controls, 2 : adrenalectomized, 3 : pretreated with thyroid powder

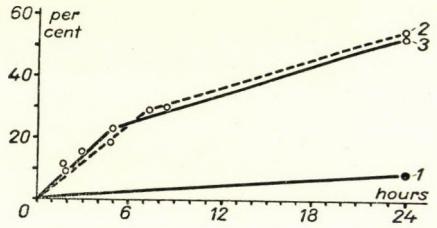


Fig. 7. Susceptibility to shock in control rats (12), rats treated with thyroid powder (11), rats treated with sevenal + thyroid gland powder (14). Ordinate : mortality rate in per cent. Abscissa : survival time, in hrs. 1 : controls, 2 : thyroid powder pretreatment. 3 : thyroid powder + sevenal

in 24 hours. During the same period, 33 per cent of the animals treated with 20 g adrenaline, died, whereas of the 200 μg group not one was alive at the 19th hour. Mean survival time was 1325 minutes for the control group, 950 for the 20 g adrenaline group, and 455 for the 200 μg 200 μg group. This last difference is very markedly significant ($p < 0{,}001$). Control experiments showed that animals not subjected to shock were well able to support 200 μg of adrenaline.

d) *Effect of adrenalectomy on the susceptibility to shock of animals pretreated with powdered thyroid gland*

Fig. 6 shows that the mortality curves for the control animals in shock, those of the adrenalectomized animals, and of those subjected adrenalectomy and, in addition, 3 weeks' thyroid pretreatment. Of the control group 91 per cent were still alive 8 hours after induction of shock ; of the adrenalectomized

animals 80 per cent died. The thyroid-powder treatment pronouncedly increased the mortality of the adrenalectomized animals. These all died (100 per cent) within 4 hours. Mean survival time for the control group was 415 minutes; for the adrenalectomized group 225 minutes and for the animals subjected to adrenalectomy plus pretreatment with thyroid powder 110 minutes. Thyroid powder also increased the mortality rate in the adrenalectomized animal ($p < 0{,}05$).

e) *Effect of sevenal on susceptibility to shock of animals pretreated with thyroid powder*

In Fig. 7 may be seen the effect of sevenal on the mortality curve of animals in shock previously treated for 3 weeks with thyroid powder. The thyroid powder decidedly increased their mortality, comparing it with that of the controls. In 24 hours 8 per cent of the controls died, while of the treated animals 54 per cent. The rats treated with sevenal and thyroid powder died at the same rate.

f) *Lowering metabolism by means of methylthiouracil*

The effect of methylthiouracil on rats in shock was studied in three series of experiments. In the series shown in Fig. 1 it may be seen that methylthiouracil retards the death of the animal in shock, e. g. 2½ hours after shock was induced 30 per cent of the control group were still alive, while as many as 75 per cent of the animals treated with methylthiouracil. Mean survival time for the control group was 140 minutes, for the methylthiouracil-treated animals 175 minutes. The difference borders on the significant. In the series shown in Fig. 2, 20 hours after shock 80 per cent of the control group died, 35 per cent of the treated group. Mean survival time for the controls was 370 minutes, and 695 for the treated animals. This difference is likewise on the limits of significance. A similar difference is apparent in Fig. 3. Here, 30 hours after induction of shock, 77 per cent of the control group died and only 17 per cent of the methylthiouracil-treated group. Mean survival time for the control animals was 915 minutes, and 1690 for the methylthiouracil group. The difference is significant ($p < 0{,}05$).

In the statistical analysis of the methylthiouracil group a significant prolongation of survival time could not be shown in every case, but after reduction of the results of the different groups by the X^2 process a significant difference was obtained ($X^2 = 17{,}19$, $p < 0{,}01$).

When at least two animals survived, calculation was also made with time reciprocals. These analyses yielded similar results as calculations with rithmic time, but in every case with a somewhat higher p value.

A statistical evaluation of the survival experiments is given in Table I.

The weight of the thyroid gland in the different groups changed in relation to the experiments as follows. Among the controls there were 24 weighing

$15 \pm 0{,}5$ mg; those of 23 animals treated for 3 weeks with thyroid powder was $10 \pm 0{,}3$; of 27 rats treated for 3 weeks with methylthiouracil, $40 \pm 2{,}7$ mg. Compared with the controls, both experimental groups show a significant difference ($p < 0{,}001$).

Table I

Summary of statistical calculations

Series	Group	Survival after shock Mean value, in min	Range	t	(f)	p
				as compared with controls		
1.	control	140	85—235	—	—	—
	thyroxin	100	75—110	2,678	(17)	0,02
	uracil-treated	175	125—250	1,824	(20)	0,04
2.	control	370	120—1200*	—	—	—
	thyroid powder, 1 week	165	125—855	2,245	(21)	0,05
	thyroid powder, 3 weeks	85	45—375	3,775	(18)	0,01
	uracil	695	180—1200*	1,798	(22)	0,05
3.	control	915	190—1800*	—	—	—
	thyroid powder, 3 weeks	195	80—335	4,681	(16)	0,001
	uracil	1690	1230—1800*	2,437	(18)	0,05
—3.	combined uracil groups	—	—	17,19		0,01
4.	control	210	80—360*	—	—	—
	1 mg dinitrophenol	155	55—360*	1,286	(25)	0,20
	2 mg dinitrophenol	100	50—360*	3,222	(26)	0,01
5.	control	1325	570—1440*	—	—	—
	20 mg adrenaline	950	90—1440*	1,139	(21)	0,20
	200 mg adrenaline	455	180—1200	5,003	(21)	0,001
6.	control	415	90—480*	—	—	—
	adrenalectomized	225	30—480*	2,037	(22)	0,05
	adrenalectomized + thyroid powder	110	60—240	6,607	(24)	0,001
	difference between adrenalectomized and adrenalectomized + thyroid powder treatment	—	—	2,617	(26)	0,05

* Means that the animal survived beyond the time given.

Discussion

It may be stated from these experiments that treatment with thyroid powder, thyroxin, dinitrophenol or adrenaline, considerably shortened the survival time of rats in shock. It is well known of all those substances that, in suitable doses, they accelerate metabolism [13]. From this we suppose that the shortening of survival time in shock might be attributable to the mutual characteristic, the increase in oxygen consumption. Our conclusions are supported by the well-known clinical observation that the mortality rate is very high in hyper-thyroid patients undergoing surgery with no previous treatment. The investigations of KERPEL—FRONIUS et al. [14, 15] in infantile dehydration call attention to the significant disproportion between oxygen requirement and supply. They show that metabolism accelerated by due to febrile conditions leads rapidly to the clinical symptoms of circulatory shock.

According to SMITH and SMITH [16], after radiation-injury mortality increased on the effect of thyroid powder and dinitrophenol ; this shows that a change in oxygen requirement also influences the progress of radiation inquiry.

In shock grave stagnating hypoxia occurs. It may be supposed that the lowering of oxygen consumption is a result of the impaired circulation resulting from shock. This hypothesis is supported by the fact that *in vitro* the oxygen uptake of organs of animals in severe shock is not always lower than normal [3]. As, according to LEBLOND [17], thyroxin or dinitrophenol markedly shorten survival time in arterial anoxia, it is probable that in shock, because of the stagnating anoxia, the disproportion between oxygen supply and requirement leads to a higher mortality rate.

It has been observed by several authors that a sharp drop in the ambiant temperature improves the course of shock, whereas a rise in temperature increases its gravity [7, 8, 9]. It is usual to attribute this to a diminished or accelarated metabolism. As both influences increase the metabolism rate in the animal with a normal thermo-regulation, some derangement in this regulation must, from the foregoing, be supposed in shock. This is also indicated by the circumstance that in shock no shivering occurs when there is a drop in body temperature [14] and a sharp increase in heat loss can be shown to take place without change in oxygen up-take [18].

Investigating the effect of thyroid powder on mortality in shock, it was thought that, in view of the connection between thyroid and adrenocortical regulation [19], the effect might be due to injury of the adrenocortical system. This possibility, however, is excluded by our experiments, where thyroid-powder treatment aggravated the shock in adrenalectomized rats.

ISSEKUTZ sen. and DIRNER [20] have stated that the metabolism accelerated by means of thyroxin could be reduced by luminal to normal or less than normal. In our experiments sevenal treatment did not affect the higher mortality

rate of the animals that were given thyroid powder. This suggests that the dual effect is not brought about by the same mechanism. Against it is the circumstance that other metabolism-increasing agents (adrenaline, dinitrophenol) were quite as effective as the thyroid gland powder.

A summing up of our methylthiouracil experiments, carried out in several series, shows that after treatment the animals are better able to withstand shock and that survival time is lengthened. The advantageous effect of the treatment may probably be attributed to the drop in the rate of metabolism. Our experiments agree with the results of KERPEL—FRONIUS et al. [21, 22] who found that in infants with atrophy or cretinism no symptoms of shock develop in circulatory impairment which, with a normal or a high metabolic rate, would lead to severe shock.

SUMMARY

In experiments carried out on 288 rats it has been shown that

1. Survival time in shock is considerably shortened by pretreatment for 1 to 3 weeks with powdered thyroid gland, by thyroxin given for 3 days (100 μg per animal), by 2 mg/100 g body weight of dinitrophenol, by 200 μg/100 g adrenaline given subcutaneously. In all these cases the effect is due to an acceleration of metabolism. Survival time is also shorter in animals subjected to treatment with thyroid powder or adrenalectomy, or those treated with sevenal. The shorter survival cannot be attributed to injury to the adrenocortical system and cannot be prevented by administration of sevenal.

2. Methylthiouracil mixed in the food in 0,2 per cent quantities for three weeks before the experiment prolongs survival time after shock, presumably by lowering the rate of metabolism.

LITERATURE

1. TAKÁCS, L., KOVÁCH, A. G. B., MOHÁCSI, A., KÁLDOR, V., KALMÁR, Z.: Acta Physiol. Hung. **5**, Supp. 30 (1954).
2. HENDERSON, Y.: Am. J. Physiol. **27**, 152 (1910).
3. KOVÁCH, A. G. B.: Z. Ärztl. Fortbild. **49**, 679 (1955).
4. WIGGERS, C. J.: Physiology of Shock, Cammonwealth Fund, New York, (1950).
5. HENDERSON, Y.: Adventures in Respiration. Williams and Wilkins, Baltimore, (1938).
6. GOVIER, W. M., GREIG, M. E.: J. Pharmacol. Exp. Ther. , **72**, 321, (1941).
7. ALLEN, F. M.: Arch. Path. **25**, 249 (1938).
8. ANTOS, R. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **56**, 60 (1944).
9. TABOR, H., ROSENTHAL, S. M.: Am. J. Physiol. **149**, 449 (1947).
10. KOVÁCH, A. G. B., CSÁKY, T. Z.: Arch. Biol. Hung. **18**, 390 (1948).
11. HALD, A.: Statistical theory with engineering application. Wiley (1952) New York.
12. FINNEY, D. J.: Statistical Methods in Biological Assay, Griffin, London (1952).
13. ISSEKUTZ, B., sen., HARANGOZÓ—OROSZY M.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **199**, 292 (1942).
14. KERPEL—FRONIUS, Ö.: MTA Orvostudományok Osztályának Közleményei **3**, 249 (1952).
15. KERPEL—FRONIUS, Ö., VARGA, F., VÖNÖCZKY J., KUN K.: Orvosi Hetilap **91**, 1311 (1950).
16. SMITH, W. W. SMITH, F.: Am. J. Physiol. **165**, 639 (1951).
17. LEBLOND, G. P.: Proc. Soc. Exp. Biol. **55**, 114 (1944).
18. RICHARDS, D. W., jun.: Harvey Lectures **39**, 217 (1943—44).
19. DE LA BALZE, F. A., MAUCINI, R. E., SCARPA, C. J., ARRILAGA, F. G.: Antibiot. Chemother. **1**, 358 (1951).
20. ISSEKUTZ, B. sen., DIRNER, Z.: Arch. exp., Pathol. Pharmakol. **185**, 685 (1937).
21. KERPEL—FRONIUS, Ö., VARGA, F., KUN, K.: Orvosi Hetilap **95**, 366, (1954).
22. KERPEL—FRONIUS, Ö., VARGA, F., VÖNÖCZKY, J., KUN, K.: Pediatrics **7**, 623 (1951).

THE CIRCULATION OF LIMBS IN HYPOXIC CONDITIONS

By

L. TAKÁCS

with the technical assistance of DUDÁS and P. HACKER

3rd DEPARTMENT OF MEDICINE, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received July 1, 1956)

In previous experiments [29] coronary circulation was studied in stagnant hypoxia (in shock and in dehydration) and in arterial hypoxia. It has been shown that, although the minute volume was low in shock and dehydration and high in arterial hypoxia, the coronary fraction of the minute volume was increased in all three conditions. This indicates that in hypoxia, be it either stagnant or arterial in nature, a relatively higher proportion of the available minute volume is directed to the heart. A similar, though reversed, rule applies to renal circulation [12, 13, 18, 19, 20, 27].

In the series of experiments which constitute the subject matter of this paper the circulation of limbs has been studied in different hypoxic conditions, notably in stagnant shock and dehydration and arterial hypoxia. The aim was to establish whether the conditions in which hypoxia is a common feature would be associated by comparable circulation changes in the extremities similar to what has been found to occur in cardiac and renal circulation.

As the conditions to be compared were associated partly with low, and partly with high minute volume values, the *limb fraction of the minute volume* was also determined to support the data obtained by measuring blood flow and vascular resistance in the limbs. The limb fraction namely reliably indicate within a given minute volume the improvement or deterioration of blood supply to the test organ, as compared to that of the other organs.

Experimental

31 dogs of both sexes, weighing 9 to 20 kg were used in the experiments which were carried out in anaesthesia with 0,10 g/kg chloralose.

Blood flow in the hind limb was measured by means of a rotameter inserted into the femoral vein above the deep femoral vein. The blood flowing from the rotameter was directed back into the central stump of the femoral vein. By measuring venous flow, injury to vascular innervation could be avoided. Before inserting rotameter the dogs were given 5 mg/kg heparin (Tromboliquin, *Roche)* intravenously and further doses about 1 mg/kg each every 2 hours.

Blood pressure was determined directly in the carotid artery. Minute volume was estimated on the basis of the FICK principle. Oxygen consumption was measured by using a KROGH apparatus adapted to dogs. Arterio-venous oxygen differences as well as oxygen saturation were determined by the method of ISSEKUTZ, JR., HETÉNYI, JR. and FEUER [16]. Arterial blood was obtained from the brachial artery, mixed venous blood from the right auricle, through a heart catheter. Vascular resistance in the organism and in the limb was calculated by the common

formula and was expressed in 10^3 dyneseccm^{-5}. Venous pressure was ignored in the calculation. The limb fraction of the minute volume means the blood flow through the limb, expressed in percents of minute volume. The control value for one limb was found around 1,5 per cent in shock and hypoxia, and higher in dehydration. The cause why higher control values were obtained in dehydration was seen in differences in the structure of the hind limb between different kinds of dog. This, however, does not interfere with evaluation, as all three series were auto-control ones.

Ischaemic shock was induced in 9 dogs by ligating one limb in the inguinal flexure for 4 hours. Prior to ligation two control points were taken at an approximately 15 minutes interval; subsequent determinations followed immediately before the release of ligation, 15 to 20 minutes after it, and 1, 2 and 3 hours later. At the time the last determination was made only 6 of the dogs were alive. Both the ligated and the normal limb were examined.

Dehydration was induced in 10 dogs by pyloric ligation, the determinations were made prior to, and 3 days after, ligation of the pylorus. In these experiments the control determination

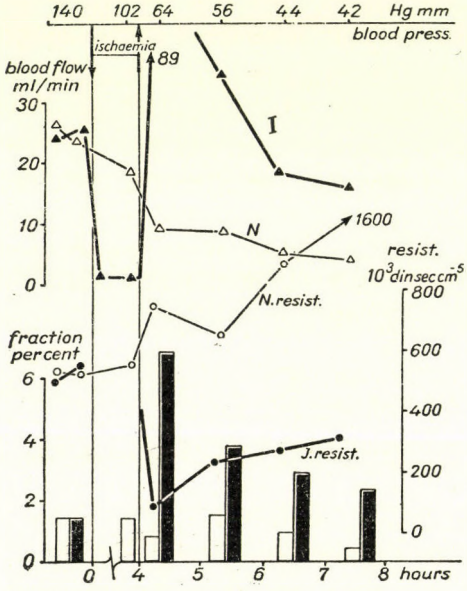


Fig. 1. Dog. Circulation of hind limb in ischaemic shock
N = normal limb I = ischaemic limb.

was made in one hind limb, the postoperative one in the other. The shock experiments demonstrate that there is no difference in circulation between the two limbs (Fig. 1).

Arterial hypoxia was induced in 12 dogs, by exposure for about 95 minutes to an atmosphere of 8 to 10 per cent oxygen in nitrogen. Before inducing hypoxia 2 control determinations were made, followed by two hypoxic determinations 45 and 90 minutes and two regeneration determinations 155 and 175 minutes from the onset of hypoxia.

Statistical evaluation was made by the one-sample „t" test in each case [8].

The figures show the means for single series.

Results

In ischaemic shock blood pressure fell from the initial average 140 mm Hg to an average of 102 mm Hg during ligation and dropped suddenly to 64 mm Hg after release of ligation. Later it decreased to 42 mm Hg. During ligation minute volume decreased from 1860 and 1910 ml to 1310 ml. Immediately after

release it was practically unchanged, then in 3 hours it decreased gradually to 730, 570 and 510 ml. Systemic vascular resistance was unaffected by ligation and fell from the control level of 6,5—6,4 to 3,8. It rose again to the control level during shock.

The blood flow in the ligated limb increased after release from 24 to 89 ml, then decreased to 34, 17 and 16 ml. Vascular resistance was very low throughout shock ; in contrast with the initial value of about 500, it was 67, 223, 259 and 295. The difference between the control and the 295 value is significant ($P < 0,01$). The limb fraction of minute volume was very high in the ligated limb. It increased at first from the control level of 1,5 per cent to 6,8 per cent. Further values obtained were 3,7, 2,9 ($P < 0,02$) and 2,4 per cent.

In the non-ligated limb circulation showed an entirely different behaviour. During shock, blood flow decreased to 1/5 or 1/6 of the control value. Resistance increased from 500 to 731, 639, 884 ($P < 0,05$) and, finally to 1630. Prior to ligation, the limb fraction of minute volume was the same as in the other limb 1,5 per cent. During ligation, it did not change for 4 hours. Later, 0,8, 1,5 and 0,5 per cent values were obtained.

In dehydration blood pressure decreased slightly, while minute volume fell from 2000 ml to about 1000 ml/min. Vascular resistance in the whole organism increased from 6,2 to 9,4.

The circulation of the limb was characterised by an excessive diminution of blood flow, with an increase of resistance and a significant increase in the limb fraction of minute volume (Table I).

Table I

Circulation of the hind limb of the dog in dehydration

(C = Control, D = Dehydrated)

	Blood pressure mm Hg		Blood flow ml/min		Resistance 10^3 dynseccm^{-5}		Limb fraction of min. vol. %	
	C	D	C	D	C	D	C	D
Mean	133	103	51	18	245	70	2,60	1,61
±	3	3	6	3	38	170	0,21	0,32
Mean of change	−30		−33		+441		−0,99	
n	12		10		10		9	
t	14,5		6,81		2,46		2,53	
p	<0,01		<0,01		<0,05		<0,05	

In arterial hypoxia the oxygen saturation of arterial blood was 62 and 60 per cent. Blood pressure decreased from 130 mm Hg to 109 and 105 mm Hg. Minute volume was significantly increased, to 4100 and 4200 ml. The control

values were 2100 and 1800 ml. Correspondingly, the total systemic vascular resistance decreased from 6,4 and 7,4 to 3,5 and 3,3, respectively.

In 9 out of 12 cases the blood flow in the limb increased more or less markedly, from 24 to 22 ml to an average of 35 ml. The change is on the borderline of significance ($p < 0{,}10$). In both hypoxic periods, vascular resistance was 370, and 360 *i. e.* lower than the 550 an 570 control values. ($p < 0{,}05$.) As compared with the control values of 1,4 and 1,6 per cent, the limb fraction of minute volume was 1,0 and 0,9 per cent ($p < 0{,}05$). The changes were reversible (Fig. 2).

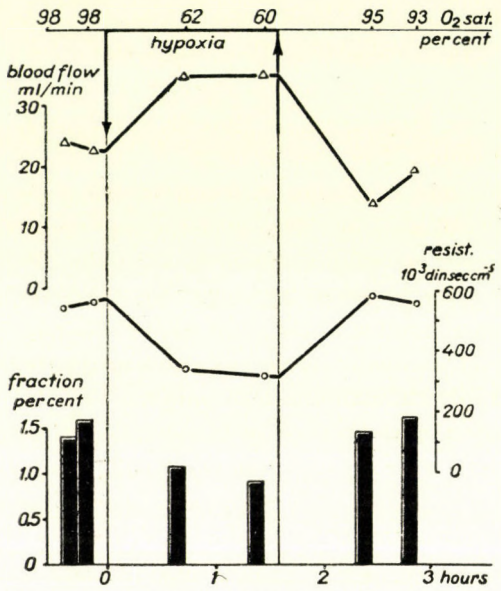


Fig. 2. Dog. Circulation of hind limb in arterial hypoxia

Discussion

It has been shown experimentally that in *ischaemic shock* blood flow in the ligated limb is greatly increased and vascular resistance decreased. For about 90 minutes after the release of ligation blood flow in the limb exceeds the control even in absolute value. Essentially similar observations have been made by REMINGTON et al. [24] in traumatised, and by ISSEKUTZ, JR., HETÉNYI, JR., and WINTER [17] in ischaemic limbs. The increase in blood flow may be considered to be due to a reactive hyperaemia. The excessive increase in blood flow means a great burden to systemic circulation, because after one limb is damaged, as much as 6,8 per cent of the minute volume may be directed to it. This is the more significant, if we compare it to the flow in the normal limb ;

even when in the affected limb the flow value is below the control level, 4 to 6 times as much blood flows through the damaged limb as through the normal one. It is believed that the steep fall in blood pressure and the diminution of systemic vascular resistance, which occur after the release of ligation and which are generally claimed to be due to a release of humoral agents in the ligated limb, are at least in part attributable to local vasodilatation.

In ischaemic shock, flow decreases and resistance gradually increases in the normal limb. Similar results have been obtained by other workers in various forms of shock [2, 7, 14, 15, 24, 31]. However, the role of limb circulation in the total circulation has been rather neglected in the literature. Our experiments indicate that the diminution of flow in the limb is more marked that that of the minute volume. The limb fraction of the minute volume decreases, apparently as a result of a diversion of blood to other organs.

As it has observed also by MARRIOTT [2] and UTHEIM [31] by plethysmographic measurements in infants, blood flow in the extremities is very low in *dehydration*. This is the result of an active vasoconstriction and increase of resistance, rather than of a fall in blood pressure. In this case, too, the diminution of the limb fraction of minute volume indicates that circulation in the limbs decreases more markedly than the minute volume.

A more or less persistent increase of blood flow has been reported to occur in experimental animals with *arterial hypoxia* [4, 22, 23, 25]. In the case of the isolated carotid sinus or of the limb with only nervous connexions, systemic hypoxia may produce vasoconstriction in the limb [3, 6, 20]. The results obtained in man are not equivocal [1, 10].

In most of our experiments, at a desaturation of 60 per cent, blood flow

Table II

Changes in the limb fraction of minute volume in the dog during ischaemic shock, dehydration and arterial hypoxia

	n	mean	±	t	p
Control	7	1,52	0,23		
in shock*		0,98		3,01	<0,05
change		−0,54	0,18		
Control	8	2,60	0,21		
in dehydration		1,61		2,53	<0,05
change		−0,99	0,39		
Control	10	1,61	0,22		
in arterial hypoxia		0,88		3,84	<0,01
change**		−0,73	0,19		

* 140 minutes after removal of ligations.
** 90 minutes following onset of hypoxia.

increased and vascular resistance decreased in the limb. However, the general increase of circulation and the increase of minute volume greatly exceeded the increase in the blood flow in the limb. This means that a smaller proportion of the augmented minute volume was only directed to the limb ; in other words, the limb fraction of minute volume decreased.

From all the three series of experiments it can be concluded that in stagnant hypoxia (in shock and in dehydration), as well as in arterial hypoxia the relation of limb circulation to minute volume shifts in a similar direction, in spite of the fact that in the limb blood flow and vascular resistance change differently. A diminution of the limb fraction of minute volume is a feature common to all three kinds of hypoxic condition (Table II). It seems that, irrespective of the kind of hypoxia, circulation of the limb deteriorates and part of the blood is diverted from the limb to other organs. It can, therefore, be stated in conclusion that in hypoxic conditions the circulation in the limbs, heart [29] and kidney [12, 13, 19, 27, 28, 30], shows common features, irrespective of the mechanism of hypoxia. It is believed that in the wide variety of hypoxic conditions the characteristic changes in circulatory re-distribution are produced by hypoxia.

SUMMARY

In a total of 31 dogs the circulation of the hind limb was studied in ischaemic shock, dehydration and arterial hypoxia, respectively.

It has been found that

1. In ischaemic shock the ligated limb shows a substantial increase of blood flow and a reduction in vascular resistance. The limb fraction of minute volume increases to several times the control value. In contrast with this, in the non-ligated (normal) limb blood flow decreases to fractions of the control value and resistance increases. The limb fraction of minute volume decreases.

2. In dehydration, extremital blood flow is low, resistance is increased. The limb fraction of minute volume decreases.

3. In arterial hypoxia blood flow in the limb slightly increases and resistance decreases. The limb fraction of minute volume is decreased.

Considering that the limb fraction of minute volume decreases in both stagnant hypoxia (shock and dehydration) and arterial hypoxia, it is assumed that the decrease is due to hypoxia.

LITERATURE

1. Abramson, D. I., Landt, H., Benjamin, J. E.: Arch. Int. Med. **71**, 583 (1943).
2. Antos, R. J.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **50**, 60 (1944).
3. Bernthal, T.: Am. J. Physiol. **121**, 1 (1938).
4. Bernthal, T., Bronk, D. W., Cordero, N., Gesell, R.: Am. J. Physiol. **83**, 435 (1928).
5. Bernthal, T., Schwind, F. J.: Am. J. Physiol. **143**, 361 (1945).
6. Bernthal, T., Woodcock, C. C.: Am. J. Physiol. **166**, 45 (1951).
7. Eckstein, R. W., Liebow, J. M., Wiggers, C. J.: Am. J. Physiol. **147**, 685 (1946).
8. Fisher, K. A.: Statistical Methods for Research Workers, Oliver and Boyd, London (1950).
9. Frey, J.: Klin. Wschr. **26**, 42 (1948).
10. Gellhorn, E., Steck, I.: Am. J. Physiol. **124**, 735 (1938).
11. Gesell, R., Moyle, A. C.: Am. J. Physiol. **63**, 32 (1922).
12. Gömöri, P., Kovách, A., Takács, L., Földi, M., Szabó, Gy., Nagy, Z., Wiltner, W.: Magyar Belorvosi Arch. **7**, 129 (1954).
13. Gömöri, P., Takács, L.: Magyar Tudományos Akadémia V. Oszt. Közleményei **7**, 269 (1956); Z. ärztl. Fortbild. **50**, 286 (1956).

14. GREEN, H. D., DWORKIN, R. M., ANTOS, R. J., BERGERON, G. A.: Am. J. Physiol. **142,** 494 (1944).
15. GREEN, H. D., LEWIS, R. N., NICKERSON, N. D., HELLER, H. L.: Am. J. Physiol. **141,** 48 (1944).
16. ISSEKUTZ, B. JR., HETÉNYI, G. JR., FEUER, I.: J. Physiol. **108,** 9 (1949).
17. ISSEKUTZ, B., JR., HETÉNYI, G. JR., WINTER, M.: Acta Physiol. Hung. **7,** 361 (1955).
18. LAUSON, H. D., BRADLEY, S. E., COURNAND, A.: J. Clin. Invest. **23,** 381 (1944).
19. KERPEL-FRONIUS, E., Varga, F., KUN, K., VÖNÖCZKY, J.: Acta Med. Hung. **5,** 27 (1954).
20. MALMEJAC, J., CHARDON, G., GROSS, A.: Compt. rend. soc. biol. **142,** 682 (1948).
21. MARRIOTT, W. M. Physiol. Rev. **3,** 275 (1923).
22. MARSHAK, M. E. *(Маршак, М. Е.):* Арх. Биол. Наук. **60,** 106 (1940), — Ronas Ber. **124,** 598 (1941).
23. REIN, H. K., LOOSE, E., OTTO, V.: Z. Kreislaufforsch. **33,** 241 (1941).
24. REMINGTON, J. W., HAMILTON, W. F., CADDEL, H. M., BOYD, G. H., WHEELER, N. C., PICKERING, E. W.: Am. J. Physiol. **161,** 124 (1950).
25. SCHROEDER, W., SCHOOP, W., STEIN, E.: Pflügers Arch. **259,** 124 (1954).
26. SCHNEIDER, E. C., TRUESDELL, D.: Am. J. Physiol. **71,** 90 (1924).
27. SELKURT, E. E.: Am. J. Physiol. **145,** 699 (1945).
28. TAKÁCS, L.: Magyar Belorvosi Arch. In the press ; Acta Med. Hung. In the press.
29. TAKÁCS, L.: Magyar Belorvosi Arch. **9,** 72 (1956) ; Acta Physiol. Hung. **11,** 55 (1957)
30. TAKÁCS, L.: Candidate Dissertation. Budapest, 1956.
31. TRUETA, J., BARCLAY, A. E., DANIEL, P. M., FRANKLIN, K. J., PRICHARD, M. M. L.: Studies on Renal Circulation, Thomas, Springfield (1947).
32. UTHEIM, K.: Am. J. Diseases Children **20,** 366 (1920).

THE METABOLISM OF LIMBS IN HYPOXIC CONDITIONS

By

L. TAKÁCS

with the technical assistance of G. DUDÁS, MRS. F. BOHÁNSZKY and MRS. M. HORVÁTH

3rd DEPARTMENT OF MEDICINE, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received August 1, 1956)

It is well-known from the literature that in shock various changes take place in the metabolism of muscle [9, 17], as, for example, the reduction in the ATP and glycogen levels. In previous experiments (KOVÁCH et al, [9—13]) further disturbances have been demonstrated in muscle metabolism during shock. It has been shown in studies *in vitro* that the glucose uptake of the diaphragm decreased. This has been ascribed to an inhibition of hexokinase antagonisable with insulin. It has been also described that instead of the normally predominant phosphorylation, glycogen is broken down mainly by hydrolysis. An analysis of the development of the changes has revealed that in hypoxic conditions other than the shock only the energy reserves of muscle (ATP, glycogen) decrease, but no changes take place either in phosphorylation, or in amylase activity. From this we have drawn the conclusion that alterations of these processes in shock are due to a factor other than hypoxia (TAKÁCS, T.—SZABÓ [16]).

In the present investigations comparative *in vivo* studies have been made of the oxygen and glucose uptake, as well as of the lactic acid and inorganic phosphate output of the hind leg of the dog in shock and dehydration associated with stagnant hypoxia, as well as in arterial hypoxia. We have endeavoured to determine whether in shock the changes occurring in the metabolism of live muscle would appear also in other types of hypoxia, *i. e.* whether they are due to hypoxia, a well-known feature of shock, or eventually to some other factors peculiar to shock.

Experimental

29 dogs of both sexes were used in the experiments. These were performed in anaesthesia induced by 0,10 g per kg of chloralose. Blood flow was measured by a rotameter in the femoral vein. The method of measuring flow and flow relations has already been described [15].

Shock was induced in 9 dogs by ligation one hind leg for 4 hours. 2 determinations were made before ligation, 1 determination immediately before release, and 20, 80, 140 and 200 minutes after the release of ligation. At the time of the last determination, only 6 dogs were alive.

Dehydration was induced in 10 dogs by ligating the pylorus for 3 days. The control determinations were made in one hind limb before pyloric ligation; then 3 days later in the

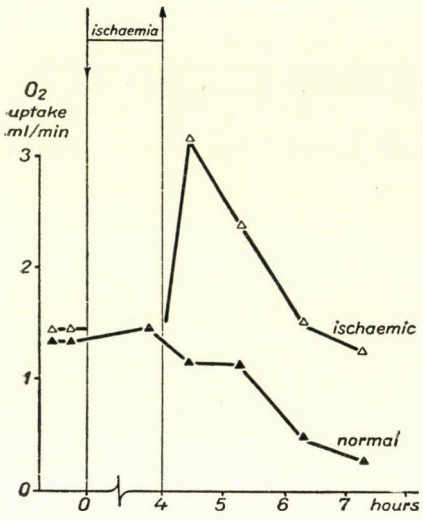


Fig. 1. Ischaemic shock. Oxygen uptake in the hind limb of the dog

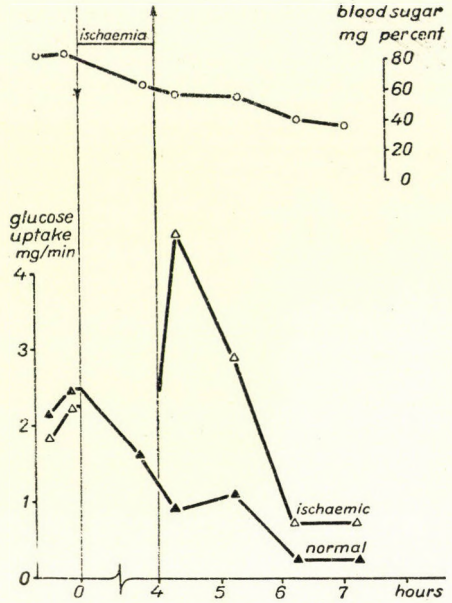


Fig. 2. Ischaemic shock. Glucose uptake in the hind limb of the dog

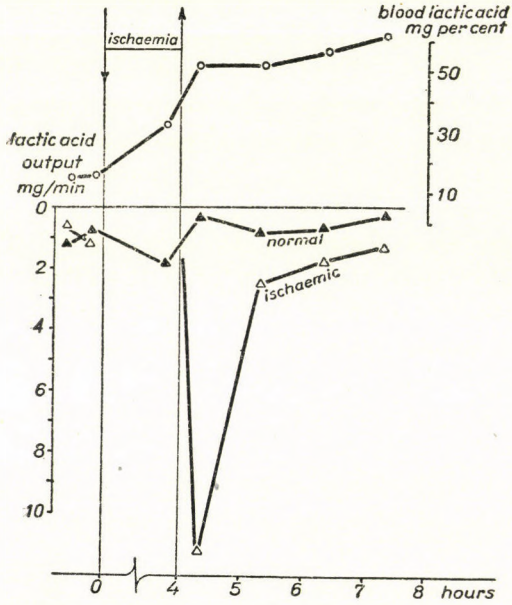


Fig. 3. Ischaemic shock. Lactic acid output in the hind limb of the dog

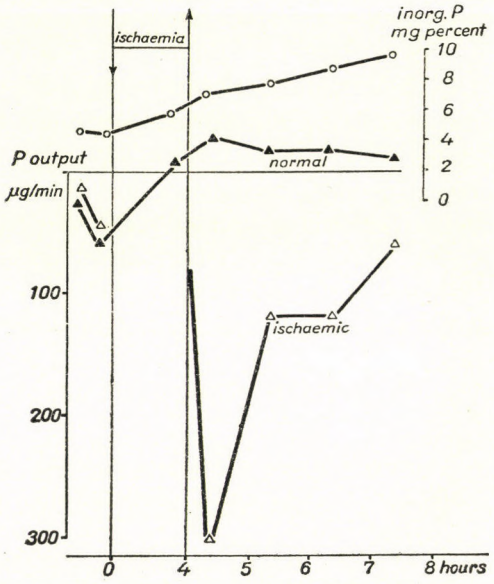


Fig. 4. Ischaemic shock. Inorganic P output in the hind limb of the dog

other. The experiments in shock revealed that circulation in the two limbs did not differ significantly (Figs 1 to 4). In the dehydration experiments the normal values were somewhat higher than in the experiments in shock or hypoxia. This was thought to be due to differences in the weight of the limbs of the dogs which were of different size and kind. However, this did not interfere with evaluation, as all the three series were auto-control ones.

Hypoxia was induced in 10 dogs by exposure for 90 minutes to an atmosphere of 8 to 10 per cent oxygen in nitrogen. Before exposure to the hypoxic atmosphere, 2 control determination were made, then in the 45th and 90th minutes 2 hypoxic, and in the 155th and 175th minutes 2 regeneration determinations.

Metabolism of the limb was determined on the basis of the blood flow measured in the femoral vein and of the arterio-venous difference between brachial artery and femoral vein. Oxygen was estimated according to ISSEKUTZ, JR., HETÉNYI, JR. and FEUER [7], glucose from 0,5 ml blood according to SOMOGYI [14], lactic acid according to DISCHE and LÁSZLÓ [4], inorganic P (so-called direct P) according to FISKE and SUBBAROW [6].

Statistical evaluation was made by the one-sample „t" test [5]. The Figures show the means of 6 to 10 experiments.

Results

In ischaemic shock the blood sugar level decreased from the control 81—82 mg per 100 ml to 63 mg per 100 ml during ligation already, and to 58, 57, 40 and 39 mg per 100 ml after the release of ligation. The control lactic acid values were 13 and 15 mg per 100 ml, while during ligation 31 mg per 100 ml, and later 50 to 60 mg per 100 ml values were recorded. The plasma level of inorganic P started from 4,7 and 4,4 mg per 100 ml and rose gradually to 9,6 mg per 100 ml.

In the ligated limb the release of ligation was followed by a marked increase of blood flow [15] and a simultaneous, highly significant increase of metabolism. Oxygen uptake rose steeply from 1,5 ml per min to 3,2 ml/min, then sank to 2,5, 1,6 and 1,3 ml/min. The control value of glucose consumption was 2,6 mg/min, while immediately after release of ligation it was 4,6 and 1 to 3 hours later 2,9, 0,7 and 0,7 mg. Ligation was followed by a marked increase of lactic acid production. The control level was 0,8 to 0,7 mg/min ; after the release of ligation lactic acid output of the limb rose to 11,2, 3,0, 1,9 and 1,4 mg/min. The initial P output of 9 and 62 μg increased to 308, 121, 122 and 57 μg.

In the normal limb of the animal in shock metabolism showed a characteristic decrease. Oxygen uptake, the control value for which was 1,4 ml/min, did not change significantly during ligation, but subsequently it sank to 1,1, 1,1, 0,5 and 0,4 ml. During ligation glucose uptake decreased from 2,1 and 2,5 mg/min to 1,6, then to 0,9 and 1,1 mg. 2 and 3 hours after onset of shock it varied around 0,1 to 0,3 mg. The control value of lactic acid output was 1,1 and 0,6 mg/min. The pre-release value was 1,7 mg, and after release 0,2, 0,9, 0,7 and 0,1 mg values were obtained. The initial low P output changed during ligation and after it into a P uptake, varying from 11 to 33 μg. (Figs 1 to 4).

In dehydration both blood sugar and lactic acid were at levels higher than normal, but the change of blood sugar was only significant. The oxygen uptake

of the limb decreased by 50 per cent, the glucose consumption by about 40 per cent. No significant changes were noted in lactic acid output (Table I).

Table I

The metabolism of the hind leg of the dog in dehydration
(N = normal, D = dehydrated)

	O_2 uptake ml/min		Glucose uptake mg/min		Lactic acid output mg/min		Blood sugar mg per 100 ml		Blood lactic acid mg per 100 ml	
	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D
Mean	2,6	1,3	4,2	2,5	1,6	1,9	68	91	15	24
±	0,4	0,4	1,1	0,6	0,5	0,8				
Mean of change	−1,3		−2,0		+0,3		+26		+7	
n	10		9		9		10		9	
t	3,09		2,58		0,05		2,45		1,26	
P	<0,02		<0,05		>0,50		<0,05		>0,20	

In *arterial hypoxia* oxygen saturation decreased to 62 and 60 per cent. The blood sugar level rose slightly, from 71 mg per 100 ml to 83 and 78 mg

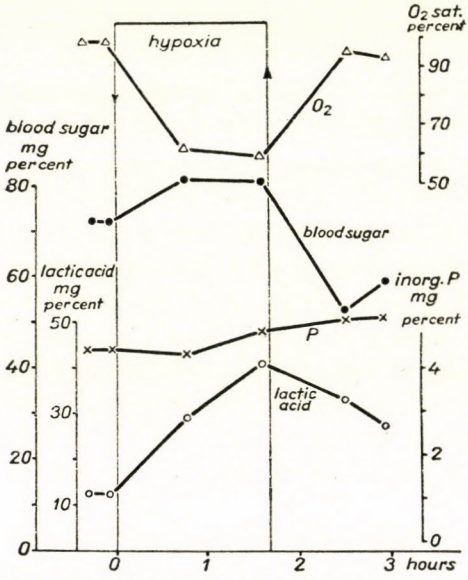


Fig. 5. Arterial hypoxia. Changes in oxygen saturation, blood level of glucose and lactic acid and inorganic serum P in the dog

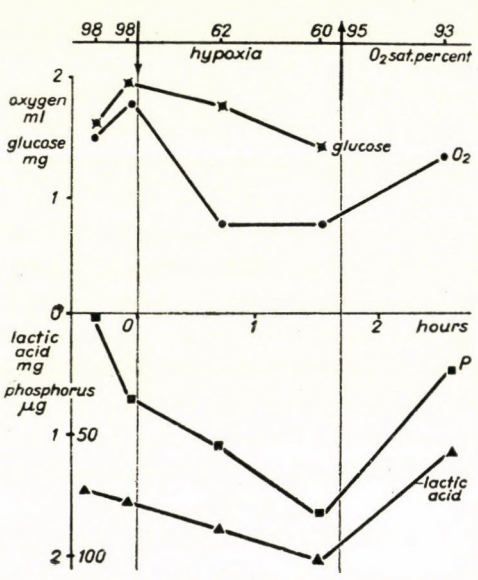


Fig. 6. Arterial hypoxia. Oxygen and glucose uptake, lactic acid and inorganic P output in the hind limb of the dog

per 100 ml. The lactic acid level increased from 12 to 13 mg per 100 ml to 29, then to 42 mg per 100 ml. No change took place in the level of inorganic P in plasma.

Oxygen consumption of the limb decreased from 1,5 to 1,9 ml/min to 0,8 ml/min. The change is highly significant ($p < 0{,}01$). As compared to the control levels of 1,6 and 2,0 mg/min, in hypoxia glucose uptake was found to be 1,8 and 1,4 mg. This difference is not significant ($p > 50$). In the preliminary period lactic acid output was 1,4 and 1,5 mg/min ; this rose to 1,7 and 2,0 mg in hypoxia and decreased again to 1,1 and 1,6 during regeneration. As compared to the preliminary periods, the increase is not significant ($p < 0{,}20$), but the difference between hypoxia and regeneration was significant ($p < 0{,}05$). Inorganic P output of the limb was initially 2 mg, then 36 to 52 and and 80 μg in hypoxia ($p < 0{,}20$). After hypoxia this value decreased again (Figs 5 and 6).

Discussion

There are few data in the literature concerning metabolism in the limbs in shock. BEATTY [1, 2] has shown that in haemorrhagic shock the difference in the levels of glucose and lactic acid in the blood of the femoral artery and vein is significantly widened. The same was observed by DAVIS [5] in traumatized limbs. From these experiments, however, one cannot draw conclusions concerning the quantity of sugar uptake or of lactic acid output in the limb, because the blood flow relations have not been determined. In ischaemic shock it has been observed by ISSEKUTZ, JR., HETÉNYI, JR., and WINTER [8] that a temporary, significant increase in oxygen and glucose uptake, as well as in lactic acid and inorganic P output takes place in the ligated limb.

Our experiments, too, show that the metabolism of the ischaemic limb is greatly increased after ligation has been released. This applies to oxygen and glucose uptake and lactic acid output alike. Two to three hours later the values are again at, or below, the initial level. In comparison with the normal limb, the values in the ligated limb are still very high at that time. Meanwhile, a considerable decrease takes place in the level of high-energy phosphate compounds in the ischaemic limb, as indicated by the excessive inorganic P output observed both by other authors and by us. The relatively high uptake of oxygen and glucose, which is not followed by an increase in energy reserves (ATP, phosphocreatine, glycogen), is believed to be one of the decisive factors in the loss of energy by the organism in shock.

In shock, the normal limb shows a significant increase of oxygen and glucose uptake, while lactic acid output is decreased to a smaller measure. This may be looked upon as a manifestation of defensive effort and would mean that the diminution of transport capacity involves an active reduction in the supply to the limb. One of the possibilities for achieving this is the inhibition of hexokinase by some pituitary factor, as we have demonstrated it in *in vitro* diaphragm studies [13]. The other explanation may be that, as a result of diminished circulation, the tissues are incapable of meeting their oxygen or

glucose demands even when utilisation is the best. In contradiction with the latter view is the fact that the diminution in limb circulation does not exceed that in metabolism [15]. It is remarkable that during shock the limbs consequently take up inorganic P. In connection with the data on uptake and output of glucose, lactic acid and inorganic P one might claim that the measured values reflect the true situation in metabolism only apparently, since the levels of glucose, lactic acid and inorganic P vary during the experiment. The values obtained are probably the resultants of the quantitative relations of limb metabolism, on the one hand, and of the equilibration of the difference between the extracellular space in the limb and blood, on the other. In view of the fact that glucose uptake decreases more or less parallel with the decrease in oxygen uptake, it is believed that the equilibration may not significantly influence the numerical results representing the amounts of substances used up in metabolism. The fact that lactic acid output, as compared to that in the control periods, would increase in any greater measure only in the last shock period can be interpreted as a sign of an inhibition of glucose metabolism in the anaerobic phase.

In *dehydration* the excessive diminution of oxygen and glucose uptake is not associated with an alteration of lactic acid production. This again indicates preponderance of anaerobic glucose breakdown. The decrease in glucose consumption might be due to an inhibition of hexokinase.

In *arterial hypoxia*, too, the limb consumes very little oxygen, while glucose uptake does not significantly deviate from normal. There is an apparent increase in lactic acid production. Thus here, too, hypoxia results in a preponderance of anaerobic glucose breakdown.

In conclusion it can be stated that a diminution of oxygen uptake associated with a preponderance of the anaerobic phase of glucose breakdown is a feature common to the metabolism of the *in situ* limb, as well in shock associated with stagnant hypoxia, as in dehydration, and in the arterial hypoxia used as a model experiment. This change seems to be independent of the mode of development of hypoxia and can be traced back to hypoxia itself. In addition, both in shock and in dehydration, glucose uptake is markedly diminished.

SUMMARY

The metabolism of the *in situ* limb has been studied in 29 dogs, in ischaemic shock, in dehydration and in arterial hypoxia.

It has been found that in ischaemic shock there is a significant increase of oxygen and glucose uptake, as well as of lactic acid and inorganic P output in the ligated limb and it takes hours before these values would decrease below the control values. In the normal limb a more or less marked increase of oxygen and glucose uptake, as well as of lactic acid output were recorded. During shock the slight P output changed into P uptake.

In dehydration, only the oxygen and glucose uptake decreased, lactic acid output was unaffected.

In arterial hypoxia oxygen consumption of the limb decreased while glucose uptake was unchanged. Lactic acid output was slightly elevated.

In all the three series, *i. e.* in stagnant (shock and dehydration) and arterial hypoxia alike, oxygen uptake decreased and the anaerobic phase of glucose breakdown preponderated in the metabolism of the limb *in situ*.

LITERATURE

1. BEATTY, C. H.: Am. J. Physiol. **143,** 579 (1945).
2. BEATTY, C. H.: Am. J. Physiol. **144,** 233 (1945).
3. DAVIS, H. A.: Shock and Allied Forms of Failure of the Circulation. Grune and Stratton, New York (1949).
4. DISCHE, Z., LÁSZLÓ, D.: Biochem. Z. **187,** 344 (1927).
5. FISCHER, K. A.: Statistical Methods for Research Workers. Oliver and Boyd, London (1950).
6. FISKE, H., SUBBAROW, S.: J. Biol. Chem. **66,** 375 (1925).
7. ISSEKUTZ, B. JR., HETÉNYI, G. JR., FEUER, I.: J. Physiol. **108,** 9 (1949).
8. ISSEKUTZ, B. JR., HETÉNYI, G. JR., WINTER, M.: Acta Physiol. Hung. **7,** 361 (1955).
9. KOVÁCH, A. G. B.: Z. ärztl. Fortbild. **49,** 1 (1955).
10. KOVÁCH, A. G. B., TAKÁCS, L., KISS, S.: Acta Physiol. Hung. **10,** 303 (1956).
11. KOVÁCH, A. G. B., TAKÁCS, L., KISS, S., ANTAL, J.: Acta Physiol. Hung. **10,** 291 (1956).
12. KOVÁCH, A. G. B., TAKÁCS, L., MENYHÁRT, J., IRÁNYI, M., KALMÁR, Z.: Acta Physiol. Hung. **3,** 357 (1952).
13. KOVÁCH, A. G. B., TAKÁCS, L., ROHEIM, P., KISS, S., KOVÁCH, E.: Acta Physiol. Hung. **3,** 345 (1952).
14. SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem. **186,** 513 (1950).
15. TAKÁCS, L.: Acta Physiol. Hung. **11,** 189 (1957).
16. TAKÁCS, L.—T. SZABÓ, M.: Acta Physiol. Hung. **10,** 67 (1956).
17. WIGGERS, C. J.: Physiology of Shock. Harvard Univ. Press Cambridge, Mass., (1950).

THE APPARENT EXPANSION OF THE EXTRACELLULAR SPACE (INULIN SPACE) IN THE NEPHRECTOMIZED DOG

By

P. BÁLINT and I. FORGÁCS

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received August 6, 1956)

The substances suitable for the determination of the extracellular space are those passing through the capillary membrane, not penetrating into cells, distributed evenly and rapidly in the extracellular space, not decomposed in the organism and eliminated exclusively with the urine. Numerous authors agree in that inulin is one of the substances meeting the above requirements in the fullest measure.

It has been shown by SCHACHTER et al. [1] that, after a single injection, inulin, which is eliminated fast, is not evenly distributed in the extracellular space. GAUDINO et al. [2, 3], however, reported that when given by constant infusion, a constant plasma concentration would develop and the amount of inulin injected could be recovered from the urine. It takes about 2 to 3 hours for the above even distribution to develop in the dog. In the patient with anuria after a single injection of inulin the plasma concentration becomes constant in 6 hours. In the nephrectomized dog the level produced by a single injection of inulin becomes also constant in about 6 hours, but later the plasma level of inulin begins to decline. This decline in the nephrectomized dog has been explained as being due to a slow expansion of the extracellular space, resulting from an outflow of fluids from the intracellular space. RAISZ, YOUNG and STINSON [4], as well as EPSTEIN et al. [5], demonstrated a gradual diminution of the plasma inulin level in the nephrectomized dog, while ECKEL and SMITH [6] observed that inulin disappears within 6 hours from the plasma of the nephrectomized rat.

According to FINKENSTAEDT et al. [7], and HAMBURGER and MATHÉ [8], the distribution space of 0,2 g/kg inulin injected after operation into the nephrectomized animal was around 17 per cent. In the course of the following days the level of inulin in plasma gradually declined and after 120 hours no inulin was demonstrable in the plasma. The plasma level produced by a single dose of inulin in the patient with anuria is so decreased that the apparent distribution space increases from 25 per cent to 50 per cent.

These observations have been supplemented by the investigations of BERNE and LEVY [9, 10], and of LAST et al. [11], according to whom in man it is not possible to recover from the urine the total amount of infused inulin. DEANE

and SMITH [12] found in man that, after injecting inulin and recirculating it by infusing the urine intravenously, only 80 per cent of the amount of the inulin administered could be recovered from the urine.

The above data from the literature do not therefore permit rigidly to adhere to the view that inulin is eliminated quantitatively from the organism. The possibility arises that inulin is either broken down in the body and/or enters the cells, and/or is eliminated by some extrarenal route as well. Experience obtained in nephrectomized animals and patients with anuria seems to point at the same possibilities and, in addition, a true expansion of extracellular space during anuria should be taken into consideration.

To decide the question, nephrectomized dogs were subjected to serial experiments in which the apparent distribution space of inulin was determined postoperatively, after injecting a single dose. Further, by studying the distribution space of inulin injected 3 and 5 days following operation, we endeavoured to elucidate the role of a true increase of extracellular space in the diminution of the plasma inulin level.

Experimental

Dogs of both sexes were used in the experiments. After a few days of kennel-life and 14 hours of fasting and thirsting, under ether anaesthesia bilateral nephrectomy was performed through a median laparatomy incision. Immediately after operation a sample of blood was taken for use in a blank test, then 0,2 g/kg inulin were injected intravenously, in the form of a 5 per cent solution. The first sample to be tested for inulin was taken 6 to 8 hours following the onset of infusion, and sampling was continued at 24-hour intervals until the animal died. After operation, which was performed under aseptic conditions, a single dose of 200 000 U penicillin was injected intramuscularly. The nephrectomized dogs were allowed no food throughout the experiment, while fluid intake was unrestricted. The animals drank very little even on very hot days.

The inulin solution injected was, as also the sera, analysed for yeast resistant inulin (according to HARRISON [13] and for alkali resistant inulin (according to LITTLE [14]. The amount of inulin injected divided by its plasma concentration (after deducting the blank value obtained prior to inulin injection) gives the apparent distribution space of inulin. This is expressed in percentage of preoperative body weight throughout the tables. Postoperative loss of weight was ignored. The serum of the last sample prior to death was tested for NPN (by the JENDRASSIK and CLEGHORN method [15]) and for sodium (by flame photometry).

To elucidate whether the decrease of plasma inulin concentration actually indicated a true expansion of inulin space, two types of experiment were carried out. In one series the dose of inulin was repeated 3 to 5 days after operation and its distribution space was determined 6 to 8 hours after injection, dividing the amount given as the second dose by the plasma concentration. The plasma concentration estimated before the second injection was taken as the blank value. In the following this type of experiment will be referred to as the "over-loading" type. In the other series no inulin was given immediately after operation. The first dose was infused 3 to 5 days following nephrectomy. The distribution space of inulin was obtained by dividing the amount infused by the plasma concentration. This type will be referred to in the following as the "after loading" type.

Results

The results for the postoperative, single loading experiments are to be found in Table I. Nephrectomy was performed in the morning hours in every case. Day 1 means the evening hours of that day, with the "following days" meaning

24 hours intervals. The numerical values represent the apparent distribution space of inulin, expressed in percentage of preoperative body weight. On the 2nd day NPN was about 100 mg per 100 ml, increasing by about 100 mg per 100 ml a day. Serum sodium varied from 128 to 130 meq/l, thus it was below the usual normal laboratory level of 145 meq/l. The columns headed "YR" show the distribution space for yeast-resistant, those headed "AR" that for

Table I

Behaviour of inulin spaces after a single loading

No	Day 1		Day 2		Day 3		Day 4		Day 5		
	YR	AR	YR	AR	YR	AR	YR	AR	YR	AR	
1/3	20,5	16,7	23,6	19,7	26,7	27,6	29,1	37,4	—	57,0	
2/8	15,0	17,5	21,0	22,5	25,0	27,0					
3/9	12,8	15,0	16,0	25,0	20,2	25,2					
4/10	15,0	18,0	21,0	27,0	28,0	42,0	32,0	62,0			over-loaded
5/11	19,2	17,2	29,0	31,0							over-loaded
6/12	12,0	13,6	18,3	19,0	22,1	21,2					over-loaded
7/14	—	19,9	—	34,4							over-loaded
8/16	17,0	16,5	26,0	23,0	28,0	28,5					over-loaded
9/24	21,2	16,5	24,2	19,8							
10/27	18,0	14,0	22,0	23,0	27,2	28,0	39,1				over-loaded
11/28	21,8	21,2	30,8	27,0	38,6	37,0					
12/29	20,8	20,0	25,8	22,8	32,4	27,4	38,4	33,5	48,0	40,0	
13/30	19,8	20,0	23,5	25,0	25,2						
14/32	20,2	15,3	22,5	18,2	27,0	23,5	32,5	33,2			
15/34	17,1	17,2	19,1	20,2	21,8	25,0	25,6	28,8	30,0	34,2	
16/35	16,4	19,0	20,6	22,4							
17/36	16,9	17,1	20,2	20,2	24,0	24,8					
18/37	16,5	16,0	20,0	21,5	29,0	25,0	32,2	30,0	35,8	33,5	
19/38	19,5	16,4	24,5	24,0	30,4	29,5	36,4	33,2			

alkali-resistant inulin. In the last vertical column of Table I is noted which experiments were carried out with "over-loading".

Table II is constructed on the basis of similar principles and shows the single values of the over-loading and after-loading experiments. The last vertical columns contain the distribution space values on the day before over-loading.

In Table III are presented the means for the single numerical values in Table I and II with s. d., number of cases and significance. Statistical evaluation was carried out by FISCHER's [16] „t" test.

Discussion

The two horizontal rows in Table III show the means for the distribution spaces of inulin given postoperatively, as determined on consecutive days. Thus, our experiments confirm the data in the literature, according to which the apparent inulin space gradually expands in the nephrectomized dog. The difference between the means on the single days is significant, except for the

Table II

Behaviour of inulin spaces after "over-loading" and "after-loading"

No	Day 3		Day 4		Day 5		Previous day	
	YR	AR	YR	AR	YR	AR	YR	AR
				"over-loading"				
1/10	—	—	—	—	24,2	20,0	(32,0)	(62,0)
2/11	24,0	14,0	—	—	—	—	(29,0)	(31,0)
3/14	—	17,0	—	—	—	—	—	(34,4)
4/12	—	—	20,0	27,2	—	—	(22,1)	(21,2)
5/16	—	—	22,0	22,2	—	—	(28,0)	(28,5)
6/27	—	—	—	—	22,4	—	(39,1)	—
				"after-loading"				
7/7	—	—	19,3	16,8	—	—	—	—
8/20	22,0	22,1	—	—	—	—	—	—
9/22	16,6	16,0	—	—	—	—	—	—
10/23	20,0	16,0	—	—	—	—	—	—
11/26	18,7	17,0	—	—	—	—	—	—
12/39	17,9	18,6	—	—	—	—	—	—
13/40	18,3	19,4	—	—	—	—	—	—
14/41	—	—	19,1	16,9	—	—	—	—
15/42	—	—	18,0	18,2	—	—	—	—

two last days ; there, however, the small number of cases and the wide scattering of values explain the lack of significance.

The yeast-resistant and the alkali-resistant inulin distribution spaces were identical throughout the experiments. The preparation employed *(Fluka)* was almost 100 per cent yeast-resistant and about 90 per cent alkali-resistant. COTLOVE [17] pointed out that commercial inulin preparations contain, in addition to fructose-polysaccharide, also oligosaccharides of different molecular size and even free fructose. Treatment with yeast removes the fructose (as well as the glucose in plasma) and the oligosaccharides of smaller molecular size, while boiling in the presence of base eliminates also the oligosaccharides of larger molecular size. Thus, our experiments showed no difference in dis-

tribution space between the different fractions (the so-called alkali-stable and alkali-labile) of inulin.

In the horizontal rows 3 and 4 of Table III the results of the over-loading and after-loading experiments have been summed up. The means fall between those obtained on the 1st and 2nd days of the series in which inulin was injected immediately after operation. The results for the over-loading experiments (after 3 and 4 days) do not differ from those of the after-loading ones, nor is

Table III

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Inulin space (Yeast-resistant)	17,7±3,2	22,6±4,1	27,0±4,7	33,2±4,9	38,8±8,8
n	n=18	n=18	n=15	n=8	n=3
p	<0,001		<0,01	<0,02	>0,05
Inulin space (Alkali-resistant)	17,2±2,1	23,4±4,2	27,8±5,3	36,9±11,4	41,1±11,7
n	n=19	n=19	n=15	n=7	n=4
p	<0,001		<0,01	<0,05	>0,05
Inulin space supra-and after-loading (Yeast-resistant)	—	—	19,6±2,6	19,7±1,5	23,3
n			n=7	n=5	n=2
p	—	—	<0,01* >0,05**	<0,001* >0,05**	
Inulin space supra- and after-loading (Alkali-resistant)	—	—	17,5±2,5	20,2±4,5	20,0
n			n=8	n=5	n=1
p			<0,01* >0,05**	<0,02* >0,05**	

* Against non-after-loaded series of the same day.
** Against non-after-loaded series of the first day.

there a significant difference between these values and those obtained 1 day after operation. On the other hand, there is a highly significant difference between the values obtained by over- and after-loading after 3 and 4 days, and those on the 3rd and 4th days in the postoperative injection series.

These data reveal that the decrease of inulin concentration in the serum of the nephrectomized dog does not mean a true expansion of the extracellular space. The over- and after-loading experiments show clearly that no true ex-

pansion of the inulin distribution space takes place in the dog during the days following nephrectomy.

What happens then with the inulin introduced into the organism? Theoretically, one might suggest breakdown in the body, elimination by the extrarenal route, as well as penetration into the intracellular space. The animals were given 0,2 g/kg inulin post-operatively, which is equal to about 0,2 g/kg yeast-resistant and alkali-resistant inulin. This dose produces an approximately 80 to 100 mg per 100 ml yeast-resistant, and alkali-resistant, inulin concentration in serum. The level of inulin in serum decreases by about 20 to 25 mg per 100 ml a day, which is equal to a loss of about 0,05 g of inulin per kg body weight.

JANCSÓ [18] has shown that in the mouse following intravenous administration of 0,1 g inulin, crystals of inulin appear in the cell of the reticuloendothelial apparatus and in the connective tissue histiocytes proove that substances smaller than macromolecular in size may also be stored. It seems therefore obvious to suggest that the decrease of the level of inulin in serum, as it occurs in the nephrectomized dog, is in connection with an intracellular storage of inulin.

SUMMARY

In the nephrectomized dog the distribution space of inulin is around 17 per cent of the total body weight on the day of operation. During the following days the serum level of inulin declines gradually, *i. e.* the apparent distribution space of inulin increases. In over-loading and after-loading experiments made 3 to 5 days after operation it has been demonstrated that the decrease of serum concentration was due to factors other than a true expansion of inulin space. Among the possible explanations intracellular storage of inulin seems to be the most plausible.

LITERATURE

1. SCHACHTER, D., FREINKEL, N., SCHWARTZ, I. L.: Amer. J. Physiol. **160,** 532 (1950).
2. GAUDINO, M., SCHWARTZ, I. L., LEVITT, M. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **68,** 507 (1938).
3. GAUDINO, M., LEVITT, M. F.: Amer. J. Physiol. **157,** 387 (1949).
4. RAISZ, L. G., YOUNG, M. K., STINSON, I. T.: Ibid. **174,** 72 (1953).
5. EPSTEIN, F. H., KLEEMAN, C. R., RUBINI, M. E., LAMDIN, E.: Ibid. **182,** 553 (1955).
6. ECKEL, R. R., SMITH, G.: Ibid. **175,** 333 (1953).
7. FINKENSTAEDT, J. T., O'MEARA, M. P., MERRILL, J. P.: J. Clin. Invest. **32,** 209 (1953).
8. HAMBURGER, J., MATHÉ, G.: Fluid balance in anuria. (In The Kidney, Ciba Foundation Symposium, Churchill, London (1954) p. 288.
9. BERNE, R. M.: Amer. J. Physiol. **163,** 697 (1950).
10. BERNE, R. M., LEVY, M. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. **77,** 582 (1951).
11. LAST, J. H., JONES, R. A. MCDONALD, G. O., BOND, E. E.: Feder. Proc. **11,** 367 (1952).
12. DEANE, N., SMITH, H. W.: J. Clin. Invest. **34,** 681 (1955).
13. HARRISON, H. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **49,** 109 (1942).
14. LITTLE, J. M.: J. Biol. Chem. **180,** 747 (1949).
15. JENDRASSIK, L., CLEGHORN, N. R. A., cit. BÁLINT, P. and HEGEDÜS A., Klinikai laboratóriumi diagnosztika, Művelt Nép, Budapest (1955).
16. FISCHER, R. A.: Statistical Methods for Research Workers, 10th Ed. Oliver and Boyd, London (1946).
17. COTLOVE, E.: Feder. Proc. **13,** 30 (1954).
18. JANCSÓ, N.: Speicherung. Akadémiai Kiadó, Budapest (1955).

Pharmacologia

PHARMAKOLOGIE DER AMINOKETONE

IV. ADRENOLYTISCHE AMINOKETONE*

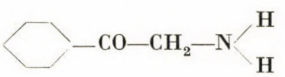
Von

J. PÓRSZÁSZ, K. NÁDOR, KATALIN PÓRSZÁSZ-GIBISZER und GY. SUCH

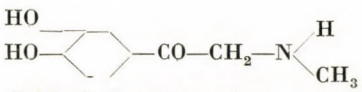
PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT SZEGED,
PHARMAKOLOGISCHE ABTEILUNG DES INSTITUTES FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZINISCHE FORSCHUNG
DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, BUDAPEST

(Eingegangen am 28. Mai 1956)

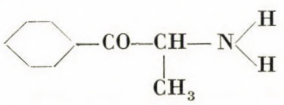
Die dem Adrenalin und verwandten Verbindungen entsprechenden Ketonderivate verfügen nach den Untersuchungen von BERGER und DALE [1] über eine sympathomimetische Eigenschaft, doch ist ihre Wirkung 150—1000mal schwächer, als die des Adrenalins. Solche sind z. B.:

das  Adr. Aktivität

a-Phenyl-*a*-Oxo-*β*-Aminoaethan 1 : 1,000

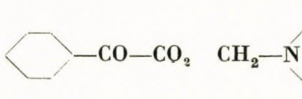


3-4-Dioxy-Phenyl-*a*-Oxo-*β*-Methylaminoaethan 1 : 150



a-Phenyl-*a*-Oxo-*β*-Aminopropan 1 : 443

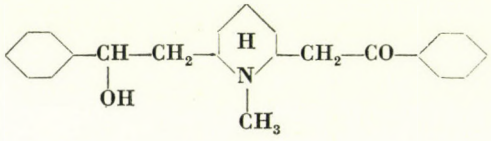
Bei Adrenalin ähnlich aufgebauten Verbindungen stellten MERCIER und SESTIER [2, 3] fest, dass das Diaethylaminopropiophenon (1-Diaethylamino-3-phenyl-propan-3-on) auch eine solche Eigenschaft hat :

 *β*-Diaethylaminopropiophenon

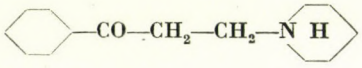
Ausgehend aus der Überlegung, dass es mit dem BRAUN'schen Hetero-

* Prof. B. Issekutz anlässlich seines 70. Geburtstages gewidmet.

topieprinzip [4] vielleicht gelingen wird im Lobelinmolekül durch die Übertragung des an das N-Methyl-piperidino-Gerüst in α-Lage gebundenen Phenazylradikals auf das N eine starke respirationssteigernde Verbindung zu finden, haben wir i. J. 1953 Versuche mit 1-(Amino)piperidino-aethyl(methyl- oder propyl)-ketonen angestellt



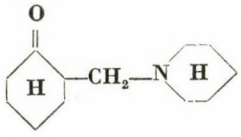
Lobelin



NA—65

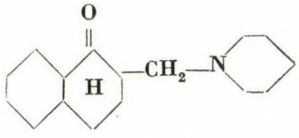
β-Piperidinopropiophenon

So haben wir unter anderen auch das von MERCIER untersuchte β-Diaethylaminopropiophenon hergestellt. In diesen Untersuchungen [5, 6, 7] wurde festgestellt, dass derartige Verbindungen (unter ihnen das von MERCIER hergestellte β-Diaethylaminopropiophenon) überhaupt keine adrenolytische Eigenschaft haben, sondern ihre bezeichnendste pharmakologische Eigenschaft in der Hemmung der Nikotinkonvulsionen besteht. Ferner fanden wir, dass jene Aminoketone, in denen die Ketongruppe nicht in einer offenen C-Kette, sondern zyklisch angeordnet ist, wie z. B. in der mit NA-66 bezeichneten Verbindung, über eine sehr starke respirationssteigernde und zentrale analeptische Wirkung verfügen. Auf Grund unserer weiteren Forschungen versuchten wir durch die Steigerung des Molgewichts noch aktivere Verbindungen zu gewinnen. Inzwischen konnten wir das Erscheinen einer starken adrenolytischen Eigenschaft beobachten. Eine solche ist z. B. die Verbindung NA-86.



1-Piperidinomethyl-cyklohexanon-2

Na-66 (5)



1-Piperidinomethyl-tetralon-2

Na-86 (7)

Um den Zusammenhang zwischen Wirkung und chemischer Struktur zu studieren, haben wir neue Verbindungen hergestellt, bzw. zum Gegenstand eingehender pharmakologischer Untersuchung gemacht. In der Tabelle I sind die Formeln, Toxizitäts- und andere Daten der Verbindungen dargestellt. Für die Versuche wurde die 2—5%-e Lösung der Verbindungen benutzt. Bei Kochen werden sie zersetzt.

Methodik

Die auf subtoxische Dosen auftretenden Allgemeinsymptome haben wir an weissen Mäusen untersucht, die Antinikotinwirkung 6 mg/kg. i. v. (DL_{100}) Nikotintartarat gegenüber ebenfalls an Mäusen, mittels der in einer früheren Mitteilung beschriebenen Methode [5], die Wirkung auf Blutdruck und Respiration bei 22 Katzen (50 mg/kg i. p.) in Chloralose- und Urethannarkose (300 mg/kg i. p.), ferner bei drei Hunden in Morphin- (2 mg/kg s. c.) und Chloralose- (70 mg/kg i. v.) Narkose untersucht. Die Blutströmung wurde mit der REIN'schen Thermostromuhr in der Vena femoralis, die Respiration mit Gummimembranmanometer und der Blutdruck mit Glasmembranmanometer am Photokymographion (System JAQUET), die Kontraktionen der Katzennickhaut mittels eines isotonischen Hebels von 1 : 12 Übertragung registriert.

A. Allgemein-Symptome bei Mäusen

Die Verbindungen *N-538*, *N-530*, *NA-86* verursachen abhängig von ihrer Dosis zuerst eine mässige motorische Unruhe, dann entwickelt sich eine sich allmählich vertiefende Narkose. In diesem Zustand ist die Körpertemperatur schon sehr niedrig [9]. Nicht selten sinkt die Temperatur der Tiere sogar bis 26 C°. Bei toxischen Dosen tritt der Tod infolge von Respirationslähmung ein.

N-332 in 50 mg/kg s. c. Dosis verursacht bereits 8—10 Min. nach der Injektion eine starke Muskelschwäche. Die Maus ist auch auf die Wirkung von starkem Schmerzreiz kaum im Stande einige Schritte vorwärts zu machen. Ihre Körperhaltungsreflexe sind normal, die Atmung wird später oberflächlich und der Tod tritt gewöhnlich binnen einer $^1/_2$ Stunde infolge von Atemlähmung ein.

N-454 verursacht nicht einmal in einer Dosis von 400 mg/kg irgend eine Veränderung im Verhalten des Tieres, und auch keine Narkose.

NA-110 verursacht in einer Dosis von 600 mg/kg eine oberflächliche (++) Narkose. Krämpfe haben wir bei diesen Dosen nicht beobachtet.

F-933 vermindert zwar in einer Dosis von 600 mg/kg s. c. sehr stark die spontanen Bewegungen der Tiere, doch ist selbst bei dieser Dosis keine Narkose zu beobachten. Die Körpertemperatur der Tiere wird bereits durch 100 mg/kg beträchtlich herabgesetzt.

B. Wirkung auf den Blutdruck und die Atmung

N-538, *N-530*, *NA-86*.

a) *Untersuchungen an Katzen*

Diese Verbindungen rufen bereits in einer Dosis von 3—5 mg/kg eine starke Blutdrucksenkung von ungefähr 50—80 Hgmm hervor, die in 20—45 Min. vollständig aufhört. Am stärksten wirkt in dieser Beziehung die Verbindung NA-86 und am schwächsten N-538. Von *N-538* sind 7 mg/kg nötig um eine ebenso starke Wirkung zu erzielen, wie durch 3 mg/kg des NA-86.

Nach intravenöser Injektion ist regelmässig eine vorübergehende Apnoe (5—10 Sec.) und nachher eine erhebliche Steigerung der Respiration zu beobachten. Die Respirationssteigerung dürfte durch die plötzliche Blutdrucksen-

kung verursacht werden. Die Hemmung der blutdrucksteigernden Wirkung des Adrenalins zeigt Abb. 1. In diesem Falle senkt 3 mg/kg NA-86 intravenös verabfolgt den Blutdruck ungefähr um 60 Hgmm und hemmt die durch eine vorherige Adrenalingabe von 2,5—5 μg/kg verursachte Blutdrucksteigerung nicht nur nicht, sondern kehrt diese sogar um. Diese Hemmwirkung besteht auch in solchen Fällen, wo das NA-86 den Blutdruck nicht anhaltend senkt. Dies ist auch an Abb. 1 zu sehen. Der Antagonismus ist langdauernd und wie es

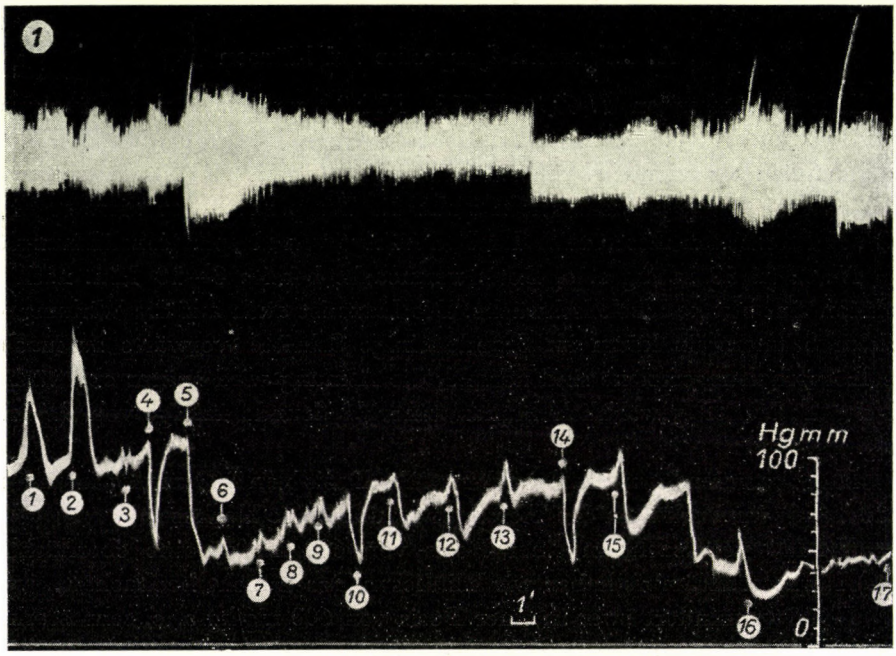


Abb. 1. 3000 g schwere Katze. Urethannarkose (1g/kg). Adrenolytische Wirkung des NA-86. Zeichen von oben nach unten: Respiration, Blutdruck

1 : 2,5 μg Adr., 2 : 5 μg Adr., 3 : 0,1 μg Hist., 4 : 1 μg Hist., 5 : 3 mg A-86, 6 : 2,5 μg Adr., 7 : 5 μg Adr., 8 : 2,5 μg Adr., 9 : 2,5 μg Adr., 10 : 0,1 μg Hist., 11 : 5 μg Adr., 12 : 5 μg Adr., 13 : 5 μg Adr., 14 : 1 μg Hist., 15 : 5 μg Adr., 16 : 5 μg Adr., 17 : 5 μg Adr.

im mitgeteilten Fall sichtbar ist, besteht er noch nach 75 Min.; er ist nicht hochgradig, da er sich auf eine 4—8fache Adrenalinmenge nicht mehr erstreckt, d. h., dass NA-86 in einer Dosis von 3 mg/kg nicht mehr imstande ist die Wirkung von 20, bzw. 40 μg/kg Adrenalin zu antagonisieren. Dies ist z. B. an Abb. 2 zu beobachten. Es ist sichtbar, dass nach 3 mg/kg NA-86, 40 μg/kg Adrenalin die gleiche Blutdrucksteigerung verursacht, wie vorher 5 μg/kg. In diesem Fall erstreckt sich also der Antagonismus auf das achtfache der anfänglichen Adrenalindosis. Abb. 2 zeigt auch, dass die adrenolytische Aktivität nicht nur am Blutdruck, sondern auch an der Nickhaut in Erscheinung tritt. Die auf die Nickhaut entfaltete Hemmung dauert sogar — was sehr auffallend ist — viel

länger als die Hemmung der durch das Adrenalin bewirkten Hemmung der Blutdrucksteigerung und ist auch stärker, weil 40 μg/kg Adrenalin an der Nickhaut völlig wirkungslos ist, obwohl diese Dosis den Blutdruck bereits steigert.

Die Stärke des NA-86 bleibt kaum hinter dem F-933 zurück. An Abb. 3 teilen wir einen diesbezüglichen Versuch mit, wo 3 mg/kg F-933, die durch 10 und 20 μg/kg Adrenalin verursachte Blutdrucksteigerung hemmt und ihre Wirkung umkehrt. Aber bereits 40 μg/kg Adrenalin verursacht eine ungefähr

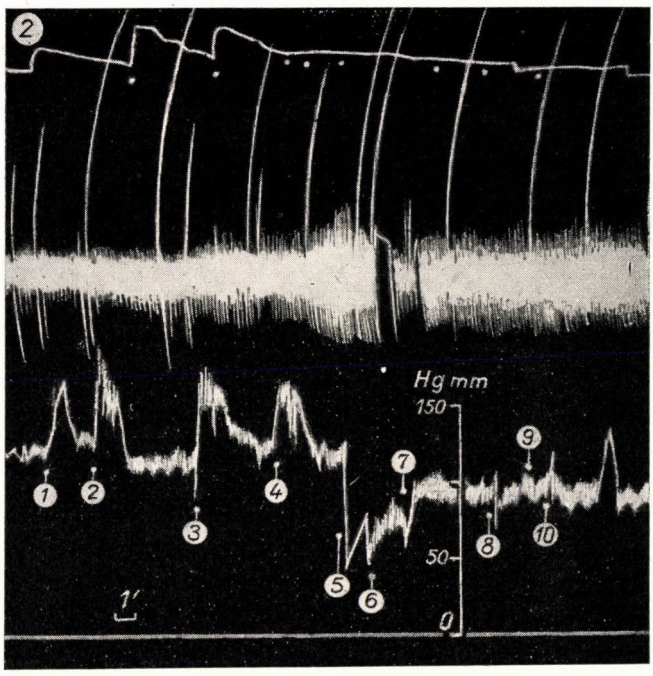


Abb. 2. 3500 g schwere Katze. Chloralosenarkose (50 mg/kg i. p.). Einfluss des NA-86 auf die Blutdruck- und Nickhautwirkungen des Adrenalins und der Verbindung NA-102. Zeichen: oben Membrana nictitans, unten Respiration und Blutdruck, 0-Linie
1 : 5 μg Adr., 2 : 10 μg Adr., 3 : 200 μg A-102, 4 : 10 μg Adr., 5 : 3 mg A-86, 6 : 10 μg Adr., 7 : 200 μg A-102, 8 : 10 μg Adr., 9 : 20 μg Adr., 10 : 40 μg Adr.

ebenso grosse Blutdrucksteigerung, wie 10 μg/kg Adrenalin vor der Gabe von F-933. Der Antagonismus bezieht sich nach diesem Versuch bloss auf die vierfache Adrenalinmenge. Nach GYÖRGY [10] ist das NA-86 ein kompetitiver Antagonist des Adrenalins, da die Dosiswirkungskurven des Adrenalins bei den mit verschiedenen NA-86 Mengen behandelten Tieren parallel verlaufen. Nach seinen Untersuchungen ist die am Blutdruck gezeigte Hemmung etwas schwächer, als die des F-933, an der Nickhaut aber stärker.

Unter den antagonistischen Adrenalinwirkungen wird eine *a)* sympathicusblockierende, *b)* eine adrenolytische und *c)* eine sympatholytische Aktivität unterschieden [11]. Von einer echten sympathicusblockierenden Verbindung

ist zu erwarten, dass sie die nach Abklemmung der Karotiden auftretende Blutdrucksteigerung zu hemmen fähig sei. Aus diesem Grunde führten wir Untersuchungen in dieser Richtung mit dem NA-86 aus. An Abb. 4 ist gut zu sehen, dass das NA-86 nicht nur die Blutdruckwirkung des Adrenalins umkehrt, sondern auch die nach Abklemmung der Karotiden für 20 Sec. auftretende

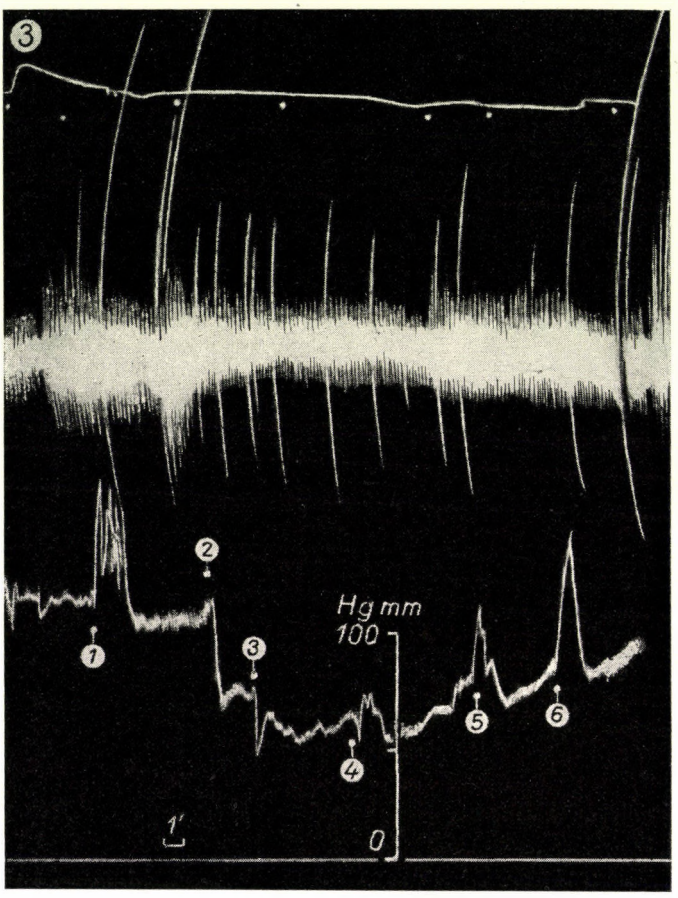
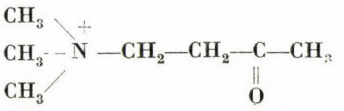


Abb. 3. 3500 g schwere Katze. Chloralose- (50 mg/kg) und Urethan- (300 mg/kg i. p.) Narkose
Adrenolytische Aktivität des F-933
Zeichen: wie in *Abb. 2*
1 : 10 µg Adr., 2 : 3 mg F-933, 3 : 10 µg Adr., 4 : 20 µg Adr., 5 : 40 µg Adr., 6 : 40 µg Adr.

Blutdrucksteigerung hemmt. Demnach verfügt die Verbindung NA-86 nicht nur über eine adrenolytische, sondern auch über eine sympatholytische Aktivität. Dies spricht dafür, dass das NA-86 auch eine zentrale Depressionswirkung hat, wie es von uns in einer früheren Mitteilung angenommen wurde [9]. Die Verbindung NA-86 antagonisiert nicht nur die vasopressorische Wirkung des Adrenalins, sondern ähnlich dem F-933 auch die des Nikotins.

Nach unseren mit den Aminoketonen ausgeführten Untersuchungen verursacht das dem Acetylcholin entsprechende Ketonderivat [6, 7] das 1-Dimethylamino-3-methyl-butan-on-3-jodmethylat und das NA-102



die Erregung der sympathischen Ganglien und bewirkt bei mit Chloralose narkotisierten Katzen bereits in der Menge von 100 μg/kg eine starke Blutdrucksteigerung und Respirationserhöhung. Dies ist an Abb. 5 zu beobachten. Diese Erscheinungen sind mit Ganglionblockern (TEA, C_6) oder mit einem Sympatholytikum (F-933) zu verhindern. Das NA-86 verhält sich in dieser Hinsicht ähnlich dem F-933, wie es an Abb. 2 zu sehen ist. Auffallend ist aber, dass durch NA-86 und F-933 die Blutdruckwirkungen des NA-102 nicht nur gehemmt, sondern auch umgekehrt werden. Das gleiche Phänomen ist auch nach Anwendung von Ganglionblockern zu beobachten. Die Erklärung dieses Phänomens werden wir später in einer die quaternären Aminoketone behandelnden Arbeit mitteilen.

Die Verbindungen N-530 und N-538 sind bezüglich ihrer adrenalinhemmenden Wirkung schwächer, als das NA-86. Die Reihenfolge der Aktivität ist : NA-86 > N-530 > N-538.

b) *Versuche an Hunden*

Die Ausschaltung der sympathischen vasomotorischen Impulse führt infolge der Verminderung des peripheren Widerstandes zur Blutdrucksenkung. Gleichzeitig wächst das Minutenvolumen und steigt die die periphere Arterie oder Vene durchströmende Blutmenge [12]. Obwohl nach den bisher ausgeführten Versuchen das NA-86 und analoge Verbindungen durch ihre sympathicusblockierenden Eigenschaften gekennzeichnet sind, haben wir zur genaueren Klärung des Wirkungsmechanismus auch diese Frage zum Gegenstand der Untersuchung gemacht.

Wir führten derartige Untersuchungen an 3 Hunden aus und stellten fest, dass 5 mg/kg NA-86 i. v. eine erhebliche und anhaltende Blutdrucksenkung verursacht, gleichzeitig kommt es auch zur Vermehrung der durch die Vena femoralis strömenden Blutmenge, demnach ist die durch das NA-86 verursachte Drucksenkung die Folge der Verminderung des peripheren Widerstandes. Unsere Versuche haben auch den Beweis erbracht, dass die inverse Adrenalinwirkung nicht nur in den allgemeinen Blutdruckverhältnissen des Tieres in Erscheinung tritt, sondern auch an den peripheren Gefässen zur Geltung kommt. Geben wir nämlich den mit NA-86 behandelten Hunden Adrenalin, so erhöht sich gleichzeitig mit der Blutdrucksenkung der Kreislauf in der Vena femoralis.

N-454 und *N-332*.

Beide Verbindungen sind strukturell dem NA-86 sehr ähnlich. Das N-454 unterscheidet sich darin von diesem, dass der von der Oxo-Gruppe ferner liegende Ring auch hydriert ist, während im N-332 der Ring mit Oxo-Gruppe

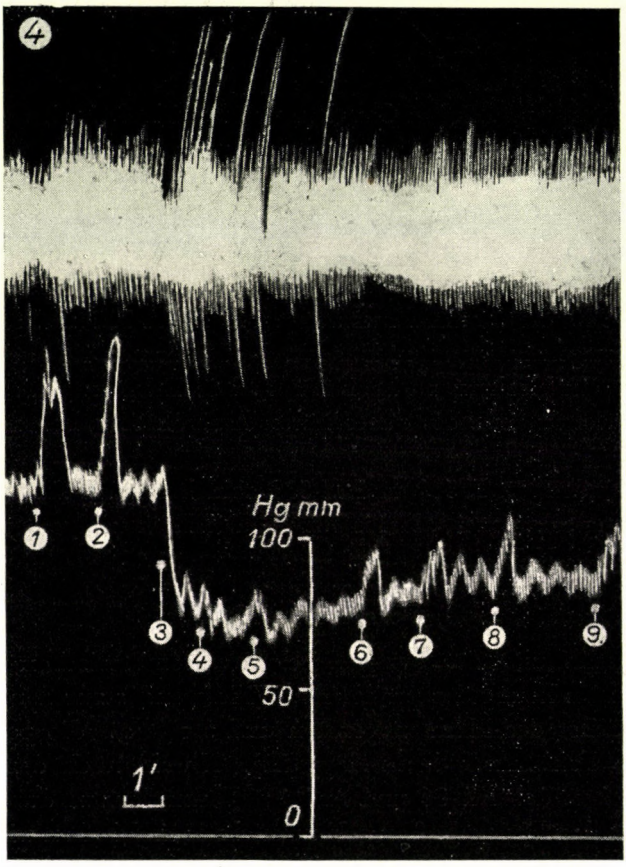


Abb. 4. 3500 g schwere Katze. Chloralose- (50/mg/kg) und Urethan- (300 mg/kg i. p.) Narkose A-86 hemmt die Blutdrucksteigerung bei Abklemmung der beiden Karotiden
Oben Respiration, unten Blutdruck, Zeit an der 0-Linie, 1 : 5 μg Adr., 2 : 20″ Abklemmung der beiden Karotiden, 3 : 3 mg A-86, 4 : 5 μg Adr., 5 : 20″ Abklemmung der beiden Karotiden, 6 : 20″ Abklemmung der beiden Karotiden, 7 : 5 μg Adr., 8 : 20″ Abklemmung der beiden Karotiden, 9 : 5 μg Adr.

5 C-Atome enthält. Die genannten Verbindungen sind also analog mit dem NA-86 (N-454) oder zeigen nur eine geringe strukturelle Abweichung (N-332), doch sind ihre pharmakologischen Wirkungen nicht identisch. Keine dieser Verbindungen ist imstande die Blutdruckwirkungen des Adrenalins zu antagonisieren. Die Verbindung N-332 ruft zwar in der Dosis von 5 mg/kg eine starke Blutdrucksenkung hervor und diese Wirkung hält ziemlich lange

an, doch vermag sie selbst die durch 5 μg/kg Adrenalin verursachte Blutdrucksteigerung nicht zu antagonisieren. Sehr interessant ist die Verbindung N-454. Diese verhält sich nämlich gerade umgekehrt, wie die Verbindung NA-86, sie ruft (meist nur in Chloralose-Narkose) eine Erhöhung des Blutdrucks hervor, die aber lediglich bei kleineren, 1—2 mg/kg i. v. Dosen nachzuweisen ist. Grössere Dosen senken den Blutdruck, haben aber keine adrenolytische Eigenschaft.

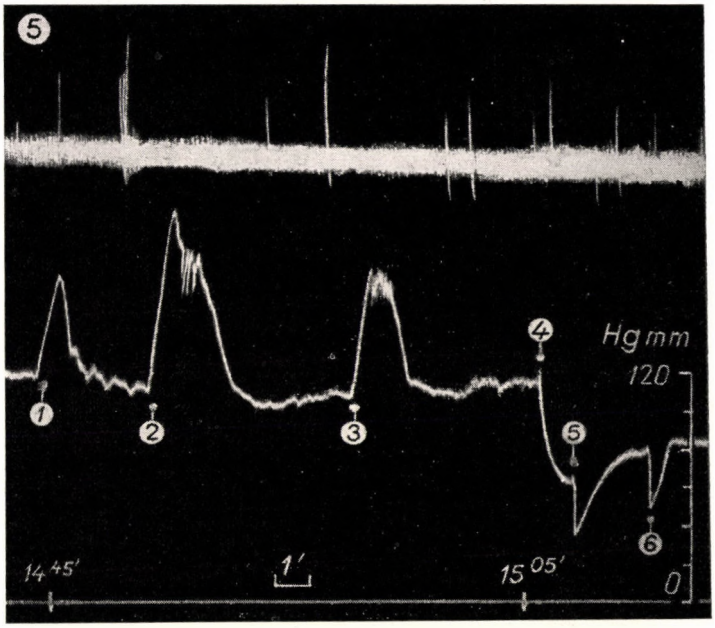


Abb. 5. 2500 g schwere Katze. 50 mg/kg Chloralose-Narkose i. p. Wirkung des NA-110 auf Respiration und Blutdruck. Die vasopressorische Aktivität wird durch Hexamethonium (1,5 mg/kg) vollständig gehemmt, sogar umgekehrt
Zeichen: oben Respiration, unten Blutdruck, Zeit an der 0-Linie
1 : 2,5 μg Adr., 2 : 4 mg NA-110, 3 : 2 mg NA-110, 4 : 1,5 mg C_6, 5 : 2 mg NA-110, 6 : 2 mg NA-110

NA-110.

Diese Verbindung weist ebenfalls eine grosse chemische Ähnlichkeit mit dem NA-86 auf, übt jedoch eine ihm gegensätzliche Wirkung auf den Blutdruck des Tieres. Wie as aus unseren mit dieser Verbindung angestellten, an Abb. 6 mitgeteilten Versuchen ersichtlich ist, steigert sie sehr beträchtlich den Blutdruck und erhöht die Respiration. 2 mg/kg wirkt ungefähr äquipressorisch mit 2,5 μg/kg Adrenalin und 40 μg/kg Nikotintartarat. So ist ihre blutdrucksteigernde Wirkung ungefähr 1000mal schwächer, als die des Adrenalins und 50mal schwächer, als die des Nikotins. Die plötzlich auftretende Blutdrucksteigerung mit gleichzeitiger Erhöhung der Respiration weist auf eine nikotinartige Eigenschaft hin. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht

unsere experimentell gewonnene Erfahrung, dass die Verbindung nach 1,5 mg/kg i.v. verabfolgtem Hexamethonium keine Blutdrucksteigerung hervorruft und auch ihre respirationssteigernde Wirkung praktisch aufhört (Abb. 6). Sehr auffallend ist aber, dass das NA-110 bei solchen Verhältnissen vasodepressorisch wirkt. In Anbetracht dessen, dass durch die Ganglionblocker nicht nur die

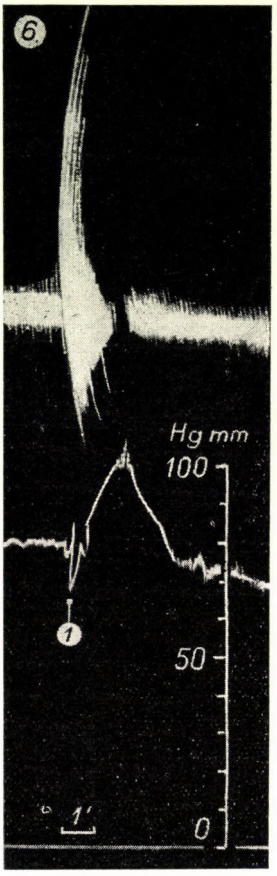


Abb. 6. 3500 g schwere Katze. 50 mg/kg Chloralosenarkose i. p. Wirkung des NA-102 (200 μg/kg i. v. (auf die Atmung (oben) und Blutdruck (in der Mitte)
1 : 200 μg NA-102

sympathischen, sondern auch die parasympathischen vegetativen Umschaltungsstellen gelähmt werden, kann diese Blutdrucksenkung nicht auf die Reizung der parasympathischen Ganglien zurückgeführt werden. Wahrscheinlich ist die *muskarinartige* Eigenschaft der Verbindung.

c) *Untersuchung der Hemmung der Nikotintoxizität an Mäusen*

Nach CAHEN [13] wird der Nikotintremor der Kaninchen durch F-933 (1-Piperidinomethylbenzodioxan), ferner durch Dibenamin (Dibenzyl-β-Chloraethylamin) und F-883 (1-Diaethylamino-methylbenzodioxan) gehemmt. Es

wurde angenommen, dass das primäre in dieser Hemmung die den Endapparat lähmende adrenergische Wirkung der Verbindungen ist. LAURENCE und STACEY [14] konnten in ihren Mäuserversuchen den Nikotintremor mit Dibenamin, Yohimbin und Dihydroergotamin ebenfalls hemmen. Dagegen fanden BOVET und LONGO [15], dass das Dibenamin in der Antagonisierung des Nikotintremors von Kaninchen völlig unwirksam ist.

Nach den Gesagten unterliegt es keinem Zweifel, dass bezüglich der nikotinantagonisierenden Wirkung der Adrenolytika kein einheitlicher Standpunkt erreicht wurde. Es erschien deshalb lohnend die Frage von zwei Gesichtspunkten zu untersuchen: *a)* Das NA-86 wirkt ebenfalls stark adrenolytisch und zeigt in seiner chemischen Struktur eine gewisse Ähnlichkeit mit F-933. *b)* Bei der Verbindung NA-86 und den chemisch ihm ähnlichen anderen, zwei kondensierte Benzolringe enthaltenden, alicyklischen Aminoketonen wäre zu erwarten gewesen, dass die Antinikotinwirkung im Verhältnis zu den Aminoketonen vom allgemeinen —CO—$(CH_2)_n$NR Typ, im Sinne des Gesetzes der Molgewichtsvermehrung, zunehmen wird [8].

Nach unseren Ergebnissen (Tabelle I) verfügen weder das F-933, noch das NA-86 über eine wesentliche Antinikotinwirkung, wenn sie auf Grund des therapeutischen Indexes: $\frac{DC}{DT} = \frac{\text{Dosis curativa}}{\text{Dosis toxica}}$ mit dem Parpanit verglichen werden, dessen therapeutischer Index 0,05 entspricht. Sehr stark wirkt ferner auch die Verbindung 216/325 [mit dem Quotienten 0,032], die aber keine adrenolytische Aktivität besitzt. Wie aus Tabelle I hervorgeht, wird die Nikotintoxizität beinahe von allen untersuchten Verbindungen gehemmt, doch ist ihr therapeutischer Index zwischen 0,5—0,25, demnach ist ihre spezifische Wirkung zweifelhaft.

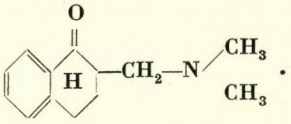
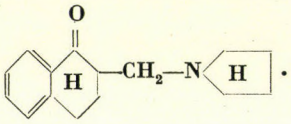
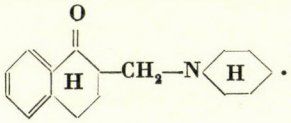
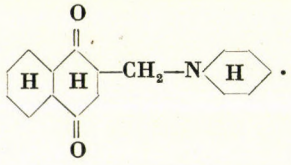
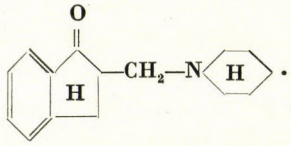
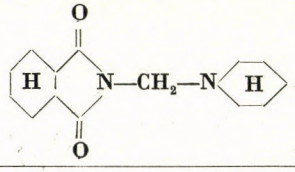
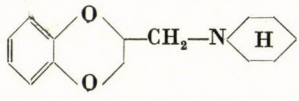
Auffallend ist aber die »Antinikotinwirkung« des NA-110. Unserer Ansicht nach ist dies auf die Eigenschaft zurückzuführen, dass diese Verbindung in grosser Dosis die Ganglien blockiert und nach HAZARD und SAVINI Pharmaka solcher Eigenschaft die Nikotinkrämpfe hemmen (Heteroprotection).

Besprechung der Ergebnisse

In Katzen- und Hundeversuchen haben wir festgestellt, dass es unter den alicyklischen, zwei kondensierte Benzolringe enthaltenden 1-Amino-(oder-Piperidino-)methyl-ketonen solche Verbindungen gibt, welche imstande sind die blutdrucksteigernde Wirkung des i. v. gegebenen Adrenalins umzukehren: NA-86 (1-Piperidinomethyl-tetralon-2 HCl), N-538 (1-Dimethylaminomethyl-tetralon-2 HCl), N-530 (1-Pirrolidinomethyl-tetralon-2 HCl).

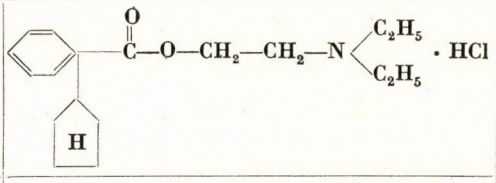
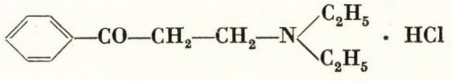
Am stärksten erwies sich in dieser Beziehung das NA-86. Durch diese Verbindung wird die Adrenalinwirkung nicht nur bei Katzen, sondern auch bei

Tabelle I

Name oder Zeichen der Verbindung	Chemische Formel	Adrenalin-vasopressorischer Antagonismus mg/kg i. v. an Katzen	DL_{100} Maus s. c. mg/kg	50% Hemmwirkung gegenüber 6 mg/kg Nikotintartarat. Maus mg/kg s. c. (10—10 Mäuse)	DC/DT
N-538		5—7	400	nicht untersucht	—
N-530		3—5	>200	>100	>0,5
NA-86		3—5	200	75	0,375
N-454		∅	>400	100	>0,25
N-332		∅	50	25	0,5
NA-110		∅*	700	100	0,143
F-933		3—5	700	400	0,57

* Nikotinartiger Vasopressor

DC = 50% Hemmdosis mg/kg. s. c.
DT = DL_{100}

Name oder Zeichen der Verbindung	Chemische Formel	Adrenalin-vasopressorischer Antagonismus mg/kg i. v. an Katzen	DL_{100} Maus s. c. mg/kg	50% Hemmwirkung gegenüber 6 mg/kg Nikotintartarat. Maus mg/kg s. e. (10—10 Mäuse)	DC/DT
Parpanit		∅	500	25	0,05
216/325		∅	400	12,5	0,032

Hunden umgekehrt. In Hundeversuchen stellten wir fest, dass sie die Blutdrucksenkung durch die Verminderung des peripheren Widerstandes auslöst.

Vom Gesichtspunkt des Zusammenhanges zwischen chemischer Struktur und Wirkung haben nur jene Verbindungen eine adrenolytische Eigenschaft, in denen die Oxo-Gruppe das Glied eines gesättigten, aus 6 Atomen bestehenden Ringes darstellt und der neben ihm kondensierte Ring ungesättigt ist (sog. Tetralontyp). Falls die Oxo-Gruppe in einen 5 C Atome enthaltenden Ring angeordnet ist, geht die adrenolytische Wirkung völlig verloren. Obwohl die Verbindung N-332 (1-Piperidinomethyl-indan-on-1) den Blutdruck erheblich herabsetzt und stark toxisch wird, wirkt sie nicht adrenolytisch.

Wenn der zur Oxo-Gruppe kondensierte zweite Ring gesättigt wird, bleibt die adrenolytische Wirkung ebenfalls aus. Eine solche Verbindung ist das N-454 (1-Piperidinomethyl-dekalon-2 HCl). Es tritt sogar als gegensätzliche Wirkung, wenn auch schwach, eine nikotinartige Adrenalin-mobilisierende Eigenschaft in Erscheinung. Eine besonders starke nikotinartige Aktivität zeigt die Verbindung NA-110 (N-Piperidino methyl-phtalimid).

Bei den Verbindungen N-454 und NA-110 ist also weniger das Ausbleiben der Antiadrenalinwirkung überraschend, als die völlige Umkehr der Wirkung. Der Adrenalinantagonismus ist nach den in Tabelle I mitgeteilten Daten lediglich für solche Verbindungen charakteristisch, in denen der eine (neben der Oxo-Gruppe liegende) Ring nicht hydriert ist. Dies ist auch für die Verbindung F-933 charakteristisch. In dieser Verbindung ist aber das o nicht ketonisch, sondern in Aetherbindung.

Der Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und Wirkung kann mit der raumausfüllenden Wirkung der neben der Ketongruppe liegenden Radikale nicht erklärt werden, da die dem NA-86 entsprechende Verbindung N-454 ihre adrenolytische Aktivität gänzlich verliert und der Unterschied

zwischen den zwei Verbindungen nur darin besteht, dass entweder nur die eine, oder beide hydriert sind. Ebenso schwer ist eine Erklärung für die Tatsache zu finden, dass das N-332 (1-Piperidinomethyl-indan-on-1), das sich vom NA-86 bloss in einer CH_2 Gruppe unterscheidet, ebenfalls völlig wirkungslos ist.

Weder das Ausbleiben, noch die Umkehr der Wirkung können lediglich auf die Unterschiede in der Raumausfüllung zurückgeführt werden. Wir halten es für wahrscheinlich, dass diese Wirkungsänderungen durch die Oxo-Gruppe, bzw. durch deren elektrostatische Umgebung bedingt sind. Unsere, den Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der pharmakologischen Wirkung betreffenden Untersuchungen sind im Gange und auf Grund der bisherigen Ergebnisse scheint unsere Annahme sehr wahrscheinlich zu sein [7].

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das 1-Piperidinomethyl-cyklohexanon-2 (NA-66) ist ein die Respiration steigerndes, starkes zentrales Analeptikum. Die zur Stärkung der Wirkung hergestellte Verbindung: das 1-Piperidinomethyl-tetralon-2 (NA-86) ist von starker adrenolytischer Aktivität. Die Aktivität der Homologen dieser Verbindung: 1-Dimethyl-aminoethyl-tetralon-2 (N-538) und 1-pirrolidinomethyl-tetralon-2 (N-530) nimmt in der mitgeteilten Reihenfolge ab.

2. NA-86 hat nicht nur eine adrenolytische sondern auch eine sympathicuslähmende Eigenschaft. Sie hemmt die auf die Abklemmung der Karotiden auftretende Blutdrucksteigerung. Die Blutdrucksenkung ist die Folge der Erweiterung der peripheren Gefässe und die inverse Adrenalinwirkung kommt auch hier zustande. Die Verbindung hemmt die Kreislaufswirkungen des Nikotins und des nikotinartigen 1-Dimethylamino-3-methylpropan-3-on-jodmethylat (NA-102).

3. Die adrenolytischen Aminoketone und das F-933 hemmen die Nikotintoxizität bei Mäusen ebenfalls nicht.

4. Die mit dem NA-86 analoge Verbindung 1-Piperidinomethyldekalon-2. HCl (NA-454) und besonders das N-Piperidinomethyl-phtalimid (NA-110) sind von nikotinartiger Eigenschaft sie steigern den Blutdruck und erhöhen die Respiration.

5. Der Wirkungsunterschied zwischen der adrenolytischen und nikotinartigen Aktivität kann durch das elektrostatische Verhalten der Umgebung der Ketongruppe bedingt werden. Die auf Raumausfüllung zurückgeführten Ursachen reichen für die Erklärung nicht aus.

LITERATUR

1. BERGER, DALE, H. H.: J. Physiol. **41,** 19 (1910).
2. MERCIER, M., MERCIER, J., ROSE-MARIE SESTIER: J. de Physiol. Paris. **45,** 186 (1953).
3. MERCIER, F., ROSE-MARIE SESTIER: C. R. Soc. Biol. **147,** 443 (1953).
4. BRAUN, V.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. **55,** 666 (1922).
5. ISSEKUTZ, B. SEN., PÓRSZÁSZ, J., ISSEKUTZ, L., NÁDOR, K.: Acta Physiol. Hung. **6,** 95 (1954)
6. PÓRSZÁSZ, J., NÁDOR, K., PÓRSZÁSZ-GIBISZER, K., WIESZT, T., PADÁNYI, R.: Acta Physiol. Hung. **7,** 139 (1955).
7. PÓRSZÁSZ, J.: Pharma'ologie der Aminoketone. Dissertation, Budapest (1955).
8. RICHARDSON, Zit. in OSWALD: Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung. Berlin (1924).
9. PÓRSZÁSZ, J., NÁDOR, K., PÓRSZÁSZ-GIBISZER, K., BACSÓ, I.: Acta Physiol. Hung. (Im Druck).
10. GYÖRGY, L.: Dissertation. Budapest. (1956).
11. KRAUSE, D.: Dtsch. Tierärztl. Wschr. **62,** 45 (1955).
12. GOODMAN, L. S., GILMAN, A.: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 2nd Ed. MacMillan, New York 1955 p. 588.
13. CAHEN, R. K., THOMAS, J. M., TVEDE, K. M.: J. Pharmacol. **107,** 424 (1953).
14. LAURENCE, D. R., STACEY, R. S.: Brit. J. Pharmacol. **8,** 62 (1953).
15. BOVET, D., LONGO, F.: J. Pharmacol **102,** 22 (1951).
16. HAZARD, R., SAVINI, E.: Arch. Int. Pharmcodyn. **92,** 471 (1953).

SOME CHARACTERISTICAL HIGHER NERVOUS ACTIVITY CHANGES IN DOGS FOLLOWING TEMPORARY ISCHAEMISATION OF THE HEAD

PRELIMINARY REPORT

By

A. J. ÁNGYÁN, P. FINÁLY and P. ROHEIM

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL, BUDAPEST

(Received October 1, 1956)

No clear answer about the disappearance and the restitution of conditioned reflexes and their display following cerebral anaemisation or ischaemisation may be obtained from known literary data [1—5]. Their contradictions may be due in part to the use of traumatising or aspecific anaemising methods, to complications with operative and anaesthetic procedures or to species and type differences.

It was therefore, endeavoured to follow the dynamics of conditioned reflexes on unanaesthetized dogs, after previous establishment of their Pavlovian types. For temporary cerebral anaemisation (resp. ischaemisation) and to avoid the trauma, the "pressure cuff" method of KABAT and DENNIS [6] was employed, 2—14 days following severance of the vertebral arteries on both sides of the III—VII. cervical vertebrae. A pressure of 700 mm Hg was applied on the neck of the animal, for 7 to 12 minutes. Respiration was ensured by tracheal intubation and, if needed, by a respiration apparatus. Its frequency, as well as the pulse rate, corneal and tendon reflexes were registered. 3 to 15 minutes after the pressure had been discontinued, the dogs could stay on their feet only with help, and showed an ataxic and apathic behaviour. Most animals recovered from this state in 1—2 hours.

The conditioned reflexes were previously established and controlled by various typological tests, especially of extinction before, and one hour after applying the pressure cuff, as well as on the following days — three to four weeks.

Classical Pavlovian salivary reflexes and their extinction were controlled on a dog of the weak (melancholic) type, three times, at intervals of 2 to 3 months (Fig. 1). In each case, conditioned reflexes disappeared in 1 hour to 1 day following the pressure cuff. Unconditioned reflexes were maintained. The next 3 to 4 days, however, conditioned salivation increased significantly, discrimination (D) was heavily impaired and the positive reflexes could not be extinguished. (Shown by the extinction curves on Fig. 1 — as compared with the normal, *black* extinction curve taken on the same day before the pressure cuff.) A relative improvement of the weakened central inhibition, and a reestablishment of normal responses was obtained 2 to 3 weeks later.

To answer the question, whether the changes were specific, or due to the type of the dog, or even characteristic of feed reflexes, subsequent observations were made with avoidance reactions. Conditioned instrumental avoidance reflexes to alternated positive and negative sound stimuli, reinforced by electric-

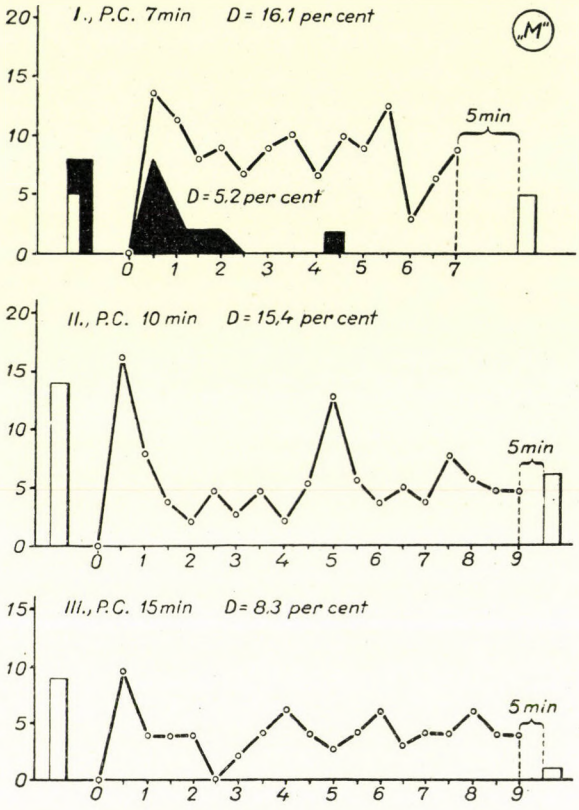


Fig. 1. Conditioned salivary reflexes, and their extinction curves before and after repeated cerebral ischaemisation in a dog of the weak (melancholic) Pavlovian type
Ordinate, conditioned salivation in drops. Abscissa, minutes of "continuous" extinction. First column, intensity of conditioned reflex to sound, to be extinguished. First row: black area, before white area, 24 hours after head ischaemisation
Extinction curves (black, before; white, after cerebral ischaemisation) are represented by the sums of conditioned salivation every minute, during extinction
Last column: recovered intensity of conditioned reflexes 5 minutes after extinction has been discontinued
"P. C. 7" — pressure cuff for 7 minutes
"D=16, 1%" — percentual value of discrimination before extinction (by comparing the conditioned response to the negative stimulus with the sum of conditioned responses)

al shock on the leg, were built up in three dogs. The dynamics of their conditioned reflex activity and their Pavlovian types were repeatedly determined by a new, shortened testing procedure, before and after operation and ischaemisation

[7]. (This method, developed by one of us especially for controlling transitory changes of higher nervous activity following operations or during drug application, is based upon controlling of reciprocal induction and irradiation, external inhibition, and extinction of positive and negative conditioned reflexes in the

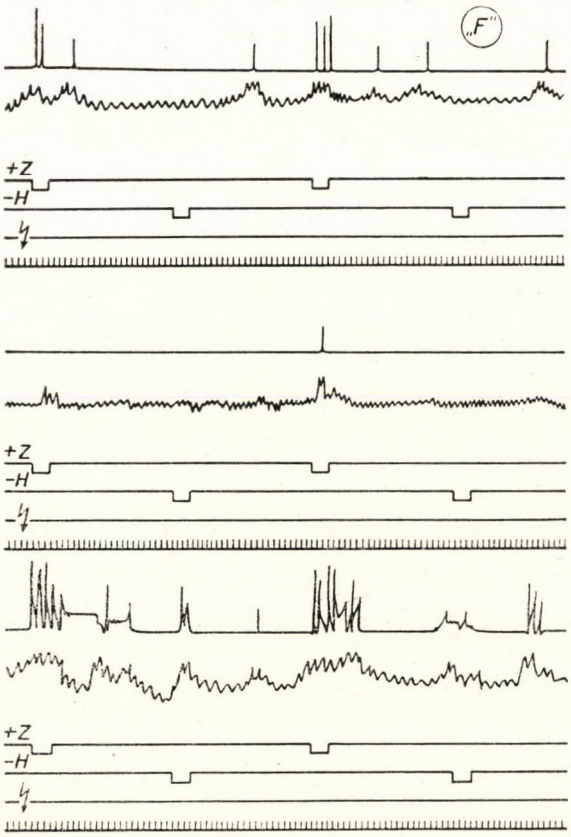


Fig. 2. Conditioned avoidance responses (hind leg flexion) in a strong, equilibrated, inert (phlegmatic) dog, immediately before, 1 hour after, and a day after cerebral ischaemisation.
On the kymogram sections: hind leg flexion, respiration (pneumatically registrated) signs of positive (+Z), of negative (—H) conditioned stimulation, of the nociceptive electric shock, time marking.
[Before ischaemisation: repeated, intensive positive reactions; no response during negative stimulus, rare reaction during intervals.
Immediately after ischaemisation: only one weak positive response during a session, in which 20 alternating positive and negative stimuli were given. No interval ("intersignal" responses) 24 hours later: Repeated, intensive reactions to positive, somewhat weaker, but marked, responses to negative stimuli. Interval responses show irradiation of conditioned ones.]

course of one experimental session, upon a statistical evaluation of these effects, on basis of their correspondance to the four Pavlovian types).

After the "typological spectra" had been determined, three dogs, a phlegmatic (strong, equilibrated, inert) animal, a choleric (strong, unequilibrated,

labile) animal, were selected for cerebral anaemisation. As shown by the typical results of the experiments (Fig. 2, 3), the dynamics of conditioned avoidance reflexes following cerebral ischaemisation showed essentially the same changes as the food reactions of the first melancholic dog. Fig. 2 shows that the normal responses and the rare intersignal reactions present before cerebral ischaemisa-

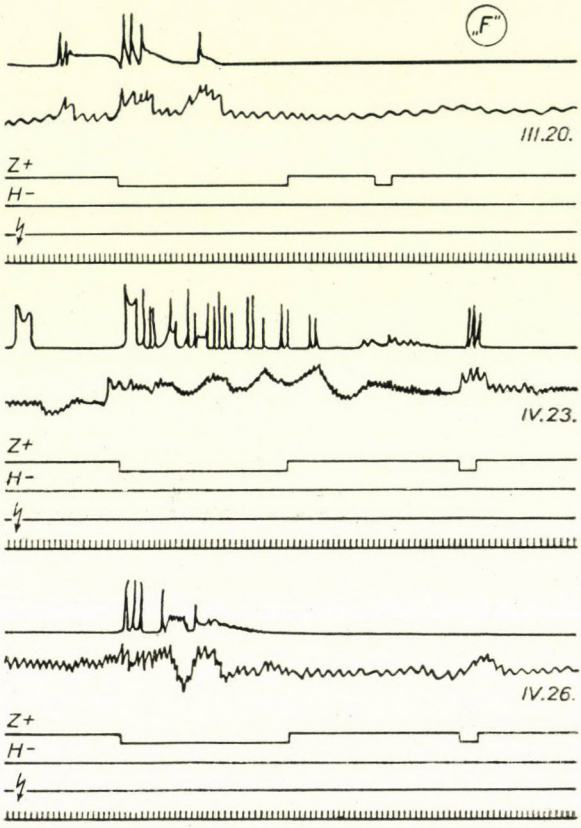


Fig. 3. Extinction of conditioned avoidance reflexes and their spontaneous recovery, — before, and 24 hours after ischaemisation, as well as after restitution of normal dynamics in dogs of the phlegmatic, resp. choleric-sanguinic type
Explanation of kymographic registration, as in Fig. 2.
Fig. 3a : strong equilibrated, inert (phlegmatic/dog/"F") :
[1st row : Before the pressure-cuff. Decrease and disappearance of conditioned responses during extinction (prolonged administration of the positive conditioned stimulus), — no spontaneous recovery after 30 seconds. Pressure-cuff : 22. IV.
2nd row : 24 hours later. No extinction, but irradiation and slow decay of conditioned responses. Spontaneous recovery after 1 minute.
3rd row : 4th day following ischaemisation. Extinction, with no spontaneous recovery, as before, (characteristic of this type)]

tion almost disappeared immediately after releasing the pressure cuff, whereas 48 hours later increased excitatory responses prevailed. Fig. 3 (a. and b.) show the testing of extinction which was normal and corresponded to the type charac-

teristics observed before the pressure cuff (first row), but could not be carried out 48 hours later (second row.). With restitution of nearly normal responses, some days (F) or a week later (C), extinction could be carried out again.

A graphic representation of the typological spectra of the dogs of different types (Fig. 4) shows on basis of the tests that after cerebral ischaemisation the

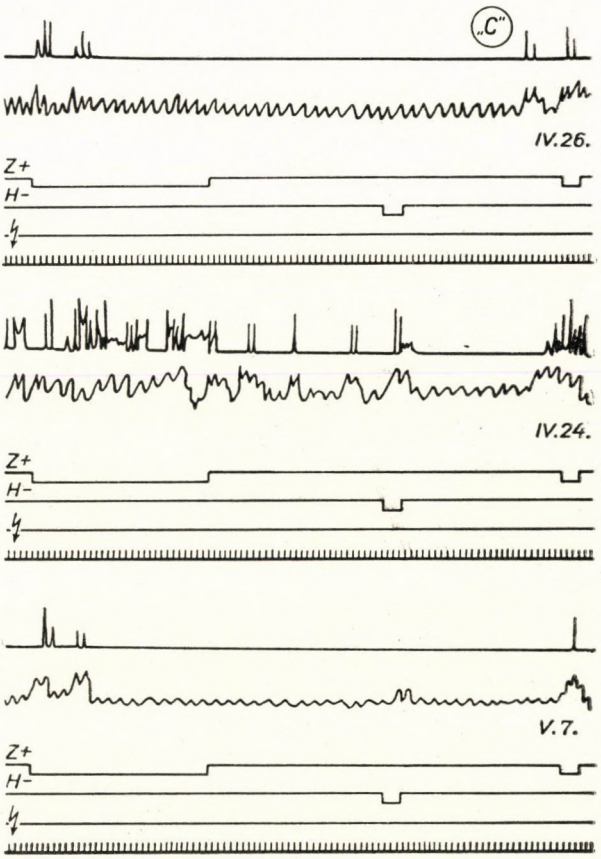


Fig. 3b: Strong, less equilibrated, labile (choleric-sanguinic, "C") dog.
[1st row: Extinction is obtained, full discrimination and recovery of extinguished response. Pressure-cuff on the next day. (27. IV.)
2nd row: 36 hours following ischaemisation. No extinction discrimination, or spontaneous recovery of the extinguished response is possible.
3rd row: After a week. Full restitution of extinction, discrimination and of spontaneous recovery]

type features changed in all dogs in the same direction. It may be assumed that following temporary cerebral ischaemisation two typical phases may be distinguished in the higher nervous activity of dogs. The first one — on the first day — shows an inhibition of conditioned responses. The second, however, — on the subsequent days — is characterised by an exaltation or disinhibition. During the second phase extinction is not possible.

These typical changes do not seem to depend on variations of the procedure, or on type differences. The restitution course and its duration may, however, be influenced by typological features as well as by the severity of the anaemisation. This may be inferred also from a comparison of our results with known literary data, although it may be suggested that to consider only the disappearance or persistance of conditioned reflexes is not a satisfactory indicator of

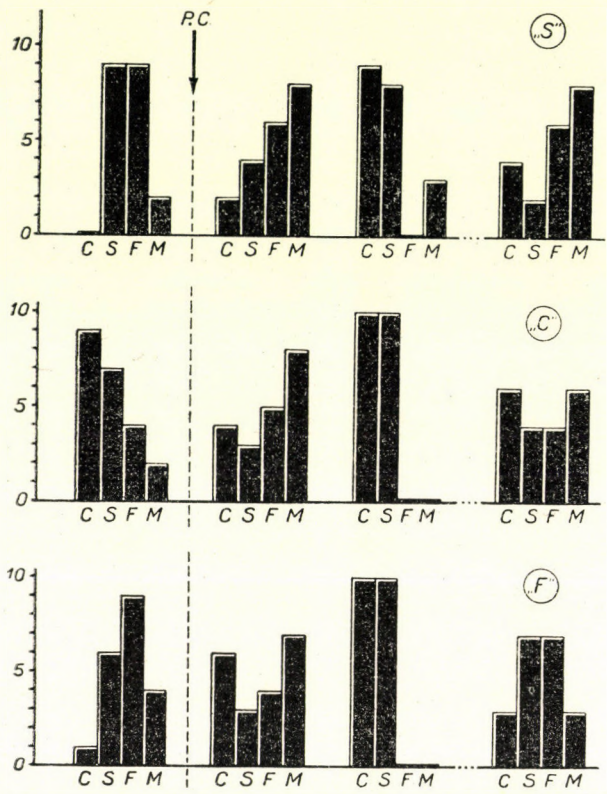


Fig. 4. Typological spectra of three dogs, — before, immediately 24 to 48 hours and a week after head ischaemisation.

[Ordinate: Typological units, from 20 tests, carried out in a session, by evaluation of the correspondance of their immediate and after-effects with the four basic types. The black columns show the relative distribution of type characters, obtained from the tests. P. c. : pressure-cuff. Whereas before ischaemisation individual type differences are marked, on the first day the weak (melancholic) type, on the 2nd, 3rd days the choleric-sanguinic features prevailed, and a week later partial restitution of previous characters (especially in the phlegmatic dog) was found]

higher nervous, or especially of cortical activity but investigation of the dynamism must also be carried out.

An explanation of the consequences of cerebral anaemisation may be searched in answering the question about the dynamics of conditioned reflex activity as attempted by this approach.

LITERATURE

1. ANDREJEV, L. A.: Arch. Neur. Psych. **34,** 669 (1935).
2. ASRATYAN, E. A. (Азратян, Э. А.): Физиол. Ж. **35,** 3 (1949).
3. SAHYULINA, G. T.: (Ж. Высш. Нервн. Деят. **2,** 187 (1951); **5,** 76 (1955).
4. MALMEJAC, M. M., PLANE, P., BOGAERT, E.: Bull. Ac. Med. Belg. **19,** 11 (1954).
5. TEN CATE, J., BOELES, Th. F., KLOPPER, P. J.: Arch. int. Physiol. **63,** 51 (1955).
6. KABAT, H., DENNIS, C.: Proc. Soc. Exp. Biol. **38,** 864 (1938).
7. ÁNGYÁN, A.: Acta Phys. Hung. Suppl. **11.** In the press.

PULMONARY CIRCULATION IN SHOCK

A PRELIMINARY REPORT

By

L. TAKÁCS, Z. NAGY and K. KÁLLAY

3rd DEPARTMENT OF MEDICINE, MEDICAL UNIVERSITY, BUDAPEST

(Received February 1, 1957)

It is well-known that in the various types of shock minute volume and blood pressure are significantly reduced and systemic vascular resistance increases sooner or later. In connection with studies on the regulation of pulmonary circulation, we have examined the behaviour of pulmonary circulation in dogs with traumatic shock. Shock was induced by 200 to 300 hammer blows on both hind limbs, in 13 dogs under chloralose anaesthesia. Minute volume was determined on the basis of the FICK principle, arterio-venous oxygen difference was estimated by the method described by ISSEKUTZ, JR. et al. [1]. Systemic arterial pressure was measured in the carotid artery, pulmonary pressure in the pulmonary artery by means of a membrane manometer of the VORSATZ—KÁLLAY [2] type.

Table I

Dog, ♀, 13 kg

Time	Min. vol ml/min	Blood pressure mm Hg		Resistance 10^5 dynesecm^{-5}		P S
		carotid	pulmonary	systemic	pulmonary	
10^{15}	890	113	18	10,1	1,6	15,9
10^{25}	1200	110	16	7,3	1,0	14,5
trauma						
10^{45}	890	67	12	6,0	1,0	17,9
11^{50}	360	59	12	13,1	2,6	20,3
13^{00}	390	54	12	11,0	2,4	22,3
13^{50}	110	50	12	37,8	9,1	24,1

P/S = pulmonary resistance × 100/systemic resistance.

It has been found that whereas mean minute volume diminished to 39 per cent of the initial value and carotid pressure to 47 per cent, pulmonary arterial pressure decreased by a mere 9 per cent, i.e. to 91 per cent of the initial level. Correspondingly, systemic vascular resistance increased slightly, but

pulmonary vascular resistance was elevated on the average by 200 per cent. The ratio of pulmonary resistance to systemic vascular resistance increased by 100 per cent during shock.

Table I illustrates one of our experiments.

The investigations will be extended to other types of shock and to an analysis of the mechanism underlying the phenomenon described.

LITERATURE

1. ISSEKUTZ, B. Jr., HETÉNYI, G. Jr., FEUER, I.: J. Physiol. **108**, 9 (1949).
2. VORSATZ, B., KÁLLAY, K.: Orvosi Hetilap, In press.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
A kézirat nyomdába érkezett: 1956. IX. 15. — Terjedelem: 9,65 (A/5) ív, 49 ábra

Akadémiai Nyomda, Budapest, Gerlóczy u. 2. — 40653/57 — Felelős vezető: Puskás Ferenc

The *Acta Physiologica* publish papers on experimental medical science in English, French, German and Russian.

The *Acta Physiologica* appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be addressed to :

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Physiologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. — Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les *Acta Physiologica* paraissent en allemand, français, anglais et russe et publient de mémoires du domaine des sciences médico-expérimentales.

Les *Acta Physiologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On es prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction à l'adresse suivante :

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forint par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. — Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«*Acta Physiologica*» публикуют трактаты из области экспериментальной медицинской науки на русском, английском, немецком и французском языках.

«*Acta Physiologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу :

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «*Acta Physiologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «*Kultúra*» (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

28,— Ft

INDEX

BIOCHEMIA

Kramer, M.: Induced Penicillinase Formation in Resting Bacterial Cells. I. The Characteristic Differences of the Formation of Penicillinase in Presence and in Absence of Free Penicillin, in Cells of B. Cereus NRRL-B-569 125

Kramer, M., Straub, F. B.: Induced Penicillinase Formation in Resting Bacterial Cells. II. On the Nature of the Latency Period of Penicillinase Formation in Cells of B. Cereus NRRL-B-569 133

Kramer, M., Straub, F. B.: Induced Penicillinase Formation in Resting Bacterial Cells. III. Induction of Penicillinase Formation by Extracts of B. Cereus NRRL-B-569/H Cells without Penicillin 139

Bárány, M., Bárány, K., Guba, F., Köteles, Gy., Nagy, E.: Über den Zustand des Aktins im Muskel 145

Wollemann, M., Feuer, G.: Die Enstehung von Fluorazetyl-Coenzym A und Fluorazetylcholin aus Fluoressigsäure und Fluorzitronensäure in Gehirnextrakten 165

PHYSIOLOGIA

Kovách, A. G. B., Fonyó, A., Vittay, T., Pogátsa, G.: The Oxygen and Glucose Consumption and Hexokinase Activity *in vitro* of Brain Tissue of Rats in Traumatic Shock..... 173

Kovách, A. G. B., Takács, L., Mohácsi, A., Káldor, V., Kalmár, Z.: Effect of Metabolism-Increasing or -Decreasing Substances on the Susceptibility of Rats to Shock 181

Takács L.: The Circulation of Limbs in Hypoxic Conditions 189

Takács, L.: The Metabolism of Limbs in Hypoxic Conditions 197

Bálint, P., Forgács, I.: The Apparent Expansion of the Extracellular Space (Inulin Space) in the Nephrectomized Dog 205

PHARMACOLOGIA

Pórszász, J., Nádor, K., Pórszász-Gibiszer, K., Such, Gy.: Pharmokologie der Aminoketone. IV. Adrenolytische Aminoketone. 211

COMMUNICATIONES BREVES

Ángyán, A. J., Finály, P., Roheim, P.: Some Characteristical Higher Nervous Activity Changes in Dogs Following Temporary Ischaemisation of the Head 225

Takács, L., Nagy, Z., Kállay, K.: Pulmonary Circulation in Shock 233

ACTA PHYSIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

E. ERNST, B. ISSEKUTZ SEN., N. JANCSÓ, K. LISSÁK,
E. T. SZÖRÉNYI, I. WENT

REDIGIT

F. B. STRAUB

TOMUS XI FASCICULI 3—4

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1957

ACTA PHYSIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÍSÉRLETES ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG ÉS KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Az *Acta Physiologica* német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a kísérletes orvostudományok köréből.

Az *Acta Physiologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg: több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Physiologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 forint, külföldre 110 forint Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), külföld számára pedig

a „Kultúra" Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál

(Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla 43-790-057-181 sz.), vagy külföldi képviseleteinél, bizományosainál.

Die *Acta Physiologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Gebiete der experimentellen medizinischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Physiologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion und den Verlag bestimmte Korrespondenz zu senden.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

CHANGES IN CHOLINESTERASE ACTIVITY OF STRIATED MUSCLE AFTER DENERVATION

By

F. VARGA, A. KÖVÉR, T. KOVÁCS and E. HETÉNYI

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, DEBRECEN

(Received September 25, 1956)

During the past two decades numerous authors studied the changes in the cholinesterase activity of striated muscle after denervation. These investigations merit attention from several points of view. They supplied information as to the physiological role and significance of cholinesterase, and also concerning the changed excitability of the denervated muscle. Although the results are rather contradictory, there has recently been a tendency based on the evidence published by NACHMANSOHN *et al.* [1—6] to accept the view that the cholinesterase activity of the denervated muscle was characteristically diminished. As up to now it was thought that, most of the cholinesterase in muscle is acetylcholinesterase concentrated at the end plates. The changes in cholinesterase activity measured in the whole muscle were explained exclusively or at least in a major part as changes in the acetylcholinesterase concentrated at end plates. On the basis of these observations and especially in view of the explanation offered, many authors have arrived at the conclusion that the typical hypersensitivity of the denervated muscle was due to a diminution of the acetylcholinesterase activity of end plates. However, in the light of more recent data, there is some doubt about the general validity of earlier biochemical investigations concerned with post-denervation changes in cholinesterase activity. Previous experiments made at the Institute of Physiology, Debrecen [7—8], have called attention to the fact that myosin, the contractile protein of muscle, has cholinesterase activity. Thus, striated muscle would contain two kinds of cholinesterase in greater quantity, viz. acetylcholinesterase, concentrated mainly in the neuromuscular junctions, and the so-called myosincholinesterase. There is also a "pseudo"-cholinesterase in muscle, but according to the previously published data [9, 10] and our own investigations, its quantity is negligible.

This means that the results hitherto obtained reflect truly the changes in acetylcholinesterase activity only if the quantity of myosincholinesterase is negligible beside that of acetylcholinesterase. Otherwise the quantity of myosincholinesterase, and the changes in its activity, should also be taken into account in order to obtain information about the real situation.

Materials and methods

Dogs and rabbits were used in the experiments. Under aseptic conditions the sciatic nerve of one limb was transected and, at various points of time after operation, the gastrocnemius muscle of both hind limbs was worked up. Omitting the problems that emerged while the method was being developed, only the main features of the procedure employed will be discussed.

Both hind limbs were perfused with physiological saline of body temperature, through a cannula in the abdominal aorta, washing out thereby blood from the muscle. As cholinesterase is unevenly distributed in the muscle, invariably the whole gastrocnemius was taken out and worked up.

Under continuous chilling with carbonic acid snow the muscle was pottered with 2 volumes of a pH 8,5 solution containing 1,2 *M* KCl, 0,01 *M* Na_2CO_3 and 0,04 *M* $NaHCO_3$, then it was extracted at +2° C. The relatively high KCl concentration (1,2 *M*), as well as the medium of pH 8,5 enhanced the dissociation of actomyosin and ensured effective extraction, as it could be expected on grounds of data in the literature [15]. After extraction a volume of distilled water twice the weight of muscle was added to the meanwhile swollen muscle homogenate. After centrifugation the supernatant was decanted and extraction was repeated 1, 2, 6 and 12 hours later. The activity of the cholinesterase thus brought into solution was on the average 80 to 90 per cent of that of total muscle cholinesterase. After the last extraction there still was cholinesterase in the sediment. Considering that no more myosin could be extracted from the sediment, and that the adenosine triphosphatase activity of the sediment was very low in comparison with the activity of myosin prepared from the same muscle, and finally since cholinesterase of the sediment in view of its substrate specificity appeared to be acetylcholinesterase, in subsequent work we determined the activity of the sediment, too, and took it into account as acetylcholinesterase. From an aliquot of the pooled supernatant diluted twentyfold myosin was precipitated at pH 6,8. We assayed the cholinesterase activity of the supernatant fluid, which contained myosincholinesterase and part of the acetylcholinesterase. Adding to that activity of the sediment was the total activity of the muscle obtained. Furthermore, we measured the cholinesterase activity of myosin precipitated from the supernatant. Finally, subtracting the myosincholinesterase activity from the total cholinesterase activity, the quantity of acetylcholinesterase was obtained by calculation.

In the assay for cholinesterase activity the 10 ml of the incubation mixture contained 2 ml of the test fraction, 1,8 mg acetylcholine, as well as a pH 8,0 Na-veronal-HCl buffer in an end concentration of 0,005 *M*. As at the end of extraction the KCl concentration of single fractions was adjusted invariably to 0,5 *M*, the KCl end concentration of the incubation mixture was 0,1 *M*. Incubation was in a 37° C water bath for 60 minutes. Enzymatic activity was arrested with alkaline hydroxylamine in 1 ml samples taken from the incubation mixture, then the mixtures were assayed quantitatively for acetylcholine in a HAVEMANN photometer, by the method of HESTRIN [11]. In general, the results have been expressed either in relation to total muscle, or for units of muscle weight.

Results

In Table I are presented the results of part of the experiments on dogs. The rate of cholinesterase activity is expressed as the mg amount of acetylcholine is hydrolysed in 1 hour by 1 g muscle or by the myosin in 1 g muscle. As it can be seen, in the normal (N) gastrocnemius muscle of the dog the quantity of myosincholinesterase calculated for 1 g muscle makes up on the average half of the total activity. The concentrations of the two enzymes in muscle may naturally significantly diverge, yet it is certain from these data thatmeasurement of the total cholinesterase activity of the muscle cannot truly express the changes taking place in the acetylcholinesterase concentration of the end plates. The same is confirmed by every single experiment. For example, in the gastrocnemius muscles from two dogs worked up 13 and 16 days after denervation, respectively, there was no difference in total cholinesterase activity between the normal and the denervated (D) muscle. And the detailed results indicate

that, parallel with the well-appreciable, about 25 per cent increase, in the activity of myosincholinesterase, there occurs a similar, but opposite change in the

Table I

Number of days after denervation		Weight of muscle g	Total ChE activity	Myosin ChE activity	Acetyl ChE activity
			mg ACh/g muscle/hour		
13	N	23,7	4,2	1,5	2,7
	D	22,0	4,2	2,2	2,0
16	N	37,9	3,4	1,5	1,9
	D	24,7	3,3	2,0	1,3
25	N	32,6	4,0	2,1	2,4
	D	21,2	3,2	1,0	2,2
57	N	42,5	3,7	2,0	1,7
	D	22,0	1,6	0,2	1,4
62	N	32,0	6,1	3,1	3,0
	D	24,0	3,4	0,4	3,0

ChE = cholinesterase

activity of acetylcholinesterase, which is reduced by about 25 per cent. Thus, if the total hydrolytic action on acetylcholine per 1 g muscle is measured, as it is still common practice, disregarding the detailed results, the erroneous conclusion will be drawn that no change has occurred in the cholinesterase activity of muscle. The last two experiments in Table I likewise illustrate the importance of taking into account the activity of myosincholinesterase. In these cases, in which dog muscles used 57 and 62 days after denervation, were studied, total cholinesterase activity was markedly diminished. This diminution, however, was in one case preponderantly, and in the other exclusively, due to a decrease in myosincholinesterase activity, whereas the acetylcholinesterase in the same muscles showed very little or no change.

In the total of 9 experiments on dogs unanimous evidence has been obtained of the importance of considering myosincholinesterase in studies on the changes in muscle cholinesterase activity. On the other hand, the values for normal muscle showed rather wide variations. Therefore, the experiments were continued on rabbits, most of which originated from the same breed and thus it could be expected that the results would be better comparable.

In Table II are presented the data for normal and denervated gastrocnemius muscles from rabbits. In addition to the "concentration" of enzyme, i. e. the value calculated for 1 g muscle, the enzyme activity for the whole muscle is also shown, to facilitate comparison with the results of other authors. Finally, in the last two columns of Table II are presented the values for specific myosincholinesterase activity, i. e. the amount of acetylcholine in μg hydrolysed in 1 hour by 1 mg enzyme protein, as well as the data for the myosin content of muscle. Like

Table II

Number of days after denervation		Weight of muscle g	Total ChE activity	Myosin ChE activity	Acetyl ChE activity	Total ChE activity	Myosin ChE activity	Acetyl ChE activity	Myosin ChE specific activity μg ACh/mg protein/hour	mg Myosin/g muscle
			mg ACh/muscle/hour			mg ACh/g muscle/hour				
8	N	7,5	35,3	18,6	16,7	4,7	2,5	2,2	39,9	62
	D	5,4	31,1	12,8	18,3	5,7	2,4	3,3	39,6	59
10	N	10,1	37,3	20,4	16,9	3,7	2,0	1,7	31,9	63
	D	7,0	25,5	12,1	13,4	3,6	1,7	1,9	42,8	41
14	N	15,2	77,1	30,3	46,8	5,1	2,0	3,1	—	—
	D	10,7	57,0	21,1	35,9	5,4	2,0	3,4	—	—
18	N	8,0	32,5	20,2	12,3	4,1	2,5	1,6	34,0	74
	D	4,8	27,4	11,6	15,8	5,7	2,4	3,3	42,9	56
25	N	9,1	37,5	22,9	14,6	4,1	2,5	1,6	43,9	57
	D	4,4	37,2	24,2	13,0	8,4	5,5	2,9	202,7	27
29	N	7,9	44,9	31,7	13,2	5,7	4,0	1,7	55,3	72
	D	4,8	38,2	24,8	13,4	7,9	5,1	2,8	159,4	32
46	N	10,3	49,5	24,9	24,6	4,8	2,4	2,4	38,0	64
	D	3,9	39,0	18,3	20,7	10,0	4,7	5,3	147,2	32

Table I, Table II also reveals that in the normal gastrocnemius muscle a considerable proportion about a half of the total cholinesterase activity results from myosincholinesterase. Acetylcholinesterase activity began to increase as early as 8 days after operation and was about double the normal value after 18, 25 and 46 days. In these cases acetylcholinesterase activity calculated for the whole muscle remained unchanged within the limits of error and thus the increase in the "concentration" of enzyme was explained by a reduction in the volume of the atrophying muscle. Myosincholinesterase activity calculated for 1 g muscle was initially either unchanged or diminished and began to increase only later, after about 25 days. Total activity, the value usually estimated by other authors, shows the sum of the two supplying changes, thus giving no information as to the details. For example, in the rabbits used 18 days after denervation the total activity per 1 g muscle increased by about 40 per cent, whereas the detailed results disclosed that within that time myosincholinesterase activity did not change and the 40 per cent increase in total activity was due to a 100 per cent increase of acetylcholinesterase activity. In the gastrocnemius muscles from the rabbits used after 8, 10 and 18 days total myosincholinesterase in the whole muscle was reduced by even more, but the diminution was proportionate to the decrease in muscle volume and therefore did not indicate a true change in the "concentration" of enzyme. In the rabbits used subsequently the diminution in myosincholinesterase activity calculated

for the whole muscle was relatively less and not proportionate to the reduction of muscle volume as was shown also by the increase in the "concentration" of enzyme. In the animals worked up between 8 and 18 days the specific activity of myosincholinesterase changed little, but in the gastrocnemius muscles from the animals used after 25, 29 and 46 days the specific activity of cholinesterase was already significantly increased, to about 3 to 4 times the normal value. Finally, in the last column of Table II are presented the data for changes in the myosin content of muscle following denervation. In harmony with the published data [12] the myosin content of the denervated muscle was found to have definitely reduced. In the present experiments these data were useful because they offered an explanation why the amount of myosincholinesterase per 1 g muscle was increased in a lesser degree than the specific activity of myosin in the same muscle. For example, the specific activity of myosincholinesterase prepared from the denervated muscle of a rabbit worked up 46 days after operation was about 4 times the normal. At the same time, the myosincholinesterase activity of 1 g muscle was doubled, obviously because the myosin content of the muscle was reduced by about 50 per cent.

Naturally, in the knowledge of the above one may still ask whether there really exists a correlation between the hypersensitivity of denervated muscle and changes in the cholinesterase activity? In the experiments aimed to elucidate this point we determined the excitability of the gastrocnemius muscle *in situ*, before working it up. We studied galvanic and faradic excitability and measured the frequency inducing tetanus and the sensitivity to acetylcholine. As the results generally agreed with those published in the literature, we do not wish to discuss them in detail. All we want to point out is that after transection of the sciatic nerve the excitability by galvanic stimulation increased, that to faradic stimulation diminished ; a lower frequency sufficed to elicit complete tetanus, sensitivity to acetylcholine increased, i. e. the muscle has become "tonic" as far as excitability is concerned.

In addition to findings similar to those discussed above Table III includes also data on acetylcholine sensitivity, i. e. the smallest dose of acetylcholine still eliciting well-registerable contraction in the muscles of the denervated hind leg on injection into the aorta perfused with Tyrode solution. Similar doses of acetylcholine administered in the same way caused no contraction in the muscles of the normal limb.

It is seen that the amount of acetylcholinesterase calculated for 1 g muscle decreased in 5 to 6 days. Correspondingly, the acetylcholinesterase activity of the whole muscle showed a more marked decrease than the reduction of muscle weight. However, this initial diminution was less marked after 7 to 8 days and this explains why it was not observable in the rabbits shown in Table II that were worked up later. Otherwise, the data for changes in enzyme activity in Table III are similar to those in Table II.

Table III

Number of days after denervation		Weight of muscle g	Total ChE activity	Myosin ChE activity	Acetyl ChE activity	Total ChE activity	Myosin ChE activity	Acetyl ChE activity	Myosin ChE specific activity μg ACh/mg protein/hour	ACh sensitivity μg ACh/kg body weight
			mg ACh/muscle/hour			mg ACh/g muscle/hour				
5	N	14,5	92,3	51,3	41,0	6,3	3,5	2,8	56	—
	D	12,5	60,2	34,1	26,1	4,8	2,7	2,1	51	240
6	N	8,4	89,6	53,8	35,8	10,6	6,4	4,2	94	—
	D	7,6	51,6	32,3	19,3	6,7	4,2	2,5	84	280
7	N	11,6	64,1	35,2	28,9	5,5	3,0	2,5	42	—
	D	9,6	54,3	33,4	20,9	5,7	3,5	2,2	49	380
10	N	7,9	65,4	44,3	21,1	8,3	5,6	2,7	79	—
	D	6,3	35,3	19,4	15,9	5,6	3,1	2,5	60	170
13	N	7,7	63,4	33,9	29,5	8,2	4,4	3,8	82	—
	D	4,7	54,8	18,8	36,0	11,7	4,0	7,7	126	12
15	N	10,9	72,0	43,8	28,2	6,6	4,0	2,6	62	—
	D	6,7	52,6	22,3	30,3	7,8	3,3	4,5	73	10
18	N	8,5	52,4	22,1	30,3	6,2	2,6	3,6	38	—
	D	6,0	51,8	16,2	35,6	8,6	2,7	5,9	71	6
26	N	15,7	99,0	58,1	40,9	6,3	3,7	2,6	60	—
	D	7,5	81,7	37,1	44,6	10,8	4,9	5,9	130	25
33	N	17,7	104,6	48,5	56,1	5,9	2,7	3,2	47	—
	D	8,8	128,7	45,3	83,4	14,6	5,1	9,5	135	7

Acetylcholine hypersensitivity of the muscle is evident 5 to 6 days following denervation, at a time when acetylcholinesterase activity is really decreasing. Later, however, when enzyme activity increases, hypersensitivity due to denervation continues to increase and thus, on the basis of these observations, it seems unfounded to search for a parallelism between the diminution of acetylcholinesterase activity and the increase of hypersensitivity.

Discussion

The evidence presented proves that in the normal gastrocnemius muscle of the rabbit and the dog about half of the total cholinesterase activity is due to myosincholinesterase. These data indicate that when studying changes in the cholinesterase activity of muscle it does not suffice to determine the sum of the activities of the two enzymes (acetyl- and myosincholinesterase), as it was normal with earlier authors, and that the application to end plates of data obtained by the determination of the so-called total cholinesterase activity leads to false results.

The question arises how one should correct the data with regard to myosincholinesterase, i. e. what are the real changes taking place in the cholinesterase content of muscle after denervation. On grounds of our findings we are unable to give an answer of general validity. On the contrary, our experiments clearly show how incorrect it is to draw general conclusions from estimations made on some muscle of some animal species. Without going into details, we point only at the obvious differences between the data for dogs (Table I) and rabbits (Tables II and III). For example, the specific activity of the myosincholinesterase prepared from the denervated gastrocnemius muscle of the rabbit was increased to 2 to 4 times the normal and, correspondingly, in spite of the diminution of the myosin content of the muscle, the concentration of myosincholinesterase, i. e. its amount calculated for 1 g muscle, likewise increased. In contrast with this, in the dog the concentration of myosincholinesterase was greatly decreased, there having occurred a loss of myosin, and also a diminution of specific enzymatic activity. Another significant difference was that observed in the changes of acetylcholinesterase activity between the two species. In the rabbit the initial decrease was followed by a significant increase, whereas in the dog the activity was either unchanged or diminished, but it never increased.

We had to emphasize these findings because in our opinion they explain most of the discrepancies among the data published.

As to the explanation of the divergent results published in the literature, the report by BROOKS and MYERS [9], according to which after denervation the cholinesterase activity of different muscles (serratus anterior and gastrocnemius) underwent different changes in the same species (guinea pig), is believed to be of particular interest. There is no reason for doubt that the results of experiments performed on different denervated muscles of different species may show common features. However, we think that a finer analysis of such features would require more attention to be devoted to myosincholinesterase activity.

NACHMANSOHN [1], in his studies on the changes in the cholinesterase activity of muscle after denervation, did in fact describe a method taking into account the *muscle* cholinesterase. This allows a more precise estimation of the changes taking place in the cholinesterase concentration of end plates. Unfortunately, the method has not gained acceptance, although, as it is obvious from our data, it represented an undoubtedly correct trend.

It has been known since long from the investigations of NACHMANSOHN [13] that the so-called aneural part of muscle also had cholinesterase activity. This has been looked upon ever since as the cholinesterase of muscle. Our data on the myosincholinesterase activity per unit of weight of the normal muscle agree with those observed for nerveless muscle by NACHMANSOHN and therefore we suppose that the cholinesterase of the so-called aneural muscle is preponderantly myosincholinesterase.

Finally, we should like to point out that in the above two series of experiments the specific myosincholinesterase activity of the gastrocnemius muscle of

rabbits used for preparation a longer time after denervation (18 to 33 days) was more than doubled. As it is just in that period that the excitability relations of muscle become similar to those of the so-called tonic muscle, the question arises whether there is a correlation between the characteristic excitability relations of the so-called tonic muscles and the increase in the specific activity of myosincholinesterase. In this respect considerable importance attaches to the report of VAN DER KLOOT [14], according to which in the frog sartorius muscle the sodium transport is correlated with intracellular cholinesterase activity. If the agent responsible for that activity is in fact intracellular cholinesterase, so this in all probability is identical with myosincholinesterase. It is therefore only logical to look for a correlation between the change in the specific activity of myosincholinesterase and the change in the excitability of muscle. We are carrying out experiments in this direction.

SUMMARY

In the gastrocnemius muscle of the rabbit and of the dog about half of the total cholinesterase activity falls to myosincholinesterase, and therefore a measurement of the total cholinesterase activity of the muscle cannot truly elucidate the changes taking place in the acetylcholinesterase concentration of end plates.

Following transection of the sciatic nerve the cholinesterase activity of the gastrocnemius muscle changes differently in the dog and in the rabbit.

In the dog the decrease of the cholinesterase activity calculated for unit of muscle weight, or within that the diminution of myosincholinesterase activity, becomes more and more manifest, especially during the 4th to 8th weeks, whereas at the same time acetylcholinesterase activity shows little or no alteration.

In the rabbit the first few post-operative days are characterized by a decrease of acetylcholinesterase concentration, which becomes more and more marked from the second week on. In the first few weeks the concentration of myosincholinesterase decreases, then it is unchanged and as late as in the fourth week it begins to increase.

The specific activity of myosincholinesterase increases to several times the normal beginning from about the 4th post-operative week. This accounts for the increase of the concentration of enzyme in the muscle, in spite of the simultaneous diminution of myosin content.

LITERATURE

1. COUTEAUX, R., NACHMANSOHN, D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **43**, 177 (1940).
2. COUTEAUX, R.: Bull. biol. **76**, 14 (1942). — Cit. Berichte ges. Physiol. **131**, 290 (1943).
3. COUTEAUX, R.: Rev. Canad. Biol. **6**, 563 (1947). Cit. Brit. Abstr. A III. 107 (1949).
4. COUTEAUX, R., NACHMANSOHN, D.: Nature **142**, 481 (1938).
5. MARNAY, A., NACHMANSOHN, D.: Compt. rend. soc. biol. **126**, 785 (1937).
6. NACHMANSOHN, D.: Compt. rend. soc. biol. **128**, 599 (1938).
7. VARGA, E., SZIGETI, J., KISS, E.: Acta Physiol. Hung. **5**, 383 (1954).
8. VARGA, E., KŐNIG, T., KISS, E., KOVÁCS, T., HEGEDÜS, L.: Acta Physiol. Hung. **7**, 171 (1955).
9. BROOKS, U. V., MYERS, D. K.: J. Physiol. **116**, 158 (1952).
10. LANGEMANN, H.: Helv. Physiol. Pharmakol. Acta **2**, C. 17 (1944).
11. HESTRIN, S.: J. Biol. Chem. **180**, 249 (1949).
12. FISCHER, E., RAMSEY, V. W.: Am. J. Physiol. **145**, 571 (1946).
    FISCHER, E.: Arch. physical. Med. **29**, 291 (1948). — Cit.: KRÜGER, P.: Tetanus und Tonus der quergestreiften Skelettmuskeln der Wirbeltiere und des Menschen. Geest und Portig K.-G. Leipzig. 1952.
13. MARNAY, A., NACHMANSOHN, D.: J. Physiol. **92**, 37 (1938).
14. VAN DER KLOOT, W. G.: Nature **178**, 366 (1956).

CHANGES IN THE ACETYLCHOLINE-SENSITIVITY AND CHOLINESTERASE ACTIVITY OF SKELETAL MUSCLES IN THE COURSE OF ONTOGENESIS

By

E. VARGA, A. KÖVÉR, T. KOVÁCS and E. HETÉNYI
INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, DEBRECEN

(Received September 25, 1956)

In a previous report [1] we have discussed, among others, that after denervation the otherwise characteristical tetanic function of the gastrocnemius muscle becomes "tonic", i. e. it is characterized by a relatively prolonged contraction, instead of a twitch, by an increased acetylcholine sensitivity and, in general, by a changed excitability; at the same time, an increase in the specific activity of myosincholinesterase is observable. As, according to our working hypothesis, the physiological role of myosincholinesterase becomes first of all in the features of excitability of tonic muscles manifest, it has been deemed necessary to approach the problem from another angle, as well.

On grounds of their well-known experiments, KOSHTOYANTZ and RYABINOVSKAYA [2] pointed out that during the first postnatal weeks the otherwise characteristic tetanic function of the rabbit's gastrocnemius muscle is still tonic in reaction. It is known from other authors that in that period the sensitivity of muscles to acetylcholine [3,4], as well as their cholinesterase activity are increased [5—7]. However, the latter data concern only the sum of the two kinds of cholinesterase activity (acetyl- and myosincholinesterase) of muscle. The changes in the activity of each of the enzymes are unknown.

Methods

Rabbits were used in the experiments. To facilitate comparison, muscles from newborn rabbits of the same mother were prepared, essentially by the method described in a previous report [1]. Considering the small amounts of muscle, the muscles of both hind limbs were used. Before removal of the muscles, we determined under urethane anaesthesia the acetylcholine-sensitivity of the muscles of the hind limbs, i. e. the smallest dose acetylcholine which, injected into the abdominal aorta perfused with Tyrode's solution, still elicits a readily recordable contraction of the muscles of the hind limb.

Perfusion of the hind limbs with Tyrode's solution was intended to remove blood from the muscles and thus to eliminate blood cholinesterase from the muscle homogenisate to be studied. Perfusion lasted usually for a short time 10 to 15 minutes, and was carried out at low pressure (40 cm water). The oedema thus caused in the hind limbs was therefore too slight to interfere with the reliability of the measurements. Cholinesterase activity was assayed according to HESTRIN [19], as specified in a previous report. ATP-ase activity was measured in a mixture containing a glycine-NaOH buffer (pH 9) and 0,01 *M* $CaCl_2$, estimating phosphorus according to TAUSSKY and SHORR [20], and protein according to KJELDAHL.

Results

A total of 38 young animals from 7 mothers was used.

Before dealing with the results, for the sake of comparison we present the values for the normal gastrocnemius muscles of adult rabbits.

acetylcholinesterase activity: 2,63 ± 0,65 mg ACh/g muscle/hour,
myosincholinesterase activity: 3,55 ± 0,88 mg ACh/g muscle/hour,
total cholinesterase activity: 6,18 ± 1,52 mg ACh/g muscle/hour,
specific activity of myosincholinesterase: 52,7 ± 15,1 μg ACh/mg protein/hour.

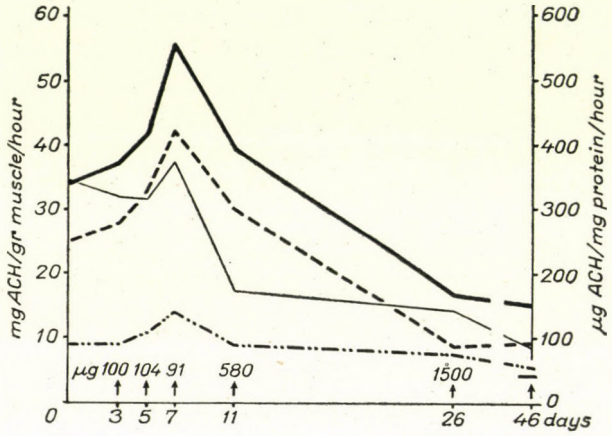


Fig. 1. Changes in cholinesterase activity of striated rabbit muscle during the first weeks of postnatal life. Abscissa: time between birth and study, in days. Ordinata on the left: cholinesterase activity per unit of muscle weight, i. e. the amount in mg of acetylcholine hydrolyzed in 1 hour by 1 g muscle or by the myosin in 1 g muscle
Ordinata on the right: specific activity of myosincholinesterase, i. e. amount in μg of acetylcholine broken down in 1 hour by 1 mg of myosin protein
——— total cholinesterase activity per unit of muscle weight
– – – – – acetylcholinesterase activity per unit of muscle weight
– · – · – · myosincholinesterase activity per unit of muscle weight
——— specific activity of myosincholinesterase
The figures above the arrows show the changes in acetylcholine-sensitivity. Explanation see in text

(The above values are means of the results obtained in gastrocnemius muscles from 16 adult rabbits, as well as the standard deviations.)

In Fig. 1 are presented the results for 7 rabbits from the same mother. It can be seen that acetylcholinesterase activity is increasing considerably during the first postnatal days, reaching the peak at the 7th day. Then it declines gradually, but on the 46th day it is still as high as about three times the normal value for adults. The activity of myosincholinesterase calculated for unit of muscle weight shows relatively smaller changes. It is about almost three times the normal during the first postnatal days, reaches the peak at the 7th day and subsequently declines

gradually, but on the 46th day it is still higher than the normal value for adult muscle. The total activity, commonly estimated by earlier authors, shows the sum of the activities of the two kinds of cholinesterase. The specific activity of cholinesterase is the highest during the first days after birth, then declines rapidly, but after 46 days it is still about 150 per cent the normal value.

The changes in myosincholinesterase activity per unit of muscle weight, or the correlation thereof with specific activity, are due to changes in myosin content. For example, there was a significant difference between the rabbits studied on the 7th and 11th days as regards the specific activity of myosincholinesterase,

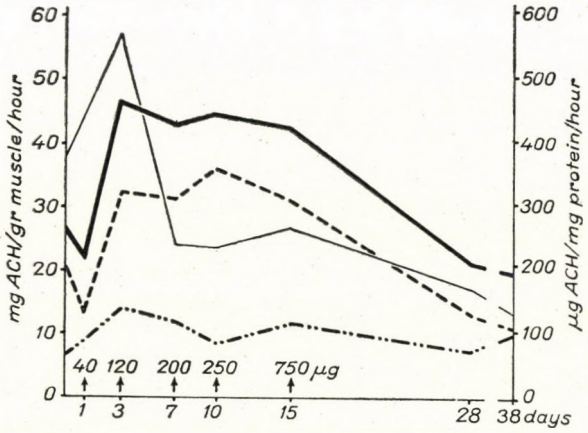


Fig. 2. Changes in cholinesterase activity during the first weeks of postnatal life, in striated rabbit muscle. Abscissa: interval in days between birth and analysis. Ordinata on the left: cholinesterase activity calculated for unit muscle weight, i. e. amount in mg of acetylcholine hydrolyzed in 1 hour by 1 g muscle or by the myosin in 1 g muscle. Ordinata on the right: specific activity of myosincholinesterase, i. e. amount in µg of acetylcholine broken down in 1 hour by 1 mg myosin protein

——— total cholinesterase activity per unit of muscle weight
– – – – – acetylcholinesterase activity per unit of muscle weight
– · – · – · myosincholinesterase activity per unit of muscle weight
——— specific activity of myosincholinesterase

The figures above the arrows show the changes in acetylcholine-sensitivity. Explanation see in text

which sank by about 50 per cent ; in the meantime the reduction in the activity calculated for 1 g muscle was less, amounting to about 30 per cent. This discrepancy can be explained by an increase in the myosin content of muscle and thus the substantial diminution of specific activity is somewhat counterbalanced by the quantitative increase of enzyme.

Finally, above the abscissa are written the data for acetylcholine-sensitivity, i. e. the smallest dose of acetylcholine/kg body weight which on injection into the abdominal aorta perfused with Tyrode solution still caused a well-recordable contraction of the hind leg muscle. As it can be seen, there was no parallelism

between the changes in acetylcholinesterase activity and changes in the sensitivity to acetylcholine. For instance, the muscles of animals analysed on the 5th and 11th days, respectively, were almost equal in acetylcholinesterase activity, whereas they differed considerably in their sensitivity to acetylcholine (100 μg, as compared to 580 μg).

Essentially similar results can be seen in Fig. 2 which shows the results for 8 rabbits born from another mother. The acetylcholinesterase level remained high for a longer time, whereas the specific activity of myosincholinesterase was reduced by more than 50 per cent as early as in the 3rd day. There was no parallelism between the changes in sensitivity to acetylcholine and the changes in acetylcholinesterase activity.

Similar results were obtained in 5 further series.

The observations made in 7 series can be summarized as follows.

1. In rabbits during the first few days of postnatal life the sum of the activities of the two kinds (acetyl and myosin) of cholinesterase in muscle is, in agreement with data in the literature, much higher than in the adult, normal animal (an average of 43,0 $\pm$ 8 mg ACh/g muscle/hour activity, as compared to the adult value of 6,2 mg ACh/g muscle/hour). In the period from the 6th to the 11th day (average, 8 days) the increase of enzyme activity reaches the peak. This is followed by a constant decline during the subsequent 5 to 8 weeks.

2. The increase of total activity is mainly due to an increase in the concentration of acetylcholinesterase, which reaches the peak likewise in the period from 6 to 11 days (average, 8 days). At that time acetylcholinesterase activity per 1 g muscle is about 12 times the normal (31,0 $\pm$ 8,0 mg ACh/g muscle/hour as compared to the average 2,6 mg ACh/g muscle/hour for normal adult muscle).

3. Myosincholinesterase activity per 1 g of muscle during the first postnatal week increases less markedly, though the increase is still significant (an average of 12,8 $\pm$ 1,5 mg ACh/g muscle/hour, as compared to the average found in normal adult muscle i. e. 3,5 mg ACh/g muscle/hour). There is no sharp peak in the increase of myosincholinesterase concentration similar to that shown by acetylcholinesterase. Instead, myosincholinesterase activity tends to remain at a relatively constant high level.

4. The specific activity of myosincholinesterase is the highest during the first few days (average 1 to 3 days) after birth, when it is about 8 times higher than the value for the normal adult muscle (419 $\pm$ 104 μg ACh/mg protein/hour, as compared to the adult value of 52,7 μg ACh/mg protein/hour). In the second postnatal week the myosincholinesterase decreases significantly and this may account for the fact that, notwithstanding the increase in the myosin content of the muscle, myosincholinesterase activity per 1 g muscle diminishes.

5. The sensitivity of the muscle to acetylcholine is the highest during the first days following birth, then declines gradually. In this way the peak maximum of acetylcholine sensitivity coincides with the maximum of myosincholinesterase

activity and by the time acetyl- and total cholinesterase activities reach the peak, acetylcholine-sensitivity is usually on the decrease.

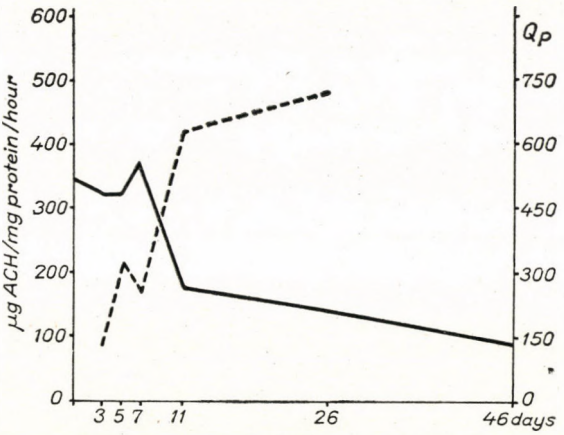


Fig. 3. Changes in myosincholinesterase and ATP-ase activity during the first weeks of postnatal life, in striated rabbit muscle. Abscissa : interval in days between birth and study. Ordinata on the left : specific activity of myosincholinesterase, i. e. the amount in μg of acetylcholine hydrolyzed in 1 hour by 1 mg myosin protein. (——) Ordinata on the right, myosin-ATP-ase activity in Q_P. (- - - - -)

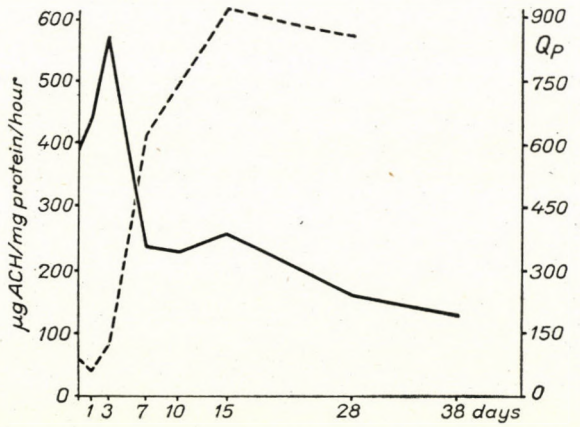


Fig. 4. Changes in myosincholinesterase and ATP-ase activity during the first weeks of postnatal life in striated rabbit muscle. Abscissa : interval in days between birth and study. Ordinata on the left : specific activity of myosincholinesterase, i. e. the amount in μg of acetylcholine hydrolyzed in 1 hour by 1 mg myosin protein. (——) Ordinata on the right: myosin-ATP-ase activity in Q_P. (- - - - -)

Finally, there is a correlation between the cholinesterase and adenosine triphosphatase activity of myosin. It is known from the literature [17, 18] that in the first days of postnatal life the activity of myosin-adenosine-triphosphatase of striated muscle is very low. Our assays for enzyme activity yielded the following results (see Fig. 3).

In Fig. 3 are shown changes taking place in the two kinds of enzymatic activity, notably in the adenosine triphosphatase and cholinesterase activity, of myosin during the first weeks of postnatal life. One curve shows the inversed shape of the other. When adenosine triphosphatase activity significantly increases after the minor variations observable during the first week, cholinesterase activity shows an almost equal degree of decrease. From the 11th day on both values begin to approach slowly but steadily the level characteristic of adult muscle.

Essentially similar data are shown by Fig. 4. Adenosine triphosphatase activity is the lowest during the first 3 days, when cholinesterase activity just reaches the maximum. When, however, the adenosine triphosphatase activity suddenly begins to increase, cholinesterase activity shows a similarly sudden decline.

Discussion

Almost at the same period numerous authors were studying the changes in the cholinesterase activity of skeletal muscles in the course of ontogenesis. NACHMANSOHN [5], LEIBSON [6], and TORDA [7], all found that by the end of intrauterine life and during the first weeks of extrauterine life the cholinesterase activity of striated muscle is considerably higher than in adult muscle. As far as the high total cholinesterase level is concerned, our data are in agreement with those of the above authors. However, the explanation varies from author to author. According to NACHMANSOHN [5], the great increase in enzyme activity is due to a relative increase in the volume of end plates as related to that of muscle fibres in a certain period of ontogenesis ; as the concentration of cholinesterase in the end plates is several thousand times higher than that in the muscle, a relative increase in the volume of end plates necessarily leads to an increase of cholinesterase concentration. LEIBSON ascribed the high cholinesterase activity to a change in the "receptive substance" or to a change of enzyme in that substance, whereas TORDA pointed out that the embrionic muscle is already sensitive to acetylcholine before the end plates develop and that time it is the task of the muscle fibre to hydrolyse acetylcholine. Although numerous data confirmed the NACHMANSOHN's theory, on grounds of our findings it seems that this explanation needs to be completed. According to our data, namely, a considerable proportion of the increase in total cholinesterase activity is due to an increase of myosincholinesterase activity. The fact that in comparison with normal adult muscle first of all the acetylcholinesterase activity has been found to be markedly increased in newborn muscle proves the validity of the explanation put forward by NACHMANSOHN. On the other hand, the significant increase in myosincholinesterase activity is a new finding, which directs attention to the afore-mentioned explanation of TORDA. The possibility that in the early

phase of ontogenesis it is the task of the whole muscle fibre to split acetylcholine must be taken into account, and the more so, since essentially the same conclusion has been drawn also by KUPFER and KOELLE [8]. Considering, further, the observation that the peak of sensitivity to acetylcholine coincides with the maximum of the specific activity of myosincholinesterase, this may be regarded not a mere coincidence but the sign of a closer relation between the two factors.

The problem may and should be approached from several angles. However, the evidence hitherto obtained allows at least to determine the direction of future investigations. In the previous [1] and the present report we have presented unequivocal evidence showing that when the otherwise tetanic functioning of the muscle changes into a tonic function (either in the early phase of ontogenesis, or in the course of post-denervation dedifferentiation), the specific activity of myosincholinesterase is significantly increased. It is, accordingly, conceivable that the change in the excitability relations of muscle is correlated with the change in the specific activity of myosincholinesterase.

In the evaluation of the results the fact is also essential that the physiological role of cholinesterase in the neuromuscular transmission of impulses in mammals was studied almost exclusively in a system in which the impulses reach the muscle *via* the thick motor fibre and the end plate. It is, however, known that in striated muscles there are also fibres which are reached by impulses not by the above way, but through the so-called "small nerve-system" [9]. In this system, too, acetylcholine is released at the endings, but there are no typical end plates, there is no so-called cholinesterase "wall", the neuromuscular transmission of impulses functions by an unknown and unstudied mechanism. It will have to be cleared whether myosincholinesterase plays an important role in that transmission. This assumption is to a certain extent justified by the fact that just the slowly reacting, so-called "tonic" muscles [10] have the above property, and, according to our data, such muscles appear to possess a characteristically high myosincholinesterase activity. On the other hand, this assumption is overshadowed by the fact that KUFFLER could demonstrate the above-mentioned role of the "small nerve system" only in the frog. According to that author, in mammals the thin fibres serve the muscle spindles.

However, according to the observation of HÄGGQUIST [11], a considerable percentage of all neurons leaving the spinal cord through the anterior roots (in the lumbar section about 30 per cent, and even more in the thoracic segment) belongs to the group of thin fibres and this big number makes it questionable that all these fibres would run exclusively to muscle spindles (BRECHT [12]).

On the other hand, a comparison of the present data with those published in our previous report reveals that, when studying the changes in the cholinesterase activity of striated muscle, the changes in the activity of myosincholinesterase must also be taken into account. If we ignore that factor, evaluation will be erroneous. For example, it is known that BACQ and NACHMANSOHN [13]

made comparative studies in different animal species on the acetylcholine-sensitivity and cholinesterase activity of muscles. They found no correlation between acetylcholine-sensitivity and total cholinesterase activity of muscle. However, on grounds of the above, it is conceivable that a reproduction of their experiments with due consideration to myosincholinesterase activity might be revealed in hitherto unknown correlations. For instance, the myosin-cholinesterase activity of hirudo muscle, which is well-known for its great sensitivity to acetylcholine, was found by us much higher than that of the less acetylcholine-sensitive muscles from other species. The details of these experiments will be discussed later.

The question of localisation also emerges. Recently, numerous authors have studied by histochemical methods the localisation of muscle cholinesterase. The results unequivocally confirmed the earlier theory, or they went even further and claimed that cholinesterase is localized almost exclusively in the end plates. Although our investigations in this direction are in the initial stage, on the basis of published data in the literature we cannot regard the problem as solved. In this connection we want to draw attention to the remarkable parallelism between our own findings and the figures in the previously cited report by KUPFER and KOELLE [8], as well as in that by WOHLFART [14]. In both reports, in the case of normal adult muscle it is in fact exclusively the end plates that exhibit the staining reaction corresponding to cholinesterase activity. However, in the muscle of a 9-day old rat examined by KUPFER and KOELLE (Fig. 25), and in the preparations made of muscles 30 days after denervation in WOHLFART's report (Fig. 5) not only the end plates show the typical staining reaction, but though less intensely also the muscle fibres. As according to our findings, it is just in these cases that a significant increase occurs in the specific activity of myosincholinesterase, it may be supposed that the high activity might become demonstrable by histochemical methods, in contrast with adult muscle in which myosincholinesterase activity is lower.

Finally, we should refer to the peculiar correlation we have found to exist between the two enzymatic activities of myosin, notably between the ATP-ase and cholinesterase activities. In the days following birth, ATP-ase activity is very low and cholinesterase activity reaches the peak. Then, at the same time when ATP-ase activity suddenly begins to increase, the specific activity of myosin cholinesterase suffers a steep fall. When interpreting these data, it should be borne in mind that the ATP-ase activity of myosin is commonly known to be the property of the H-meromyosin part [15], whereas, according to our earlier investigations [16], cholinesterase activity is bound to L-meromyosin. Accordingly, L-meromyosin may be considered the more ancient, primitive component of the myosin molecule. Dedifferentiation in this direction may possibly take place also in rabbit muscle, in which the increase in the specific activity of myosin-cholinesterase occurs simultaneously with the diminution of ATP-ase activity.

SUMMARY

1. In the first days of postnatal life in rabbits the sum of the two kinds of cholinesterase activity (acetyl- and myosincholinesterase activity) in striated muscle is, in accordance with data in the literature, much higher than in the muscle of the normal, adult animal.

2. The increase in total activity, which is due mainly to an increase in the concentration of acetylcholinesterase, reaches the peak in 6 to 11 days.

3. Myosincholinesterase activity per 1 g muscle increases less markedly, though significantly: the activity being is about 3,6 times that found in adult muscle. The increase in the concentration of myosincholinesterase results in a prolonged high level and shows no sharp peak as that displayed by acetylcholinesterase.

4. The specific activity of myosincholinesterase is the highest during the first days after birth, when it is about 8 times that of adult muscle. Then it decreases markedly during the second week of postnatal life. This explains the decrease in the amount of myosincholinesterase calculated for 1 g muscle, in spite of the increase of the myosin content of muscle.

5. The sensitivity to acetylcholine of muscle is the highest during the days immediately following birth, then declines gradually. Thus, the peak of acetylcholine-sensitivity coincides with the peak of the specific activity of myosincholinesterase and by the time acetyl-and total cholinesterase activities reach the maximum, acetylcholine-sensitivity is usually decreasing.

LITERATURE

1. Varga, E., Kövér, A., Kovács, T., Hetényi, E.: Acta Physiol. Hung. **11**, 235 (1957).
2. Koshtoyantz, Kh. S., Ryabinovskaya, A.: Arch. ges. Physiol. **235**, 416 (1935).
3. Rückert, W.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **150**, 221 (1930).
4. Ryabinovskaya, A.: Bull. Biol. Med. Exp. URSS. **1**, 305 (1936).
5. Nachmansohn, D.: Compt. rend. soc. biol. **128**, 599 (1938).
6. Leibson, R.: Bull. Biol. Med. Exp. URSS. **7**, 522 (1939).
7. Torda, C.: Biochimica e Ter. sper. **25**, 532 (1938). Cit.: Ber. ges. Physiol. **112**, 388 (1939).
8. Kupfer, C., Koelle, G. B.: J. Exp. Zool. **116**, 397 (1951).
9. Kuffler, St. W., Williams, E. M. V.: J. Physiol. **121**, 289; 318 (1953).
10. Krüger, P.: Dtsch. Z. Nervenheilk. **173**, 404 (1955).
11. Häggquist, G.: Ann. med. exper. biol. Fenniae. **26**, 1 (1948). Cit.: Brecht (12).
12. Brecht, K.: Dtsch. Z. Nervenheilk. **173**, 409 (1955).
13. Bacq, Z. M., Nachmansohn, D.: J. Physiol. **8**, 368 (1937).
14. Wohlfart, G.: Dtsch. Z. Nervenheilk. **173**, 426 (1955).
15. Mihályi, E., Szent-Györgyi, A. G.: J. Biol. Chem. **201**, 211 (1953).
16. Varga, E., Kőnig, T., Kiss, E., Kovács, T., Hegedüs, L.: Acta Physiol. Hung. **7**, 171 (1955).
17. Hermann, H., Nicholas, J. S.: J. Exp. Zool. **107**, 177 (1948).
18. Robinson, D. S.: Biochem. J. **52**, 633 (1952).
19. Hestrin, S.: J. Biol. Chem. **180**, 249 (1949).
20. Taussky, H. H., Shorr, E.: J. Biol. Chem. **202**, 675 (1953).

ON THE PROPERTIES OF MYOSINCHOLINESTERASE

By

A. KÖVÉR, T. KOVÁCS and T. KÖNIG

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, DEBRECEN

AND

INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY, BUDAPEST

(Received December 22, 1956)

M. BEZNÁK [1] was the first to study the ability of myosin to hydrolyse acetylcholine. Approaching the problem from another point of view, similar observations have been reported by VARGA *et al.* [2a, 2b]. The experiments of the latter authors revealed that L-meromyosin — which is obtained from myosin by trypsin digestion and which has been believed to be enzymatically inactive — is responsible for the cholinesterase activity of myosin. It has been also observed that by crystallizing L-meromyosin the activity of the enzyme can be increased to 3 to 4 times that of the myosin digested with trypsin [3].

Cholinesterase activity is a newly recognized property of myosin and it was endeavoured to clear its physiological significance. The first step in the investigations was to determine the conditions (pH, substrate concentration, ionic milieu) required for optimum enzyme activity.

Methods

Actomyosin prepared according to SZENT-GYÖRGYI [4], myosin purified from actomyosin obtained by WEBER's method [5] and crystalline L-meromyosin [6] were used. The enzyme preparations were stored at 2°C in a refrigerator, using one drop of toluene for conservation. Each preparation was used for 2 to 3 weeks, during which time the activity of the enzyme did not change. The ionic concentration of the still undissolved or crystallized enzyme preparations varied from 0,02 to 0,03 *M*. As a result of dilution, ionic concentration of enzyme preparations diminished to about one-tenth the initial in the incubation mixture; under such conditions it did not influence the ionic strength of the incubation mixture. To stabilize pH, a sodium-veronal-hydrochloric acid buffer and a glycine-sodium hydroxyde buffer were used, the former in the range of pH 7,0 to 8,5, the latter in that of pH 8,0 to 9,5, at an end concentration of 0,01 *M*. The pH of the mixtures was controlled before and after incubation, using an electric pH-meter and glass electrode. The end concentration of acetylcholine *(Hoffmann—La Roche)* was $8{,}2 \cdot 10^{-4}$ *M*. Acetylcholine was estimated according to HESTRIN [7].

Experimental

Optimum pH. In the first part of the experiments the optimum pH for myosincholinesterase activity was studied at low ionic strengths (Fig. 1). As pH is increased, the activity of myosincholinesterase increases like that of

acetylcholinesterase, reaching the optimum at pH 8,5. In the control mixtures the autohydrolysis of acetylcholine was always estimated and, if present, taken into consideration. In general, no autohydrolysis occurred at pH 8,0 and was marked only above pH 8,5.

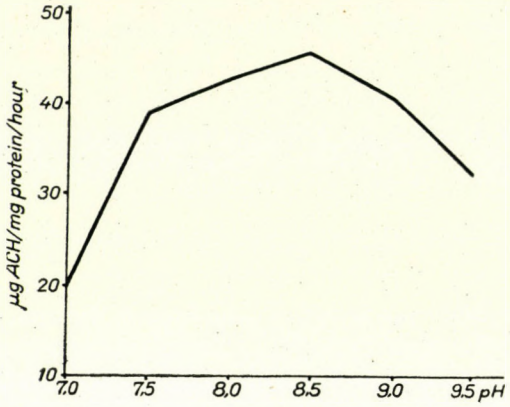


Fig. 1. Activity of myosincholinesterase at different pH. Incubation in 15 ml mixture at 37°C for 30 minutes. Composition of mixture (end concentration) myosin, 200 mg per 100 ml, 0,01 *M* veronal-sodium-hydrochloric acid buffer, $8{,}2 \cdot 10^{-4}$ *M* Ach.

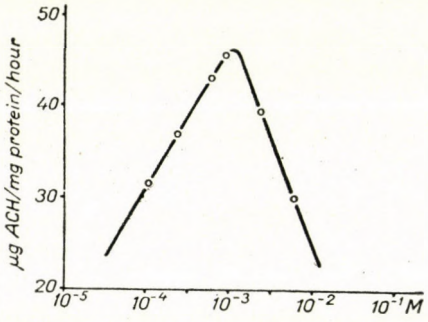


Fig. 2. Activity of myosincholinesterase at different substrate concentrations. Incubation in 15 ml mixture at 37°C for 30 minutes. Composition of mixture (end concentration) actomyosin, 150 mg per 100 ml, 0,01 *M* veronal buffer pH 7,4. Estimation at $7{,}5 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-3}$, $9 \cdot 10^{-4}$, $7{,}6 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ and $0{,}5 \cdot 10^{-4}$ *M* acetylcholine

Optimum substrate concentration. VARGA *et al.* found [2] that, like acetylcholinesterase, myosincholinesterase also inhibits acetylcholine at high concentrations. As the various kinds of acetylcholinesterase preparations have the substrate optimum at different concentrations, it was deemed necessary to determine the substrate optimum for myosincholinesterase. The effect of substrate concentration on the activity of the enzyme was studied at the acetylcholine end concentrations shown in Fig. 2, where it can be seen that the optimum substrate concentration of myosincholinesterase is $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M* acetylcholine under the given conditions. The curve is of the typical bell-shape.

Effect of potassium ions on myosincholinesterase. At pH 7,0, 7,5, 8,0 and 8,5 potassium concentration was increased from 0,01 to 1,0 *M* and its effect on the activity of myosincholinesterase was studied. As seen in Fig. 3 the K^+ ion activates at low, and inhibits at high concentrations. Maximum activation was in the range from 0,1 to 0,2 *M* K^+. The degree of activation and inhibition changes with the increase of pH ; as pH increases, enzyme activity is enhanced and activation by K^+ decreases. On the other hand, at higher K^+ concentrations inhibition becomes more marked. As no such phenomena were observed in the

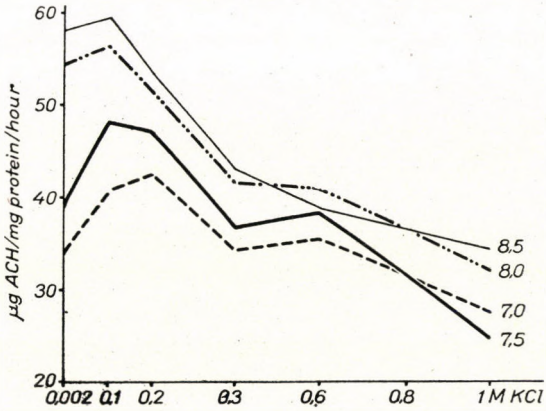


Fig. 3. Activity of myosincholinesterase at different hydrogen ion and KCl concentrations. Incubation in 37°C water bath for 30 minutes. The composition of the 15 ml mixture (end concentration) was actomyosin, 150 mg per 100 ml, 0,01 *M* veronal buffer, $8{,}2 \cdot 10^{-4}$ *M* ACh, suitable concentrations of KCl. The preparation of actomyosin contained 0,025 *M* KCl, which was diluted 1 : 10 in the incubation mixture

experiments with Na^+, it can be stated that K^+ acts specifically, i. e. not by changing ionic strength.

Effect of bivalent cations on myosincholinesterase. The effect of Ca^{++}, Mg^{++} and Mn^{++} was studied. There being different opinions in the literature regarding the activating concentration, we examined the effect of bivalent cations on enzyme activity at different concentrations of the latter. The experiments revealed (Fig. 4) that at pH 7,0, $5 \cdot 10^{-2}$ to $5 \cdot 10^{-6}$ *M* concentrations of Mg^{++} has no influence on the activity of myosincholinesterase, whereas such concentrations greatly increase the activity of acetylcholinesterase prepared from brain tissue, in agreement with data in the literature. Similar results were obtained for Ca^{++} and Mn^{++} ions. Thus, the bivalent cations, which at pH 7,0 activate other cholinesterases, have no influence on the activity of myosincholinesterase.

This difference can be explained in two ways. 1. The part of myosin-molecule responsible for the cholinesterase activity contains in linkage the bivalent cation required for maximum activity and therefore the bivalent cations

added are ineffective. 2. Neither contains the group responsible for cholinesterase activity bivalent cations in linkage, nor have the bivalent cations added influence on activity.

To elucidate the problem, ethylene-diaminetetraacetate (EDTA), in an end concentration of 0,001 *M*, was added to myosin at pH 8,0 and at low ionic strength. According to literary data [8], under such conditions EDTA combines optimally with bivalent cations. In our experiments, EDTA did not influence the

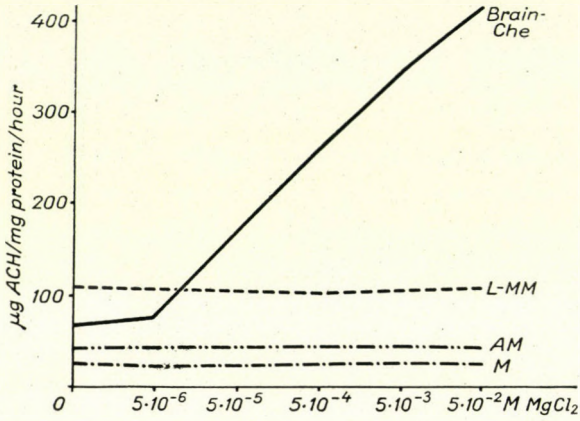


Fig. 4. Effect of magnesium on the activity of brain cholinesterase and myosincholinesterase. In the mixture the following end concentrations of enzyme were employed (per 100 ml), myosin (M), 43 mg; actomyosin (AM) 32 mg; L-meromyosin (L-MM), 45 mg; brain cholinesterase, (Agy) 8 mg 0,01 *M* veronal buffer, pH 7,0, 8,2 · 10^{-4} acetylcholine. $MgCl_2$ in concentrations specified. Incubation in 15 ml mixture at 37°C for 30 minutes

activity of myosincholinesterase. This observation, however, is no absolute proof that the part of myosin-molecule responsible for cholinesterase activity contains no bivalent cations in linkage. WEBSTER [9] has shown that EDTA does not equally form complexes with free bivalent cations and bivalent cations bound to myosin. However, the data published by SZENT-GYÖRGYI [10], according to which bivalent cations would be linked to H-meromyosin and monovalent ones mainly to L-meromyosin, contradict the first assumption. As VARGA *et al.* [3] have shown, L-meromyosin is responsible for cholinesterase activity. The lack of activating action of bivalent ions on the L-meromyosin is probably due to the fact that it does not form a complex with bivalent ions. To prove this, we examined the effect of Mg^{++} on the cholinesterase activity of crystalline L-meromyosin.

Fig. 4 reveals that Mg^{++} did not enhance the cholinesterase activity of L-meromyosin even at a concentration as high as 5 · 10^{-2} *M*.

On grounds of the above evidence it can be stated that the groups of myosin responsible for cholinesterase activity do not combine with Mg^{++}, and that Mg^{++} has no influence on the activity of the enzyme.

Discussion

The optimum pH of myosincholinesterase is 8,5, i. e. it is closely similar to that reported for other cholinesterases [11, 12]. The optimum substrate concentration for myosincholinesterase is $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M* acetylcholine, at pH 7,4, at an ionic strength of 0,02. This value is lower than those reported for cholinesterases prepared from bovine and horse erythrocytes ($2{,}88 \cdot 10^{-3}$ *M)* and from dog brain ($3{,}55 \cdot 10^{-3}$) [13].

According to MENDEL, MUNDEL and STRELITZ [14], as well as GLICK [15], the K^+ ion inhibits serum cholinesterase, whereas NACHMANSOHN [16], MENDEL and RUDNEY [17] and more recently MYERS [18] found in experiments with true cholinesterase that the breakdown of acetylcholine was increased in the presence of monovalent cations. In our experiments it was found that K^+ activates myosincholinesterase at low concentrations and inhibits it at high concentrations. The effect of K^+ is highly dependent on the pH of the incubation mixture. According to data in the literature, K^+ and Na^+ ions act in the same direction on the various cholinesterases. On the other hand, in our experiments K^+ proved to have a specific action on myosincholinesterase, as in equal concentrations Na^+ did not influence the activity of that enzyme. Our data indicate that in certain properties myosin cholinesterase differs from other cholinesterases.

It is also known that the peculiar intra- and extracellular distribution of monovalent Na^+ and K^+ ions is of decisive importance in the fundamental processes of muscle function. If this is considered in the light of the specific effect of intracellular K^+ on the activity of myosincholinesterase, the question may arise what role this property of myosincholinesterase plays in the elicitation of muscle contraction by an impulse running along the membrane?

There is general agreement in the literature that bivalent cations significantly enhance the activity of both true- and pseudo-cholinesterase, the only difference between the authors being in respect of the activating concentration and the degree of activation. NACHMANSOHN [17] found that the activity of cholinesterase prepared from the Torpedo electric organ and subjected to protracted dialysis was increased 5 to 10 times by $5 \cdot 10^{-5}$ *M* Ca^{++}, Mg^{++} and Mn^{++}. In contrast with this, at pH 7 a concentration as high as $5 \cdot 10^{-2}$ *M* of Ca^{++}, Mg^{++} and Mn^{++} had no effect on the activity of myosin cholinesterase. This difference, too, indicates that in some properties myosincholinesterase is different from other cholinesterases. Our findings have shed light on new problems concerning the specificity and physiological role of myosincholinesterase, which will be further investigated in subsequent experiments.

SUMMARY

On grounds of experimental evidence the properties of myosincholinesterase may be summarized as follows.

1. The optimum pH is 8,5.

2. The optimum substrate concentration is $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M* acetylcholine, at pH 7,4 and at an ionic strength of 0,02.

3. The activity of the enzyme is enhanced by K^+ in concentrations of 1,0 to 0,2 *M*, and inhibited at higher concentrations. Activation decreases and inhibition increases with the increase in pH.

4. The effect of K^+ is specific and is not due to a change in ionic strength.

5. In contrast with other cholinesterases, the activity of myosincholinesterase is not influenced by bivalent cations (Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}).

LITERATURE

1. Beznák M.: Magyar Orvosi Arch. **44**, 3 (1944).
2/a Varga, E., Szigeti, J., Kiss, E.: Kísérletes Orvostud. **5**, 304 (1953).
2/b Varga, E., Szigeti, J., Kiss, E.: Acta Physiol. Hung. **5**, 383 (1954).
3. Varga, E., König, T., Kiss, E., Kovács, T., Hegedüs, L.: Acta Physiol. Hung. **7**, 171 (1955).
4. Szent-Györgyi, A.: Studies from the Institute of Medical Chemistry, University Szeged, 1944.
5. Weber, H. H.: Z. Naturforsch. **5b**. 61 (1950).
6. Mihályi, E., Szent-Györgyi, A. G.: J. Biol. Chem. **201**, 189 (1953).
7. Hestrin, S.: J. Biol. Chem. **180**, 249 (1949).
8. Dowen, V. J., Kerwin, T. D.: J. Biol. Chem. **211**, 237 (1954).
9. Webster, H. L.: Nature **172**, 453 (1953).
10. Szent-Györgyi, A.: Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle. Academic Press, New York (1953) p. 17.
11. Glick, D.: Biochem. J. **31**, 521 (1937).
12. Werle, E., Uebermann, H.: Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **189**, 421 (1938).
13. Augustinsson, K.-B.: Acta Physiol. Scand. **52**, 15. Suppl. (1948).
14. Mendel, B., Mundel, D. B., Strelitz, F.: Nature **144**, 479 (1939).
15. Glick, D.: Nature **148**, 662 (1941).
16. Nachmansohn, D.: Nature, **145**, 513 (1940).
17. Mendel, B., Rudney, H.: Science **102**, 616 (1945).
18. Myers, K. D.: Arch. Biochem. **37**, 469 (1952).

ON THE SPECIFICITY OF MYOSINCHOLINESTERASE

By

A. KÖVÉR and T. KOVÁCS

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, DEBRECEN

(Received December 22, 1956)

In a previous report [1] it has been pointed out that as far as certain properties (first of all ionactivability, but also substrate optimum) are concerned, myosincholinesterase proved to be different from the other kinds of cholinesterase. However, this by itself does not decide whether the enzyme we deal with represents in fact a new type of cholinesterase. Cholinesterases from different sources are usually typed on grounds of differences in hydrolysing action on cholinesters and in affinity to cholinesterase inhibitors. If myosincholinesterase is different from the known cholinesterases, it must show differences also in its affinity to inhibitors and in its hydrolysing action on various substrates. The physiological role of myosincholinesterase can be studied *in vivo* only by the use of such substrates and inhibitors to which the enzyme has a selective affinity, or an affinity different from that of other cholinesterases. On grounds of these considerations it has been thought necessary to study first the specificity of myosincholinesterase *in vitro*.

Methods

Actin-free myosin prepared from rabbit striated muscle and heart muscle by the method of A. G. SZENT-GYÖRGYI [3] was used. The preparation was dissolved in 0,6 *M* KCl. Insoluble particles, if present, were removed by centrifugation. Toluene was used for conservation.

In the comparative studies acetylcholinesterase prepared from rabbit striated muscle by the method of ORD and THOMPSON [4] was used. Digestion with trypsin was omitted, because, according to MIHÁLYI and A. G. SZENT-GYÖRGYI [5], trypsin makes myosin to split into meromyosins and change solubility relations. The precipitate resulting on saturation with 67 per cent ammonium sulphate was dissolved in distilled water, dialysed against distilled water and adjusted to the same KCl concentration as that of myosin. This preparation was used as acetylcholinesterase.

The activity of the enzyme was assayed in an incubation mixture containing: a sodium-veronal-hydrochloric acid buffer of pH 8,0 and at an end concentration 0,01 *M*, 40 to 80 mg myosin and a suitable concentration of substrate. The incubation mixtures were maintained in a water bath at 37°C for 60 minutes. The actual substrate concentration was determined according to HESTRIN [6], after controlling the pH before the water bath (0 minute), as well as in aliquot samples taken after 60 minutes. Autohydrolysis of the substrate was measured, and, if present, taken into correction. The activity of inhibitors was assayed at 10^{-3} *M* acetylcholine *(La Roche)* end concentration. The inhibitors were used without preincubation.

Results

Examination of substrate specificity. In Fig. 1 the enzymatic hydrolysis of various cholinesters at different concentrations, in the presence of myosin from striated muscle, is presented. As it can be seen, myosin cholinesterase splits acetyl-β-methylcholine at the same rate, acetylthiocholine at a higher rate, than acetylcholine. Likewise, there are differences in substrate optimum between

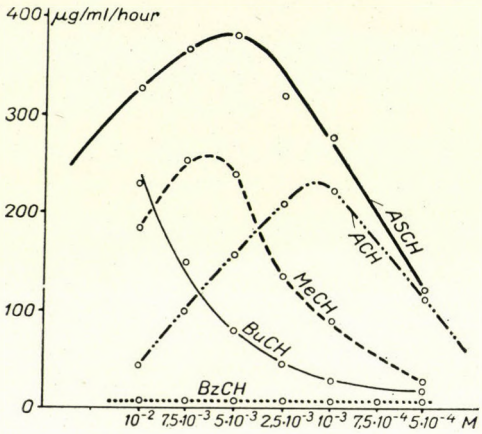


Fig. 1. Hydrolysis of different cholinesters in the presence of myosin prepared from rabbit striated muscle. The abscissa shows the molar substrate concentration, the ordinata the amount in μg of substrate broken down by 1 ml myosin in 1 hour. Incubation in 10 ml mixture at 37° C for 60 minutes. Composition of mixture (end concentration): myosin, 400 mg per 100 ml; 0,01 *M* sodium-veronal-hydrochloric acid buffer pH 8,0.
Signs: Acetylthiocholine iodide (Light): ASCH;
Acetylcholine chloride (Hoffmann—La Roche): ACH;
Acetyl-β-methylcholine chloride (Light): MECH;
Butyrilcholine chloride (Light): BuCH;
Benzoylcholine chloride (BDH): BzCH

acetylcholine, acetylthiocholine and acetyl-β-methylcholine. There is no agreement in the literature as to the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine [7, 8]. AUGUSTINSSON and others emphasize that acetylcholinesterase hydrolyses acetyl-β-methylcholine much less effectively than acetylcholine [10]. Benzoylcholine is hydrolysed by acetylcholinesterase only slightly, and by myosin-cholinesterase not at all. There is a substantial difference in butyrilcholine hydrolysis. As the substrate concentration increases, hydrolysis of butyrilcholine increases and at the highest substrate concentration employed the rate of hydrolysis is about the same as that of acetylcholine at the optimum substrate-concentration and under similar conditions. It was unexpected that no substrate inhibition occurred at a concentration of 10^{-2} *M*. This does not exclude the possibility that at higher concentrations butyrilcholine might exert an inhibitory

action, considering that the concentration optimums were different with the different substrates. In the experiments under discussion the HESTRIN method limited the possibility to clear up this problem [11].

From the data published by ORD and THOMSON we have concluded that the actin-free myosin prepared from heart muscle was different from the myosin cholinesterase of striated muscle. It was therefore decided to study also the specificity of myosincholinesterase from heart muscle. The results presented in

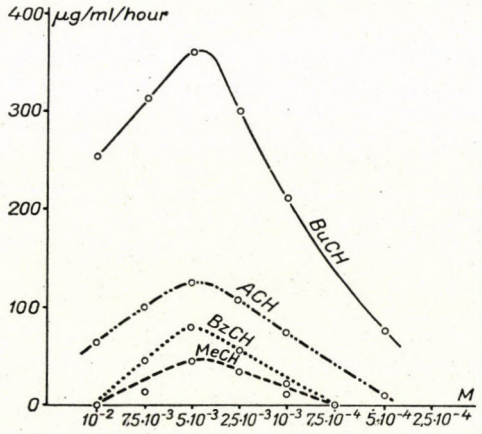


Fig. 2. Hydrolysis of different cholinesters in the presence of myosin prepared from rabbit heart muscle. The abscissa shows the molar substrate concentration, the ordinata the amount of substrate (in μg) broken down by 1 ml myosin in 1 hour. Incubation in 10 ml mixture at 37°C for 60 minutes. Composition of mixture (end concentration), myosin 400 mg per 100 ml, 0,01 *M* veronal-sodium-hydrochloric acid buffer pH 8,0.
Signs: Acetylcholine chloride (Hoffmann—La Roche): ACH;
Acetyl-β-methylcholine chloride (Light): MECH;
Butyrilcholine chloride (Light): BuCH;
Benzoylcholine chloride (BDH): BzCH

Fig. 2 support the view that myosincholinesterase from heart muscle differs in behaviour from that of skeletal muscle.

1. Benzoylcholine, acetyl-β-methylcholine, acetylcholine, as well as butyrilcholine have the same substrate concentration optimum.

2. Whereas myosincholinesterase from skeletal muscle does not hydrolyse benzoylcholine, heart muscle myosincholinesterase splits benzoylcholine at a higher rate than acetyl-β-methylcholine.

3. The hydrolysis of acetylcholine exceeds that of benzoylcholine and of acetyl-β-methylcholine.

4. Myosincholinesterase from heart muscle breaks down butyrilcholine at a higher rate than the other cholinesters. It must be emphasized that in the experiments with heart muscle myosin at high butyrilcholine concentrations substrate inhibition was observable.

The results of the above experiments show that as far as substrate specificity is concerned significant differences exist between myosincholinesterase and acetyl- or pseudocholinesterases.

Effect of cholinesterase inhibitors on myosincholinesterase

In the second part of the experiments we examined the effect of different inhibitors on myosincholinesterase. According to data published in the literature,

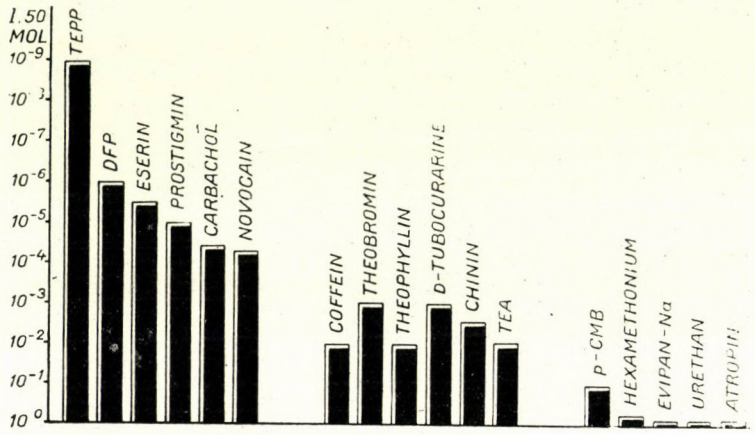


Fig. 3. Effect of different inhibitors on the activity of myosincholinesterase prepared from striated muscle. The columns indicate the molar inhibitor concentration required for 50 per cent inhibition (I_{50}). The inhibitors were used without preincubation

pseudo- and acetylcholinesterase have different affinity to the inhibitors. For example, diisopropylfluorophosphate inhibits pseudocholinesterase at a concentration of 10^{-9} *M* whereas it blocks acetylcholinesterase only at a concentration as high as 10^{-6} *M* (I_{50}). We examined the inhibitory effect of 17 different compounds. Of the inhibitors, tetraethylpyrophosphate (TEPP), diisopropylfluorophosphate (DFP), eserine, prostigmine, carbaminoylcholine, as well as procaine inhibited myosincholinesterase at different concentrations, even at higher dilutions. Coffeine, theobromine, theophylline, d-tubocurarine, quinine, tetraethylammoniumchloride (TEA) inhibited only at higher concentrations and less effectively, whereas hexamethonium, evipan (sodium-methyl-cyclohexenyl-methylbarbituric acid), p-chloromercuribenzoate (p-CMB), urethane and atropine had very little or no inhibitory action (Fig. 3). In comparative studies on their behaviour against the inhibitors employed no significant difference was found between acetylcholinesterase and myosincholinesterase.

Discussion

On the basis of the studies by ALLES and HAWES [12], GLICK [13], ZELLER and BISSEGGER [14], and AUGUSTINSSON [9], acetylcholinesterases from different tissues may be divided into two groups, on grounds of differences in their hydrolytic action on the substrates. The first group is that of the so-called *cholinesterases* (pseudo-, nonspecific), which hydrolyse cholinesters at a higher rate, than noncholine esters, their hydrolysing capacity increases with the length of the acyl chain (from acetyl to butyril), they split equally or more effectively benzoylcholine than acetylcholine and, finally, the activity of the enzyme increases with the increase of substrate concentration.

The other group consists of the so-called *acetylcholinesterases* (true, specific). These hydrolyse propionylcholine and acetylcholine in almost the same rate but are able to split other cholinesters just slightly or not at all. By increasing substrate concentration the activity of the enzyme can be increased to a well-defined optimum; a further increase in substrate concentration then results in an inhibition of enzyme activity. Furthermore, the enzymes of this group hydrolyse noncholine esters very slightly or not at all.

It has been demonstrated by NACHMANSOHN *et al.* [15] and LANGEMANN [16] that striated muscle contains preponderantly acetylcholinesterase, which was said to be localized mainly in the myogenic parts of end plates and in the membrane of muscle fibres. We have pointed out [2] that the above data do not present the real situation, because they ignore myosincholinesterase, which is present in about the same amount, but in diffuse distribution. We have demonstrated that in certain properties myosincholinesterase differs from other cholinesterases. Thus, it has become necessary to investigate whether significant differences useful from the point of view of physiological studies could be detected in the substrate specificity and in regard to inhibitors between myosincholinesterase — which makes up a considerable proportion of total muscle cholinesterase — and other cholinesterases.

Our experimental results revealed sharp differences in substrate hydrolysis between myosincholinesterase and the other cholinesterases. The fact that myosincholinesterase hydrolyses butyrilcholine at a higher rate makes it possible to study the physiological importance of myosincholinesterase in tonic and tetanic muscles and its role in tonic and tetanic changes of muscular activity by using butyrilcholine as a substrate. Naturally, the use of butyrilcholine will facilitate such studies only if the difficulties presented by permeability relations are overcome. Quaternary ammonium salts cannot pass through the resting membrane. This fact makes it difficult to study the changes in the activity of intracellular cholinesterase. Recently, the readily penetrating compounds monochlorethylacetate and dimethylaminoethylacetate have been used for this purpose. The activity and the changes in the activity of intracellular myosin-

cholinesterase can be studied only after permeability has been increased by depolarising the membrane, or if the quaternary ammonium salts are introduced into the fibres by means of microcapillaries. These points should be borne in mind in experiments with butyrilcholine.

In the inhibitor experiments it has been found that, as far as the inhibitors used are concerned, no substantial differences exist between myosin- and acetylcholinesterase. The observation that p-chloromercuribenzoate inhibited the activity of myosincholinesterase only at a concentration of 10^{-2} *M* is in agreement with the evidence published by VARGA *et al.*, that myosincholinesterase activity is bound to the L-meromyosin, which according to SZENT-GYÖRGYI, contains no free SH groups. This excludes the possibility that myosincholinesterase would be an SH-enzyme.

The observation that significant differences exist in substrate specificity between myosincholinesterases prepared from the heart muscle and the striated muscle of the same animal raises the question of the factors determining the type-properties in the various cholinesterases. We attribute the decisive role to the protein structure. The structure of cholinesterase changes according to the structural and functional role played by the enzyme in the tissue it originates from. On the basis of our results it is conceivable that this would determine and decide the type of cholinesterase. In some properties (inhibition of substrate myosincholinesterase is similar to acetylcholinesterase, whereas in others (hydrolysis of butyrilcholine) it resembles cholinesterases, and still in others (ionic activity) it is similar to neither of them. From all these we were not inclined to conclude that myosincholinesterase is a third type of cholinesterases. On the contrary, on grounds of the differences existing between striated muscles and heart muscle myosincholinesterases we believe that the active groups are common to all cholinesterases, but the protein structure exerts a decisive influence on the substrate and inhibitor affinity and other properties of a certain type of cholinesterases.

SUMMARY

1. Myosincholinesterase prepared from striated muscle hydrolyses acetyl-β-methylcholine at a same rate than acetylcholine, acetylthiocholin at a higher rate and benzoylcholine not at all. The hydrolysis of butyrilcholine increases with the increase of substrate concentration and at the highest concentration tested (10^{-2} *M*) the rate of hydrolysis is about the same than that of acetylcholine at the optimum acetylcholine concentration and under similar experimental conditions.

2. Myosincholinesterase prepared from heart muscle splits benzoylcholine at a lower rate than acetylcholine, acetyl-β-methylcholine at a still lower rate. The rate of hydrolysis of butyrilcholine exceeds that of acetylcholine.

3. Comparative studies have revealed no differences between the action of inhibitors on myosin- and acetylcholinesterase.

LITERATURE

1. KÖVÉR, A., KOVÁCS, T., KÖNIG, T.: Acta Physiol. Hung. **11**, 253 (1957).
2. VARGA, E., KÖVÉR, A., KOVÁCS, T., HETÉNYI, E.: Acta Physiol. Hung. **11**, 235 (1957).
3. SZENT-GYÖRGYI, A. G.: J. Biol. Chem. **192**, 361 (1951).
4. ORD, M. G., THOMPSON, R. H. S.: Biochem. J. **49**, 191 (1951).
5. MIHÁLYI, E., SZENT-GYÖRGYI, A. G.: J. Biol. Chem. **201**, 189 (1953).
6. HESTRIN, S.: J. Biol. Chem. **180**, 249 (1949).
7. KOELLE, G. B.: J. Pharmacol. Exper. Therap. **100**, 158 (1950).
8. MARQUARDT, P., VOGG, G.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **219**, 50 (1953).
9. AUGUSTINSSON, K-B.: Acta Physiol. Scand. **15**, Suppl. **52** (1948).
10. WHITTAKER, V. P.: Physiol. Rev. **31**, 312 (1951).
11. ORD, M. G., THOMPSON, R. H. S.: Biochem. J. **46**, 346 (1950).
12. ALLES, G. A., HAWES, R. C.: Science **100**, 75 (1944).
13. GLICK, D.: Science **102**, 100 (1945).
14. ZELLER, E. A., BISSEGGER, A.: Helv. physiol. pharmacol. Acta **2**, C. 63 (1944).
15. NACHMANSOHN, D., ROTHENBERG, M. A.: J. Biol. Chem. **158**, 653 (1945).
16. LANGEMANN, H.: Helv. physiol. pharmacol. Acta **2**, C. 17 (1944).

EINFLUSS VON ADRENALIN AUF DIE MUSKELPHOSPHORYLASE-AKTIVITÄT UND DEREN BEDEUTUNG IM MECHANISMUS DER ERMÜDUNGSHEMMENDEN WIRKUNG

Von

E. VARGA, E. HETÉNYI und GY. BOT

PHYSIOLOGISCHES UND PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDINIZISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

Aus den Untersuchungen von L. A. ORBELI [1] wissen wir, dass die Tension des ermüdeten quergestreiften Muskels durch entsprechende Sympathikusreizung gesteigert, seine Ermüdung herabgesetzt wird. Diese Erscheinung — die unter dem Namen ORBELI-Effekt bekannt wurde — ist von zahlreichen Autoren untersucht worden, deren überwiegende Mehrzahl ORBELIS Angaben zu bestätigen vermochte. Auf die Besprechung dieser Ergebnisse wollen wir hier nicht eingehen, sondern lediglich auf die Arbeiten von RIESSER [2], KUNTZ [3], TIEGS [4] und WENT [5] verweisen, welche die Literatur der Frage ausführlich behandeln. Die verschiedenen Autoren sind sich im allgemeinen darüber einig, dass Adrenalin ähnlich wie die Sympathikusreizung über eine ermüdungshemmende Wirkung verfügt, doch gehen die Meinungen über den Mechanismus der Wirkung auseinander. Ein beträchtlicher Teil der Autoren vermochte die ermüdungshemmende Wirkung des Adrenalins oder der Sympathikusreizung nur an dem durch indirekte Reizung ermüdeten Muskel zu beobachten ; am direkt gereizten Muskel konnten sie eine derartige Wirkung nicht feststellen, weshalb sie als Angriffspunkt der Wirkung die neuromuskulären Junktionen bezeichnen [1, 2, 3, 4, 6—9].

In den letzten Jahren teilten CORI und Mitarbeiter Angaben mit, die sich unserer Ansicht nach zur Klärung dieser mehrere Jahrzehnte währenden Diskussion verwerten lassen. SUTHERLAND und CORI stellten nämlich fest, dass Adrenalin imstande ist, das inaktivierte Phosphorylasesystem zu aktivieren [10, 11, 23], während sie an anderer Stelle mitteilten, dass sich in den mit tetanisierender Frequenz gereizten und ermüdeten Muskeln des Kaninchens die aktive Phosphorylase-*a* grösstenteils zu Phosphorylase-*b* umwandelt, d. h. inaktiviert wird [12]. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte man zwischen der Muskelermüdung herabsetzenden Wirkung des Adrenalins und seinem das Phosphorylasesystem aktivierenden Einfluss gewisse Zusammenhänge vermuten. Zur Klärung dieser Zusammenhänge führten wir die folgenden experimentellen Untersuchungen durch.

Methoden

Die Versuche wurden an überwiegend aus eigener Zucht stammenden 2—3 kg schweren Kaninchen beiderlei Geschlechts vorgenommen. Die mit Urethan (1,0—1,5 g/kg Körpergewicht) narkotisierten Tiere wurden nach der Methode von SHERRINGTON präpariert, und gewöhnlich registrierten wir die Kontraktionen der Muskeln beider hinterer Extremitäten. Die Reizung erfolgte durch Entladungen des mit Tyratron-Röhre regulierten Kondensators von supermaximaler Intensität und 40—60 Frequenz; die indirekte Reizung erfolgte mit Hilfe von Platinelektroden, die auf den N. ischiadicus gelegt wurden, die direkte mit in den Bauch des M. gastrocnemius und in die Achillessehne gestochenen Nadelelektroden. Die Belastung betrug 1000—1500 g. Die Vergrösserung des Schreibarms war etwa 15fach. Adrenalin (Tonogen sec. Richter) wurde in einer Menge von 1 ml in die Ohrvene der Kaninchen injiziert und etwa mit der gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung die Vene nach der Injektion durchspült. Unseren Erfahrungen nach ist es wichtig, die Adrenalinlösung verhältnismässig rasch einzuführen, weil gleiche Adrenalingaben bei langsamerer Injektion weniger oder überhaupt nicht wirken. Zur Messung der Enzymaktivität wurden aus dem M. gastrocnemius etwa 1 g schwere Stücke herausgeschnitten, deren Gewicht wir nach Gefrieren in einem Äther-Kohlensäureschnee-Gemisch (etwa —20 —30° C) feststellten. Aus dem Muskel bereiteten wir mit 0,1 *M* NaF-Lösung unter Benutzung von Quarzsand ein 10%iges Homogenat. Das Homogenat wurde durch ein Tüllnetz filtriert und 5fach verdünnt; so benutzten wir es zur Messung der Enzymaktivität. Die Phosphorylase-Aktivität bestimmten wir nach dem zum Teil modifizierten Verfahren [14] von CORI [13] durch Messung des aus Glukose-1-phosphat befreiten anorganischen P.

Ergebnisse

Da CORI und Mitarbeiter ihre Untersuchungen unter anderen Bedingungen ausgeführt hatten, verglichen wir bei unseren ersten Versuchen die Phosphorylase-Aktivität des ermüdeten M. gastrocnemius mit der des kontralateralen ruhenden Muskels. Nach unseren früheren Untersuchungen ist nämlich die Glykogen-Phosphorylation der verschiedenen Muskeln von unterschiedlichem Ausmass [24], weshalb wir den kontralateralen Gastrocnemius für eine geeignetere Kontrolle hielten als die Rückenmuskeln.

Tabelle I gibt die Resultate von 5 orientierenden Versuchen wieder. Bei diesen wurden nur die Muskeln einer hinteren Extremität durch Reizung ermüdet, die andere Extremität auf gleiche Weise präpariert, aber nicht gereizt. Die

Tabelle I

Phosphorylase-Aktivität im ruhenden und ermüdeten Muskel

Nr.	Dauer der Ermüdung	Phosphorylase-*a*-Aktivität im Muskel		Abweichung %
		im ruhenden	im ermüdeten	
1	1′30″	32,8 mg P/g	15,7 mg P/g	— 52,1
2	1′30″	27,3 „	13,8 „	— 49,4
3	2′	39,8 „	20,0 „	— 49,7
4	2′30″	13,9 „	7,8 „	— 43,8
5	10′	24,6 „	6,3 „	— 74,3

Reizung erfolgte mit supermaximaler Intensität und tetanisierender Frequenz (40—60|Sek.). Der nach dem Reiz auftretende komplette Tetanus wurde registriert und sodann in den verschiedenen Phasen der Senkung der Muskeltension — aber noch während der Reizung — aus dem M. gastrocnemius zur Messung der Enzymaktivität ein Stück herausgeschnitten. — In Tabelle I ist das Ausmass der Phosphorylase-Aktivität in der in mg bezeichneten Menge des von 1 g Muskel während 10 Minuten aus Glukose-1-phosphat befreiten anorganischen P angegeben.

Wie aus Tabelle I ersichtlich, ist die Phosphorylase-*a*-Aktivität des ermüdeten Muskels in allen Fällen beträchtlich (um 43—74%) geringer als die des ruhenden Kontrollmuskels. Nach parallel durchgeführten Messungen in Anwesenheit von Adenylsäure ist die geringere Enzymaktivität darauf zurückzuführen, dass sich Phosphorylase-*a* während der Ermüdung zu Phosphorylase-*b* umwandelt. Bei diesen Versuchen erzielten wir demnach — wenn auch unter anderen Bedingungen — die gleichen Ergebnisse wie CORI und Mitarbeiter, d. h. wir beobachteten im ermüdeten Muskel die Inaktivierung des Phosphorylasesystems.

Hier sei erwähnt, dass wir bei einigen Versuchen ähnliche Resultate — die Senkung der Phosphorylase-Aktivität — auch dann beobachteten, wenn der Muskel mit niedrigerer (4/Sek.), d. h. nicht tetanisierender Frequenz gereizt und ermüdet wurde. Diese Angaben wollen wir hier nicht eingehender besprechen, da die Versuche im weiteren an tetanisierten Muskeln vorgenommen wurden. Unseren Erfahrungen nach tritt nämlich die ermüdungshemmende Wirkung des Adrenalins am tetanisierten Muskel ausgeprägter in Erscheinung.

Im weiteren injizierten wir während der Reizung, in der 2.—3. Minute der Muskelermüdung, Adrenalin (im allgemeinen 10 μg/kg Körpergewicht) in die Ohrvene des Tieres, und als die Zunahme der Muskeltension deutlich wurde (gewöhnlich 1—1½ Minuten nach der Adrenalin-Injektion) schnitten wir aus dem Muskel ein Stück heraus.

Bei den auf diese Weise durchgeführten 7 Versuchen war der Durchschnittswert der Phosphorylase-Aktivität höher als in den Muskeln der auf gleiche Weise ermüdeten, aber nicht mit Adrenalin behandelten Tiere. Die Bewertung dieser Versuche wurde jedoch dadurch erschwert, dass in der Enzymaktivität sowohl der ruhenden wie der ermüdeten Muskeln erhebliche individuelle Unterschiede zu beobachten waren. Aus diesem Grunde wurden im weiteren die Muskeln beider hinterer Extremitäten gleichzeitig, unter identischen Bedingungen ermüdet.

Die Ergebnisse der 6 in dieser Weise durchgeführten Kontrollversuche sind auf Tabelle II veranschaulicht. Bei diesen Versuchen wurden die Muskeln beider hinteren Extremitäten ebenso gereizt und ermüdet, wie der Gastrocnemius der einen Seite bei den auf Tabelle I wiedergegebenen Versuchen. Wie Tabelle II zeigt, stimmte die Phosphorylase-Aktivität der auf identische Weise ermüdeten bilateralen M. gastrocnemii innerhalb der Fehlergrenzen überein, so dass also

Tabelle II

Phosphorylase-Aktivität der ermüdeten Muskeln von Kontrollkaninchen

Nr.	Phosphorylase-*a*-Aktivität im ermüdeten Muskel		Abweichung %
	rechte Seite	linke Seite	
1	5,4 mg P/g	5,4 mg P/g	± 0
2	8,5 „	8,8 „	+ 3,5
3	16,1 „	17,4 „	+ 8,0
4	9,0 „	7,0 „	— 22,0
5	17,5 „	19,7 „	+ 12,5
6	18,6 „	18,5 „	— 0,5

dieser Versuchstypus zur Untersuchung der Adrenalinwirkung gut verwendet werden kann.

Bei den weiteren Versuchen injizierten wir nach der auf gleiche Weise erfolgten Ermüdung der Muskeln der beiden hinteren Extremitäten je 10 μg/kg

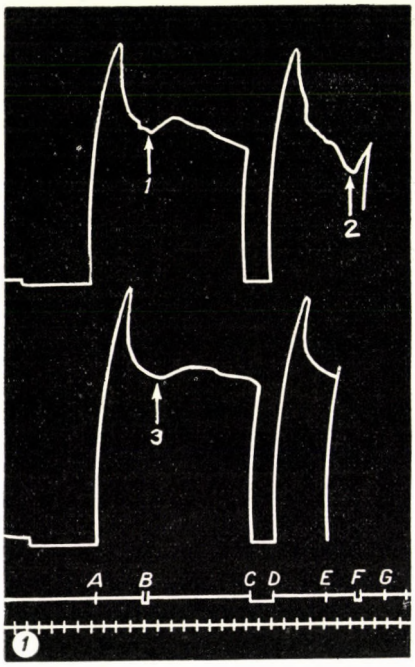


Abb. 1. Die Muskelermüdung verringernde Wirkung des Adrenalins am SHERRINGTONschen Kaninchen (s. Text)

Adrenalin in die Ohrvenen des Kaninchens. Zur Messung der Enzymaktivität wurde unmittelbar vor der Adrenalin-Injektion ein Stück aus dem Gastrocnemius

der einen Seite herausgeschnitten und zum Gefrieren gebracht. Etwa 1 Minute nach der Adrenalingabe, als die Muskeltension bereits ausgeprägt stieg, aber das Maximum noch nicht erreicht hatte, wurde die Exzision auch aus dem Gastrocnemius der anderen Seite vorgenommen.

Ein derartiger Versuch ist auf Abb. 1 dargestellt. Bei »A« beginnt die Reizung auf beiden Seiten. In der zweiten Minute der Reizung gaben wir dem 2,5 kg schweren Kaninchen i. v. 20 μg Adrenalin (»B«). Auf beiden Seiten ist die Zunahme der Muskeltension deutlich zu sehen. Nach Abklingen der Wirkung unterbrachen wir die Reizung (»C«) und liessen den Muskel 10 Minuten ruhen. Nach der Pause begann bei der Bezeichnung »D« wieder die Reizung, in deren zweiter Minute ein Stück des ermüdeten Kontrollmuskels herausgeschnitten wurde (untere Kurve, »E«). Hiernach gaben wir innerhalb 1 Minute das Adrenalin (obere Kurve, mit Pfeil bezeichneter Zeitpunkt), und während der Steigerung der Muskeltension nahmen wir die Exzision auf der kontralateralen Seite vor (»G«).

Auf Tabelle III sind die Ergebnisse von 20 derart durchgeführten Versuchen verzeichnet. Bei 16 dieser 20 Versuche nahm die Muskelermüdung auf Adrenalin-

Tabelle III

Veränderung der Phosphorylase-Aktivität des ermüdeten Muskels auf Wirkung von Adrenalin

Nr.	Phosphorylase-*a*-Aktivität im ermüdeten Muskel		Abweichung %	Bemerkungen
	vor Adrenalin (Kontrolle)	nach Adrenalin		
1	10,2 mg P/g	14,5 mg P/g	42,1	
2	13,9 „	23,0 „	65,5	
3	6,5 „	10,8 „	66,1	
4	10,7 „	14,3 „	33,6	
5	16,4 „	20,0 „	21,9	
6	2,7 „	20,4 „	655,0	
7	18,8 „	22,9 „	22,0	Auf Adrenalinwirkung war die Ermüdung *verringert*, die Muskeltension gestiegen
8	17,0 „	33,6 „	94,0	
9	24,0 „	40,0 „	66,0	
10	21,3 „	26,3 „	23,0	
11	12,5 „	18,7 „	49,6	
12	20,6 „	26,2 „	31,0	
13	11,9 „	16,8 „	41,1	
14	10,5 „	16,1 „	53,3	
15	9,6 „	9,6 „	± 0,0	
16	7,5 „	7,3 „	— 3,0	
17	9,9 „	11,0 „	+ 11,1	Auf Adrenalinwirkung hatte die Ermüdung *nicht* nachgelassen, die Muskeltension war unverändert
18	14,7 „	16,0 „	+ 8,8	
19	14,8 „	17,7 „	+ 19,5	
20	5,4 „	4,6 „	— 14,8	

wirkung ab, während die Tension ausgeprägt stieg. In 14 Fällen nahm auch parallel mit der Erhöhung der Muskeltension die Phosphorylase-Aktivität im Vergleich zur Kontrollseite zu. Bei einem Versuch (Nr. 6) stieg gegenüber der ungewöhnlich niedrigen Aktivität des ermüdeten Muskels die Phosphorylase-Aktivität nach Adrenalinwirkung auf das Mehrfache. In zwei Fällen (Nr. 15, 16) trat keine Erhöhung der Enzymaktivität ein. Ferner sind auf Tabelle III die vier Versuche

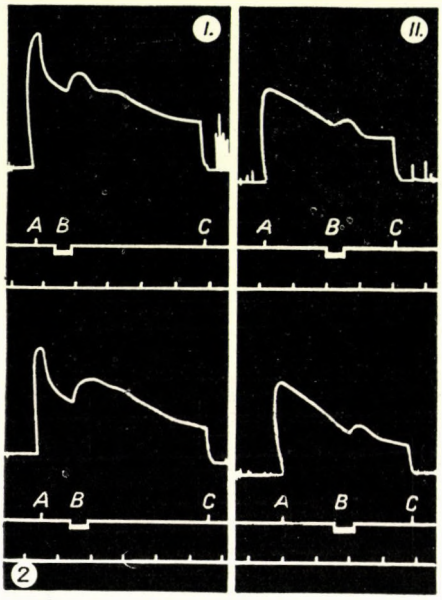


Abb. 2. Untersuchung der die Muskelermüdung vermindernden Adrenalinwirkung am curarisierten SHERRINGTONschen Kaninchen. — Erklärung im Text

angeführt (Nr. 17—20), in denen die Muskeltension von Adrenalin nicht erhöht wurde, d. h. der ORBELI-Effekt nicht ausgelöst werden konnte. Bei diesen vier Versuchen trat auch — wie aus Tabelle III ersichtlich — keine wesentliche Veränderung in der Enzymaktivität ein.

Da diese Ergebnisse die unmittelbare Muskelwirkung des Adrenalins entschieden bestätigen, ergibt sich erneut die Frage, ob der ORBELI-Effekt am direkt gereizten Muskel ausgelöst werden kann. Wenn nämlich die Veränderung der Muskeltension mit der der Phosphorylase-Aktivität tatsächlich in so engem Zusammenhang steht, wäre auf Grund der obigen Resultate zu erwarten, dass die die Muskelermüdung hemmende Wirkung des Adrenalins auch am direkt gereizten Muskel zur Geltung kommt.

Zur Untersuchung dieser Frage registrierten wir zunächst die auf Wirkung des während indirekter Reizung verabreichten Adrenalins eintretende Veränderung der Muskeltension und gaben dann langsam (binnen 1—2 Minuten) etwa

100 μg/kg Curare (D-Tubocurarine chlorid, *L. Light & Co.*) in die Ohrvene des Tieres. Unterdessen kontrollierten wir das Aufhören der indirekten Reizbarkeit, was gewöhnlich in der 1.—3. Minute nach der Curareverabreichung eintrat. Nunmehr führten wir durch direkte Reizung Tetanus herbei und gaben in gleicher Weise und Menge wie vorher in der 2.—3. Minute der Ermüdung Adrenalin. Bei den an 5 Tieren vorgenommenen 8 Proben war die ermüdungsherabsetzende, muskeltensionssteigernde Wirkung des Adrenalins in allen Fällen zu beobachten. Die Ergebnisse eines derartigen Versuches sind auf Abb. 2 wiedergegeben.

Bei diesem Versuch wurden die Muskeln beider hinterer Extremitäten gleichzeitig ermüdet. Der mit I bezeichnete Versuch zeigt die Adrenalinwirkung vor der Curarebehandlung, der mit II bezeichnete die Wirkung danach. An sämtlichen Kurven bezeichnet A den Beginn der Reizung, bei B wurde Adrenalin verabreicht, während C das Aufhören der Reizung anzeigt. Die Zeitschreibung erfolgte je Minute. — Man sieht, dass die während der Reizung verabreichten 20 μg/kg Adrenalin auch nach der Curarisierung ausgeprägte muskeltensionssteigernde Wirkung ausübten.

Besprechung

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die die Muskelermüdung herabsetzende Wirkung des Adrenalins eine auch am direkt gereizten Muskel zu beobachtende unmittelbare Muskelwirkung darstellt, die mit der Aktivierung der während der Reizung inaktivierten Phosphorylase in engem Zusammenhang steht. Es ergibt sich die Frage, wie sich die gesteigerte Funktion des Muskels bzw. die Verminderung seiner Ermüdung mit der Aktivierung der Phosphorylase erklären lässt. Eine Erklärung dieser Frage kann sowohl die gesteigerte Glykogenmobilisierung als auch die Energie bieten, die aus dem während der Phosphorylase-Aktivierung vor sich gehenden ATP-Abbau und PO_4-Einbau stammt [22].

Die unmittelbare Muskelwirkung war nach den einleitungsweise erwähnten Angaben Coris und seiner Mitarbeiter anzunehmen, lässt sich aber dennoch mit zahlreichen Angaben der den Mechanismus des Orbeli-Effektes untersuchenden Autoren nicht ohne weiteres in Einklang bringen.

In erster Linie müssen wir darauf hinweisen, dass mehrere Autoren als Angriffspunkt des Adrenalins ausschliesslich die neuromuskuläre Junktion bezeichnen, und tatsächlich sprechen zahlreiche Beobachtungen für diese Auffassung [1, 2, 4, 6—9]. Im Gegensatz dazu beobachteten andere Autoren [15—20] die ermüdungshemmende Wirkung des Adrenalins bzw. der Sympathikusreizung auch am direkt gereizten Muskel, nach Denervation oder Curarisierung. Auf Grund dieser Feststellungen halten sie die Wirkung sowohl des Adrenalins wie der Sympathikusreizung für einen unmittelbar am Muskel zur Geltung kommenden Effekt, und der Veränderung der neuromuskulären Impulsübertragung messen sie keine Bedeutung bei. Wir glauben, unsere hier mitgeteilten Versuchsergebnisse

liefern nicht nur weitere Angaben zu dieser seit mehreren Jahrzehnten vor sich gehenden Diskussion, sondern auf Grund unserer Resultate scheint auch die Möglichkeit zur Klärung der Widersprüche in den bisherigen Literaturangaben vorhanden zu sein.

Die Ergebnisse beweisen eindeutig, dass es sich bei der ermüdungshemmenden Wirkung des Adrenalins am Kaninchen um eine unmittelbare Muskelwirkung handelt, die auch am curarisierten Muskel ausgelöst werden kann. In bezug auf die Frage, inwieweit unsere an Kaninchen gewonnenen Beobachtungen verallgemeinert werden können, bietet eine Übersicht der Literaturangaben die Möglichkeit zu sehr interessanten Schlussfolgerungen. Gruppieren wir nämlich die erwähnten widersprechenden Angaben nach dem Gesichtspunkt, ob die Versuche an Säugetieren oder am Frosch vorgenommen wurden, so zeigen die Resultate ein viel einheitlicheres Bild. Es stellt sich dann heraus, dass die Autoren, die ihre Versuche an Säugetieren durchführten, durchweg Ergebnisse erzielten, welche die unmittelbare Muskelwirkung beweisen. GRUBER [19] und LUCO [18] beobachteten die ermüdungshemmende Wirkung des Adrenalins auch an denervierten Muskeln der Katze ; zu ähnlichen Resultaten gelangten neuerdings auch BROWN, BÜLBRING und BURNS [17]. Von den Autoren, die den ORBELI-Effekt an Säugetieren untersuchten, vermochte allein GUGLIELMETTI [7] die ermüdungsherabsetzende Wirkung des Adrenalins an denervierten Muskeln des Hundes nicht zu beobachten. Die Arbeit GUGLIELMETTIS lässt sich indessen nur schwer bewerten, weil in seiner Mitteilung wichtige Angaben — so z. B. die Grösse der verwendeten Adrenalingaben — fehlen. Gegen eine Berücksichtigung seiner Resultate spricht ferner, dass er die Hunde 1 Monat nach der Nervendurchtrennung aufgearbeitet hatte, d. h. zu einem Zeitpunkt, wo laut unseren früheren Feststellungen [14] die Phosphorylase-Aktivität des denervierten Muskels bereits irreversibel geschädigt ist, also auch mit Adenylsäure nicht mehr aktiviert werden kann. Unter diesen Bedingungen ist aber auf Grund unserer mitgeteilten Angaben eine Entwicklung der Adrenalinwirkung gar nicht mehr zu erwarten, da ja Adrenalin im normalen Muskel seine Wirkung gerade durch die Aktivierung der Phosphorylase, d. h. durch Umwandlung der inaktiven *b*- in die aktive *a*-Form, ausübt. — GUGLIELMETTI erzielte auch mit Curare negative Ergebnisse. Indessen glauben wir, auch hier, wie bei der Bewertung anderer ähnlicher Versuche, muss in Betracht gezogen werden, dass Curarisierungsversuche in zuverlässiger und reproduzierbarer Form erst seit dem Zeitpunkt durchgeführt werden können (KING 1935), wo Präparate von entsprechender Reinheit zur Verfügung stehen [25]. Bei dem von GUGLIELMETTI im Jahre 1922 verwendeten Curare handelte es sich aller Wahrscheinlichkeit nach noch um ein Rohpräparat, so dass die damit gewonnenen Angaben, die den neueren Beobachtungen allein gegenüberstehen, nicht berücksichtigt werden können.

Man könnte fragen, ob eine derartige Gruppierung der Literaturangaben berechtigt ist. Unserer Ansicht nach beweisen neben unseren Beobachtungen

auch die Literaturangaben selbst die Richtigkeit dieser Gruppierung. Bekanntlich vermochten ORBELI [1] sowie CORKILL und TIEGS [6] am Frosch die ermüdungshemmende Wirkung der Symphatikusreizung bzw. des Adrenalins mit Ergotoxin abzuwehren. Anderseits erweisen die Resultate von BAETJER [21], BÜLBRING und BURN [9] sowie LUCO [18], dass der ORBELI-Effekt bei Säugetieren auch nach Ergotoxinbehandlung wahrgenommen werden kann. Aus diesen Angaben geht hervor, dass der ORBELI-Effekt bei Säugetieren auf einem anderen Mechanismus beruht als beim Frosch, weshalb obige Gruppierung berechtigt und zweckmässig erscheint.

Wir müssen bemerken, dass die Ergebnisse der am Frosch vorgenommenen Versuche durchaus kein sehr einheitliches Bild ergeben. LUSSANA [20], MICHOL [16] und SSINIZIN [15] vermochten den ORBELI-Effekt auch an curarisierten bzw. denervierten Muskeln des Frosches auszulösen. Demgegenüber haben ORBELI [1] sowie CORKILL und TIEGS [6] das Phänomen am Frosch weder nach Curarisierung noch nach Denervation beobachten können, und aus diesem Grunde betrachten sie entschieden die neuromuskuläre Junktion als ausschliesslichen Angriffspunkt. — Unsere an Kaninchen gewonnenen Resultate vermögen natürlich keine unmittelbar verwertbaren Angaben zur Deutung der auf Frösche bezüglichen widersprechenden Literaturangaben zu bieten. Jedenfalls muss auch bei Berücksichtigung der am Frosch gewonnenen Angaben die Frage gestellt werden, ob die Adrenalinwirkung unter Anwendung eines entsprechend reinen Curare-Präparates bzw. in einer genügend frühzeitigen Periode nach der Denervation untersucht wurde. Wir glauben, dass die auf die Froschversuche bezüglichen Widersprüche durch Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte leichter geklärt werden können.

In der Debatte über den Mechanismus der die Muskelermüdung herabsetzenden Wirkung des Adrenalins müssen wir auf Grund vorstehender Ausführungen entschieden dahingegen Stellung nehmen, dass bei Säugetieren die neuromuskuläre Junktion keinesfalls als ausschliesslicher Angriffspunkt angesehen werden kann. Unsere Untersuchungen erstreckten sich nicht auf die Frage, ob Adrenalin überhaupt auf die neuromuskuläre Junktion wirkt bzw. welche Rolle diese Wirkung in der Auslösung des ORBELI-Effektes spielt. Auf Grund der Literaturangaben dürfte es jedoch wahrscheinlich sein, dass Adrenalin bei Säugetieren nicht über einen, sondern über mehrere Angriffspunkte verfügt und weder die auf die neuromuskuläre Junktion noch die auf den Muskel unmittelbar ausgeübte Wirkung allein zur Geltung kommt, sondern in der Auslösung des Effektes beide Mechanismen mitwirken. Die Richtigkeit dieser Auffassung kann auch aus unserer Beobachtung geschlossen werden, dass die Hemmungswirkung des Adrenalins auf die Ermüdung des indirekt gereizten Muskels ohne Curarisierung im allgemeinen ausgeprägter in Erscheinung trat als an den gleichen Tieren während der Curarisierung (Abb. 2).

ZUSAMMENFASSUNG

Bei Versuchen an Kaninchen wurde festgestellt, dass während der Ermüdung des Muskels (M. gastrocnemius) die Phosphorylase inaktiviert wird. Auf Wirkung von nach Eintritt der Muskelermüdung i. v. verabreichten Adrenalin konnte zu gleicher Zeit mit der Erhöhung der Muskeltension auch die Aktivierung der Phosphorylase beobachtet werden. Es wird angenommen, dass die Zunahme der Muskeltension bzw. die Herabsetzung der Ermüdung — die nach Adrenalingabe regelmässig wahrzunehmen sind — mit der Steigerung der Aktivität des Phosphorylasesystems in engem Zusammenhang stehen, d. h. Adrenalin seine Wirkung zum Teil auf diese Weise ausübt. Hierfür spricht auch, dass die die Muskelermüdung hemmende Wirkung des Adrenalins auch am direkt gereizten Gastrocnemius des curarisierten Kaninchens systematisch zu beobachten war.

*

Ein Teil der Versuche wurde im Biochemischen Institut durchgeführt, weshalb wir Prof. TANKÓ, dem Direktor des Institutes und A. ZSINDELY für seine Mitwirkung an einzelnen Messungen auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen wollen.

LITERATUR

1. ORBELI, L. A.: Bull. Inst. Lesgafta, **6** (1923), zit. BRÜCKE, E. T.: Klin. Wschr. **6**, 703 (1927).
2. RIESSER, O.: Muskelpharmakologie und ihre Anwendung in der Therapie der Muskelkrankheiten. Huber, Bern. 1949. S. 135.
3. KUNTZ, A.: The Autonomic Nervous System. 4. ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 1953. p. 346.
4. TIEGS, O. W.: Physiol. Rev., **33**, 119 (1953).
5. WENT, I.: Orvostudomány és Egészségügy. Im Druck.
6. CORKILL, A. B., TIEGS, O. W.: J. Physiol., **78**, 161 (1933).
7. GUGLIELMETTI, J.: Compt. rend. soc. biol., **87**, 692 (1922).
8. GUGLIELMETTI, J.: Quart. J. exp. Physiol., **12**, 139 (1919).
9. BÜLBRING, E., BURN, J. H.: J. Pharmacol. Exp. Therap., **68**, 150 (1940).
10. SUTHERLAND, E. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **54**, 693 (1951).
11. SUTHERLAND, E. W.: Phosphorus Metabolism, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1951. **1**, p. 62.
12. CORI, G. T.: J. Biol. Chem., **158**, 332 (1945).
13. GREEN, A. A., CORI, G. T.: J. Biol. Chem., **151**, 21 (1943).
14. BOT, GY., KÖVÉR, A., VARGA, E.: Acta Physiol. Hung., **8**, 321 (1955).
15. SSINIZIN, N. P.: (Синизин, Н. П.): Физиол. Ж. **22**, 150 (1937).
16. MICHOL, E.: Z. Biol., **90**, 313 (1930).
17. BROWN, G. L., BÜLBRING, E., BURNS, B. D.: J. Physiol., **107**, 115 (1948).
18. LUCO, J. V.: Am. J. Physiol., **125**, 196 (1939).
19. GRUBER, C. M.: Am. J. Physiol., **33**, 335 (1914).
20. LUSSANA: Arch. intern. physiol., **12**, 119 (1912), zit. WASTL, H.: Arch. ges. Physiol., **219**, 337 (1928).
21. BAETJER, A.: Am. J. Physiol., **93**, 41 (1930).
22. KREBS, E. G., FISCHER, E. H.: Biochim. Biophys. Acta, **20**, 150 (1956).
23. SUTHERLAND. E. W., CORI, C. F.: J. Biol. Chem., **188**, 531 (1951).
24. VARGA, E., KOSTYA, K., SZABÓ, É., ASZÓDI, L., KESZTYÜS, L.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., **210**, 214 (1950).
25. HÜGIN, W.: Schweiz. Med. Wschr., **77**, 791 (1947).

BEEINFLUSSUNG DER DEGENERATION PERIPHERER NERVEN DURCH BEHANDLUNG MIT ADENOSINTRIPHOSPHAT

Von

E. VARGA, J. NAGY, M. TÓTH und E. HETÉNYI

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT UND INSTITUT FÜR GERICHTLICHE MEDIZIN DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

Auf die die Muskelatrophie verzögernde Wirkung des Adenosintriphosphats (ATP) hatte FERDMAN [1—3] hingewiesen, und auf Grund seiner Ergebnisse gelangt ATP bei Erkrankungen der menschlichen Skelettmuskulatur heute bereits erfolgreich zur Anwendung [4, 5]. PERSSON vermochte die therapeutische Wirkung von ATP bei Dystrophia musculorum progressiva nachzuweisen. Wir nehmen an, dass die atrophischen Prozesse des Muskels mit der Degeneration der peripheren Nerven in so engem Zusammenhang stehen müssen, dass auf Grund der Resultate FERDMANS und seiner Mitarbeiter auch eine die Nervendegeneration verzögernde Wirkung der ATP-Behandlung vorausgesetzt werden kann. Diese Vermutung fand auch eine gewisse Stütze in dem Umstand, dass wir im Verlauf unserer Versuche, bei denen wir den Mechanismus der die Muskelatrophie verzögernden ATP-Behandlung untersuchten [7, 8], häufig auch eine Verzögerung der Degeneration des peripheren Nervensystems beobachten konnten. Über die einschlägigen Untersuchungen haben wir bereits früher kurz berichtet [9—11]. In der vorliegenden Arbeit wollen wir — auch auf Grund neuerer Versuche — die Ergebnisse ausführlicher mitteilen.

Die statistische Auswertung der experimentellen Resultate wurde im Institut für Angewandte Mathematik der Kossuth Universität Debrecen vorgenommen. Im Hinblick darauf, dass die Anzahl der beobachteten Fälle bei den einzelnen Versuchen zwischen 6 und 10 schwankte, wurde beim Vergleich der auf die behandelten Tiere bezüglichen Ergebnisse mit den Kontrollangaben nicht die parametrische, sondern die WILCOXONsche Methode verwendet [13]. Bei den Signifikanzuntersuchungen diente üblicherweise ein 5%iger Wahrscheinlichkeitswert als Grundlage. — Für die Durchführung der Berechnungen möchten wir Prof. B. GYIRES auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Methoden

Die Versuche wurden an überwiegend aus der gleichen Zucht stammenden, durchschnittlich 100—150 g schweren Ratten vorgenommen. Ein N. ischiadicus der Ratten wurde in Äthernarkose unter sterilen Bedingungen in Höhe der Trochanter auf 2 mm breitem Abschnitt lädiert. Die Läsion nahm die gleiche Person unter identischen Bedingungen mit einer innen gerillten, fixierbaren augenärztlichen Pinzette vor. Nach genügender Übung erwies sich das Verfahren als

anwendbar, da wir, wie die Kontrollversuche ergaben, nach Läsion des N. ischiadicus gut reproduzierbare Resultate erzielten.

Eine Tiergruppe erhielt nach der Operation täglich zweimal intramuskulär 6 mg ATP. Wir benutzten Na-ATP (Pharmazeutische Werke Gedeon Richter, Budapest) in der Weise, dass wir es in hypotonischer NaCl-Lösung stets frisch lösten und mit *N* NaOH neutralisierten. Die zur Injektion kommende Lösung war so annähernd isotonisch, wie dies auch durch einige Kontrollmessungen nachgewiesen werden konnte. Am Tage der Aufarbeitung erhielten die Tiere kein ATP mehr. Die Kontroll-, d. h. nicht behandelten Tiere bekamen das gleiche Futter und wurden unter denselben Bedingungen gehalten.

Die Aufarbeitung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation auf zwei verschiedene Arten. Wir untersuchten die direkte und indirekte Reizbarkeit des M. gastrocnemius, ferner den Zustand des peripheren Nervennetzes im selben Muskel sowie in der ebenso innervierten oberflächlichen Plantarmuskulatur mit supravitaler Methylenblaufärbung nach NAGY [12]. Bei der Untersuchung der Muskel- und Nervenreizbarkeit bestimmten wir anfangs ihre Chronaxie, doch hielten wir es im Hinblick auf die ziemlich grosse Streuung der Ergebnisse für besser, die Reizschwelle mit Kondensatoren von verschiedener Kapazität zu bestimmen, deren Resultate letzten Endes als Ergebnisse paralleler Bestimmungen aufgefasst werden können und daher zuverlässigere Angaben darstellen. Bei der Aufarbeitung war die Stelle der Läsion auch mit blossem Auge gut sichtbar, so dass wir die Möglichkeit hatten, die zur indirekten Reizung verwendete Elektrode stets in der gleichen Entfernung von der lädierten Stelle (4 mm) auf den Nerven zu legen. An dem zur Bestimmung der Reizschwelle benutzten Apparat war die Kapazität der Kondensatoren zwischen 0,001 und 2,0 mF variierbar. Die Untersuchungen wurden an urethannarkotisierten Tieren durchgeführt.

Die beschriebene Methode erwies sich bei den orientierenden Versuchen als brauchbar, da wir bei den nach den einzelnen Operationen aufgearbeiteten Ratten annähernd gleiche Resultate erzielten. Es sei betont, dass die Ergebnisse der Reizschwellenbestimmungen mit den Befunden der histologischen Untersuchungen übereinstimmten.

Ergebnisse

Die Degeneration der peripheren Nerven für experimentelle Zwecke wird am häufigsten mittels Durchtrennung oder Läsion der Nerven hervorgerufen. Die durch die beiden verschiedenen Verfahren herbeigeführten Degenerationen sind wesentlich verschieden, weshalb es zweckmässig schien, dass wir uns mit der Beeinflussbarkeit der nach Durchtrennung und Läsion der Nerven entstehenden Degeneration durch ATP gesondert befassen. Zuerst wollen wir über die Versuche berichten, bei denen die Degeneration des N. ischiadicus durch Läsion hervorgerufen wurde.

Die Resultate der direkten Reizschwellenbestimmungen, die eigentlich nur zur Kontrolle dienten, wollen wir hier nicht eingehend behandeln. Die nach direkter Reizung gewonnenen Angaben glichen den Ergebnissen von FERDMAN und Mitarbeitern [1]. Bekanntlich hatten diese Autoren festgestellt, dass die nach *Durchtrennung* des N. ischiadicus zur Entwicklung kommende *Muskelatrophie* durch ATP-Behandlung verzögert werden kann und dementsprechend die Reizbarkeit des *Muskels* weniger abnimmt als bei den unbehandelten Tieren. In den Tagen unmittelbar nach der Operation fand aber auch FERDMAN, dass die *direkte* Reizbarkeit der atrophisierenden Muskeln der behandelten und unbehandelten Tiere einige Tage lang gleichmässig geringer wird. In den auf die Operation folgenden Tagen erhielten wir hinsichtlich der direkten Reizbarkeit des Muskels ähnliche Ergebnisse. Auch nach Läsion des N. ischiadicus verringerte sich die

direkte Reizbarkeit des M. gastrocnemius bei den behandelten und unbehandelten Tieren in gleicher Weise. Die unter abweichenden Bedingungen gewonnenen ähnlichen Resultate führen wir darauf zurück, dass sich die Muskelatrophie in den ersten postoperativen Tagen, ob sie nun mittels Durchschneidung des Nerven oder durch Läsion hervorgerufen wurde, gleichmässig zu entwickeln beginnt. Weiterhin scheint es, dass ATP in dieser Initialperiode vom Gesichtspunkt einer Verzögerung der Muskelatrophie noch in beiden Fällen unwirksam ist oder zumindest seine günstige Wirkung mit den verwendeten Methoden noch nicht registriert werden kann.

Ausführlicher wollen wir uns mit den Untersuchungsergebnissen der *indirekten* Reizbarkeit befassen, die im Gegensatz zu den vorigen — als Kontrolle zu betrachtenden — Versuchen den wesentlichen Teil unserer Untersuchungen darstellten.

Abb. 1 zeigt die Resultate der an je 6 Rattengruppen durchgeführten Versuche. Auf Grund der bei früheren Untersuchungen [9—11] gewonnenen Erfahrungen verglichen wir die Reizbarkeitsergebnisse des N. ischiadicus der zu gleicher Zeit operierten und daher zum selben Zeitpunkt aufgearbeiteten Ratten.

Die einzelnen Volt-Kapazitätskurven sind sowohl hier wie bei den weiteren Abbildungen in ein Koordinatensystem aufgenommen, dessen Abszisse den mF-Wert der Kapazität der Kondensatoren, die Ordinate den Wert der kleinsten wirksamen Spannung in Volt angibt — beides in logarithmischen Abstufungen. Die an der Abszisse angeführten Zahlen bedeuten nur die Nr. der Kondensatoren und nicht ihren Kapazitätswert.

In den Koordinatensystemen, in welchen die Kondensatoren mit Zahlen bis 13 versehen sind, ist die

Kapazität	des	Kondensators	Nr.	1	0,0001	mF
«	«	«	«	2	0,00015	«
«	«	«	«	3	0,00030	«
«	«	«	«	4	0,0005	«
«	«	«	«	5	0,0012	«
«	«	«	«	6	0,002	«
«	«	«	«	7	0,005	«
«	«	«	«	8	0,01	«
«	«	«	«	9	0,05	«
«	«	«	«	10	0,1	«
«	«	«	«	11	0,5	«
«	«	«	«	12	1,0	«
«	«	«	«	13	2,0	«

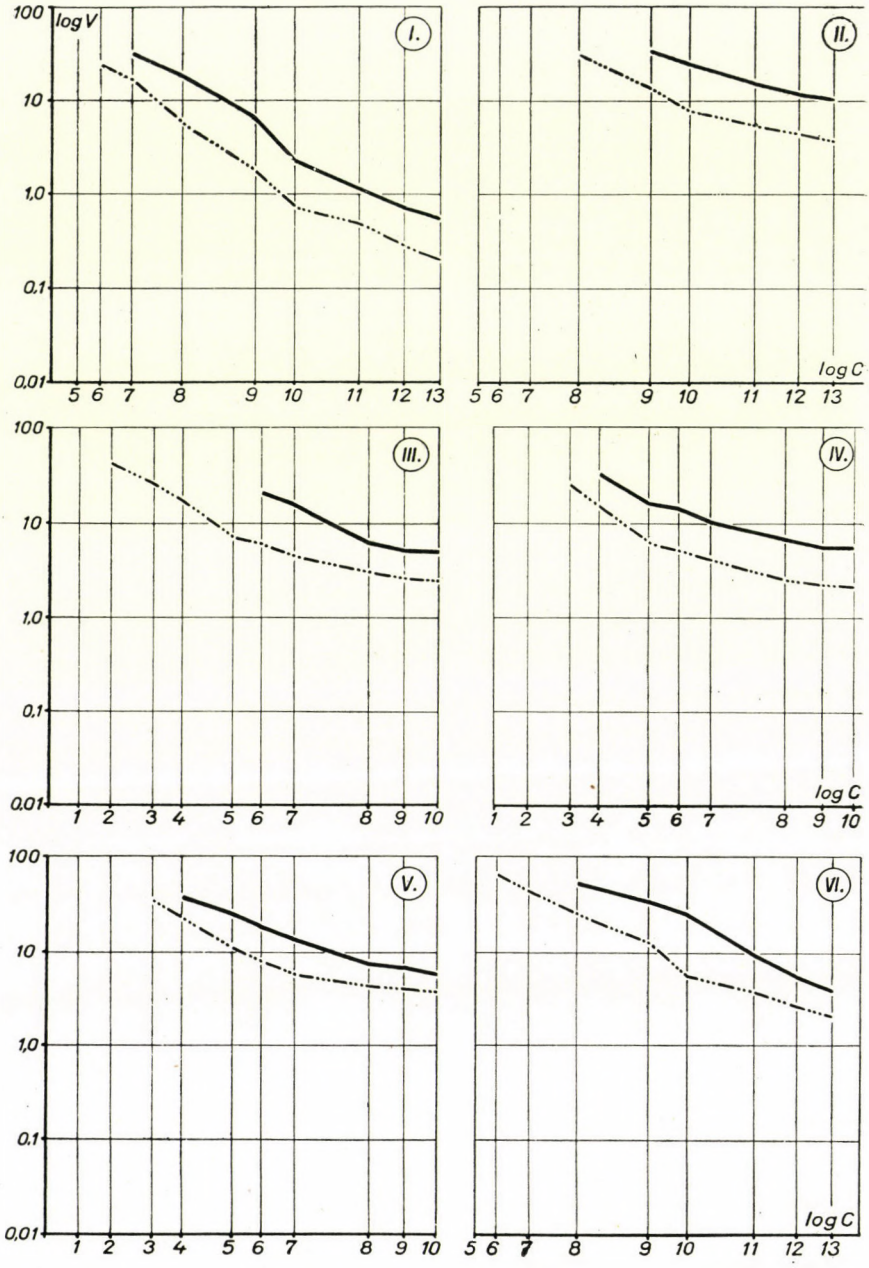


Abb. 1. Wirkung der ATP-Behandlung auf die Reizbarkeit des lädierten N. ischiadicus von Ratten

·· — ·· Reizschwellenwerte der ATP-behandelten Ratten zeigende Volt-Kapazitätskurve

——— Reizbarkeits- (Volt-Kapazitäts-) Kurve der unbehandelten Kontrollratten. Erklärung im Text

In den Koordinatensystemen, in denen die Kondensatoren mit Zahlen bis 10 versehen sind, ist die

Kapazität	des	Kondensators	Nr.	1	0,0012	mF
«	«	«	«	2	0,0025	«
«	«	«	«	3	0,006	«
«	«	«	«	4	0,01	«
«	«	«	«	5	0,03	«
«	«	«	«	6	0,05	«
«	«	«	«	7	0,1	«
«	«	«	«	8	0,5	«
«	«	«	«	9	1,0	«
«	«	«	«	10	2,0	«

Die Kurven in Abb. 1 geben die Durchschnittswerte der am lädierten N. ischiadicus der mit ATP behandelten und der unbehandelten Kontrollratten gewonnenen Reizschwellenangaben wieder. Die einzelnen Gruppen umfassten 6—10 ATP-behandelte und ebensoviele Kontrollratten. Die Aufarbeitung der I. Serie erfolgte am zweiten Tage nach der Operation, die der II.—IV. Serie am dritten Tage, die der V. Serie am vierten Tage und die der VI. Serie am fünfzehnten Tage nach der Läsion. Bei sämtlichen Gruppen der auf Abb. 1 dargestellten 6 Serien ist zu sehen, dass die Reizschwelle des lädierten N. ischiadicus der ATP-behandelten Ratten niedriger ist als die der unbehandelten Tiere. Wie die statistische Auswertung ergab, ist diese Differenz bei sämtlichen 6 Gruppen signifikant. Das gleiche beweist auch die Beobachtung, dass sich der lädierte N. ischiadicus der ATP-behandelten Ratten auch noch mit jenen Kondensatoren von kleinerer Kapazität reizen lässt, welche den Ischiadicus der unbehandelten Kontrolltiere bei der gegebenen Spannung nicht zu reizen vermögen.

Das charakteristischste Bild zeigten die neurohistologischen Veränderungen an den ersten drei Tagen. Die Methylenblau-Supravitalfärbung bot die Möglichkeit, die Veränderungen der Nervenfasern auf ausgedehnten Gebieten zu untersuchen und in gewisser Hinsicht auch quantitativ auszuwerten. Die bei der histologischen Aufarbeitung dieser je 6 Rattenserien beobachteten charakteristischen Veränderungen sind auf Abb. 2 und 3 veranschaulicht.

Auf den Bildern 1—12 der Abb. 2 sind die typischen degenerierten Nervenfasern des peripheren Nervennetzes zu sehen. Die degenerativen Veränderungen der Fasern kommen in der verminderten Farbstoffaufnahme, in ihrer ungleichmässigen Färbung und im Zerfall der Faserstruktur zum Ausdruck. Dies bezieht sich sowohl auf die dickeren wie auf die dünneren Fasern. Am 2.—3. Tage nach der Läsion zeigte die Mehrzahl der Fasern des peripheren Nervennetzes dieses Bild. Die Bilder 13—24 veranschaulichen die von ATP-behandelten Tieren stam-

menden Fasern. Wie ersichtlich, zeigen die von ATP behandelten Tieren stammenden Nervenfasern in den auf die Läsion folgenden Tagen keine so schweren Veränderungen wie die der unbehandelten Tiere. Die Farbstoffaufnahme in den einzelnen Fasern ist beinahe völlig normal, etwas geschwollene Fasern sind in grosser Anzahl zu sehen, und die Verschwommenheit der Struktur ist weniger ausgeprägt als bei den unbehandelten Kontrollen. Nach ATP-Behandlung zeigt die Mehrzahl der peripheren Nervenfasern das Bild der hier dargestellten Fasern. Die Bilder 25—30 der Abb. 2 zeigen — zu Vergleichszwecken — von intakten Tieren stammende Nervenfasern, die gute Farbstoffaufnahme, gleichmässig gefärbte Fasern und Endapparate aufweisen. Die einzelnen Faserarten wurden nach Durchsicht mehrerer hundert Fasern und Auswertung des ganzen Nervennetzes photographiert.

Auf Abb. 3 sind einige charakteristische Faserarten in stärkerer Vergrösserung wiedergegeben. Die Bilder 1—8 zeigen von unbehandelten, die Bilder 9—16 von ATP-behandelten, die Nr. 17—21 von gesunden Tieren stammende Fasern. Wie auf den Bildern deutlich zu sehen, sind die degenerativen Veränderungen bei den behandelten Tieren weniger ausgeprägt als bei den unbehandelten Kontrollen.

Auch die mit Methylenblaufärbung vorgenommenen neurohistologischen Untersuchungen ergaben demnach bei allen 6 Rattengruppen eindeutig, dass das periphere Nervennetz der ATP-behandelten Tiere in den auf die Läsion folgenden Tagen dem Normalzustand in vieler Hinsicht gleicht, im Gegensatz zu dem der unbehandelten Kontrolltiere, wo die bezeichnenden histologischen Veränderungen der Degeneration ausgeprägter in Erscheinung traten.

Abb. 4 zeigt die Ergebnisse von weiteren vier Versuchsserien, die ebenso durchgeführt wurden wie die vorigen. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte am 3.—4. Tage nach der Operation. Wie aus den Diagrammen ersichtlich, war bei diesen vier Serien auf Wirkung der ATP-Behandlung keine der vorangegangenen ähnliche Wirkung zu beobachten. Da die Differenzen nach den Resultaten der mathematischen Auswertung die signifikanten Werte in keiner Gruppe erreichten, lassen sich die Angaben dieser vier Serien so bewerten, dass die ATP-behandelten und Kontrollgruppen innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmende Reizbarkeit aufwiesen, d. h. ATP in diesen Fällen wirkungslos war.

Vom Gesichtspunkt der Auswertung erscheint es notwendig, wiederholt zu betonen, dass die Resultate der Reizschwellenbestimmungen mit denen der histologischen Untersuchungen immer übereinstimmten, d. h. in den Fällen, in denen die ATP-Behandlung nach den Reizschwellenbestimmungen wirkungslos blieb, auch das histologische Bild im Vergleich mit dem der unbehandelten Kontrollen keine Abweichung zeigte.

Diese Angaben lassen sich naturgemäss nur nach weiteren Kontrolluntersuchungen entsprechend bewerten. Man könnte z. B. die Frage stellen, ob die ATP-Behandlung nicht auch in der Reizbarkeit intakter Nerven Veränderungen

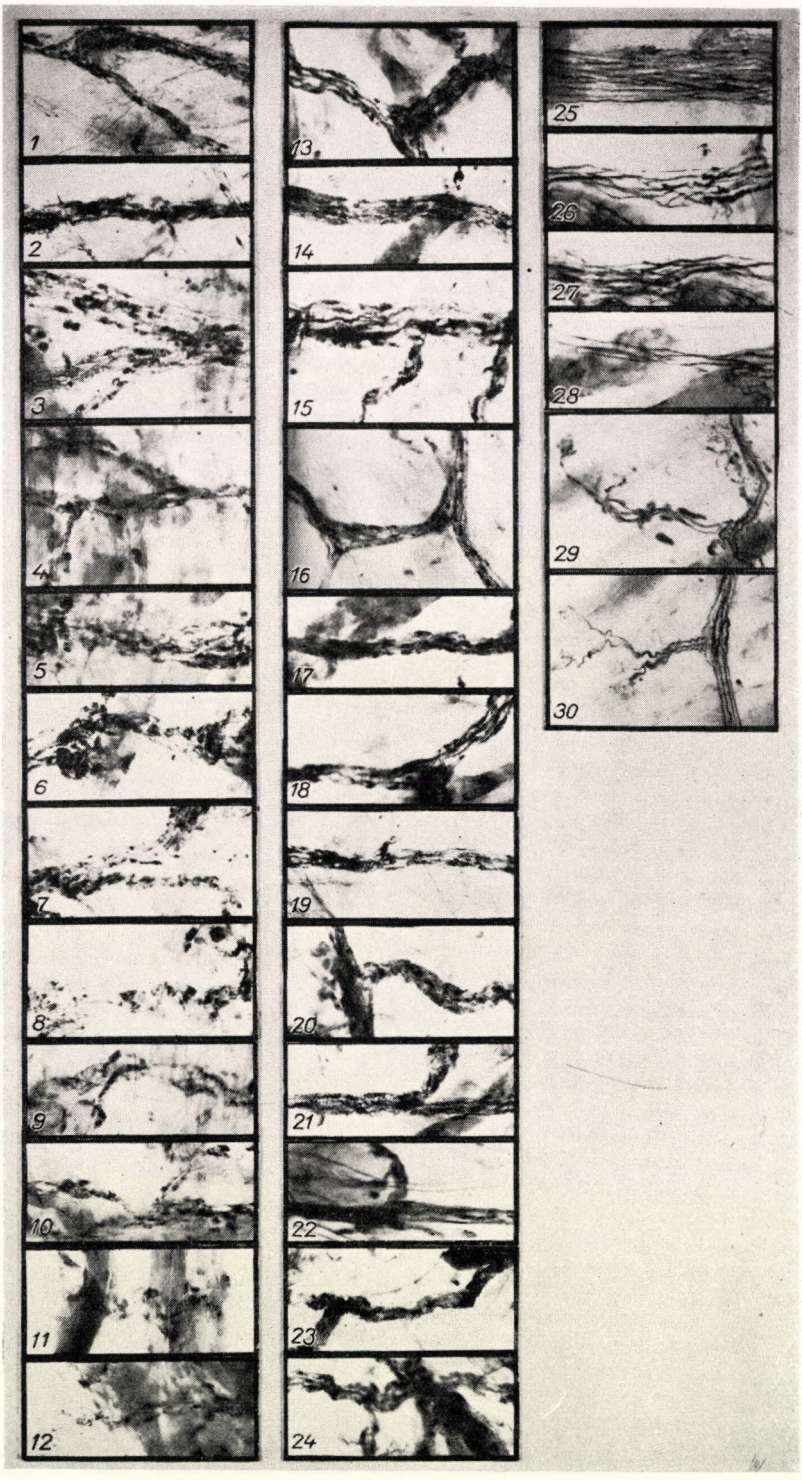


Abb. 2. Die peripheren Fasern des N. ischiadicus. Methylenblau-Supravitalfärbung (Obj. 20×, Ok. 8×, Zeiss-Mikroaufsatz; nachträgliche Vergrösserung auf 9×12 cm).
1—12: Bild des peripheren Nervennetzes 48 Stunden nach Läsion des N. ischiadicus
13—24: Bild des peripheren Nervennetzes 48 Stunden nach Läsion des N. ischiadicus bei den ATP-behandelten Tieren
25—30: Bild des intakten peripheren Nervennetzes

verursacht, welche die Bewertbarkeit der mitgeteilten Ergebnisse herabsetzen könnten.

Abb. 5 gibt eine derartige Versuchsserie wieder und zeigt die Resultate der an je 8 Ratten durchgeführten Bestimmungen. Wie ersichtlich, stimmt die

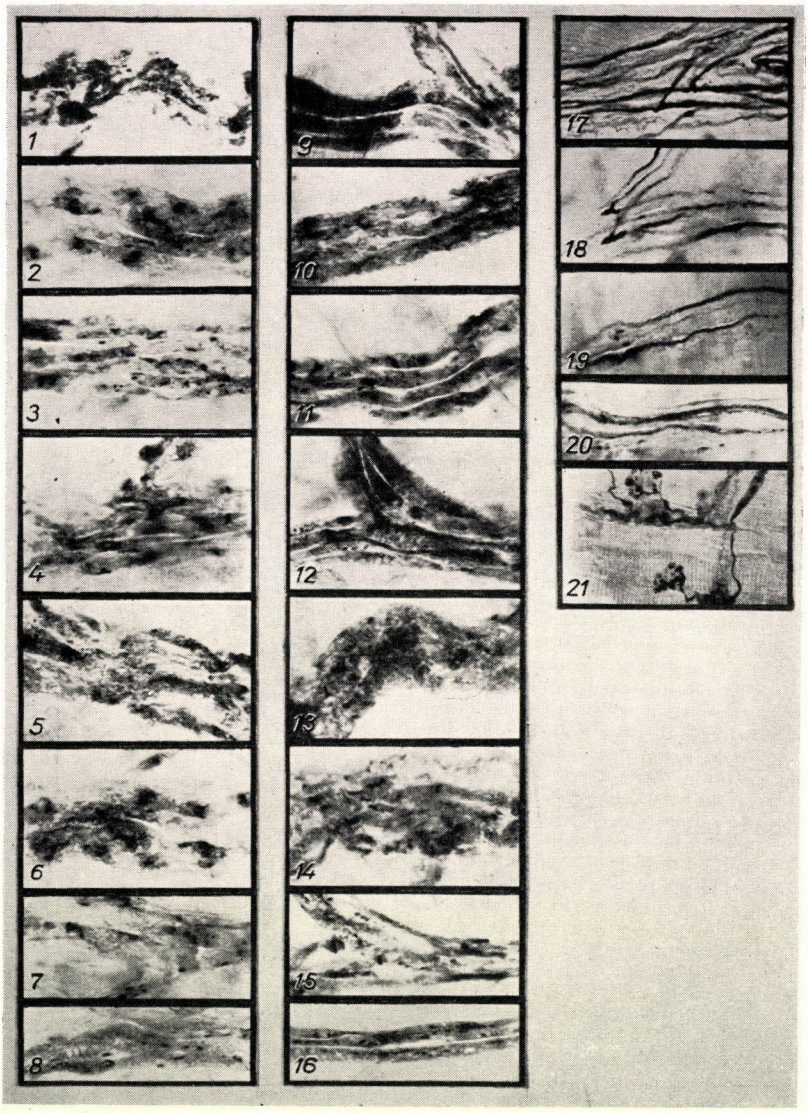


Abb. 3. Die peripheren Fasern des N. ischiadicus. Methylenblau-Supravitalfärbung (Obj. 90 H. I., Ok. 8×, Zeiss-Mikroaufsatz; nachträgliche Vergrösserung auf 9×12 cm)
1—8: Periphere Fasern 48 Stunden nach der Läsion
9—16: Periphere Fasern der ATP-behandelten Tiere 48 Stunden nach der Läsion
17—21: Intakte Fasern

Nervenreizbarkeit der behandelten Ratten innerhalb der Fehlergrenzen gut mit der der unbehandelten Kontrolltiere überein, d. h. die Reizbarkeit der normalen, intakten Nerven wird durch die ATP-Behandlung nicht verändert. Bei diesen Versuchen waren die Ratten vor der Aufarbeitung 14 Tage hindurch mit ATP behandelt worden.

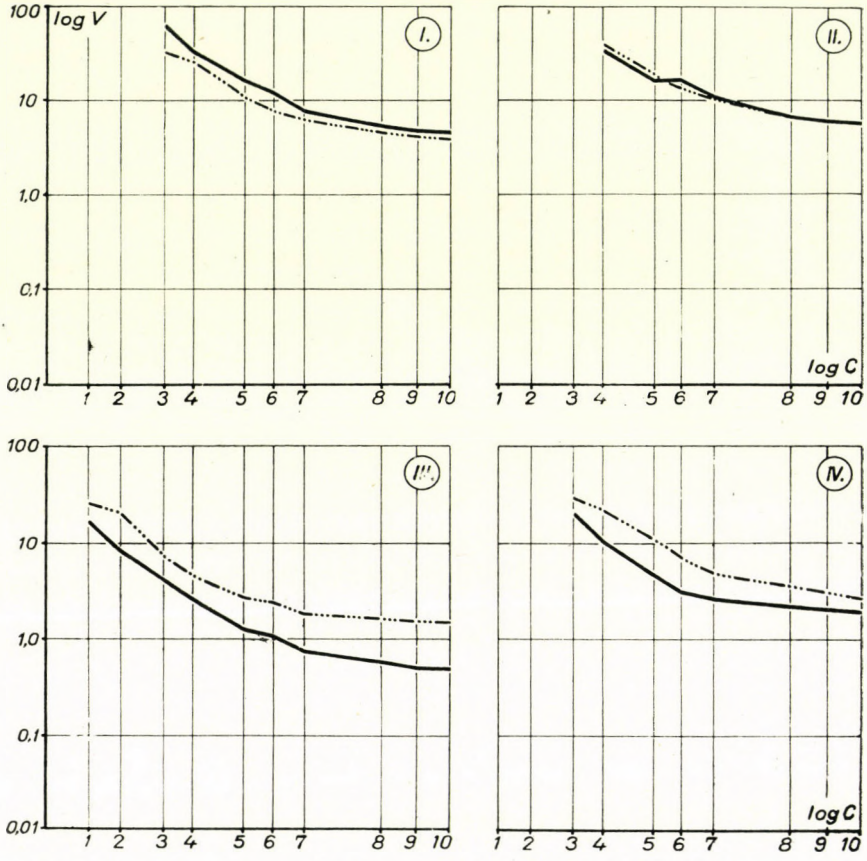


Abb. 4. Wirkung von ATP auf die Reizbarkeit des lädierten N. ischiadicus von Ratten
...—... Reizschwellenwerte der ATP-behandelten Ratten zeigende Volt-Kapazitäts-kurve
——— Reizbarkeits- (Volt-Kapazitäts-) Kurve der unbehandelten Kontrollratten. Erklärung im Text

Ferner kann sich die Frage ergeben, inwieweit die Reizbarkeitsresultate eindeutig sind, wenn eine Tiergruppe nach Läsion des Nerven — zur Kontrolle — statt ATP physiologische NaCl-Lösung erhält, d. h. welche Streuung in diesem Falle zustande kommt.

Abb. 6 veranschaulicht vier derartige Versuchsserien. Diese Ratten waren am 4. Tage nach der Operation aufgearbeitet worden, und zwar in der Weise,

dass je einer Gruppe von Ratten mit gleichartig lädiertem Nerv nach der Operation täglich zweimal je 0,5 ml physiologische NaCl-Lösung i. m. injiziert wurden. Auch in diesem Fall umfasste jede Gruppe 6—10 Ratten.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, war die Nervenreizbarkeit der zur Kontrolle mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Ratten mit der der unbehandelten Kontrolltiere entweder völlig identisch oder wies Abweichungen nur innerhalb der Fehlergrenzen auf. Nach der mathematischen Auswertung kommt der Signifikanz die Abweichung in keinem Falle nahe.

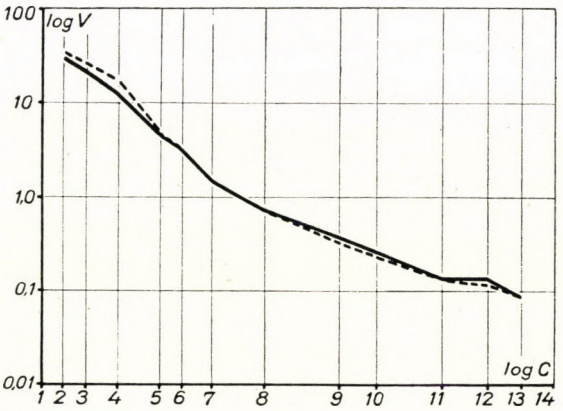


Abb. 5. Wirkung der ATP-Behandlung auf die Reizbarkeit des intakten N. ischiadicus von Ratten
— — Reizschwellenwerte der ATP-behandelten Ratten wiedergebende Volt-Kapazitätskurve
——— Reizbarkeitskurve der unbehandelten Kontrollratten. Erklärung im Text

Sowohl in theoretischer wie in praktischer Hinsicht erscheint weiterhin die Frage von Bedeutung, ob die die Nervendegeneration verzögernde ATP-Wirkung erst bei der nach *Läsion* des Nerven eintretenden Degeneration beobachtet werden kann oder auch nach *Durchschneidung* des Nerven. Deshalb schnitten wir bei weiteren je 2 Rattengruppen statt der Läsion aus dem N. ischiadicus der einen Seite ein 3—4 mm grosses Stückchen heraus und behandelten je eine Gruppe der Tiere mit physiologischer NaCl-Lösung. Abb. 7 zeigt zwei derartige Versuchsserien, in denen je eine Rattengruppe nach Durchtrennung des N. ischiadicus 4 Tage lang physiologische NaCl-Lösung erhielt (I—II). Auch in diesen Fällen fanden wir innerhalb der Fehlergrenzen bei den mit physiologischer NaCl-Lösung und den nicht behandelten Kontrolltieren übereinstimmende Reizbarkeit.

Endlich bringen wir in dem mit III—IV bezeichneten Koordinatensystem der Abb. 7 die Ergebnisse der an zwei Rattengruppen durchgeführten Versuche, die nach der Ischiadicusdurchtrennung 4 (III) bzw. 14 Tage (IV) hindurch ATP-Behandlung erhalten hatten. Wie aus Abb. 7 hervorgeht, weicht die Reizbarkeit

der ATP-behandelten Ratten von der der unbehandelten Kontrollen nicht ab, die Differenz ist nicht signifikant, d. h. nach *Durchschneidung* des Ischiadicus vermochten wir keine ähnliche günstige Wirkung wie bei der Degeneration nach der Läsion zu beobachten.

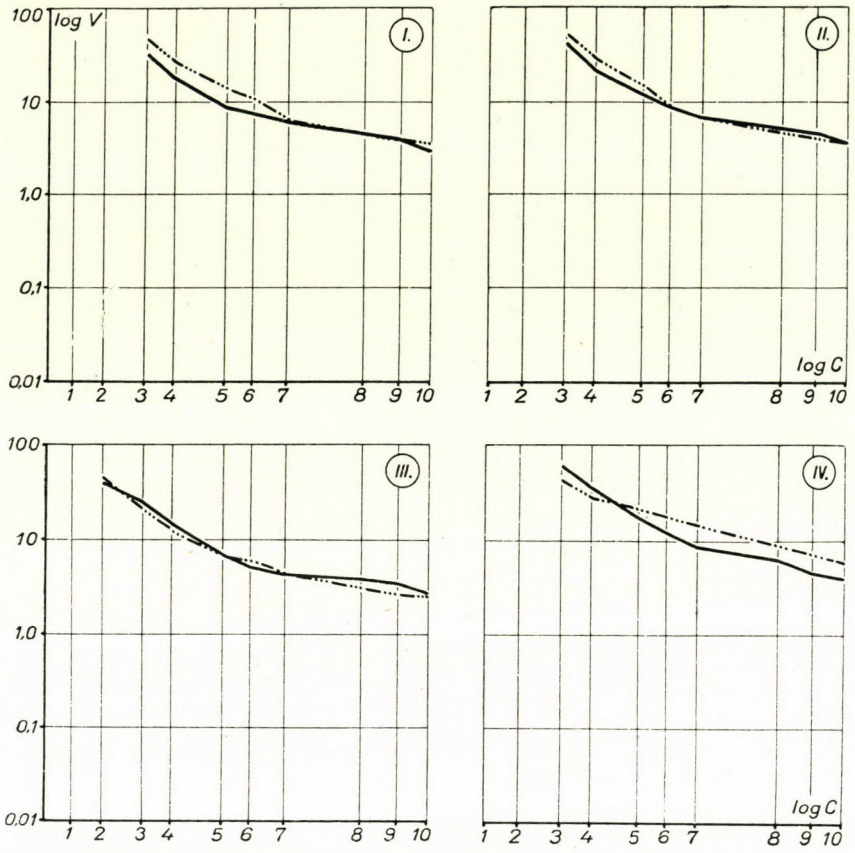


Abb. 6. Reizbarkeitskurve des lädierten N. ischiadicus der mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Ratten
•••—••• Reizbarkeitskurve der mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Ratten
——— Reizschwellenwerte der unbehandelten Kontrollratten

Besprechung

Die Angaben der Abb. 5 und 6 beweisen, dass die Reizbarkeit des normalen, intakten Ischiadicus durch ATP-Behandlung nicht verändert wird, ferner dass die Reizbarkeit des lädierten Ischiadicus der statt mit ATP zur Kontrolle mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Ratten innerhalb der Fehlergrenzen mit der der unbehandelten Kontrolltiere übereinstimmt, so dass das angewandte Verfahren zur Untersuchung der aufgeworfenen Frage als geeignet bezeichnet werden kann.

Bei 6 der 10 ATP-behandelten Rattengruppen war die Reizschwelle der behandelten Tiere signifikant niedriger als die der unbehandelten Kontrollen. Auch die histologischen Untersuchungen ergaben bei diesen Ratten ein ähnliches Bild : die Degeneration des peripheren Nervennetzes war weniger ausgeprägt.

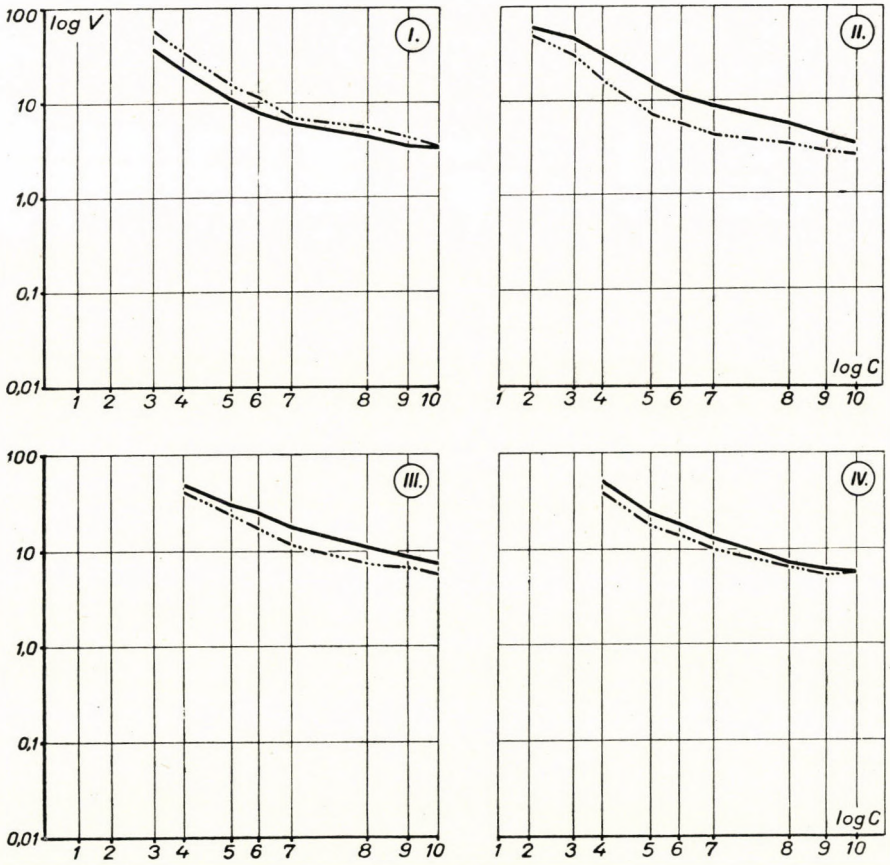


Abb. 7. I—II. Reizbarkeitskurven des durchtrennten N. ischiadicus der mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Ratten
·· — ·· Reizschwellenwerte der mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Ratten
——— Reizbarkeitskurve der unbehandelten Kontrollratten

III—IV. Wirkung der ATP-Behandlung auf die Reizbarkeit des durchtrennten N. ischiadicus von Ratten
·· — ·· Reizschwellenwerte der ATP-behandelten Ratten
——— Reizschwellenwerte der unbehandelten Kontrollratten. Erklärung im Text

Bei weiteren 4 Rattengruppen war die ATP-Behandlung sowohl nach den Reizschwellenbestimmungen wie auf Grund der histologischen Untersuchungen wirkungslos ; eine Verzögerung der Nervendegeneration war nicht zu beobachten.

Unserer Ansicht nach kann aus diesen Resultaten der eindeutige Schluss gezogen werden, dass ATP zur Behandlung der Degenerationsprozesse des peripheren Nervensystems mit gutem Erfolg angewendet werden kann. Die in 60% der Fälle wahrgenommene günstige therapeutische Wirkung dürfte schon an und für sich bedeutsam sein, wird dies aber insbesondere dann, wenn wir annehmen, dass das günstige Ergebnis durch Kombination mit anderen Methoden noch weiter verbessert werden kann. Für die Richtigkeit dieser Voraussetzung spricht die Beobachtung von LEHOCZKY [14], wonach durch Verabreichung von Vitamin B_1 und ATP bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen des Rückenmarks (Myelopathie, multiple Sklerose) günstige therapeutische Ergebnisse erzielt werden konnten. LEHOCZKYs gute Resultate konnte man bisher auf die Vitamin B_1-Wirkung zurückführen ; auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse muss jedoch auch dem ATP eine beträchtliche Rolle zugeschrieben werden.

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, gelangt ATP seit den Untersuchungen von FERDMAN und Mitarbeitern bei Erkrankungen der menschlichen Skelettmuskulatur bereits ausgedehnt zur Anwendung; das therapeutische Anwendungsgebiet des ATP hat sich auf diese Weise wesentlich erweitert. Da die therapeutische Anwendung von ATP auf Grund unserer mitgeteilten Untersuchungsbefunde noch weiter ausgedehnt werden kann, dürfte es vielleicht nicht uninteressant sein, wenn wir hier einige einschlägige toxikologische Angaben anführten.

Nach den Untersuchungen des Pharmakologischen Instituts in Neapel [15] kann das Zehnfache der unserseits benutzten Dosis Kaninchen i. v. verabreicht werden, ohne dass bei den Tieren irgendwelche toxischen Symptome auftreten. Bei chronischen Versuchen riefen täglich 10 mg/kg ATP bei i. v. Verabfolgung auch nach 30 Tagen keine toxischen Symptome hervor. Aus diesem Ergebnis, ferner anderen Literaturangaben [4, 16] und schliesslich aus unseren eigenen Erfahrungen kann geschlossen werden, dass die Anwendung von ATP auch in grösseren als den bisher üblichen Gaben völlig ungefährlich ist.

Über den Wirkungsmechanismus gaben unsere bisherigen Versuche keine Aufklärung. Es besteht die Möglichkeit, dass unsere einleitungsweise erwähnte Voraussetzung zutrifft und zwischen der von FERDMAN und Mitarbeitern beobachteten, die Muskelatrophie verzögernden, und der von uns wahrgenommenen, die Nervendegeneration vorzögernden ATP-Wirkung tatsächlich ein enger Zusammenhang vorliegt. Vorläufig sind uns jedoch die Mechanismen beider Wirkungen nicht bekannt. BECKER [17] nimmt zwar an, dass die therapeutische ATP-Wirkung bei Dystrophia musculorum progressiva auf der Steigerung der Blutdurchströmung beruht, aber auch diese Voraussetzung ist noch nicht bewiesen. Auf Grund der Literaturangaben sind zahlreiche Möglichkeiten denkbar. Die Wirkung von ATP ist vielleicht nicht spezifisch, sondern es lässt sich möglicherweise auch durch Substanzen mit anderen makroergen Bindungen substituieren ; man kann seine Teilnahme an der Eiweisssynthese annehmen, doch

ist auch möglich, dass die ATP-Wirkung nicht unmittelbar zur Geltung kommt, sondern dass es Azetylcholin freisetzt — was nach den Versuchen von BEZNÁK [18] als bewiesen erachtet werden kann — und für die beobachtete günstige Wirkung eigentlich das Azetylcholin verantwortlich ist. Auf die »trophische« Azetylcholinwirkung haben bereits mehrere Autoren hingewiesen [19—23], aber auch die mit den verschiedenen Anticholinesterasen (Prostigmin, Physostigmin) erzielten guten Resultate lassen sich in ähnlicher Weise bewerten. All dies aber sind nur Hypothesen ; die vorstehenden Fragen werden sich erst nach weiteren Untersuchungen beantworten lassen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die nach Läsion der peripheren Nerven eintretende Degeneration lässt sich, wie sowohl Untersuchungen der Nervenreizbarkeit als auch histologische Befunde ergaben, durch ATP-Behandlung wesentlich verzögern. Bei den an je 10 Rattengruppen durchgeführten Versuchen war in 60% der Fälle die Reizbarkeit des N. ischiadicus der ATP-behandelten Ratten signifikant besser als die der unbehandelten Kontrolltiere. In 40% der Fälle war die ATP-Behandlung unwirksam. Nach Durchtrennung des N. ischiadicus war eine ähnliche degenerationsverzögernde ATP-Wirkung nicht zu beobachten.

LITERATUR

1. FERDMAN, D. L., MESTETSCHKINA, A. JA., SEMJENOW, R. W. (Фердман, Д. Л., Местечкына, А. Я., Семенов, Р. В.) : Докл. Акад. Наук СССР. **75,** 757 (1950.)
2. FERDMAN, D. L., GRIGORJEWA, B. L. (Фердман, Д. Л., Григоревя, Б. Л.) : Укр. Биохим. Ж. **22,** 41 (1950).
3. FERDMAN, D. L. (Фердман, Д. Л.,): Биохимия Заболеваний Мышц. Изд. Акад. Наук. Укр. СССР. Киев, 1953.
4. SLONIMSKAJA, W. M. (Слонимская, В. М.) : Вопросы Биохимии Мышц. Изд. Акад. Наук УССР. Киев, 1954. p. 135.
5. BELITZER, W. A. (Белицер, В. А.) : Биохимия **16,** 186 (1951) ; Szovjet Orvostud. Ref. Szemle : Biokémia, **1,** 17 (1952). Budapest.
6. PERSSON, IB : Nordisk Med. **48,** 965 (1952).
7. VARGA, E., ASZÓDI, L., KOSTYA, K.: Kísérletes Orvostud. **6,** 303 (1954). — Acta Physiol. Hung., **4,** Suppl. 25 (1953).
8. BOT, GY., KÖVÉR, A., VARGA, E.: Kísérletes Orvostud. **6,** 248 (1954). — Acta Physiol. Hung. **8,** 321 (1955).
9. VARGA, E., NAGY, J., TÓTH, M.: Acta Physiol. Hung. **5,** Suppl. 24 (1954).
10. VARGA, E.: Orv. Hetil., **96,** 1324 (1955).
11. VARGA, E., NAGY, J.: Debreceni Orvostud. Egyetem Tud. Üléseinek Évkönyve, 1954—55, p. 54.
12. NAGY, J. : Debreceni Orvostud. Egyetem Tud. Üléseinek Évkönyve, 1953, p. 41.
13. WILCOXON, F.: Biometrics Bull. **1,** 6, 80 (1945).
14. LEHOCZKY, T.: Acta Med. Scand., **114,** 521 (1943).
15. GENAZZANI, E., DE NITO, E.: Boll. Soc. Biol. Ital., **28,** 441 (1952).
16. KOVÁCH, A. G. B., BAGDY, D., BALÁZS, R., ANTONI, F., GERGELY, J., MENYHÁRT, J., IRÁNYI, M., KOVÁCS, E.: Acta Physiol. Hung., **3,** 331 (1952).
17. BECKER, H.: Deutsche Z. Nervenheilk. **173,** 455 (1955).
18. BEZNÁK, A. B. L.: J. Physiol., **115,** 237 (1951).
19. NEUBURGER, F., SCHOLL, R.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **186,** 492 (1937).
20. NEUBURGER, F., SCHOLL, R.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., **188,** 64 (1938).
21. GUGGENHEIM, M.: Die biogenen Amine. Karger, Basel. 4. Aufl. 1951. S. 168.
22. WORONIN, W. W., GEDEWANISCHWILI, I. D.: (Воронин, В. В., Гедеванишвили, И. Д.) : Трофическая Язва. Изд. Груз. Акад. Наук, Тбилиси, 1955. p. 308.
23. BRECHT, K.: Z. ges. exp. Med., **113,** 579 (1944).

ÜBER DIE BEDEUTUNG DER CHOLINESTERASE IM GANGLIONÄREN ERREGUNGSPROZESS

Von

O. FEHÉR

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

Unter den Forschungsergebnissen der letzten anderthalb Jahrzehnte auf dem Gebiet der Nervenimpulse und Impulsübertragung nehmen die Angaben über die Cholinesterase einen immer wichtigeren Platz ein. Dies ist nicht nur dem Umstand zu verdanken, dass es sich bei der Cholinesterase um eines der am eingehendsten bekannten Enzyme handelt, sondern auch der Tatsache, dass ihre weite Verbreitung in der Tierwelt, ihre spezielle Konzentration und Lokalisation in den reizleitenden Geweben eine Funktion von entscheidender Bedeutung vermuten lassen. Hierauf deuten die Versuchsergebnisse von BULLOCK, NACHMANSOHN und ROTHENBERG [1], wonach die Reizleitungsfähigkeit des Tintenfisch-Axons aufhört, wenn die Azetylcholinesterase-Aktivität dieses Axons auf weniger als 20% der ursprünglichen Aktivität herabgesetzt wird. Andere *in vivo*-Versuche ergaben das gleiche Resultat [2, 3]. Auch die übrigen Eigenschaften der Azetylcholinesterase, ihre strenge Spezifität gegenüber Azetylcholin, ihre unvermeidliche Anwesenheit in den reizleitenden Geweben, die ausserordentliche Geschwindigkeit der Hydrolyse, ihre Lokalisation innerhalb der Nervenzellen, verweisen ausnahmslos auf ihre wichtige Rolle im Mechanismus der Impulsübertragung [4].

Durch die Entdeckung der Azetylcholin gegenüber streng spezifischen Azetylcholinesterase und ihre Trennung von der nicht spezifischen, sog. Pseudo-Cholinesterase wurde die Bedeutung dieses Enzyms in den Erregungs- und Reizübertragungsprozessen noch stärker hervorgehoben. KOELLE und Mitarbeiter [5, 6] hatten nachgewiesen, dass hinsichtlich der Lokalisation der beiden Enzyme im Nervensystem beträchtliche Unterschiede bestehen. In autonomen Ganglien kommen beide Enzyme vor: spezifische Cholinesterase in den präganglionären Nervenendigungen und Ganglienzellen, Pseudocholinesterase in den interstitiellen Gewebselementen. RAVIN und Mitarbeiter fanden Cholinesterase-Aktivität u. a. im Zytoplasma und in der Zellmembran [7].

Mit den vorliegenden Experimenten versuchten wir die Zusammenhänge zwischen der Cholinesterase-Aktivität und den Funktionen der Nervenzelle zu klären und damit weitere Angaben über die Bedeutung des Enzyms zu ermitteln.

Methoden

Katzen, von 2—4 kg Gewicht beiderlei Geschlechts wurden mit 0,09 g/kg Chloralose i. p. narkotisiert und nach der Methode von KIBJAKOW [8] unter Anwendung der von PERRY und PATON [9] empfohlenen Modifikationen sowie unter Berücksichtigung der neueren anatomischen Feststellungen von CHUNGCHAROEN [10] das Ganglion cervicale superius perfundiert. Die anatomischen Verhältnisse der Perfusion sind auf Abb. 1 dargestellt.

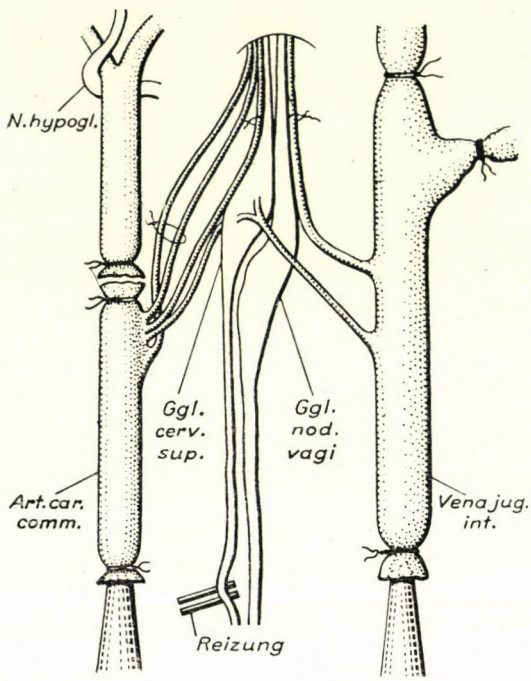


Abb. 1 Die anatomischen Verhältnisse des oberen Halsganglions der Katze (nach KIBJAKOW)

Die Perfusionsflüssigkeit war 0,2% Glukose und Azetylcholinchlorid enthaltende Locke-Lösung. Die Konzentration von Azetylcholin variierte zwischen 3—10 μg/ml, auf Azetylcholinchlorid *(Hoffmann—La Roche)* berechnet. Die Azetylcholinkonzentration wurde so gewählt, dass sie gut messbar und um mindestens drei Grössenordnungen grösser sei als die bei Reizung des Ganglions freiwerdende Azetylcholinmenge. Der konstante Druck, die Temperatur und Filtration der Perfusionsflüssigkeit wurden durch den auf Abb. 2 sichtbaren, im mechanischen und elektrotechnischen Laboratorium des Institutes hergestellten Apparat gewährleistet.

Die Flüssigkeit wird vom Infusionsapparat aus einer 20 ml-Rekordspritze durch einen Gummischlauch in ein mit Glaswolle angefülltes Gefäss gedrückt, aus dem sie filtriert in einen mit O_2 gefüllten Raum gelangt. Durch diesen geht die Flüssigkeit tropfenweise hindurch, wobei sie mit Sauerstoff gesättigt wird. Von hier gelangt die Locke-Lösung in eine mit Heizmantel umgebene Glasröhre, die sich in der Carotis-Perfusionskanüle fortsetzt. Die Temperatur der Flüssigkeit wird durch einen mit Elektronenschalter gesteuerten Heiztransformator zwischen 37°—40° C gehalten. Zur Kontrolle der Temperatur dient das in die Locke-Lösung hineinreichende Thermometer. Das Regulationssystem arbeitet mit Schwankungen von $\pm$0,5° C. Zur Kontrolle des Druckes dient ein Quecksilbermanometer; mit dessen Hilfe kann der Perfusionsdruck mit geringen Schwankungen zwischen 100—140 mm Hg aufrechterhalten werden. Die Einführung der Flüssigkeit erfolgt in die Art. carotis interna, ihre Rückgewinnung aus der V. jugularis interna. Der funktionelle Zustand des Ganglions wurde auf Grund der nach präganglionärer Reizung eintretenden Nickhautkontraktionen beurteilt. Auf diese Weise vermochten wir uns wiederholt davon zu überzeugen, dass das Ggl. cerv. superius mit unserem Verfahren 2—3 Stunden lang in gutem Zustand erhalten werden kann.

Die Reizung wurde mit einem Rechteckimpuls-Generator vorgenommen. Die Parameter der Reizung: Frequenz 25/sec, Impulsbreite 10 msec, Spannung 6 V.

Nach Erwärmung des Systems wird die Kanüle eingebunden und 15 Minuten hindurch eine Vorperfusion durchgeführt. Die Probeentnahme beginnt erst danach. Das aus der V. jug. interna durch die Kanüle zurückfliessende Perfusat wird mit einer Spritze in Fraktionen von 0,2—0,5 ml herausgesaugt und in Präzipitationsröhren gespritzt. Auf den Boden der Röhren legten wir vorher ein kleines Trichloressigsäure-Kristall zur Stabilisierung des Azetylcholins und zur Vermeidung der Enzymwirkungen, die sich aus der eventuellen Beimengung geringer Gewebs-

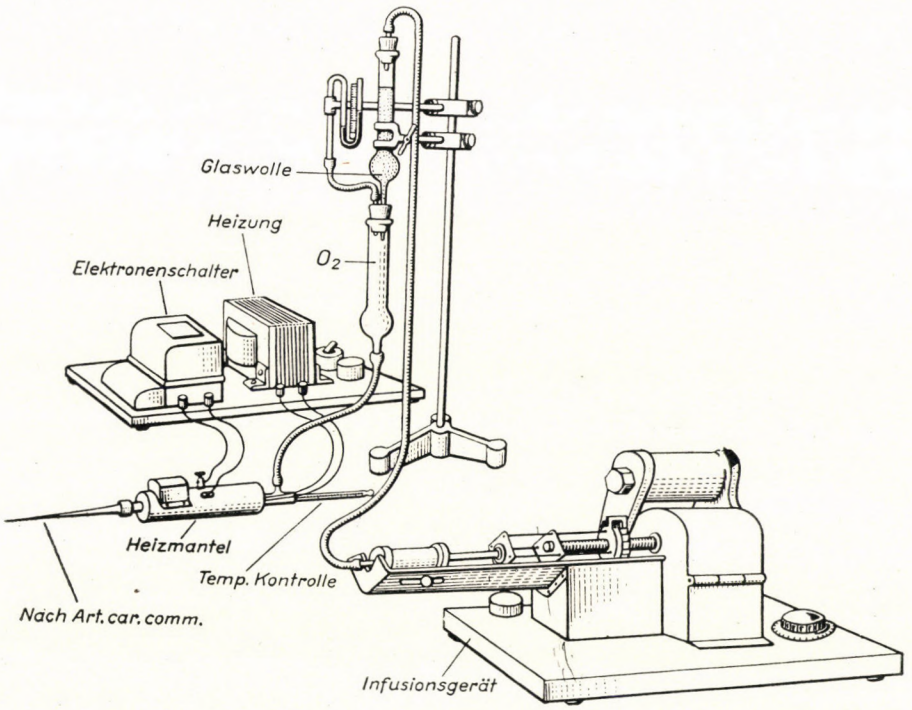


Abb. 2. Apparatur zur Perfusion des oberen Halsganglions der Katze

saftmengen ergeben können. Die Azetylcholinkonzentration der Perfusate wurde an überlebendem Rattendarm titriert.

Nach der 15 Minuten dauernden Vorperfusion beginnen wir die Entnahme der Perfusate. Erst sammeln wir 3 Perfusate im Ruhezustand, sodann 3 während der Reizung. 5 Minuten nach Beendigung der Reizung entnehmen wir wiederum Perfusate im Ruhezustand. Die Perfusionsmenge betrug 0,1—0,5 ml/Min.

Im Zusammenhang mit der Methode sei bemerkt, dass wir gleichzeitig mit dem Ggl. cerv. superius im Hinblick auf seine enge anatomische Nachbarschaft auch das Ganglion nodosum n. vagi perfundieren. Da wir jedoch im Laufe der Versuche vom Vagus jeden Reiz fernhielten und da ferner die Reizung des Vagus im Perfusat keinerlei Konzentrationsveränderung hervorrief, ist der erwähnte Umstand ohne besondere Bedeutung.

Ergebnisse

Die Versuche mit DFP ausgenommen, war in allen Fällen zu beobachten, dass das zurückgewonnene Perfusat eine niedrigere Azetylcholinkonzentration aufwies als das eingeführte. Dies führen wir in Übereinstimmung mit Bikow und

PRAWDITSCH-NEMINSKAJA [11] auf die im Ganglion wirkende Cholinesterase zurück. Bei den verschiedenen Versuchen machte der Umfang des Abbaus in den azetylcholinhaltigen Perfusaten 7—33% der Azetylcholinkonzentration der einfliessenden Flüssigkeit aus. Bei der Mehrzahl der von diesem Gesichtspunkt aufgearbeiteten Versuche lag der Abbau zwischen 11 und 25%. Bei den 16 aufgearbeiteten Versuchen verteilte sich der Abbau im Ruhezustand folgendermassen :

Die Hydrolyse im Ruhezustand war

unter	10%	bei	1	Versuch
zwischen	11—15%	«	3	Versuchen
«	16—20%	«	6	«
«	21—25%	«	3	«
«	26—30%	«	2	«
über	30%	«	1	Versuch.

Vorstehende Werte beziehen sich auf die zu Beginn des Versuches gesammelten Perfusate im Ruhezustand, da nach Reizung der Abbau im Ruhezustand zunahm, was wir auf die ungenügende Restitution oder eine Verletzung der Ganglienzellen zurückführen. Auf diese Erscheinung werden wir später noch eingehen.

Im Anschluss an die Reizung nimmt die Azetylcholinkonzentration des zurückgewonnenen Perfusates weiterhin ab, in der Mehrzahl der in dieser Hinsicht aufgearbeiteten Fälle um 16—30%, was bei einer Einflusskonzentration von 10 μg/ml Azetylcholin einen weiteren Abbau von 1,6 — 3,0 μg/ml bedeutet. Die aufgearbeiteten 22 Fälle verteilen sich folgendermassen :

Die Hydrolysesteigerung nach der Reizung war

zwischen	5—10%	bei	4	Versuchen
«	11—15%	«	2	«
«	16—20%	«	3	«
«	21—25%	«	6	«
«	26—30%	«	4	«
«	31—35%	«	1	Versuch
über	36%	«	2	Versuchen.

Die Grenzwerte betrugen bei Abbausteigerung während der Reizung 5% und 40%. Abbausteigerung konnte bei einem Teil der Versuche durch Reizung mehrmals, bei der Mehrzahl jedoch nur einmal ausgelöst werden. Dies dürfte wahrscheinlich auf der Unvollkommenheit der Reizungsmethode beruhen.

Die 5′ nach beendeter Reizung entnommenen Perfusate im Ruhezustand zeigten in manchen Fällen verminderten, in anderen weiterhin unveränderten Abbau.

Über den Verlauf des ganzen Versuchs gibt Abb. 3 Aufklärung.

Wie ersichtlich, wird bei 9 μg/ml einfliessender Azetylcholinkonzentration zu Beginn des Versuches im Ruhezustand 1 μg/ml Azetylcholin hydrolysiert

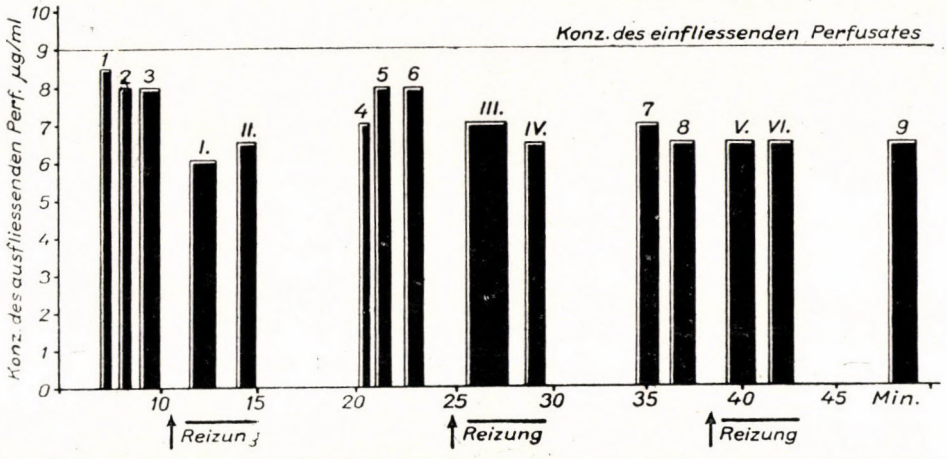


Abb. 3. Versuch 44. Geschwindigkeit der Perfusion 0,45 ml/Min. 1—9 bezeichnen die im Ruhezustand, I—VI. die, während der Reizung gesammelten Perfusate (Erklärung im Text).

(Perfusat 1, 2, 11%), während der Abbau auf Reizung um weitere 22% zunimmt und 33% erreicht (Perfusat I, II). Nach Beendigung der Reizung wird die Hydrolyse allmählich auf den Ausgangswert von 11% reduziert (Perfusat 4, 5, 6). Nach erneuter Reizung (Perfusat III, IV) wiederholt sich die vorherige Erscheinung, wenn auch in geringerem Ausmass (26%); hiernach bleibt sie bis zum Versuchsende im wesentlichen auf diesem Erregungsniveau. Daran ändert auch die dritte Reizung (Perfusat V, VI) nichts. In diesem Fall bleiben Pupillenerweiterung und Nickhautkontraktion in mässiger Stärke, aber dauerhaft erhalten. Dieses Phänomen lässt sich vielleicht mit einer Läsion des Stoffwechsels der Ganglienzellen, mit der Unfähigkeit zur vollständigen Restitution des Ruhezustandes erklären.

In anderen Fällen scheint die Wirkung der Reizung im Laufe des Versuches zuzunehmen. Ein Beispiel hierfür bietet der Versuch Nr. 8 (Abb. 4).

Aus dem Diagramm geht hervor, dass die erste Reizung wirkungslos war (I. Perf.), nach mässiger Wirkung der zweiten Reizung (II. Perf.) jedoch die

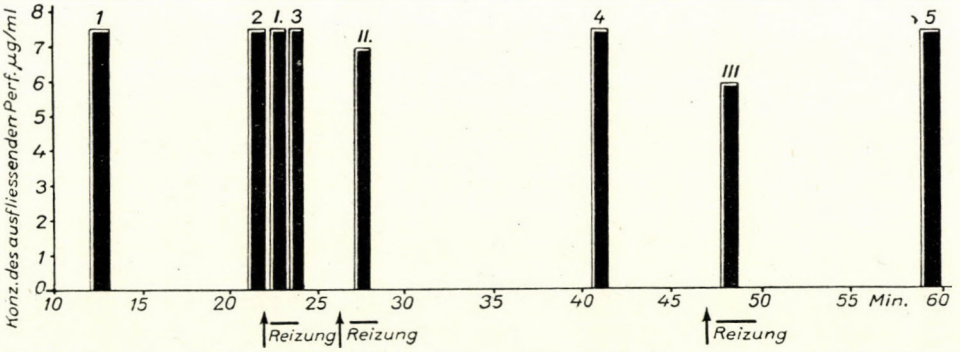


Abb. 4. Versuch 8. Geschwindigkeit der Perfusion: 0,40 ml/Min. Bezeichnungen, wie in Abb. 3.

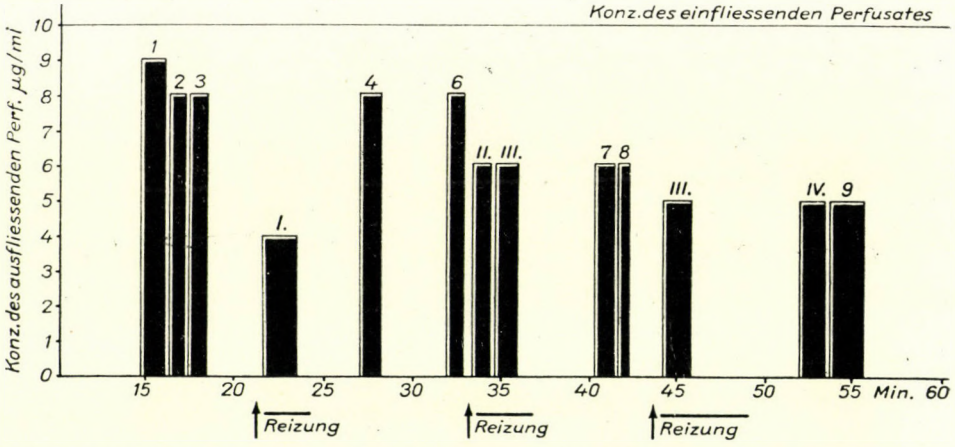


Abb. 5. Versuch 38. Geschwindigkeit der Perfusion: 0,16 ml/Min. Bezeichnungen wie in Abb. 3.

dritte Reizung die auch bei anderen Versuchen beobachtete ausgeprägte Wirkung herbeiführte (III. Perf.).

Im Versuch Nr. 38 war die Reizung in allen drei Fällen wirksam, d. h. es trat Zunahme des Abbaus im Ruhezustand ein (Abb. 5.).

Während jedoch der Abbau nach der ersten Reizung auf den Wert im Ruhezustand sank, kam es nach der zweiten und dritten Reizung nicht zu einer derartigen »Restitution«. In diesem Versuch fällt auf, dass die erste Reizung zu einer plötzlichen 40%igen Abbausteigerung mit nachfolgender vollständiger Restitution führte, während nach der wesentlich geringere Wirkung (20%ige Hydrolysesteigerung) ergebenden zweiten Reizung (II.—III. Perf.) der Abbau noch mehr zunahm. Wenngleich letzteres häufiger vorkommt, gibt es doch auch

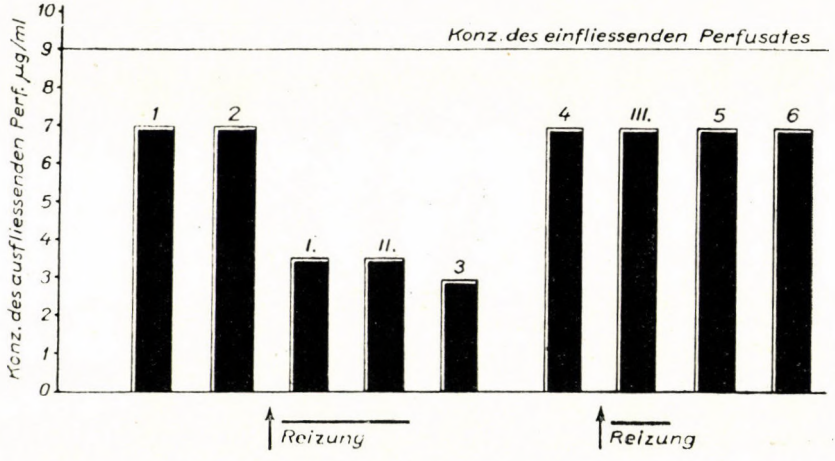


Abb. 6. Versuch 42. Bezeichnungen, wie in Abb. 3.

in anderen Versuchen Beispiele für rasche und hochgradige Abbausteigerung (Abb. 6).

Auf die Analyse der Nachwirkungen der Reizung kommen wir später zurück.

Der vorstehend beschriebene Versuchstypus wurde in 32 Fällen angewandt. Bei 23 der 32 Versuche stellten wir in 38 Fällen nach Reizung Hydrolysesteigerung fest; bei 9 Versuchen war diese nicht nachweisbar. Bei 4 der 9 Versuche sahen wir in 6 Fällen Hydrolyseverminderung. Diese Erscheinung trat jedoch weder systematisch auf, noch konnte sie mit irgendeiner der experimentellen Bedingungen in Zusammenhang gebracht werden.

Laut KOELLE (5, 6) und mehreren anderen Autoren sind im Ggl. cerv. superius beide Cholinesterasen anzutreffen. In der folgenden kurzen Versuchsserie suchten wir eine Methode zur gesonderten Messung der Aktivität der beiden verschiedenen Cholinesterasen zu finden. Auf diesem Wege vermochten wir bei den hier besprochenen Versuchen nur den ersten, anfänglichen Schritt zu tun, der noch durch andere Methoden ergänzt werden muss. Zur Trennung der beiden Cholinesterasen schien die Hemmung mit DFP am geeignetsten. Nach den Angaben von BODANSKY [12], AUGUSTINSSON und NACHMANSOHN [13] sowie MAZUR und BODANSKY [14] wird Pseudo-Cholinesterase von DFP in kleinen Konzentrationen mit nur geringer Hemmung der Azetylcholinesterase-Aktivität gelähmt. So setzt nach BODANSKY $2 \cdot 10^{-8}$ *M* DFP die Cholinesterase-Aktivität von Pferdeserum auf die Hälfte herab, während die Cholinesterase-Aktivität der menschlichen roten Blutkörperchen erst von $2 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$ *M* DFP auf die Hälfte verringert wird. Da sich die Verhältnisse bei unseren Versuchen von den bei den vorstehend angeführten Versuchen vorkommenden hochgradig unterschieden, war es ziemlich schwer, die zur Trennung der beiden Cholinesterasen geeignete DFP-Konzentration zu finden.

Drei Versuche wurden mit 10^{-5} *M* DFP und 10 μg/ml Azetylcholin enthaltender Locke-Lösung vorgenommen. Den Verlauf eines dieser Versuche gibt Abb. 7 wieder.

Wie das Diagramm zeigt, kommt Hydrolyse im Ruhezustand, anders als bei den vorigen Versuchen, zu Beginn des Versuches nicht vor. Nach Reizung tritt jedoch der Abbau im gewohnten Umfang ein, nicht nur nach der ersten, sondern auch nach der zweiten Reizung. Zwischen beiden Reizungen ist eine beträchtliche Reduktion des Abbaus zu beobachten. Die Ergebnisse sind unserer Meinung nach damit zu erklären, dass 2 μg/ml DFP ausreichen, die im Interstitium anwesende Pseudo-Cholinesterase zu hemmen, aber — in Übereinstimmung mit den Literaturangaben — zur Hemmung der Azetylcholinesterase der Zellen nicht imstande sind. Obwohl man sich das Vorhandensein von Faktoren vorstellen kann, welche als Resultat der Reizung der präganglionären Nervenendigungen und Ganglienzellen die Pseudo-Cholinesterase des Interstitiums aktivieren, halten wir doch die Erklärung für wahrscheinlicher, dass die auf Wirkung der Rei-

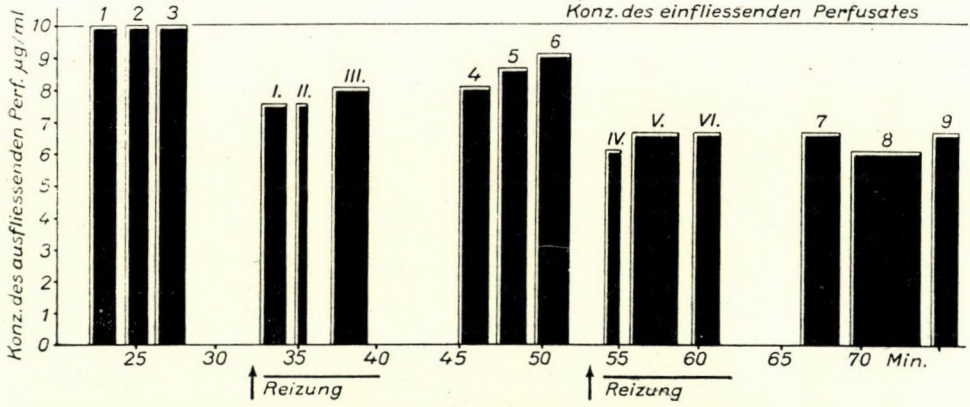


Abb. 7. Versuch 52. Geschwindigkeit der Perfusion: 0,12 ml/Min. 10^{-5} *M* DFP. Bezeichnungen, wie in Abb. 3.

zung auftretende Hydrolyse auf die Funktion der an der Oberfläche der aktiven reizleitenden Elemente befindlichen Azetylcholinesterase zurückzuführen sei. Die Cholinesterase des reizleitenden Gewebes wäre nach dieser Auffassung im Ruhezustand entweder inaktiv oder durch irgendeine Barriere der Zelle vom perfundierten Azetylcholin separiert. Zu funktionieren würde sie erst dann beginnen, wenn sie durch den Erregungsprozess aktiviert wird oder infolge der Permeabilitätssteigerung der Zelle mit dem perfundierten Azetylcholin in Berührung kommt. Mit dieser Annahme scheint der Umstand im Gegensatz zu stehen, dass die Hydrolyse in beiden, insbesondere aber in der auf die zweite Reizung folgenden Ruheperiode nicht auf Null sinkt, sondern in beträchtlichem Ausmass weiter stattfindet. Im Zusammenhang damit müssen wir bemerken, dass wir bei Beobachtung der Pupillenerweiterung feststellen konnten, dass der Ruhe-

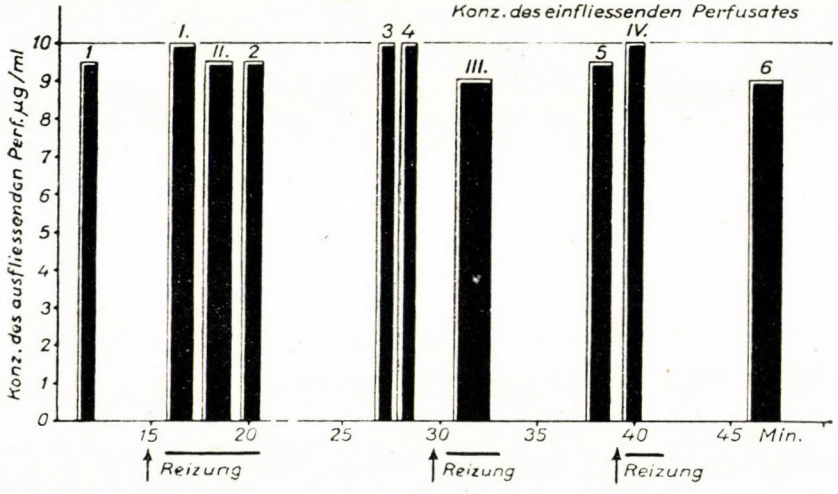


Abb. 8. Versuch 31. $5 \cdot 10^{-5}$ *M* DFP. Bezeichnungen, wie in Abb. 3.

zustand des Ganglions nach der zweiten Reizung nicht vollständig zurückkehrte, was wir für eine Folge der die Ganglienzellen bis zu einem gewissen Grade schädigenden starken Reizung halten. Wahrscheinlich bleibt daher die nach Reizung gewöhnlich auftretende Hydrolyse mindestens teilweise bestehen. Bei der Deutung dieses dauerhaften und ziemlich ausgeprägten Erregungszustandes der Ganglienzellen darf man nicht ausser Betracht lassen, dass die Wirkung der elektrischen Reizung in unserem Versuch von 10μg/ml Azetylcholin, ja auch noch von DFP unterstützt wurde. Auf die verletzliche Natur der Depolarisation

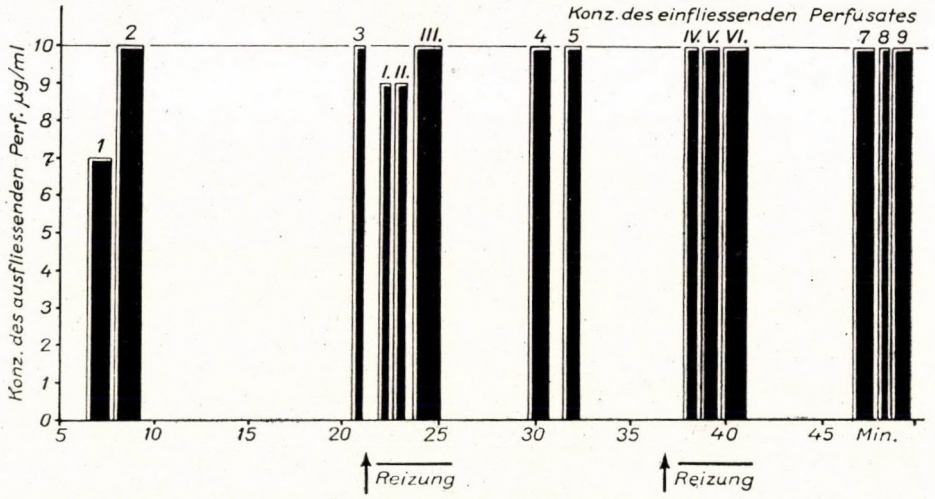


Abb. 9. Versuch 30. Geschwindigkeit der Perfusion 0,30 ml/Min. $5 \cdot 10^{-5}$ *M* DFP. Bezeichnungen, wie in Abb. 3.

weist auch noch der Umstand hin, dass — während nach der ersten Reizung wesentliche Restitution eintrat — nach der zweiten Reizung, in der 66.—76. Minute des Versuches, vor seinem Ende, die Rückkehr zum Ruhezustand nicht nur in diesem, sondern auch in anderen Versuchen nicht festzustellen war.

In der folgenden Versuchsserie betrug die DFP-Konzentration $5 \cdot 10^{-5}$ *M*. Ein charakteristisches Beispiel zeigt Abb. 8.

Bei diesem Versuch war Hydrolyse weder im Ruhezustand, noch nach der Reizung zu beobachten. Wahrscheinlich genügte die DFP-Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ *M* zur Lähmung beider Cholinesterasen. In anderen Versuchen konnte auch die zeitliche Entwicklung dieser Hemmung verfolgt werden (Abb. 9).

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, war zur Zeit der Entnahme des 1. Perfusates im Ruhezustand noch Hydrolyse vorhanden. Diese hörte einige Minuten später auf (2., 3. Perf.). Nach der ersten Reizung ist Hydrolyse noch zu beobachten, wenn auch in geringerem als dem üblichen Ausmass. Nach der Reizung besteht kein Abbau mehr, und daran ändert auch die zweite Reizung nichts. Von der 30. Minute der Perfusion an ist demnach die Hemmung beider Cholinesterasen als vollständig zu betrachten.

Besprechung

Zunächst wollen wir einige diskutierbare Fragen der experimentellen Methodik klären.

1. Lässt sich der Zustand des Ganglions, in welchem wir durch dieses 3—10 μg/ml Azetylcholin perfundieren, als Ruhezustand bezeichnen? Nach Literaturangaben wird ein perfundiertes Ganglion von etwa 3—5 μg Azetylcholin in Erregungszustand versetzt [18, 20].

Am perfundierten Ganglion registrierte U. TRENDELENBURG von 5 μg Azetylcholin an der Nickhaut ausgeprägte Wirkung. Auch unsere Versuche ergaben, dass ein Ganglion mit intakter Blutversorgung nach derartigen Azetylcholingaben in Erregungszustand versetzt wird. Bei unseren Versuchen führte jedoch am perfundierten Ganglion in der Mehrzahl der Fälle auch eine Umstellung auf eine Lösung mit der Konzentration 10 μg/ml keine Pupillenerweiterung oder Nickhautkontraktion herbei, während durch präganglionäre Reizung ein gut registrierbarer Erregungszustand zustande gebracht werden konnte. Dies führen wir darauf zurück, dass die Perfusion mit Locke-Lösung die normale Blutversorgung nicht vollständig zu ersetzen vermag und daher die Reizbarkeit der im Ganglion anwesenden Nervenstrukturen abnimmt und die Reizschwelle chemischen Reizen gegenüber höher wird.

Bei einzelnen Versuchen beobachteten wir anlässlich der Perfusion von 100 μg/ml Azetylcholinbromid anfangs ganglionäre Erregungserscheinungen, nach deren Rückentwicklung die präganglionäre Reizung jedoch gut registrierbare Nickhautkontraktionen auslöste ; nach ihrem Abklingen kehrte das Ganglion in den Ruhezustand zurück.

Auf Grund dieser Resultate glauben wir annehmen zu dürfen, dass die bei Perfusion von 10 μg/ml Azetylcholin durchgeführte präganglionäre Reizung im Ganglion Verhältnisse herbeiführt, die sich vom Zustand vor der Reizung so unterscheiden wie der Erregungszustand vom Ruhezustand.

2. Inwieweit werden die Versuchsergebnisse von dem Umstand beeinflusst, dass wir gleichzeitig mit dem Ggl. cerv. superius auch das Ggl. nodosum des N. vagus perfundierten?

Wie wir bereits bei der Beschreibung der Methode erwähnt hatten, übte die Reizung des N. vagus auf die Azetylcholinkonzentration des Perfusates keine Wirkung aus, die mit der Wirkung der präganglionären Reizung verglichen oder in Parallele hätte gestellt werden können. Bei den Reizungen achteten wir sorgfältig darauf, die Reizung des Vagusstammes zu vermeiden. Was die Teilnahme der Cholinesterase des Ggl. nodosum an der Hydrolyse anbelangt, so sei bemerkt, dass im Ganglion nodosum des Nervus vagus laut KOELLE [6] spezifische Cholinesterase kaum anzutreffen sei, während Pseudo-Cholinesterase in ähnlicher Menge und Lokalisation wie in anderen Ganglien nachgewiesen werden konnte. Wir setzen daher voraus, dass die Cholinesterase des Ggl. nodosum

am Abbau im Ruhezustand teilzunehmen vermag, jedoch an den durch Reizung ausgelösten Wirkungen im Hinblick auf die eben angeführten Umstände unbeteiligt sein dürfte.

3. Ein bis heute nicht ganz gelöstes Problem im Zusammenhang mit der Methode ist die Frage des toten Raumes. Der zum Ganglion gelegene Teil der V. jugularis interna und auch die Kanüle selbst nehmen einige Hundertstel ml Flüssigkeit auf. Durch diese Flüssigkeitsmenge werden die bei der Reizung oder nach Beendigung der Reizung auftretenden Konzentrationsveränderungen bis zu einem gewissen Grade verwaschen und verzögert.

Die Veränderungen der Cholinesterase-Aktivität im Ruhe- und Erregungszustand wurden von verschiedenen Autoren untersucht ; diese Untersuchungen erstreckten sich aber nicht auf Nervengewebe. Das Versuchsobjekt war in den meisten Fällen der quergestreifte Muskel oder ein Nervenmuskelpräparat. Die ersten Erforscher dieser Frage, LISSÁK, PÁSZTOR und NAGY [15], untersuchten die Cholinesterase-Aktivität von Katzenmuskeln in verschiedenen Stadien der neuromuskulären Impulsübertragung. Im 4. Stadium (dem der Ermüdung) ist die Cholinesterase-Aktivität geringer, im 5. Stadium, dem der Restitution der Übertragung, höher als im Ruhezustand. SEIDLITZ [16] stellte aus ruhenden und 1 Minute tetanisierten Muskeln wässrige Extrakte her. Nach 20—30 Minuten Inkubation im Thermostaten gab er 1 : 100 000 verdünntes Azetylcholin zum Extrakt, wonach er die nach 20—25 Minuten Inkubation verbliebene Azetylcholinmenge titrierte. Im Extrakt der gereizten Muskeln war eine beträchtlich geringere Azetylcholinmenge zurückgeblieben als in dem der ruhenden ; nach 40—50 Minuten war im Extrakt der tetanisierten Muskeln Azetylcholin nicht mehr enthalten, dagegen in dem der ruhenden noch nachweisbar. Der Autor zieht die Schlussfolgerung, dass die Aktivität bzw. Konzentration der Muskelcholinesterase der gereizten Muskeln grösser war und Abhängigkeit vom funktionellen Zustand der Muskeln aufwies.

BARANOWA und SPERANSKAJA [17] untersuchten den Zusammenhang zwischen der Cholinesterase-Aktivität von Leber und Muskeln und dem Erregungszustand der sympathischen Nerven und der Adrenalinwirkung, und zwar, ebenso wie die vorhin genannten Autoren, im Homogenat. Ihre Ergebnisse zeigen kein einheitliches Bild : nach Sympathikusreizung und Adrenalin-Injektionen sahen sie teilweise Senkung, in anderen Fällen Steigerung der Cholinesterase-Aktivität.

Bei unseren Versuchen haben wir zur Untersuchung der Cholinesterase-Aktivität des Ggl. cervicale superius die von den erwähnten Autoren angewandte Methode als ungeeignet gefunden. Die Homogenisierung, die Zerstörung der Zellstruktur, macht unserer Ansicht nach die Untersuchung von Prozessen, welche, wie auch der Erregungszustand, die Intaktheit der Zelle voraussetzen, unmöglich. Die spezielle Lokalisation der spezifischen Cholinesterase lässt eine besondere physiologische Funktion vermuten, und wir nehmen an, dass die sich

aus dieser Lokalisation ergebenden Verhältnisse für die Cholinesterase-Aktivität nicht indifferent sind. Es schien uns daher richtiger, die mit dem Erregungszustand zusammenhängenden Veränderungen der Cholinesterase-Aktivität »in situ« zu untersuchen. Nur auf diese Weise wird es möglich, die Wirkungen der während des Erregungszustandes eintretenden strukturellen und funktionellen Veränderungen der Membran auf die Cholinesterase-Aktivität zu beobachten.

Unsere experimentellen Ergebnisse, die als erste Resultate einer längeren Versuchsreihe zu betrachten sind, lassen sich nicht in jeder Hinsicht einheitlich deuten. Bei ihrer Erklärung muss man von der Tatsache ausgehen, dass durch die Perfusion von 3—10 μg/ml Azetylcholinchlorid an der Nickhaut und Pupille registrierbare ganglionäre Erregungssymptome nicht ausgelöst wurden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass bei der Perfusion mit Kochsalzlösung die Reizschwelle der Nervenstrukturen des Ganglions Azetylcholin gegenüber gestiegen war. Azetylcholin ist nicht imstande, in die Nervenzellen und ihre Fortsätze einzudringen, und löst keine Erregungseffekte aus. Hierauf dürfte auch die Beobachtung beruhen, dass im Ruhezustand nur die im interstitiellen Bindegewebe und Gliagewebe anwesende und mit niedrigerer DFP-Konzentration hemmbare Pseudo-Cholinesterase Hydrolyse zu bewirken vermag. Bei der präganglionären Reizung, wo im Zusammenhang mit dem Erregungsprozess die Zellpermeabilität zunimmt, wird das perfundierte Azetylcholin fähig, in die Zelle einzudringen, und kann mit der spezifischen Cholinesterase in Kontakt kommen, was in der Hydrolysesteigerung während der Reizung zum Ausdruck kommt. Interessanterweise sind die bei präganglionärer Reizung freiwerdenden, nach FELDBERG und VARTIAINEN [18] $6 \cdot 10^{-5}$—10^{-4} pro Impuls entsprechenden Acetylcholinmengen dennoch imstande, in den postsynaptischen Elementen Erregungszustand hervorzurufen. Wenn wir annehmen, die Reizübertragung beruhe darauf, dass der chemische Mediator aus den präsynaptischen Elementen auf die postsynaptische Membran gelangt, so müssen wir zur Erklärung obiger Tatsachen auch voraussetzen, dass an den Endigungen der präganglionären Fasern für die Diffusion des Azetylcholins in die postsynaptischen Elemente andere Bedingungen vorliegen als an anderen Punkten der Nervenzelloberfläche.

Interessant ist in diesem Zusammenhang unser Versuch mit der Perfusion von Azetylcholin in der Konzentration 100 μg/ml. Zu Beginn der Perfusion beobachteten wir ganglionäre Erregung, die allmählich verschwand. Nach Reizung mit der Frequenz 10/sec traten erneut gut registrierbare Nickhautkontraktionen auf. Es besteht kein Zweifel, dass das perfundierte Azetylcholin in diesem Fall imstande war, in die postsynaptischen Elemente einzudringen und hier einen vorübergehenden Erregungszustand hervorzurufen. Es bleibt jedoch die Frage, ob Azetylcholin auch nach Abklingen der Erregungserscheinungen weiterhin in die Zelle eintritt oder nicht. Zumindest bei den mit höheren Konzentrationen als 10 μg/ml durchgeführten Versuchen setzen wir dies voraus. Nach DEL CASTILLO

und KATZ [19] war mit einer Mikropipette in das Innere der Muskelfaser injiziertes Azetylcholin wirkungslos. Als wirksam erwies sich lediglich das auf die Endplättchen von aussen aufgetragene Azetylcholin. Die Diffusionsgeschwindigkeit des Azetylcholins durch die übrigen Teile der Membran wird von diesen Autoren als ebenso gross vorausgesetzt wie die anderer einwertiger anorganischer Ionen. Obwohl es auf der Hand liegt, dass sich die Verhältnisse bei Muskelfasern und Ganglienzellen in morphologischer und funktioneller Hinsicht wesentlich unterscheiden, halten wir doch eine Deutung unserer Versuchsergebnisse für möglich, die sich auf eine Analogie mit den Resultaten von DEL CASTILLO und KATZ stützt.

Es scheint uns nicht ausgeschlossen, dass der unter den Endplättchen befindliche Teil der postsynaptischen Membran Azetylcholin gegenüber empfindlicher ist als andere Abschnitte der Membran. Dass jedoch die Nervenzelle auf die aus den präsynaptischen Endplättchen stammenden Azetylcholinmengen, die erheblich kleiner sind als die perfundierten, besser reagiert, lässt sich auf zweierlei Art erklären: 1. Die Konzentration des perfundierten Azetylcholins erreicht im Raume zwischen dem Endplättchen und der postsynaptischen Membran nicht die zur Erzeugung des Erregungszustandes erforderliche Stärke; 2. der erwähnte Raum ist für das eingeführte Azetylcholin durch eine Diffusionsbarriere verschlossen. Demgegenüber halten wir es für möglich, dass Azetylcholin durch andere Teile der Membran in die Zelle eintritt, ohne einen Reiz auszulösen. Bei präganglionärer Reizung kann angenommen werden, dass die die Cholinesterase von Azetylcholin trennende strukturelle Barriere verschwindet und sich die Hydrolyse in Gang setzt. Als eine derartige Barriere kann auch ein die spezifische Cholinesterase inaktivierender Faktor in Frage kommen, der vom Erregungsprozess vorübergehend aufgehoben wird. Es sei erwähnt, dass sich bei den Versuchen von PRAWDITSCH-NEMINSKAJA [11] Novokain als ein cholinesteraseaktivierendes Mittel erwies und auf seine Wirkung der Effekt der präganglionären Reizung sich wesentlich verringerte. Auch daraus kann geschlossen werden, dass die Cholinesterase im Ruhezustand der Zelle nicht ihre volle Aktivität entwickelt. Der Hemmungsfaktor lässt sich durch Reizung oder Novokain beseitigen.

Zur Bestätigung der erwähnten Hypothesen und Beantwortung der Fragen sind weitere Versuche erforderlich, vor allem zur Klärung der Frage, wo die die Cholinesterase und das perfundierte Azetylcholin trennende Barriere lokalisiert ist und welche Bedeutung dem Verschwinden dieser Barriere und dem Azetylcholinabbau im Erregungsprozess zukommt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Ganglion cervicale superius von Katzen wurde mit Azetylcholin in der Konzentration 3—10 μg/ml enthaltender Locke-Lösung perfundiert. Durch Vergleich der Azetylcholinkonzentrationen des ein- und ausfliessenden Perfusates wurde auf die Cholinesterase-Aktivität des Ganglions geschlossen.

2. Im Ruhezustand war die Grösse der Hydrolyse : 7—33%; nach präganglionärer Reizung stieg sie um weitere 5—40%.

3. Nach Perfusion von 10^{-5} *M* DFP hörte die Hydrolyse im Ruhezustand auf, kam aber nach Reizung wieder in Gang. Durch Anwendung von $5 \cdot 10^{-5}$ *M* DFP wurde die Hydrolyse sowohl im Ruhe- wie im Erregungszustand aufgehoben. Es wird angenommen, dass im ersten Fall die Inaktivierung der Pseudo-Cholinesterase, im zweiten Fall die Inaktivierung sowohl der Pseudo- als auch der spezifischen Cholinesterase stattfand.

4. Aus den Versuchsergebnissen wird der Schluss gezogen, dass die die spezifische Cholinesterase der Nervenzellen und das perfundierte Azetylcholin trennende Barriere anlässlich der Reizung verschwindet und die Hydrolyse in Gang kommt.

5. Es wird auf die Bedeutung der Lokalisation dieser Barriere und des Azetylcholinabbaus hingewiesen.

LITERATUR

1. Wilson, I. B., Cohen, M.: Biochim. Biophys. Acta, **11**, 147 (1953).
2. de Roetth, A.: J. Neurophysiol., **13**, 55 (1951).
3. Nachmansohn, D., Feld, E. A.: J. Biol. Chem. **171**, 785 (1947).
4. Nachmansohn, D., Wilson, I. B.: Metabolism and Function of the Nerve Cell. Neurochemistry XIV. Thomas, Springfield.
5. Koelle, G. B.: Biochem. J., **53**, 217 (1953).
6. Koelle, G. B.: J. Pharmacol., **100**, 158 (1950).
7. Ravin, H. A., Zacks, S. J., Seligman, A. M.: J. Pharmacol. Exp. Therap., **161**, 330 (1953)
8. Kibjakow, A. W.: Arch. ges. Physiol. **232**, 432 (1933).
9. Paton, W. D. M., Perry, W. L. M.: J. Physiol., **119**, 43 (1953).
10. Chungcharoen, D., Daly, M. B., Schweitzer, A.: J. Physiol., **118**, 528 (1953).
11. Prawditsch-Neminskaja, T. W.: Sowjet Medizin. Rundschau, Chirurgie, 5. (Okt. 1951).
12. Bodansky, O.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **47**, 521 (1946).
13. Augustinsson, K. B., Nachmansohn, D.: Science, **110**, 98 (1949).
14. Mazur, A., Bodansky, O.: J. Biol. Chem., **163**, 261 (1946).
15. Lissák, K., Nagy, E. K., Pásztor, J.: Arch. ges. Physiol. **245**, 783 (1942).
16. Seidlitz, O.: (Сейдлиц, О.) Доклады Акад. Наук СССР **6**, 179 (1938).
17. Baranowa, N. F., Speranskaja, E. N.: (Баранова, Н. Ф., Сперанская, Э. Н.) Доклады Акад. Наук СССР, **71**. 577 (1950).
18. Feldberg, A., Vartiainen, A.: J. Physiol., **83**, 103 (1935).
19. Del Castillo, J., Katz, B.: J. Physiol., **128**, 157 (1955).
20. Feldberg, W., Gaddum, J. H.: J. Physiol., **81**, 305 (1934).

UNTERSUCHUNG DER AUF ADRENALINREIZ EINTRETENDEN ANTAGONISTENMOBILISIERUNG AN DENERVIERTEN STRUKTUREN (II)

Von

E. SZÜCS und E. HETÉNYI

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 31. Januar 1957)

In einer vorigen Arbeit [6] waren wir bei der Untersuchung der Ursachen der Denervations-Überempfindlichkeit zu der Schlussfolgerung gelangt, dass an denervierten Organen jene feinere Einregulierung und Kontrolle der Effektorenfunktion fehlt, die das Nervensystem durch Mobilisierung antagonistisch wirkender biologischer Substanzen verwirklicht. Infolgedessen weisen die von der gegenregulatorischen interozeptiven Kontrolle befreiten denervierten Strukturen auf chemische Reize gesteigerte, excessive Reaktionen auf.

Bei an intakten und denervierten hinteren Extremitäten von Fröschen und Kaninchen vorgenommenen Durchströmungsversuchen hatten wir festgestellt, dass das Adrenalin die Mobilisierung antagonistisch wirkender Substanzen durch Reizung peripherer Nervenstrukturen auslöst.

In neueren Durchströmungsversuchen an der hinteren Extremität von Kaninchen untersuchten wir den Zusammenhang zwischen der auf Adrenalinreiz mobilisierten Azetylcholinmenge und der Dauer der nach der Denervation verstrichenen Zeit.

Methoden

Die Versuche erfolgten an 50 Kaninchen. Eine hintere Extremität der Tiere wurde mittels Durchschneidung des N. ischiadicus denerviert. Die Aufarbeitung der operierten Kaninchen geschah zwischen der 6. Stunde und dem 100. Tage nach der Denervation. In Äthernarkose wurde die Bauchhöhle der Kaninchen geöffnet und nach Eviszeration sowie Unterbindung der entsprechenden Gefässe in die Aorta abdominalis und in die beiden Vv. femorales je eine Kanüle gebunden. Hiernach begannen wir die Perfusion. Die in die Aorta mit 40—60 cm H_2O Druck fliessende, 37° C warme Locke-Lösung enthielt 1 mg% Eserin. Die aus den beiden Vv. femorales abfliessenden Perfusate wurden für die Testierung während der ganzen Versuchsdauer in Fraktionen gesammelt. Das Ausmass der Durchströmung kontrollierten wir mit einer elektrischen Tropfzählvorrichtung. Adrenalin wurde bei den Versuchen in der Konzentration 10—100 μg% als Infusion angewandt; die Lösungen wurden durch Zugabe von 1 mg% Vitamin C stabilisiert. Die vor und während der Adrenalinreaktion aufgefangenen Perfusate wurden nach Zentrifugieren durch Verdünnung 1 : 4 mit einer ergänzenden Lösung (NaCl 0,5%, $CaCl_2$ 0,019%) in eine Blutegel—Ringer-Lösung umgewandelt und am Blutegelrückenmuskel-Präparat auf übliche Weise titriert [1—5].

Ergebnisse

Aus den Versuchen ging hervor, dass die während der Adrenalininfusion aufgefangenen Perfusate erheblich mehr Azetylcholin enthielten als die vorher gewonnenen. Ferner stellten wir fest, dass auf der denervierten Seite durch den Adrenalinreiz weniger Azetylcholin mobilisiert wird als auf der innervierten. Dieser Unterschied in der Azetylcholinmobilisierung der intakten und denervierten Seite war auf der frisch denervierten Seite — wo der Degenerationspro-

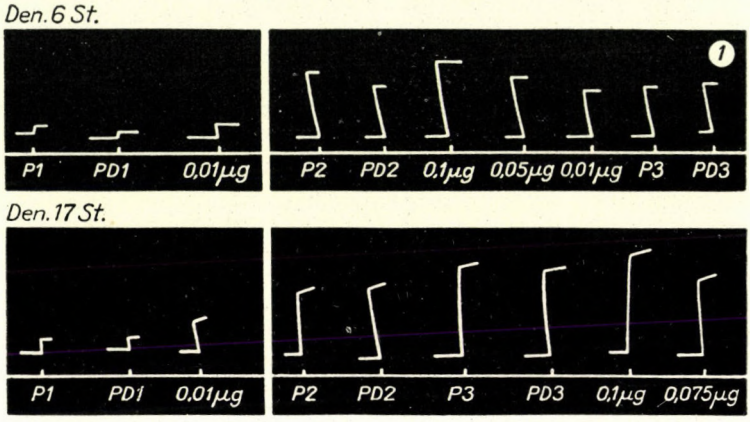


Abb. 1. Die Kurven der oberen Reihe zeigen die Wirkung der 6 Stunden nach N. ischiadicus-Durchtrennung aufgefangenen Perfusate am Blutegelrückenmuskel-Präparat. P1 = Wirkung von 0,5 ml des vor der Adrenalininfusion gewonnenen Perfusates der intakten Seite, PD1 = Wirkung von 0,5 ml des vor der Adrenalininfusion aufgefangenen Perfusates der denervierten Seite. Aus den Azetylcholin-Kontrollen (µg-Werte unter den Kurven) geht hervor, dass 0,5 ml des in den ersten 2½ Minuten der Adrenalinperfusion abgeflossenen Perfusates (P2) etwa 100mal soviel, 0,5 ml des in den folgenden 2½ Minuten abgeflossenen Perfusates 10mal soviel Azetylcholin enthielten wie die vor der Adrenalininfusion gesammelten. Kurven der unteren Reihe: Wirkungen der in dem 17 Stunden nach der Operation durchgeführten Versuch aufgefangenen Perfusate. Bezeichnungen wie oben

zess der Nerven noch nicht beendet war — nicht oder kaum wahrnehmbar. Einen derartigen Versuch zeigt Abb. 1.

Wie ersichtlich enthielten die Perfusate der intakten wie der denervierten Seite sowohl 6 und 17 Stunden vor der Adrenalininfusion als auch in den ersten und zweiten 5 Minuten der Infusion annähernd gleiche Azetylcholinmengen. Ähnliche Verhältnisse waren vom 3.—5. Tage nach der Denervation zu beobachten.

Vom 3.—5. Tage nach der Denervation beginnend und in den nachfolgenden 8—10 Wochen war der Azetylcholingehalt der während der Adrenalininfusion aufgefangenen Perfusate auf der denervierten Seite geringer als auf der intakten. Abb. 2 gibt zwei am 31. bzw. 44. Tage nach der Denervation durchgeführte Versuche wieder, die also zu einem Zeitpunkt vorgenommen worden waren, als sich die Denervations-Überempfindlichkeit bereits vollständig entwickelte.

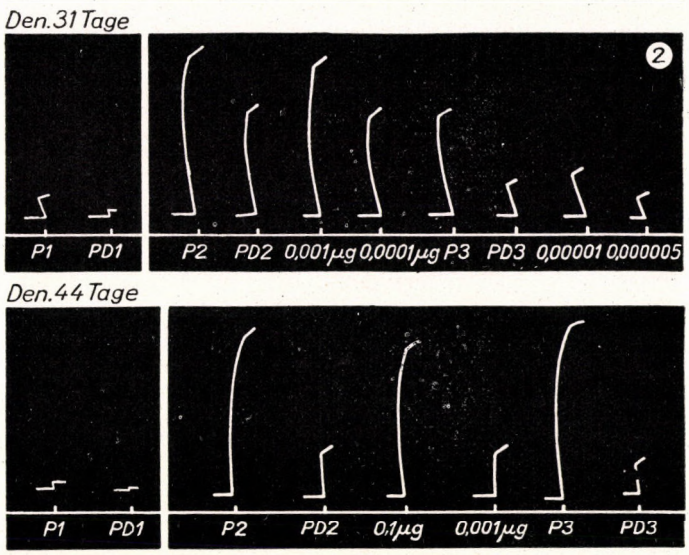


Abb. 2. Wirkung der 31 (obere Reihe) und 44 (untere Reihe) Tage nach der Denervation gesammelten Perfusate auf den Blutegel-Rückenmuskel. Bezeichnungen wie auf Abb. 1.

In beiden Versuchen erwies sich der Azetylcholingehalt des Perfusates der denervierten Seite niedriger als der der intakten Seite.

Nach dem 60.—70. Tage kommt der Azetylcholingehalt des Perfusates der denervierten Seite — wahrscheinlich infolge der Progression der Nervenregeneration — dem des Perfusates der intakten Seite wiederum nahe (Abb. 3).

Nach den dargestellten Versuchen besteht also zwischen der nach der Denervation verstrichenen Zeitperiode und der auf Adrenalinreiz mobilisierten Azetylcholinmenge ein deutlicher Zusammenhang. In den ersten Tagen nach

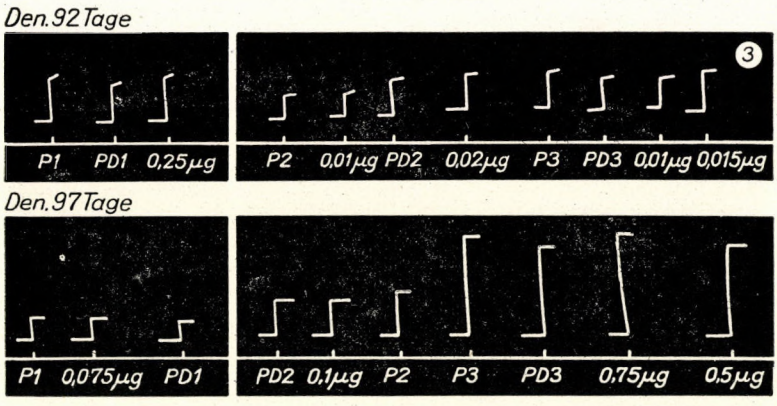


Abb. 3. Wirkung der 92 (obere Reihe) und 97(untere Reihe) Tage nach der Denervation gesammelten Perfusate. Bezeichnungen wie auf Abb. 1.

der Denervation waren auf Adrenalinreiz an der intakten und denervierten Seite annähernd gleiche Azetylcholinmengen frei geworden und in das Perfusat übergetreten. In den nachfolgenden 8—10 Wochen waren die mobilisierten Azetylcholinmengen auf der innervierten Seite wesentlich grösser als auf der denervierten. Wie wir in einer früheren Mitteilung [6] eingehender erörtert hatten, erscheint und besteht in dieser Periode die Überempfindlichkeit der Gefässe gegenüber der Pressorwirkung des Adrenalins. Vom 60.—70. Tage nach der Denervation nähert sich der Azetylcholingehalt des Perfusates der denervierten Seite dem des Perfusates der intakten und erreicht schliesslich dessen Wert.

ZUSAMMENFASSUNG

Durchströmungsversuche an intakten und denervierten hinteren Extremitäten von Kaninchen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die während der Adrenalininfusion aufgefangenen Perfusate enthielten erheblich mehr Azetylcholin als die vor der Infusion gesammelten.

2. Auf der denervierten Seite wurde durch den Adrenalinreiz weniger Azetylcholin mobilisiert als auf der innervierten.

3. Der Azetylcholingehalt der Perfusate der intakten und denervierten Seite war in den ersten Tagen nach der Denervation annähernd gleich, während zwischen dem 5. und 70. Tage das Perfusat der innervierten Seite das Vielfache des Azetylcholingehaltes der denervierten Seite enthielt.

4. Vom 60.—70. Tage nach der Denervation kam der Azetylcholingehalt der Perfusate der denervierten Seite — vermutlich infolge der progressiven Nervenregeneration — dem der Perfusate der intakten Seite erneut nahe.

LITERATUR

1. Chang, H. C., Gaddum, J. H.: J. Physiol., **79**, 255 (1933).
2. Führer, H. in E. Abderhalden: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Springer, Berlin, 1923, Abt. IV. Teil 7, S. 463.
3. Jordan, H. J., van der Feen jun., P. J. in E. Abderhalden: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Springer, Berlin, 1930. Abt. IX, Teil 4. S. 415.
4. Sajtó, Y.: Arch. ges. Physiol. **198**, 191 (1932).
5. Teschendorf, W.: Arch. ges. Physiol. **192**, 135 (1921).
6. Went, I., Szücs, E., Hetényi, E.: Acta Physiol. Hung. **9**, 193 (1956).

EIN NEUER ORDINATENSCHREIBER

Von

E. Szűcs und L. Balla

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 25. September 1956)

Die experimentelle Analyse der Gefässreaktionen und Herztätigkeit erfordert graphische Darstellung. Bei akuten Versuchen verwendet man zur Untersuchung der Gefässreaktionen vor allem Apparaturen zur Messung des venösen Ausflusses. In unserem Institut benutzten wir zur Messung des venösen Ausflusses bisher die folgende Methode :

Aus dem isolierten durchströmten Organ oder Gefässgebiet wurde isotonische Lösung oder Blut durch eine Venenkanüle in ein Tropfgefäss geleitet. Die entstandenen Tropfen fielen durch ein Elektrodenpaar, wodurch der Stromkreis geschlossen wurde, der mit Hilfe einer elektronischen Vorrichtung ein elektrisches Signal in Funktion setzte. Das Signal zeichnete am Kymographen Linien auf, die nach dem Versuch gezählt und im Koordinatensystem dargestellt wurden. Diese Methode ist mit sehr vielen Fehlern verknüpft und ihre Brauchbarkeit aus mehreren Gründen beschränkt : 1. Die Bewertung der Versuchsergebnisse nimmt viel Zeit in Anspruch (bei einem Versuch sind jeweils mehrere hundert, bisweilen mehrere tausend Linien zu zählen) ; 2. die den feineren Gefässreaktionen entsprechenden Tropfzahlveränderungen lassen sich von den aus der Inertie der Versuchsanordnung stammenden Abweichungen nicht differenzieren; 3. die während des Versuches vor sich gehenden Veränderungen vermag der Experimentator erst nach Auswertung der graphischen Darstellung, mitunter erst nach Wochen festzustellen, wodurch die zweckmässige Richtung der Forschung häufig unterbrochen oder in eine falsche Bahn gelenkt wird ; 4. die Originalergebnisse sind für Mitteilungen oder Vorträge praktisch nicht verwendbar bzw. beansprucht die Vorführung der experimentellen Resultate umfangreiche Erklärungen. — Zur Vermeidung dieser Fehler und Schwierigkeiten hat sich die Registrierung der Tropfzahlwerte mit einem Ordinatenschreiber als sehr geeignet erwiesen.

Den Gedanken des Ordinatenschreibers schöpften wir aus den Arbeiten von Clementz und Ryberg [1] sowie Forst und Heuwig [2] bzw. aus den von diesen Autoren zitierten Abhandlungen. Die in der Literatur mitgeteilten Lösungen mussten wir unseren experimentellen Anforderungen entsprechend modifizieren, vervollkommnen und vereinfachen. Der Apparat eignet sich zur graphi-

schen Darstellung von Impulsveränderungen zwischen 0—130/Min., d. h. sowohl zur Messung des venösen Ausflusses als auch zur Registrierung der Herzfrequenz. Anders als die Apparatur obiger Autoren besteht unsere Vorrichtung aus zwei unabhängig voneinander funktionierenden Systemen, und zwar aus zwei zusammengebauten Ordinatenschreibern. Diese Lösung ist durch die Richtung unserer Versuche benötigt ; durch diese Apparatur wird nämlich die gleichzeitige Registrierung von zwei Prozessen, d. h. der Reaktionen des denervierten und eines Kontrollgefässgebietes, ermöglicht. Dieser Anspruch erforderte eine Vereinfachung der Apparatur in anderer Beziehung. Bei den früheren Apparaten war die Einstellung der Zeiger und Signale auf den Kymographen mit viel Schwierigkeit verknüpft ; aus diesem Grunde ist unsere Apparatur mit dem Kymographen und der reiz- und zeitanzeigenden elektromagnetischen Signalanlage zusammengebaut. Das den Rückfall gewährleistende System (s. unten), welches bei den in obigen Mitteilungen beschriebenen Vorrichtungen aus einer komplizierten mechanischen Konstruktion besteht, ersetzten wir durch eine einfache elektronische Einrohrapparatur.

Beschreibung des Apparates

Zwei sich übereinander bewegende Zeiger (m), die von Stahldrähten geführt werden, sind vor der Trommel des Kymographen (k) angebracht. Die aufwärts gerichtete Bewegung der Zeiger ist durch eine Trommel (d) mit 30 mm Durchmesser in der Weise gesichert, dass die an den Zeigern befestigten Führungsstangen (t) von je einer Rolle (g) mit Hilfe einer Spiralfeder (r) an die sich drehende Trommel gedrückt werden. Die optimale Spannung der Spiralfedern bzw. Rollen lässt sich mit einer Schraube (cs) einstellen. Die Zeiger bewegen sich solange, bis die Führungsstangen von den Rollen zur Drehtrommel gedrückt werden. Die Auflaufsgeschwindigkeit der Zeiger kann man in 5 Abstufungen zwischen 1—81 sec (10 cm) 1, 3, 9, 27 und 81 variieren. Der Geschwindigkeitswechsel geschieht durch ein mechanisches Werk (s).

Der Rückfall der Zeiger wird durch einen elektronischen Apparat ermöglicht, der aus einem Gleichrichterteil und einer einzigen Endverstärkerröhre (EL 3) besteht. Die Endverstärkerröhre ist nach dem üblichen Schema angeschlossen, mit dem Unterschied, dass ihr Kathodenwiderstand aus einem Drahtpotentiometer besteht, so dass die Röhre bei dessen entsprechender Einstellung vollkommen verschlossen werden kann. Mit dem Gitterableitwiderstand hingegen ist parallel ein Kondensator von 0,5 mF Kapazität verbunden. Wenn die Tropfen der aus dem durchströmten Gefässgebiet kommenden physiologischen Lösung auf das Elektrodenpaar (e) fallen, wird auf den mit Gitterableitwiderstand parallel verbundenen Kondensator ein grosser positiver Impuls übertragen, der dadurch eine starke positive Ladung gewinnt, die bis dahin verschlossene

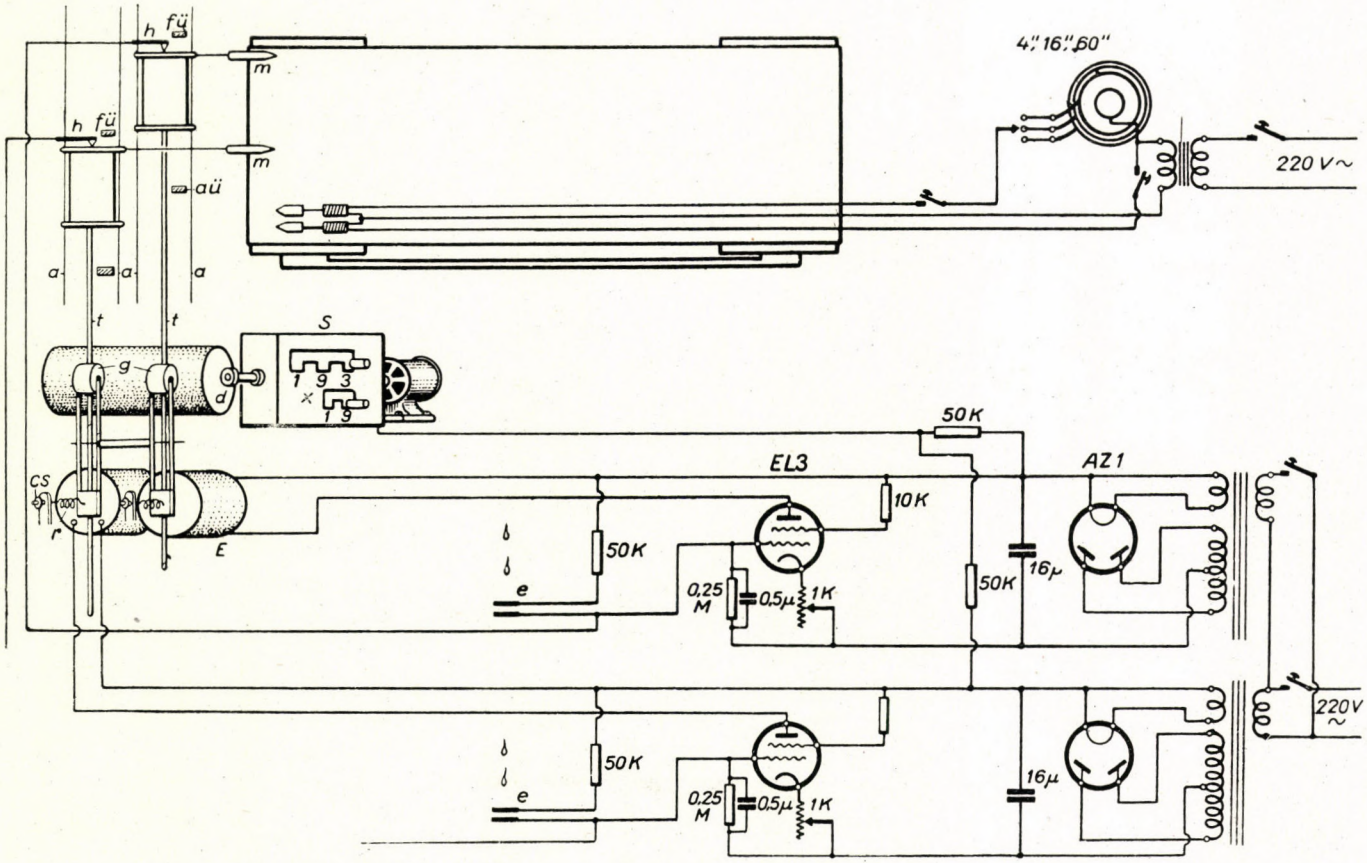


Abb. 1. Schematische Zeichnung des Ordinatenschreibers. Erklärung s. im Text

Röhre öffnet und solange offen hält, bis sich der Kondensator durch den Gitterableitwiderstand entlädt (dies beansprucht etwa 0,2 Sek.). Der im Zusammenhang mit der Öffnung der Endverstärkerröhre verstärkte Anodenstrom setzt mit Hilfe des an den Anodenkreis angeschlossenen Elektromagneten (E) den Hebel der Rolle in Bewegung, die Rolle entfernt sich von der Drehtrommel, wodurch Führungsstange und Zeiger auf Grund des Eigengewichtes auf die durch den

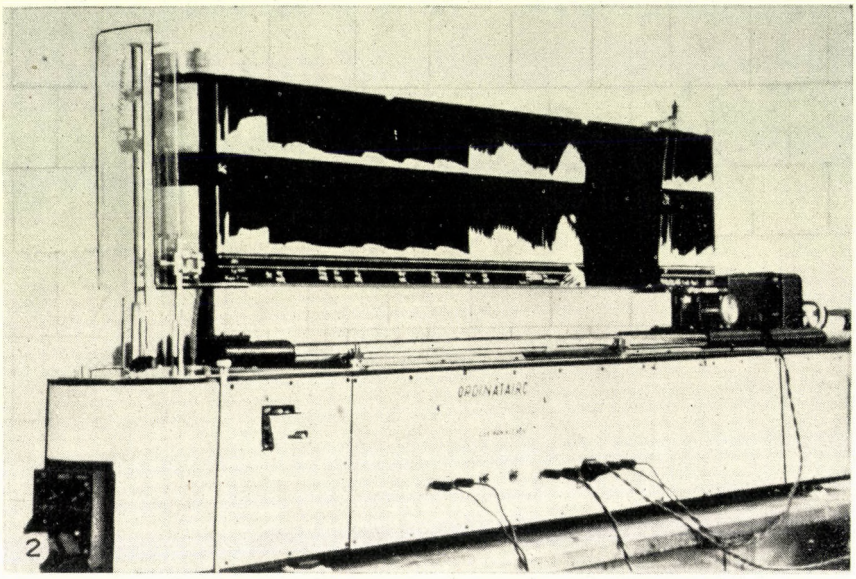


Abb. 2. Ordinatenschreiber-Apparat (15fache Verkleinerung)

Anhalter (aü) bestimmte Ausgangsstelle zurückfallen (auch dies geht in etwa 0,2 Sek. vor sich). Nach wiederholtem Verschluss der Röhre beginnt der Zeiger wiederum seinen Gang nach oben.

Sofern der Zeiger bis zum achten Zentimeter seiner Kapazität keinen Impuls empfängt, stösst er auf den am Ende der Bahn angebrachten Metallkontakt (h), der den Gitterkondensator ebenso wie oben mit positiver Ladung versieht. Durch diesen Mechanismus ist der Rückfall des Zeigers auf die Nullstellung auch in den Fällen gewährleistet, wo aus dem biologischen Präparat keine oder nur in solchen Intervallen Tropfen abfliessen, welche die Auflaufsgeschwindigkeit der Zeiger überschreiten. Eine Schädigung des begrenzenden Kontaktes wird durch den darüber angebrachten, aus Kunststoff hergestellten Anhalter (fü) verhindert.

Der elektronische Apparat, das Auftriebwerk und sein Schalter sowie der Zeitsignalapparat sind in einem an seinen beiden Enden abgerundeten Metallkasten untergebracht (Abb. 2). Am oberen Teil der Apparatur befindet sich der Kymo-

graph : seine beiden Trommeln sind an einem Metallrohrpaar befestigt, das auf den am Apparat angebrachten Haltern schienenartig hin- und hergeschoben werden kann. Anlässlich des Papierwechsels kann man den ganzen Kymographen um etwa 15 cm nach hinten ziehen, wodurch ermöglicht wird, dass das Papier ohne Gefahr einer Schädigung der Zeiger auf die Trommel gelegt wird. Die optimale Spannung der Zeiger erreichen wir dadurch, dass wir den Kymographen

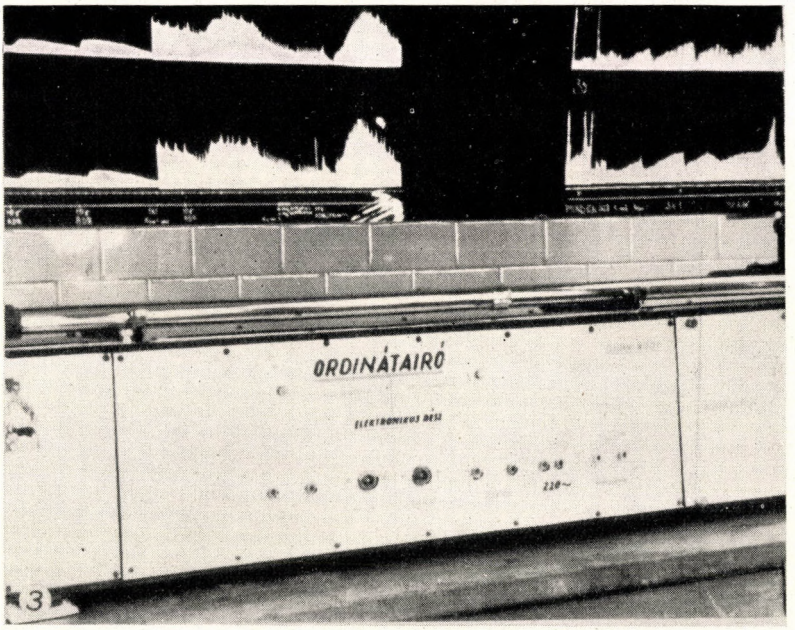


Abb. 3. Schalttafel des elektronischen Teiles

bis zu einem mit Schraube einstellbaren Anhalter vorwärtsschieben. Auf diese Weise bereitet dem Experimentator die an sich schwierige Einstellung der vier übereinander funktionierenden Zeiger (zwei Ordinatenschreiber, Zeitanzeiger- und Reizsignal) keine Schwierigkeiten. Neben der hinteren Trommel des Kymographen befinden sich der den Kymographen antreibende Motor und die die Geschwindigkeit variierende Vorrichtung, mit der 3 sprungartige Geschwindigkeiten eingestellt werden können ; die Sicherung der Übergänge ist durch die unter der Trommel angebrachte Friktionsscheibe gewährleistet. Die Länge des Papiers kann man innerhalb gewisser Grenzen in der Weise verändern, dass man die hintere Trommel der vorderen näherbringt.

Die Schaltung des elektronischen Teiles erfolgt an der an der Seite des Apparates angebrachten Schalttafel (Abb. 3). Die beiden Systeme (d. h. die beiden durch den unteren und oberen Zeiger repräsentierten Schreibvorrichtun-

gen) können mit Hilfe je eines Schalters gesondert in Tätigkeit gesetzt werden; auf der Schalttafel sind die für Wechselstrom von 220 V und für die beiden Elektrodenpaare gebildeten Einleitungen sowie die die Tätigkeit anzeigenden Lampen sichtbar. Neben dem elektronischen Teil ist der Zeitsignalisierungsapparat untergebracht (Abb. 1). Sein Antrieb geschieht durch einen Synchron-

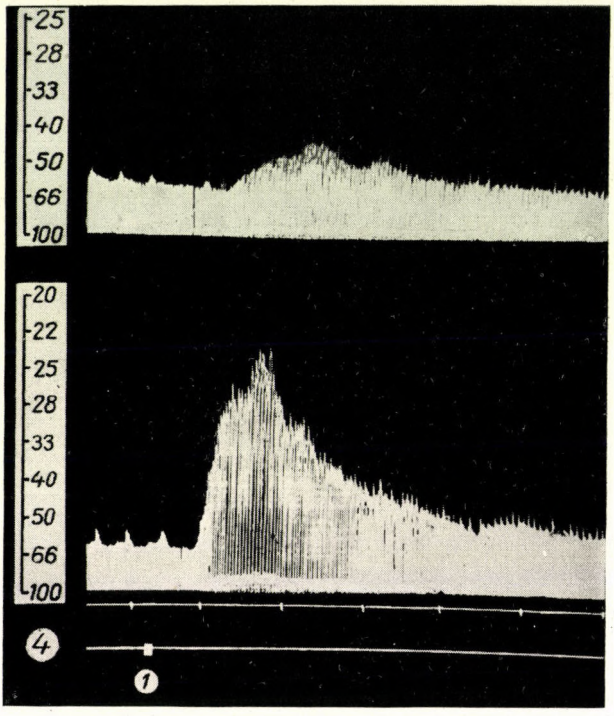


Abb. 4. Wirkung von Adrenalin auf die isoliert durchströmten hinteren Extremitäten des Hundes. Untere Reihe: denervierte Seite; obere Reihe: Gefässreaktion der innervierten Extremität. Zeit: 60 Sek. Geschwindigkeit des Antriebwerkes 3 sec/10 cm

motor, der durch Bewegung von Zahnrädern drei Kontakte hebt und so durch einen Wechselstromtransformator in Intervallen von 4, 16 oder 60 Sek. das Zeitsignal in Tätigkeit setzt.

Am vorderen Teil des Apparates sieht man die Schreibvorrichtung (Abb. 2), die durch eine Kunststoffbekleidung geschützt wird. Darunter befindet sich die Hauptschalttafel, an der die zur Einstellung des Antriebwerkes, des Kymographen und des Zeitsignalisierungsapparats dienenden Schalter, ferner der ständige und periodische Schalter des reizanzeigenden Signals und schliesslich die Reihenschalter zur Einstellung der der Kymographengeschwindigkeit entsprechenden Zeitzeichen anzutreffen sind.

Der Schalter zur Einstellung der Geschwindigkeit des Antriebwerkes befindet sich an der Seite der Apparatur, so dass ihn der neben dem Hauptschalter sitzende Experimentator zu erreichen und die optimale Antriebsgeschwindigkeit einzustellen vermag. Ebenfalls in der Nähe des Hauptschalters ist auch der Schaltknopf für die mechanische Vorrichtung, mit der einer der Schreiber ausser Betrieb gesetzt werden kann.

Registrierung der Gefässreaktionen

Der vor den Versuchen in Tätigkeit gesetzte Ordinatenschreiber zieht auf dem Papier des Kymographen mit einer durch das Geschwindigkeitswechselgetriebe des Antriebwerkes und Kymographen bestimmten Dichtigkeit und Geschwindigkeit Linien von gleicher Höhe (8 cm). Wird das Elektrodenpaar vor dem vollständigen Anlauf der Zeiger von den Tropfen geschlossen, so laufen die Zeiger nur auf einem kleineren Abschnitt ihrer Bahn und fallen auf ihren Ausgangspunkt zurück. Bei einer frequenteren Tropfzahl fallen die Zeiger bereits am Anfangsabschnitt ihrer Bahn zurück. Auf diese Weise geben die vom sich bewegenden Kymographen durch die Zeiger markierten Gebiete ein getreues Spiegelbild der Veränderungen der Tropfzahl bzw. des venösen Ausflusses.

Bei dem auf Abb. 4 dargestellten Versuch ist die Gefässwirkung von je 5 μg Adrenalin, welche in die beiden Art. femorales injiziert wurden, auf die normale (obere Abb.) und denervierte (untere Abb.) hintere Extremität eines 9 kg schweren Hundes zu sehen. Die Denervation erfolgte 23 Tage vor dem Versuch mittels Durchtrennung des N. ischiadicus. Die Perfusion der Extremität geschah mit 2% rote Blutkörperchen enthaltender LOCKE-Lösung. Die vaskuläre Wirkung des Adrenalins auf die normale und denervierte Extremität lässt sich gut vergleichen ; die Denervations-Überempfindlichkeit tritt ausgeprägt in Erscheinung.

Registrierung der Herzfrequenz

Die Registrierung der Herzfrequenz erfolg ähnlich wie die Tropfzahlregistrierung, mit dem Unterschied, dass die Arbeit des Herzens einen Quecksilberkontakt in Tätigkeit bringt [3] und dieser anstelle des Elektrodenpaares an die Apparatur angeschlossen wird. In diesem Fall muss das eine System mit dem entsprechenden Schalter ausgeschaltet werden.

Die Registrierung höherer Frequenzbereiche kann mit zwei stabilen elektronischen Unterteilungsvorrichtungen vorgenommen werden, die vor dem elektronischen Teil eingebaut werden.

Auswertung

Nach dem Versuch lässt sich mit Hilfe eines auf das fixierte Kymographenpapier gelegten Abszissenlineals die jeweilige Tropfzahl bzw. Herzfrequenz — unter Berücksichtigung der Geschwindigkeit des Antriebwerkes — genau feststellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein zur kontinuierlichen graphischen Registrierung der Gefässreaktionen und Herztätigkeit dienender Ordinatenschreiber-Apparat wird beschrieben.

LITERATUR

1. Clementz, B., Ryberg, C. E.: Acta Physiol. Scand. **32**, 259 (1954).
2. Forst, A. W., Heuwig, K.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **219**, 349 (1953).
3. Genuit, H.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **221**, 1 (1954).

ANALYSE DER BIPHASISCHEN WIRKUNG VON ADRENALIN AN KÜNSTLICH DURCHSTRÖMTER HINTERER EXTREMITÄT DES HUNDES

Von

E. SZÜCS, E. HETÉNYI und I. WENT

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 25. September 1956)

Das in die Blutbahn eingeführte Adrenalin übt bekanntlich zweifache — konstriktorische und dilatatorische — Wirkung aus. Sowohl bei Tierversuchen [7, 12, 13, 15, 16, 18, 25, 28, 30, 31, 45] als auch am Menschen [1, 4, 19, 39, 40] ist regelmässig zu beobachten, dass die Durchströmung auf den meisten Gebieten der Skelettmuskulatur von Adrenalin gesteigert wird.

Von den zur Erklärung des dilatatorischen Wirkungsmechanismus aufgestellten Theorien sind diejenigen am besten begründet, welche für die durchströmungsfördernde Wirkung des Adrenalins cholinerge Mechanismen verantwortlich machen. Bei der Untersuchung des Entstehungsmechanismus der biphasischen Adrenalinwirkung vermochten wir festzustellen [42, 43, 44], dass die depressorische Wirkung des Adrenalins an gewisse Nervenstrukturen gebunden ist und dass während der depressorischen Wirkung in den durchströmten Geweben Azetylcholin freigesetzt wird.

In vorliegender Arbeit untersuchten wir eingehend die »umgekehrte« Wirkung des Adrenalins und den für die Mobilisierung des antagonistischen Mediators verantwortlichen neuralen Mechanismus.

Methoden

Die Versuche wurden an 85 Hunden — mit einem Gewicht von 10—20 kg — vorgenommen; 5—10 Minuten vor dem Versuch erhielten die Tiere intravenös 0,2 ml/kg 5%iges Heparin [26]. Unmittelbar vor Beginn der Perfusion liessen wir die Hunde verbluten und banden sodann in die beiden Art. femoralis und die beiden V. femorales Kanülen ein, d. h. es wurden die beiden Extremitäten durch die Arterie gesondert perfundiert. Die Perfusionsflüssigkeit (Locke-Lösung: pH 7,4, 37°—38° C) enthielt 5—10% gewaschene rote Hundeblutkörperchen. Die einströmende Lösung wurde während der Versuchsdauer kontinuierlich oxygenisiert. Die Gefässreaktionen registrierten wir mit dem von SZÜCS und BALLA [41] konstruierten Doppel-Ordinatenschreiber-Apparat.

Die Einführung der verwendeten Wirkstoffe erfolgte in Locke-Lösung. Adrenalin wurde in Mengen von 0,1—10 μg gegeben, und die Lösungen durch Zugabe von 5 mg% Vitamin C stabilisiert. — Ergotamin, Atropin, Skopolamin, Hexamethonium, Eserin, DFP, Tetraäthylpyrophosphat und Nikotin gelangten in Form von 5—20 Minuten dauernden Infusionen zur Anwendung. Botulinus-Toxin* wurde akut oder 3 Tage vor den Perfusionsversuchen in Äthernarkose verabreicht [2]. Die verwendete Menge war das Doppelte bis Dreifache der von HILTON [29] empfohlenen Dosis (0,1—0,15 ml Toxin Typ B, DL_{50} [Maus]: 0,0001 ml).

*Auch an dieser Stelle danken wir dem Mikrobiologischen Institut der Medizinischen Universität, Debrecen und Assistenten Dr. Z. MELLES für die Herstellung und Titrierung des Botulinus-Toxins.

Ergebnisse

1. Gefässreaktionstypen nach Adrenalinverabreichung

Bei vorangegangenen Versuchen, die wir an den mit Locke-Lösung durchströmten hinteren Extremitäten von Fröschen und Kaninchen vorgenommen hatten, konnten wir feststellen, dass nach der Adrenalin-Infusion oder -Injektion mehr oder minder regelmässig eine biphasische Gefässwirkung auftritt. Bei den vorliegenden Versuchen beobachteten wir nach der Adrenalin-Injektion die auf Abb. 1 dargestellten Reaktionstypen.

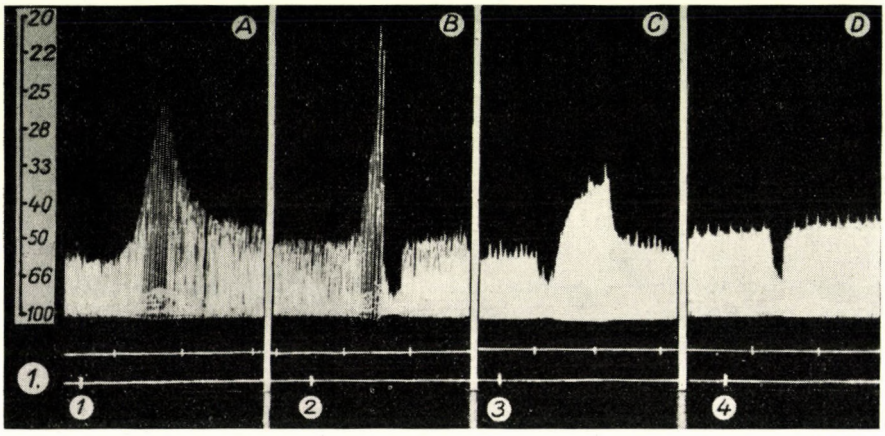


Abb. 1. Perfusionsversuch an künstlich durchströmter hinterer Extremität des Hundes; Wirkung identischer Adrenalinmengen, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Perfusion i. a. gegeben wurden. *D* unmittelbar nach Beginn der Perfusion; *B* u. *C* 10 bzw. 20 Minuten, *A* 50 Minuten nach Beginn der Perfusion. Ordinate: Tropfanzahlwerte; Zeit: 60 Sek.

Unmittelbar nach dem Beginn der Perfusion tritt auf 1—2.5 μg Adrenalin vorwiegend eine einfache, schnell ablaufende Vasodilatation ein. Im weiteren Verlauf der Perfusion zwischen den 2.—30. Minuten waren regelmässig biphasische Gefässwirkungen zu beobachten. Bei früheren Versuchen an mit blutkörperchenfreier Locke-Lösung durchströmten Extremitäten haben wir häufig beobachtet, dass die dilatatorische Wirkung nach der konstriktorischen auftrat (Abb. 1, *B*). Im Laufe der gegenwärtigen Versuche — bei Anwendung von roten Blutkörperchen enthaltendem Perfusat — trat dieser Reaktionstyp selten und unregelmässig in Erscheinung. Bei diesen Versuchen — wo die Anwendung des Ordinatenschreibers die genaue Registrierung der rasch vor sich gehenden Veränderungen ermöglichte — sahen wir in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle primär auftretende Dilatation und nachfolgende Vasokonstriktion (Abb. 1, *C*). Auch die meisten Literaturangaben weisen auf die Häufigkeit eines solchen Reaktionstyps hin [1, 4, 12—16, 18, 19, 25—32, 37, 45]. Schliesslich erscheint regelmässig

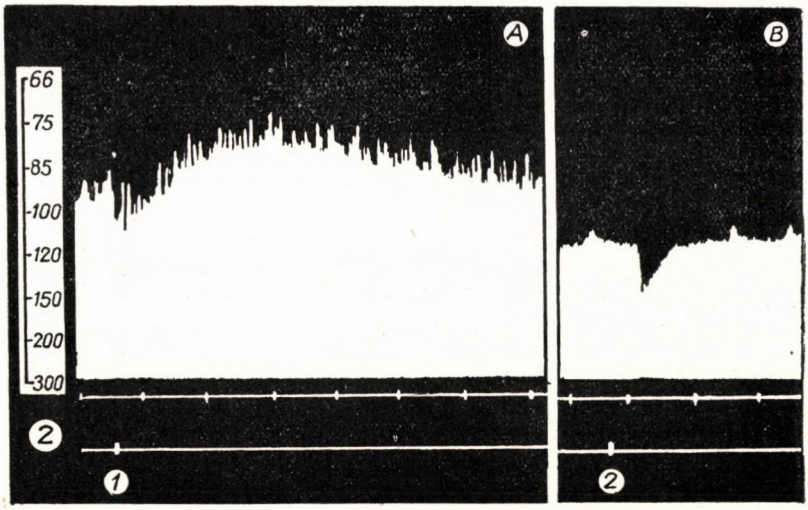


Abb. 2. A: Wirkung von 10 μg Adrenalin; *B:* nach Infusion von 20 mg Ergotamin bleibt die Pressorwirkung aus, die dialatatorische Wirkung nimmt zu. Zeit: 60 Sek.

der auf Abb. 1, *A* dargestellte Typ (einfache Pressorwirkung) nach der 30.—40. Minute der Perfusion; dieser Reaktionstyp kommt nach unseren eigenen Beobachtungen und auch nach Literaturangaben [5, 9, 26, 33, 39, 45] nach dem Typ *C* am häufigsten vor.

2. *Analyse der biphasischen Adrenalinwirkung*

Die meisten Autoren sind sich darüber einig, dass es sich bei der bekannten gefässverengernden Wirkung des Adrenalins um eine adrenerge, mit Ergot-Alkaloiden hemmbare Wirkung handelt. Auch bei unseren Versuchen blieb die

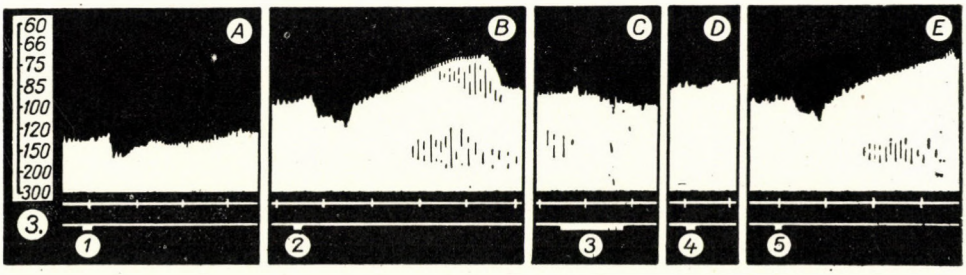


Abb. 3. A: Gefässwirkung von 2 mg Histamin (die Histaminempfindlichkeit des Präparates war auffallend niedrig); *B:* Gefässwirkung von 10 μg Adrenalin vor und *E:* nach Antistin (Ciba). *C:* 2 ml Antistin; *D:* Kontrolle der Histamin-Hemmung. Zeit: 60 Sek.

Pressorwirkung des Adrenalins bei Anwendung eines ergotaminhaltigen Perfusates aus, und lediglich die dilatatorische Wirkung trat in Erscheinung (Abb. 2).

Die nach Adrenalin eintretende Vasokonstriktion konnte unter unseren experimentellen Bedingungen mit Atropin, Skopolamin, Hexamethonium, Antistin und Botulinus-Toxin nicht gehemmt werden. Auf diese Tatsache werden wir noch zurückkommen.

Für die cholinerge Natur der nach Adrenalin primär auftretenden Durchströmungssteigerung spricht unsere Beobachtung [43, 44], dass das abfliessende Perfusat während der Entwicklung dieser Wirkung eine beträchtliche Menge Azetylcholin enthält. Den Mechanismus der auf Adrenalinwirkung stattfindenden Azetylcholinmobilisierung suchten wir einerseits durch Anwendung verschiedener hemmender Substanzen, anderseits in Versuchen an denervierten Extremitäten zu klären.

a) *Versuche mit Antistin*

Da Atropin bei einem erheblichen Teil unserer Versuche die auf die Adrenalin-Injektion folgende Durchströmungssteigerung nicht abzuwehren vermochte, ergab sich die Möglichkeit der histaminergen Natur dieser Wirkung, eventuell in der Form, dass in der Entstehung der Dilatation das vom Azetylcholin freigesetzte Histamin [6] eine Rolle spielt.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, vermochten 2 ml Antistin *(Ciba)* die Wirkung von 2 mg Histamin abzuwehren (*A* und *D*), waren aber gleichzeitig auf die vasodilatatorische Wirkung von 10 μg Adrenalin ohne Einfluss. Der Umstand, dass Antistin die nach Adrenalin eintretende Vasodilatation in keinem einzigen unserer Versuche beeinflusste, deutet darauf hin, dass im Zustandekommen dieser Wirkung ein histaminerger Mechanismus auch mittelbar keine Rolle spielen kann.

b) *Versuche mit Parasympatholytika und Botulinus-Toxin*

Die dilatatorische Komponente der biphasischen Wirkung nach Adrenalinverabreichung und Sympathikusreizung ist laut zahlreichen Beobachtungen cholinerger Natur. Diese Auffassung wird durch die Beobachtungen unterstützt, wonach aus den verschiedenen Organen und Geweben auf Adrenalinreiz [42, 43, 44] oder auf Reizung der sympathischen Fasern [10, 11, 17, 22] Azetylcholin frei wird und die dilatatorische Wirkung mit Atropin bzw. Botulinus-Toxin gehemmt werden kann [3, 10, 21].

Bei unseren Versuchen hat sich die Hemmwirkung von Atropin auf die nach Adrenalingabe eintretende Vasodilatation nicht als eindeutig erwiesen. In zahlreichen Fällen war zu beobachten, dass Atropin die nach Adrenalin eintretende Zunahme der Durchströmung weder am ergotaminisierten, noch an dem mit Ergotamin nicht behandelten Präparat aufzuheben vermochte. Das

gleiche gilt für Skopolamin, welches diese Wirkung weder allein (in der von FRANK und Mitarbeitern [24] empfohlenen Dosis), ja in einzelnen Versuchen auch bei gleichzeitiger Verabfolgung mit Atropin nicht zu hemmen vermochte.

Die unsichere parasympatholytische Wirkung des Atropins bei derartigen Versuchen bestätigt die Beobachtung von DALE und GADDUM [17], wonach sich die Erregung gewisser parasympathischer Nerven mit Atropin kaum beeinflussen lässt. Da aber unsere Beobachtungen (Mobilisierung von Azetylcholin, die durchströmunssteigernde Wirkung der cholinesterasehemmenden Mittel) für die cholinerge Natur der Erscheinung sprechen, suchten wir den Mechanis-

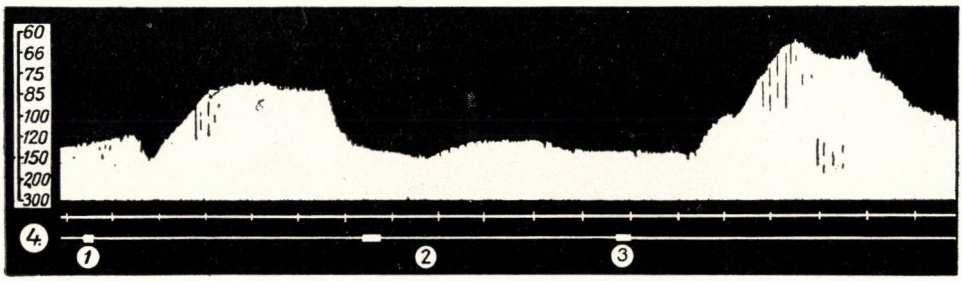


Abb. 4. Gefässwirkung von 10 μg Adrenalin vor und nach Anwendung von 0,1 ml 10fach verdünntem Butolinus-Toxin. Zeit: 60 Sek.

mus derselben durch Anwendung von Botulinus-Toxin zu klären. Die Versuche mit Botulinus-Toxin führten zu einheitlichen Resultaten, sowohl wenn wir es intraarteriell verabreichten, wie auch dann, wenn es 3 Tage vor dem Versuch als i. m. Injektion gegeben wurde.

Auf Abb. 4 ist zu sehen, dass die durch 10 μg Adrenalin hervorgerufene Dilatation nach Injektion von 0,1 ml Botulinus-Toxin ausbleibt, als Zeichen dafür, dass für diese Wirkung die dem Botulinus-Toxin gegenüber spezifisch empfindlichen peripheren parasympathischen Nervenendungen verantwortlich zu machen sind.

c) *Versuche mit cholinesterasehemmender Substanzen*

In früheren Arbeiten hatten wir festgestellt, dass der Azetylcholingehalt des aus dem isoliert durchströmten Herzen bzw. der hinteren Extremitäten abfliessenden Perfusates nach einer Adrenalingabe wesentlich gesteigert wird. Auf Grund dieser Beobachtungen hatten wir den Standpunkt eingenommen, dass für die Depressorwirkung des Adrenalins das auf Adrenalinreiz frei werdende und an verschiedenen biologischen Testobjekten gut identifizierbare Azetylcholin verantwortlich sei. Bei vorliegenden Versuchen brachten wir, um diese Rolle des Azetylcholins weiter zu klären, 3 cholinesterasehemmende Substanzen

zur Anwendung: Diisopropylfluorophosphat (DFP), dessen cholinesterasehemmende Eigenschaft von LANGE und KRÜGER [35] festgestellt wurde, Tetraäthylpyrophosphat [46] und Eserin. Wie auf den Abb. 5 und 6 ersichtlich, wurde die durchströmungssteigernde Wirkung des Adrenalins von sämtlichen drei cholinesterasehemmenden Substanzen ausgeprägt erhöht. Die Versuche

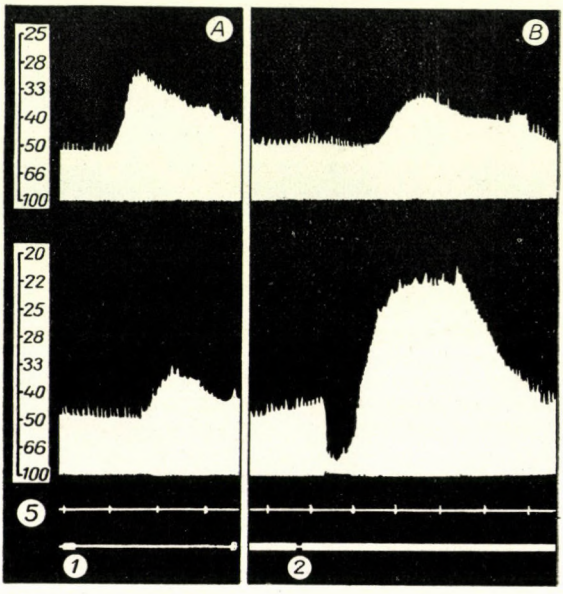


Abb. 5. Einfluss von DFP auf die dilatatorische Komponente der nach Adrenalingabe entstandenen Gefässreaktion. *A:* Je 5 μg Adrenalin riefen auf beiden Seiten annähernd die gleiche Gefässreaktion hervor; *B:* das Perfusat der linken hinteren Extremität (untere Reihe) enthielt DFP in der Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ *M*; nach Verabreichung von 5 μg Adrenalin in der 28. Minute der DFP-Infusion trat die dilatatorische Reaktion erheblich stärker in Erscheinung, während die Reaktion der als Kontrolle dienenden rechten Extremität (obere Reihe) auf Adrenalin unverändert blieb. Zeit: 60 Sek.

mit Eserin ergaben in jeder Hinsicht die gleichen Resultate wie die Versuche mit DFP.

d) *Versuche mit Hexamethonium*

SWAN [39] wies i. J. 1950 auf die Möglichkeit hin, dass im Entstehungsmechanismus der auf Adrenalin eintretenden Zunahme der Durchströmung ganglionäre Elemente eine entscheidende Rolle spielen. Die Ergebnisse unserer mit Hexamethonium vorgenommenen Versuche sprechen für die Richtigkeit dieser Annahme.

Hexamethonium in einer Menge von 2—5 mg hebt die dilatatorische Wirkung des Adrenalins auf, oder setzt sie beträchtlich herab. Wie Abb. 7 zeigt, bleibt die durchströmungssteigernde Wirkung von 20 μg Adrenalin nach i. a. Anwendung von 3 mg Hexamethonium aus.

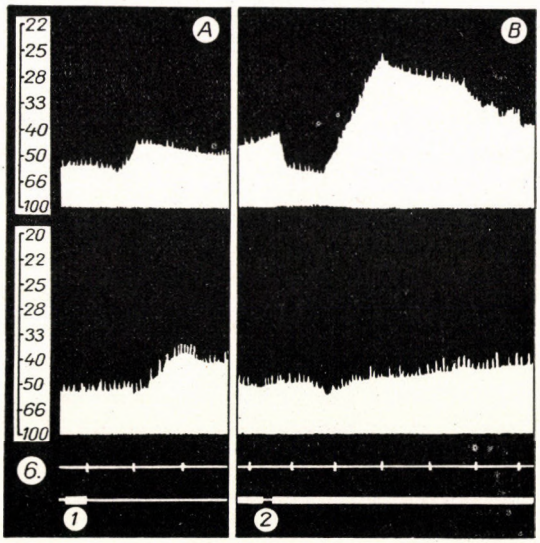


Abb. 6. Einfluss von TEPP auf die dilatatorische Komponente der auf Adrenalin zustande gekommenen Reaktion. *A:* Wirkung von je 5 μg Adrenalin; *B:* das Perfusat der rechten Extremität (obere Reihe) enthielt Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) in der Konzentration 10^{-7} *M*; nach Verabreichung von 5 μg Adrenalin in der 22. Minute der TEPP-Infusion nahm die dilatatorische Reaktion erheblich zu, während die dilatatorische Reaktion der als Kontrolle dienenden linken Extremität (untere Reihe) auf Adrenalin unverändert blieb. Zeit: 60 Sek.

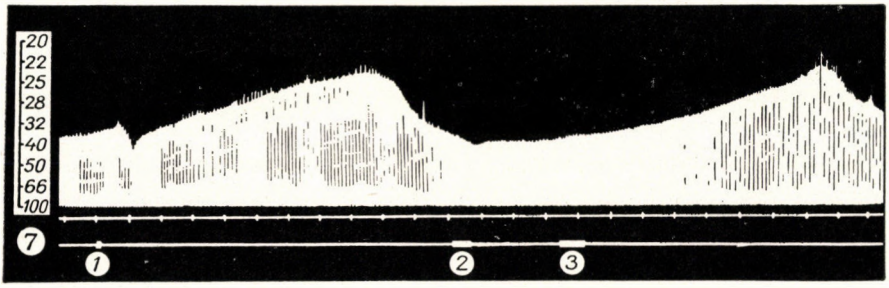


Abb. 7. Die durchströmungssteigernde Wirkung von 20 μg Adrenalin blieb nach Zugabe von 3 mg Hexamethonium aus, während die konstriktorische Wirkung unverändert in Erscheinung trat. Zeit: 60 Sek.

Besprechung der Ergebnisse

Die gefässerweiternde, durchströmungssteigernde Wirkung des Adrenalins wurde von zahlreichen Autoren beobachtet, und es sind viele Theorien und Erklärungen über die Ursachen dieser Wirkung vorhanden. Nach der Theorie von OLIVER und SCHÄFER [38] beruht die Zunahme der Durchströmung der Muskelgefässe darauf, dass das Blut der sich stark kontrahierenden mesenterialen Arterien auf Wirkung des Adrenalins in die sich weniger kontrahierenden

Muskelgefässe strömt. Von den Theorien über den Mechanismus der biphasischen Wirkung [20] erscheinen jene am besten begründet, welche die dilatatorische Wirkung des Adrenalins auf die Erregung der cholinergen, sympathischen Dilatatoren zurückführen. Diese Auffassung wird von BURN [8], BÜLBRING und BURN [10], MALTHESOS und SCHNEIDER [37] sowie FOLKOW und UVNÄS [23] vertreten, die ihre Richtigkeit durch überzeugende Versuche bestätigten.

Auch wir deuten die in den Gefässgebieten der hinteren Extremitäten nach Adrenalin eintretende Vasodilatation als eine Folge der Erregung peripherer cholinerger Nervenelemente. Im Rahmen vorliegender Versuche haben wir diesen cholinergen Mechanismus näher untersucht.

Zuerst beobachteten wir die auf Adrenalinwirkung eintretenden Gefässreaktionen. Wir vermochten vier derartige Typen zu unterscheiden. Auf das unmittelbar nach Beginn der Perfusion gegebene Adrenalin reagierten die Gefässe in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle — wenn die verwendete Adrenalinmenge innerhalb der physiologischen Grenzen lag (0,1—2,5 μg) — mit Dilatation. Erst im weiteren Verlauf der Perfusion, etwa zwischen der 2. und 30.—40. Minute, erschienen biphasische Reaktionen, und zwar überwiegend in der Form, dass die dilatatorische Reaktion vor der Konstriktion auftrat. Reaktionen, wo primär die Vasokonstriktion und erst hiernach die Vasodilatation in Erscheinung trat, waren nur sehr selten zu beobachten. Nach der 30.—40. Minute der Perfusion verschwinden die biphasischen Reaktionen immer mehr, und nach Adrenalin tritt einfache Vasokonstriktion auf.

Die Gefässreaktionstypen nach Adrenalin sind laut CLARK [14] von dem durch die Temperatur des Tieres determinierten physiologischen Zustand abhängig. Unserer Ansicht nach lässt sich die Verschiedenheit der Reaktionen dadurch erklären, dass die Nervenstrukturen der durchströmten Extremität im Laufe der Perfusion immer mehr ihre Fähigkeit verlieren, auf den Adrenalinreiz mit der Mobilisierung des antagonistischen Wirkstoffes zu reagieren. Diese Annahme findet eine Stütze einerseits in unserer Beobachtung, dass die biphasischen Wirkungen durch Erhöhung des Gehaltes der Perfusionsflüssigkeit an roten Blutkörperchen oder durch Perfusion mit Vollblut (gekreuzte Kreislaufversuche) beinahe in unbeschränkter Zahl wiederholt werden können, anderseits in der Feststellung, dass der Azetylcholingehalt des aus der Extremität abliessenden Perfusates bei fortschreitender Perfusion von einfacher oder adrenalinhaltiger Locke-Lösung ständig abnimmt.

Die cholinerge Natur der dilatatorischen Adrenalinwirkung wird auch dadurch bewiesen, dass diese Wirkung mit Botulinus-Toxin regelmässig abgewehrt werden kann. Man könnte sich demnach vorstellen, dass Adrenalin — unter Mitwirkung eines speziellen neuralen Mechanismus — an der Peripherie die Erregung der parasympathischen Endapparate bzw. Azetylcholinmobilisierung hervorruft und letztere für die nach Adrenalingabe eintretende Durchströmungssteigerung verantwortlich gemacht werden kann. Die mit Botulinus-

Toxin und Atropin ausgeführten Versuche weisen darauf hin, dass an der Azetylcholinmobilisierung gegen Botulinus-Toxin besonders empfindliche cholinerge Endigungen mitwirken.

Versuche mit dem ganglienblockierenden Hexamethonium zeigten, dass in der Azetylcholinmobilisierung Hexamethonium-empfindliche periphere ganglionäre Elemente ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. Das Vorhandensein derartiger peripherer Ganglien wurde zuerst 1922 von KROGH [34] nachgewiesen.

Im Mechanismus des auf Adrenalinwirkung zustande kommenden Freiwerdens von Azetylcholin dürfte der Angriffspunkt des chemischen Reizes in peripheren ganglionären Strukturen und — nach den Ergebnissen unserer Versuche mit Botulinus-Toxin — in cholinergen peripheren Nervenendigungen zu suchen sein. Unsere Resultate unterstützen unsere früheren Feststellungen, wonach es sich bei der nach Adrenalingabe eintretenden Vasodilatation um eine Folge der Azetylcholinmobilisierung handelt, während — wie unsere Versuche mit Antihistaminen ergaben — dem Freiwerden von Histamin in dieser Hinsicht keine wesentliche Rolle beigemessen werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung der biphasischen Wirkung von Adrenalin an den mit gewaschene rote Hundeblutkörperchen enthaltender Locke-Lösung durchströmten hinteren Extremitäten des Hundes führte zu folgenden Feststellungen:

1. Nach intraarterieller Verabreichung von 0,5—20 μg Adrenalin trat in der überwiegenden Mehrzahl der Versuche eine biphasische Wirkung auf. Bei den meisten Versuchen war vor der bekannten vasokonstriktorischen Adrenalinwirkung eine »umgekehrte« vasodilatatorische Wirkung zu beobachten.

2. Die konstriktorische Wirkung lässt sich mit Ergotamin aufheben; auf die dilatatorische Adrenalinwirkung hat das Ergotamin keinen Einfluss.

3. Durch cholinesterasehemmende Substanzen (DFP, Tetraäthylpyrophosphat, Eserin) wird die depressorische Wirkung nach Adrenalingabe gesteigert; dies steht in Einklang mit unserer früheren Feststellung, wonach die umgekehrte Wirkung durch Freiwerden von Azetylcholin hervorgerufen wird.

4. Botulinus-Toxin hebt die dilatatorische Wirkung des Adrenalins auf, während die dilatationshemmende Wirkung der allgemein verwendeten Parasympatholytika (Atropin, Skopolamin) sich als inkonsequent und zweifelhaft erwiesen hat. Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Azetylcholinmobilisierung cholinerge Endigungen mitwirken, die dem Botulinus-Toxin gegenüber spezielle Empfindlichkeit aufweisen.

5. Durch intraarteriell gegebenem Hexamethonium wurde die durchströmungssteigernde Wirkung des Adrenalins vollständig aufgehoben, als Zeichen dafür, dass an der Azetylcholinmobilisierung Hexamethonium-empfindliche periphere ganglionäre Elemente ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. Auf die auf Adrenalin eintretende Vasokonstriktion war das Hexamethonium ohne Einfluss.

6. An dem mit Antistin behandelten Präparat tritt die umgekehrte dilatatorische Wirkung des Adrenalins unverändert in Erscheinung.

7. Im Mechanismus des Freiwerdens von Azetylcholin auf Adrenalinwirkung dürfte der Angriffspunkt des chemischen Reizes in den peripheren ganglionären Strukturen und — wie Versuche mit Botulinus-Toxin ergaben — in den cholinergen peripheren Nervenendigungen zu suchen sein.

LITERATUR

1. ALLEN, W. J., BARCROFT, H., EDHOLM, O. G.: J. Physiol., **105**, 255 (1946).
2. AMBACHE, N.: J. Physiol. **108**, 127, 1949 ; **113**, 1 (1951).
3. BANISTER, J., SCRASE, M.: J. Physiol. **111**, 437 (1950).
4. BARCROFT, H., KONZETT, H.: J. Physiol. **110**, 194 (1949).
5. BINET, L., BURSTEIN, M.: Compt. rend. soc. biol. **141**, 630 (1947).
6. BORBOLA, J., BIKICH, GY., HETÉNYI, G.: Magyar. Tud. Akad. V. Oszt. Közl. **3**, 463 (1952).
7. BURN, J. H., DALE, H. H.: J. Physiol., **61**, 185 (1926).
8. BURN, J. H.: J. Physiol., **75**, 144 (1932).
9. BÜCHERL, W., SCHWAB, M.: Arch. ges. Physiol. **254**, 327 (1952).
10. BÜLBRING, E., BURN, J. H.: J. Physiol., **83**, 483 (1935).
11. BÜLBRING, E., BURN, J. H.: J. Physiol., **87**, 254 (1936).
12. BÜLBRING, E., BURN, J. H.: J. Physiol., **88**, 341 (1937).
13. BURN, J., CLARK, G. A.: J. Physiol., **69**, 171 (1930).
14. CLARK, G. A.: J. Physiol., **80**, 429 (1934).
15. CORI, C. F., FISCHER, R. E., CORI, G. T.: Am. J. Physiol., **114**, 53 (1935/36).
16. DALE, H. H., RICHARDS, A. N.: J. Physiol., **52**, 110 (1918).
17. DALE, H. H., GADDUM, J. H.: J. Physiol., **70**, 109 (1930).
18. MCDOWALL, R. J. S.: J. Physiol. **111**, 1 (1950).
19. DUFF, R. S., SWAN, H. J. C.: J. Physiol. **114**, 41 (1951).
20. DÖRNER, J.: Arch. ges. Physiol. **257**, 464 (1953).
21. ELIASSON S., LINDGREEN, P., UVNÄS, B.: Acta Physiol. Scand., **27**, 18 (1952).
22. v. EULER, U. S., GADDUM, J. H.: J. Physiol., **73**, 54 (1931).
23. FOLKOW, B., UVNÄS, B.: Acta Physiol. Scand., **15**, 383 (1948).
24. FRANK, E., NOTHMANN, M., HIRSCH-KAUFFMANN, H.: Arch. ges. Physiol. **198**, 391 (1923).
25. GAYET, R., GAYET, TH., GUILLAUMIE, M.: Compt. rend. soc. biol. **97**, 1145 (1927).
26. GOTSEV, T.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., **195**, 348 (1940).
27. GOTTSTEIN, U., HILLE, H., OBERDORF, A.: Arch. ges. Physiol. **261**, 78 (1955).
28. GUNNING, R. E. L.: Am. J. Physiol., **43**, 395 (1917).
29. HILTON, S. M.: J. Physiol. **123**, 289 (1954).
30. HOSKIN, R. G., GUNNING, R. E. L., BERBY, E. L.: Am. J. Physiol., **41**, 513 (1916).
31. IMIG, CH. J., RANDALL, B. F., HINES, H. M.: Am. J. Physiol., **169**, 22 (1953).
32. KLEINSORG, H., SCHNIER, J.: Arch. ges. Physiol. **254**, 430 (1952).
33. KONZETT, H.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., **197**, 41 (1941).
34. KROGH, A.: The Anatomy and Physiology of Capillaries. 2d ed. Yale Univ. Press. New Haven. 1929.
35. LANGE, H., KRÜGER, G.: Ber. Dtsch. Chem. Ges., **65**, 1598 (1930). Zit.: RIESSER, O.: Muskelpharmakologie. Huber. Bern. 1949.
36. LINDGREEN, P., UVNÄS, B.: Acta Physiol. Scand., **33**, 108 (1955).
37. MALTHESOS, C., SCHNEIDER, M.: Arch. ges. Physiol. **241**, 154 (1939).
38. OLIVER, G., SCHÄFER, E. A.: J. Physiol., **18**, 230 (1895).
39. SWAN, H. J. C.: J. Physiol., **111**, 5P. (1950).
40. SWAN, H. J. C.: J. Physiol. **112**, 426 (1951).
41. SZŰCS, E., BALLA, L.: Acta Physiol. Hung. **11**, 309 (1957).
42. SZŰCS, E., HETÉNYI, E. : Acta Physiol. Hung. **11**, 305 (1957).
43. WENT, I., SZŰCS, E., KOVÁCS, T.: Acta Physiol. Hung. **6**, 47 (1954).
44. WENT, I., SZŰCS, E., HETÉNYI, E.: Acta Physiol. Hung. **9**, 193 (1956).
45. WIEMERS, K.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., **213**, 314 (1951).
46. WRIGHT, C. J., SABINE, J. S.: J. Pharmacol. **93**, 230 (1948).

UNTERSUCHUNG DER AUF ADRENALINWIRKUNG PRIMÄR AUFTRETENDEN VASODILATATION AN DENERVIERTEN STRUKTUREN

Von

E. SZÜCS, E. HETÉNYI und I. WENT

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 25. September 1956)

In vorangegangenen Mitteilungen [23, 24, 28, 29] hatten wir darauf hingewiesen, dass die durch Adrenalin hervorgerufene Vasodilatation eine Folge der auf Adrenalinreiz eintretenden Azetylcholinmobilisierung sei. Als Angriffspunkt des chemischen Reizes im Mechanismus der auf Adrenalinwirkung vor sich gehenden Azetylcholinmobilisierung bezeichneten wir die peripheren ganglionären Strukturen und cholinergen Nervenendigungen. Die vorliegend besprochenen Versuche dienten der weiteren Klärung dieses neuralen Mechanismus.

Methoden

Die Versuche wurden an Hunden von 10—20 kg Gewicht vorgenommen. Zu verschiedenen Zeitpunkten (15 Stunden bis 90 Tage) vor dem Versuch wurde bei einer Gruppe der Tiere (50 Hunde) halbseitige Ischiadicusdurchtrennung, bei der anderen Gruppe (13 Hunde) halbseitige abdominale Sympathektomie durchgeführt. Die Hunde wurden in Morphin-Evipannarkose operiert. Die halbseitige Ischiadicusdurchtrennung erfolgte durch gluteales Eindringen, wobei eine Strecke von 3—5 cm des Nervenstammes entfernt wurde. Den lumbo-sakralen Abschnitt des halbseitigen Sympathikus-Grenzstranges resezierten wir durch Eindringen von vorn.

Die Durchströmung der hinteren Extremitäten wurde nach der in einer vorigen Mitteilung [24] beschriebenen Methode ausgeführt. Die in die beiden Art. femorales der vorher heparinisierten und anschliessend zum Verbluten gebrachten Hunde einfliessende Locke-Lösung enthielt 5—10% gewaschene rote Hundeblutkörperchen. Die Gefässreaktionen der intakten und denervierten Seite registrierten wir mit dem Doppel-Ordinatenschreiber-Apparat [22].

Ergebnisse

a) *Versuche an mit Durchtrennung des N. ischiadicus denervierten Extremitäten*

PERRY und REINERT [18] hatten festgestellt, dass dezentralisierte Ganglien mit Hexamethonium nicht gelähmt werden können, weil sie arm an Kalium werden. Ferner ist bekannt [17, 19], dass Nikotin — im Hinblick auf seine depolarisierenden Eigenschaften — imstande ist, die Transmission auch in dekonnektierten Ganglien zu hemmen. Wir untersuchten die nach Adrenalingabe auftretenden Gefässreaktionen unter Verwertung vorstehender Angaben

von der 15. Stunde bis zum 90. Tage nach Durchtrennung des N. ischiadicus. Die 50 operierten Tiere teilten wir der nach der Denervation verstrichenen Zeitspanne entsprechend in 3 Gruppen ein: die I. Gruppe umfasst die bis zum 3. Tage, die II. Gruppe die vom 3. bis zum 60.—70. Tage und die III. Gruppe die nach dem 60.—70. Tage aufgearbeiteten Tiere.

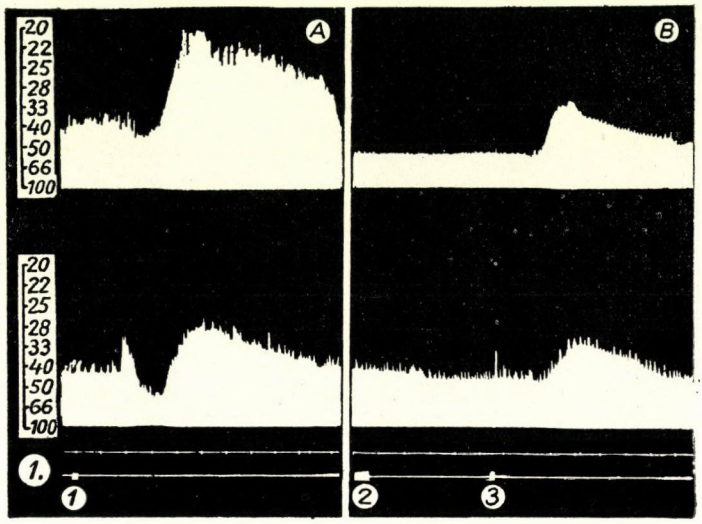


Abb. 1. Reaktion der künstlich durchströmten intakten und denervierten Extremität des Hundes auf Adrenalin. In der oberen Reihe die Gefässreaktion der intakten, in der unteren Reihe die der 3 Tage vor dem akuten Versuch ischiadicusdenervierten Extremität. *A*: Wirkung von 5 μg Adrenalin vor Hexamethoniumgabe; *B*: nach Hexamethoniumgabe. Ordinate: Tropfzahlwerte. Zeit: 60 Sek.

I. Gruppe

Von den halbseitig ischiadicusdurchtrennten Tieren gelangten 10 zwischen der 15. Stunde und dem 3. Tage zur Aufarbeitung. Bei den Durchströmungsversuchen registrierten wir die Tropfzahlen des aus der intakten und denervierten Extremität abfliessenden Perfusates. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass in dieser Zeitperiode gleiche Adrenalinmengen sowohl auf der denervierten wie auf der Kontrollseite annähernd identische Gefässreaktionen hervorriefen. Durch Hexamethonium wurde die nach Adrenalingabe eintretende Durchströmungssteigerung auf beiden Seiten aufgehoben (Abb. 1). Die identische Reaktion der beiden Seiten lässt sich damit erklären, dass der Degenerationsprozess der Nerven auf der denervierten Seite in diesem frühen Stadium noch wenig fortgeschritten ist.

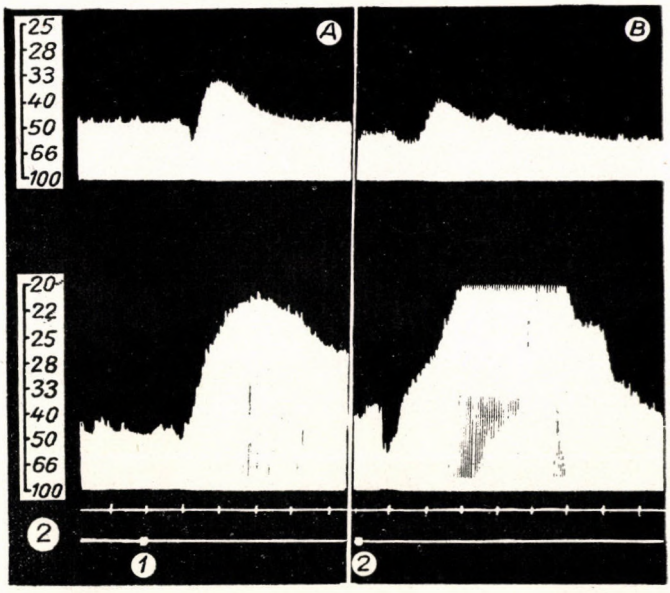


Abb. 2. 14 Tage nach Durchtrennung des N. ischiadicus durchgeführter Durchströmungsversuch Obere Reihe: Gefässreaktion der intakten, untere Reihe: der denervierten Seite. *A*: Wirkung von 5 μg Adrenalin vor Hexamethoniumgabe; *B*: nach Hexamethoniumgabe. Zeit: 60 Sek.

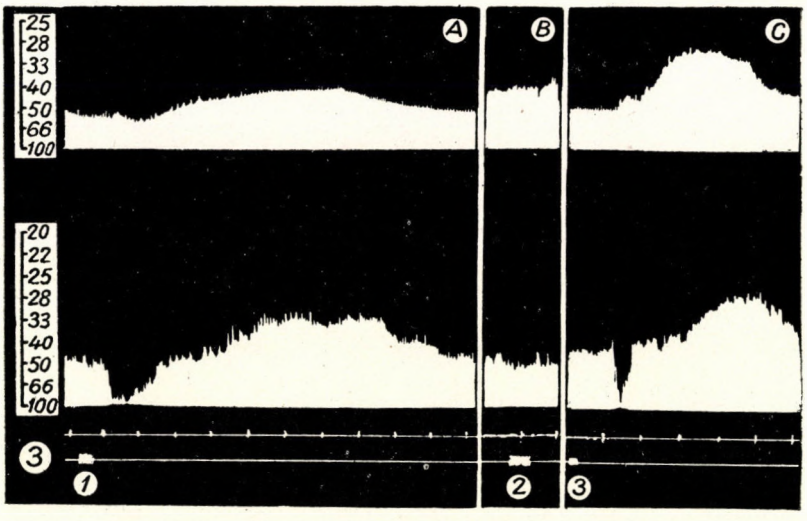


Abb. 3. 20 Tage nach der Ischiadicusdenervation vorgenommener Versuch. Obere Reihe: Gefässreaktion der intakten, untere Reihe: der denervierten Seite. *A*: Winkung von 5 μg Adrealin vor, *B*: während, *C*: nach Anwendung von Hexamethonium. Zeit: 60 Sek.

II. Gruppe

Je einen Typ der zwischen dem 3. und 70. Tag nach der Nervendurchtrennung vorgenommenen 30 Versuche zeigen wir auf den beiden folgenden Abbildungen.

Abb. 2. Dieser Versuch wurde 14 Tage nach Durchschneidung des N. ischiadicus durchgeführt ; es ist zu sehen, dass 5 μg Adrenalin auf beiden Seiten biphasische Wirkung ergaben (*A*) ; auf der denervierten Seite ist die Vasokonstriktion ausgeprägter (Denervations-Überempfindlichkeit). Von 3 mg Hexa-

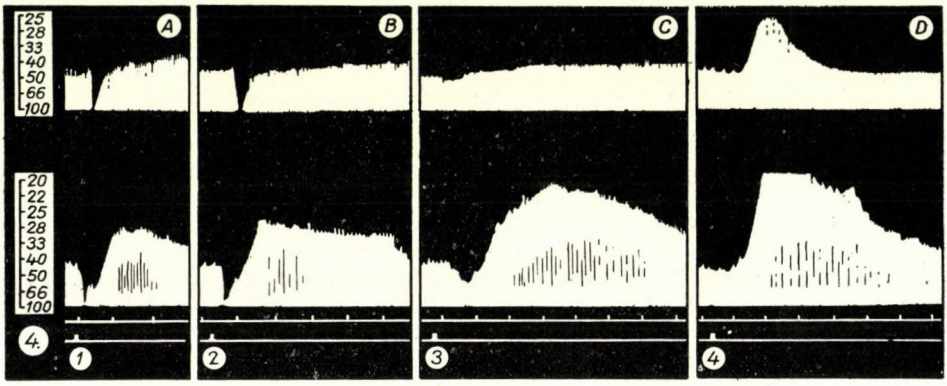


Abb. 4. 43 Tage nach der Ischiadicusdurchtrennung ausgeführter Versuch. Untere Reihe : Gefässreaktion der denervierten, obere Reihe : der kontralateralen Kontroll-Extremität. *A* : Gefässreaktion nach je 5 μg Adrenalin ; *B* : dasselbe nach Anwendung von 20 mg Atropin ; *C* : nach 3 mg Hexamethonium, *D* : nach 10 μg Nikotin. Zeit : 60 Sek.

methonium (*B*) wurde die dilatatorische Komponente der Wirkung auf der innervierten Seite (obere Reihe) stark herabgesetzt, gleichzeitig war die Dilatation auf der denervierten Seite unverändert oder stärker.

Mit fortschreitender Nervendegeneration treten also vor allem hinsichtlich der konstriktorischen Komponente sichtbare Veränderungen auf : es erscheint die Denervations-Überempfindlichkeit. Etwas später (nach dem 15.—20. Tage) vertieft sich auch die dilatatorische Reaktion immer mehr und lässt sich mit Hexamethonium immer weniger beeinflussen.

Abb. 3. 20 Tage nach der Nervendurchtrennung tritt neben der gesteigerten Konstriktion auch die dilatatorische Reaktion in ausgeprägterer Form in Erscheinung ; mit Hexamethonium kann auch in diesem Fall nur die dilatatorische Reaktion der innervierten Seite aufgehoben werden.

Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass die Azetylcholinmobilisierung, welche die Ursache der dilatatorischen Reaktionen auf Adrenalin darstellt, an die Funktion peripherer ganglionärer Elemente gebunden ist, die

mit Hexamethonium gehemmt werden kann. Die in der 3. Woche nach der Denervation zustande kommende Steigerung der dilatatorischen Reaktion erklären wir mit ganglionärer Überempfindlichkeit, die in dieser Periode von solchem Ausmass sein kann, dass die dilatatorische Reaktion die konstriktorische vollständig in den Hintergrund zu drängen vermag. Bei diesen Versuchen kommt es nach den ersten Adrenalin-Injektionen auf der innervierten Seite zu der bekannten biphasischen Wirkung, auf der denervierten Seite jedoch lediglich zu Vasodilatation. Nach Wiederholung der Adrenalin-Injektionen wird die dilatatorische Reaktion der denervierten Seite immer schwächer, und nach der Gefässerweiterung erscheint auch die konstriktorische Reaktion regelmässig. (Diesen Reaktionstypus stellt Abb. 3 *A* dar.) Die Erscheinung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass mit der Erschöpfung des Azetylcholingehaltes der Ganglien [1] die konstriktorische Komponente erneut in den Vordergrund rückt.

Abb. 4 gibt die Gefässreaktionen der 43 Tage vor dem akuten Versuch denervierten Extremität (untere Reihe) und der kontralateralen Kontrollextremität wieder. Im Laufe dieses Versuches untersuchten wir die Adrenalinwirkung vor und nach Anwendung von Atropin, Hexamethonium und Nikotin. Auf Wirkung von Adrenalin kam auf der innervierten Seite ausgeprägte Durchströmungssteigerung zustande. während gleichzeitig auf der denervierten Seite hiernach auch deutliche Gefässverengerung auftrat (*A*). Von Atropin wurde die dilatatorische Reaktion weder auf der innervierten noch auf der denervierten Seite gehemmt (*B*). Hexamethonium löste auch bei diesem Versuch nur die Di atation der intakten Seite (*C*), während Nikotin auch die Dilatation der denervierten Seite abwehrte (*D*).

III. Gruppe

Aus früheren Versuchen [23, 29], bei denen wir die Parallelität zwischen der nach der Denervation verstrichenen Zeit und der auf Adrenalinreiz mobilisierten Azetylcholinmenge untersuchten, konnte der Schluss gezogen werden, dass der Azetylcholingehalt des Perfusates der denervierten Seite nach dem 60.—70. Tage der auf die Nervendurchtrennung folgenden Zeitperiode dem der innervierten Seite erneut nahekommt. Auch unsere vorliegenden Versuchsergebnisse bestätigen diese Beobachtung. Bei den Hunden, die über den 60.—70. Tag nach der Nervendurchtrennung hinaus aufgearbeitet wurden, sind die Gefässreaktionen der denervierten und Kontrollseite wieder beinahe identisch, und die bei diesen Versuchen gewonnene dilatatorische Reaktion lässt sich ebenfalls mit Hexamethonium löschen (Abb. 5).

Die Ergebnisse der nach Durchtrennung des N. ischiadicus vorgenommenen Versuche unterstützen demnach unsere Annahme, dass für die nach Adrenalingabe eintretende dilatatorische Reaktion periphere Ganglien verantwortlich

gemacht werden können. Einen ähnlichen Mechanismus vermochten SZENTIVÁNYI und KÖVÉR [20] bei den »umgekehrten« Wirkungen des Adrenalins auf das Herz nachzuweisen.

Bei unseren Versuchen war deutlich zu beobachten, dass die Überempfindlichkeit gegenüber der Pressorwirkung des Adrenalins in ihrer Entwicklung und Regression von der Länge der nach der Denervation verstrichenen Zeitperiode

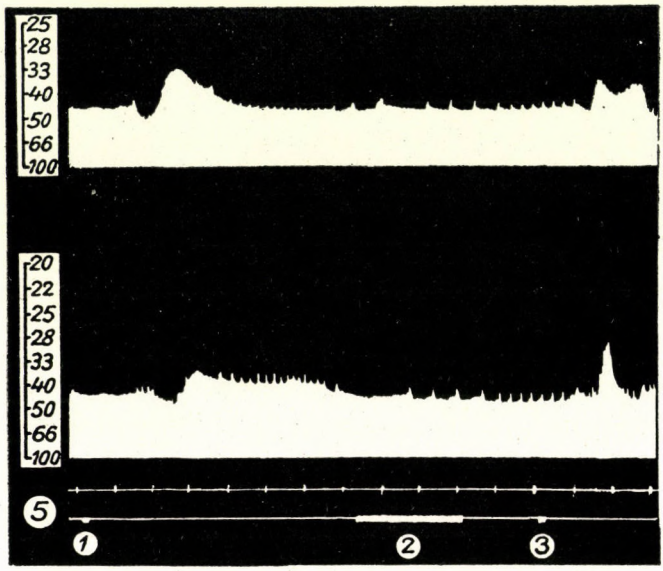


Abb. 5. 90 Tage nach Durchtrennung des N. ischiadicus ausgeführter Versuch. Obere Reihe: Reaktion des innervierten, untere Reihe: des denervierten Gefässgebietes auf 1 μg Adrenalin vor und nach Anwendung von 2 mg Hexamethonium. Zeit: 60 Sek.

abhängt. Die Überempfindlichkeit kommt bis zum 10.—15. Tage nach der Nervendurchtrennung zur Entwicklung. In dieser Periode ist die Pressorreaktion der denervierten Seite wesentlich grösser als die der Kontrollseite. Nach dem 15.—20. Tage wird auch die dilatatorische Komponente der nach Adrenalingabe erfolgten Reaktion auf der denervierten Seite ständig grösser als die Dilatation der innervierten Seite. Der Regenerationsprozess hingegen wirkt sich zuerst auf die dilatatorische Komponente aus: zuerst werden die dilatatorischen Reaktionen wieder gleich und erst danach die konstriktorische Komponente.

b) *Versuche mit abdominaler Sympathektomie an denervierten Extremitäten*

Aus obigen Versuchen kann geschlossen werden, dass die an der Azetylcholinmobilisierung teilnehmenden peripheren Ganglien ihre präganglionäre Innervation von irgendwelchen im N. ischiadicus laufenden vegetativen Nerven-

fasern erhalten. Auf die Ergebnisse von PERRY und REINERT [18], wonach dezentralisierte Ganglien mit Hexamethonium nicht gelähmt werden können, hatten wir bereits hingewiesen. Auch bei unseren Versuchen wurde die auf Azetylcholinmobilisierung beruhende dilatatorische Wirkung von Hexamethonium nur auf der innervierten Seite gehemmt, während diese Funktion der peripheren Ganglien auf der denervierten Seite — infolge Ausschaltung der

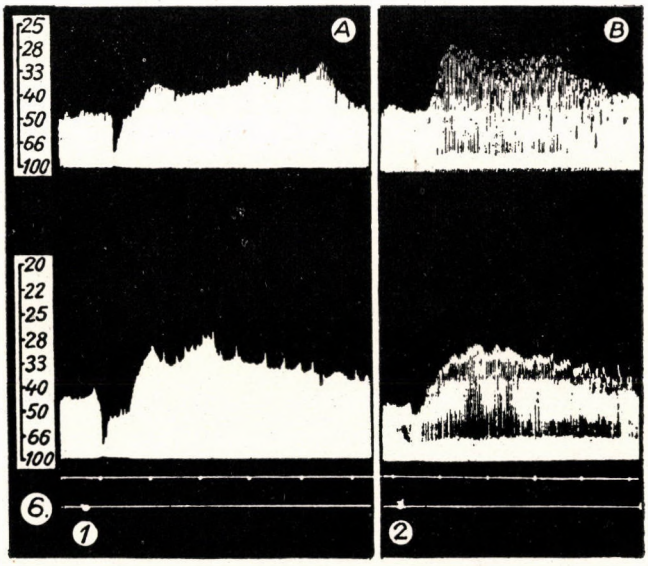


Abb. 6. 3 Tage nach halbseitiger abdominaler Sympathektomie vorgenommener Versuch. Obere Reihe: Reaktion des innervierten, untere Reihe: des denervierten Gefässgebietes auf 5 μg Adrenalin. *A*: vor; *B*: nach Anwendung von Hexamethonium. Zeit: 60 Sek.

präganglionären Innervation — durch Hexamethonium nicht beeinflusst werden konnte. Bekannt ist ferner (BÜLBRING und BURN 4, CLARK 7 u. a.), dass die Wirkung einer Reizung des sympathischen Grenzstranges an die Gefässe mit der des eingeführten Adrenalins übereinstimmt. SZENTIVÁNYI und KISS [21] haben gezeigt, dass die das Herz innervierenden Nn. accelerantes nicht nur postganglionäre, sondern auch präganglionäre Fasern enthalten, die ihre Synapsen in den peripheren Herzganglien bilden. Diese Befunde haben uns den Anlass gegeben, die Adrenalinreaktionen der Gefässgebiete der hinteren Extremitäten auch an solchen Extremitäten zu untersuchen, die durch abdominale Sympathektomie denerviert wurden. Wir nahmen die halbseitige abdominale Sympathektomie an 13 Hunden vor, die zwischen dem 3. und 56. Tage der postoperativen Periode zur Aufarbeitung gelangten. Die experimentellen Resultate stimmten mit den Ergebnissen der durch Denervation des Ischiadicus ausgeführten Versuche vollständig überein; die Adrenalin-Überempfindlichkeit begann sich auch

hier etwa nach dem 3.—5. Tage zu entwickeln, und dieser Zustand war auch noch am 56. Tage nach der Denervierung gut zu beobachten.

Auf Abb. 6 ist ein am 3. Tage nach der halbseitigen abdominalen Sympathektomie vorgenommener Durchströmungsversuch zu sehen. Adrenalin ergab auf beiden Gefässgebieten biphasische Wirkung. Die dilatatorische Wirkung

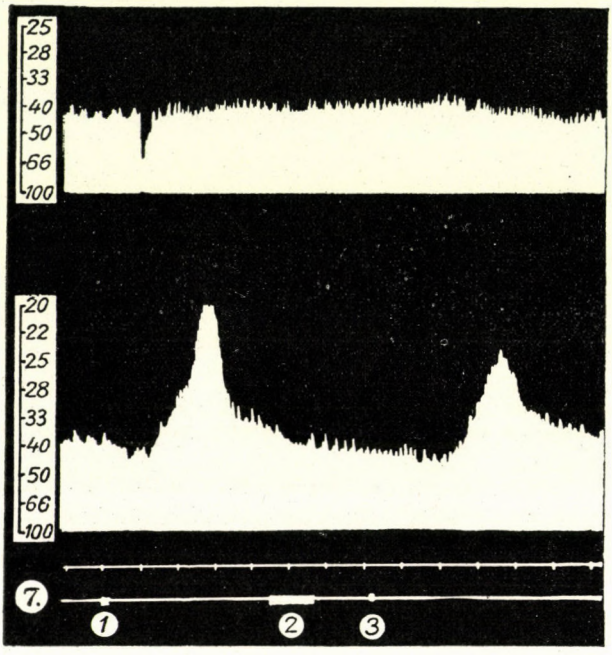


Abb. 7. 9 Tage nach halbseitiger abdominaler Sympathektomie durchgeführter Versuch. Obere Reihe: Adrenalinreaktion der intakten, untere Reihe: der operierten Seite vor und nach je 4 mg Hexamethonium. Zeit: 60 Sek.

konnte — ähnlich wie bei den Versuchen an ischiadicusdurchtrennten Extremitäten — in dieser Zeitperiode mit Hexamethonium auf beiden Seiten gehemmt werden.

Nach dem 3. Tage erschien zuerst die Überempfindlichkeit der Pressorwirkung des Adrenalins gegenüber, wie dies auch bei den mittels Ischiadicusdurchtrennung denervierten Extremitäten zu beobachten war. Abb. 7 zeigt die Wirkung von 1 μg Adrenalin, das am 9. Tage zur Anwendung gelangte und auf der innervierten Seite (obere Reihe) geringe, vorübergehende Dilatation hervorrief. Auf dem denervierten Gefässgebiet trat nach der gleichen Menge Adrenalin im Anschluss an eine kaum registrierbare, geringe Dilatation ausgeprägte Vasokonstriktion auf. Hexamethonium wehrte nur die Dilatation der innervierten Seite ab, während die schwache Dilatation der denervierten Seite unverändert erschien.

36 Tage nach der Sympathektomie (Abb. 8) erschien neben der stärkeren konstriktorischen Reaktion (Denervations-Überempfindlichkeit) auch die gesteigerte dilatatorische Reaktion. In dieser Zeitperiode vermochte Hexamethonium die dilatatorische Reaktion auf der denervierten Seite nicht aufzuheben. Demgegenüber wurde die dilatatorische Wirkung von Nikotin, das auch die dezentralisierten Ganglien lähmt, aufgehoben.

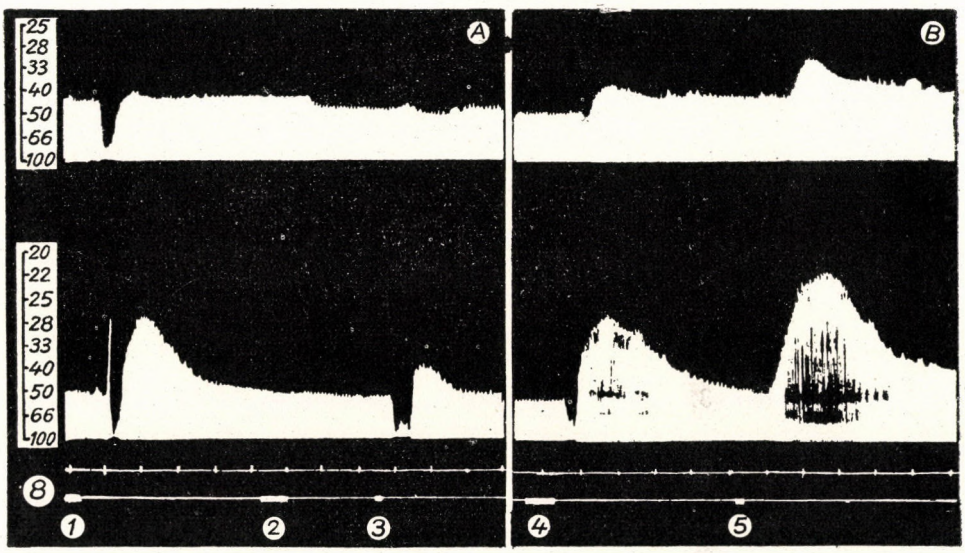


Abb. 8. 36 Tage nach der Sympathektomie vorgenommener Versuch. Obere Reihe: Gefässreaktion der intakten, untere Reihe: der denervierten Seite. *A*: Verabreichung von je 2,5 μg Adrenalin vor und nach Hexamethonium; *B*: Gefässwirkung von je 50 μg Nikotintartarat und Gefässreaktion von je 2,5 μg Adrenalin auf dem Gefässgebiet der intakten und denervierten Seite. Zeit: 60 Sek.

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, stimmen die Adrenalinreaktionen der Gefässgebiete der durch Ischiadicusdurchtrennung und durch abdominale Sympathektomie denervierten hinteren Extremitäten vollkommen überein. Offensichtlich führten beide Eingriffe zur Dezentralisierung der peripheren Ganglien.

Besprechung der Ergebnisse

In einer vorigen Mitteilung [24] hatten wir als dilatatorische Komponente der biphasischen Adrenalinwirkung die an der Azetylcholinmobilisierung mitwirkenden ganglionären Elemente und parasympathischen Nervenendigungen bezeichnet. Auf Grund unserer experimentellen Resultate halten wir das Vorhandensein der sympathischen cholinergen Fasern der peripheren Gefässe

(Skelettmuskulatur der hinteren Extremitäten) [BÜLBRING und BURN 4,5] für erwiesen, ihre postganglionäre Natur [GADDUM und EULER 12, FOLKOW, UVNÄS, LINDGREEN und ELIASSON 9, 10, 11, 26, 27, BARCROFT und SWAN 2] jedoch für unwahrscheinlich. Als postganglionär dürften die die Gefässe der hinteren Extremitäten innervierenden adrenergen, vasokonstriktorischen sympathischen Fasern zu bezeichnen sein.

Die präganglionäre Lokalisation der für die dilatatorische Wirkung des Adrenalins verantwortlichen sympathischen cholinergen Fasern scheint durch nachfolgende Beobachtungen erwiesen.

Wir hatten festgestellt, dass die Grösse der auf Adrenalin eintretenden Durchströmungssteigerung und ihre Hemmbarkeit mit Hexamethonium von der nach der Denervation verstrichenen Zeitspanne abhängig sind. Bis zum 3. Tage nach der Denervation ist an der intakten und denervierten Extremität eine gleich grosse und mit Hexamethonium in gleicher Weise hemmbare Dilatation zu beobachten ; in dieser Zeitperiode hat sich die Überempfindlichkeit der Pressorwirkung des Adrenalins gegenüber noch nicht entwickelt, vermutlich deshalb nicht, weil der Degenerationsprozess zu diesem Zeitpunkt die Peripherie noch nicht erreichte.

Zwischen dem 3. und 14. Tage tritt die Denervationsüberempfindlichkeit auf (die konstriktorische Reaktion nach Adrenalin ist auf der denervierten Seite ausgeprägter als auf der intakten), während sich das Phänomen der »ganglionären Überempfindlichkeit« (die denervierte Seite reagiert auf Adrenalin mit stärkerer Vasodilatation als die intakte) erst zwischen dem 15. und 20. Tage entwickelt. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass die für die Adrenalin-Dilatation verantwortlichen Nervenfasern die Peripherie als präganglionäre Fasern erreichen ; nach der Degeneration dieser Fasern behalten die peripheren Ganglien eine Zeitlang ihre normale Funktion und werden erst nach längerer Zeit überempfindlich [CANNON, ROSENBLUETH 6, GOVAERTS 14 u. a.].

Diese Hypothese findet eine Stütze in den Ergebnissen der Versuche, bei denen wir Hexamethonium und Nikotin anwandten. Bei diesen Versuchen — wo als Zeichen der fortschreitenden Nervendegeneration die Denervations-Überempfindlichkeit bereits erschienen war — wurde die dilatatorische Adrenalinwirkung von Hexamethonium nur auf dem Gefässgebiet der innervierten Extremität gehemmt, auf dem denervierten Gefässgebiet jedoch nicht. Dies steht in Einklang mit der Feststellung von PERRY und REINERT [18], wonach dezentralisierte Ganglien mit Hexamethonium nicht gelähmt werden können. Da Hexamethonium aber auch die Axonreflexe hemmt [15], prüften wir die präganglionäre Lokalisation der im N. ischiadicus verlaufenden dilatatorischen cholinergen sympathischen Fasern auch durch intraarterielle Einspritzung einer kleinen Nikotindosis nach. Bekanntlich wird von Nikotin die Transmission auch in dekonnektierten Ganglien gehemmt [17, 19]. Wie unsere Versuche

ergaben, wird die — zu diesem Zeitpunkt mit Hexamethonium nicht hemmbare — dilatatorische Wirkung des Adrenalins durch eine kleine Nikotindosis (10—50 μg) aufgehoben.

In einer vorigen Mitteilung [24] hatten wir festgestellt, dass nur die dilatatorische Wirkung des Adrenalins von Hexamethonium gehemmt wird, die konstriktorische dagegen nicht. Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die im N. ischiadicus verlaufenden dilatatorischen cholinergen sympathischen Fasern präganglionär, die konstriktorisch wirkenden sympathischen Fasern aber postganglionär liegen. Hierfür spricht auch unsere Beobachtung, dass vom 60.—70. Tage der Zeitperiode nach der Denervation an zuerst die Überempfindlichkeit gegenüber der dilatatorischen Wirkung des Adrenalins aufhört und erst hiernach die gegenüber der Pressorwirkung.

Der sympathische Charakter der für die durchströmungssteigernde Wirkung des Adrenalins verantwortlichen präganglionären Fasern wird neben Literaturangaben [Bülbring und Burn 3, 4, 5, Euler und Gaddum 12 u. a.] auch durch unsere Beobachtung unterstützt, wonach bei unseren Versuchen die Gefässreaktionen nach Adrenalingabe von der Durchtrennung des N. ischiadicus und der abdominalen Sympathektomie auf gleiche Weise beeinflusst wurden.

Neben den Versuchen mit Hexamethonium bestätigen auch Literaturangaben unsere Auffassung, wonach für die Depressorwirkung des Adrenalins ein mit vegetativen Ganglien zusammenhängender peripherer Reflexmechanismus verantwortlich gemacht werden kann ; so beschrieb Krogh [16] die Anwesenheit von vegetativen perivaskulären Ganglien, während Szentiványi und Kiss im Herzen die Anwesenheit von ganglionären Reflexmechanismen feststellten, durch welche die sekundäre umgekehrte Wirkung des Adrenalins zustandekommen vermag. Daneben konnte auch festgestellt werden, dass die in diesem Mechanismus teilnehmenden sympathischen und parasympathischen Ganglien ihre präganglionäre Innervation von sympathischen Fasern erhalten [20a]. — Bei unseren Versuchen hatten wir ausschliesslich das Gefässgebiet der Art. femoralis perfundiert ; unter derartigen experimentellen Bedingungen ist eine Mitwirkung der gegebenenfalls vorhandenen höheren Synapsen in diesem Reflexprozess unvorstellbar.

Endlich ist auch das Vorhandensein eines afferenten Schenkels des peripheren Reflexbogens denkbar, da wir wissen, dass Adrenalin die Ganglien nicht unmittelbar reizt [Feldberg und Vartiainen 13 u. a., 8, 25], d. h. die Erregung der Ganglien wahrscheinlich infolge der durch Adrenalin ausgelösten Reizung gewisser peripherer Rezeptoren und durch die dazugehörige Afferentation eintritt.

ZUSAMMENFASSUNG

An künstlich durchströmten hinteren Extremitäten von Hunden wurde der Einfluss der mittels Durchtrennung des N. ischiadicus und durch abdominale Sympathektomie herbeigeführten Denervation auf die Gefässreaktionen nach Adrenalin untersucht.

1. Die Denervations-Überempfindlichkeit (die stärkere konstriktorische Reaktion der denervierten Seite nach Adrenalin) tritt am 3—5. Tage nach der Operation auf und hält 60—70 Tage an.

2. Die Denervations-Überempfindlichkeit kommt nicht nur in der exzessiven konstriktorischen Wirkung des Adrenalins zum Ausdruck, sondern auch die dilatatorische Wirkung des Adrenalins nimmt — vom 14.—20. bis zum 50.—60. Tage — auf der denervierten Seite zu (»ganglionäre Überempfindlichkeit«).

3. In der Überempfindlichkeitsperiode lässt sich die dilatatorische Adrenalinwirkung auf der innervierten Seite mit Hexamethonium auslöschen, auf der denervierten Seite hingegen nicht (bekanntlich kann man dezentralisierte Ganglien mit Hexamethonium nicht lähmen).

4. Die mit Hexamethonium nicht hemmbare dilatatorische Reaktion lässt sich mit einer kleinen Nikotindosis abwehren (es ist bekannt, dass Nikotin die Transmission auch in dekonnektierten Ganglien zu hemmen vermag).

5. Die Gefässreaktionen auf Adrenalin werden von der Durchtrennung des N. ischiadicus und von der abdominalen Sympathektomie auf gleiche Weise beeinflusst.

6. Aus den Versuchsergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass für die dilatatorische Wirkung des Adrenalins die im N. ischiadicus verlaufenden präganglionären, sympathischen cholinergen Fasern, die ihre Synapsen in den peripheren Ganglien der Gefässe bilden, verantwortlich zu machen sind.

LITERATUR

1. Banister, J., Scrase, M.: J. Physiol., **111**, 437 (1950).
2. Barcroft, H., Swan, H. J. C.: Sympathetic Control of Human Blood Vassels. Arnold & Co. London, 1953.
3. Burn, J. H.: J. Physiol., **75**, 144 (1932).
4. Bülbring, E., Burn, J. H.: J. Physiol., **83**, 483 (1935).
5. Bülbring, E., Burn, J. H.: J. Physiol., **87**, 254 (1936).
6. Cannon, W. B., Rosenblueth, A.: Am. J. Physiol., **116**, 408 (1936).
7. Clark, G. A.: J. Physiol., **80**, 429 (1934).
8. Eccles, R. N.: J. Physiol., **117**, 196 (1952).
9. Eliasson, S., Folkow, B., Lindgreen, P., Uvnäs, B.: Acta Physiol. Scand. **23**, 333 (1951).
10. Eliasson, S., Lindgreen, P., Uvnäs, B.: Acta Physiol. Scand., **27**, 18 (1952).
11. Eliasson, S., Lindgreen, P., Uvnäs, B.: Acta Physiol. Scand. **31**, 290 (1954).
12. v. Euler, U. S., Gaddum, J. H.: J. Physiol., **73**, 54 (1931).
13. Feldberg, W., Vartiainen, A.: J. Physiol. **83**, 103 (1935).
14. Govaerts, J.: Arch. intern. Med. Exp. **11**, 629 (1936).
15. Hilton, S. M.: J. Physiol., **123**, 289 (1954).
16. Krogh, A.: The Anatomy and Physiology of Capillaries. 2d ed., Yale Univ. Press. New Haven. 1929.
17. Lundberg, A.: Acta Physiol. Scand. **25**, Suppl. 89, 56 (1951).
18. Perry, W. L. M., Reinert, H.: J. Physiol., **126**, 101 (1954).
19. Paton, D. M., Perry, W. L. M.: J. Physiol., **112**, 48 (1951).
20. Szentiványi, M., Kövér, A.: Acta Physiol., Hung., **9**, 203 (1956).
20a. Szentiványi, M., Kiss, E.: Acta Physiol. Hung. **10**, 337, 1956.
21. Szentiványi, M., Kiss, E.: Acta Physiol. Hung. **11**, 347 (1957).
22. Szücs, E., Balla, L.: Acta Physiol. Hung. **11**, 309 (1957).
23. Szücs, E., Heténvi, E.: Acta Physiol. Hung. **11**, 305 (1957).
24. Szücs, E., Heténvi, E., Went, I.: Acta Physiol. Hung. **11**, 317 (1957).
25. Suden, C. T., Hart, E. R., Marani, A. S.: Federation Proc. **11**, 164 (1952).
26. Uvnäs, B., Lindgreen, P.: Acta Physiol. Scand., **29**, 137 (1930).
27. Uvnäs, B.: Physiol. Rev., **34**, 608 (1954).
28. Went, I., Szücs, E., Kovács, T.: Acta Physiol. Hung., **6**, 47 (1954).
29. Went, I., Szücs, E., Heténvi, E.: Acta Physiol. Hung., **9**, 193 (1956).

ÜBER DEN SEGMENTALEN URSPRUNG DER DURCH DAS GANGLION STELLATUM VERLAUFENDEN PRÄGANGLIONÄREN SYMPATHISCHEN FASERN

Von

E. KISS und M. SZENTIVÁNYI

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 25. September 1956)

In früheren Versuchen hatten wir nachgewiesen, dass in der auf Antagonistenmobilisierung beruhenden peripheren Regulation der Herztätigkeit die intrakardialen sympathischen und parasympathischen Ganglien eine entscheidende Rolle spielen [1], ferner dass die präganglionäre Innervation dieser Ganglien durch die in den Nn. accelerantes verlaufenden sympathischen Fasern erfolgt [2]. Wir haben bereits in dieser Arbeit darauf hingewiesen, dass diese Fasern vom Rückenmark ausgehen und als I. Neuron — im Stellatum ununterbrochen verlaufend — die peripheren sympathischen und parasympathischen Ganglien erreichen. Zahlreiche Autoren hingegen setzen voraus, es sei ein selbständiges, aus Ganglienzellen bestehendes Synzytium an der Peripherie vorhanden, dem gewisse postganglionäre Fasern des Sympathicus als III. Neuron angeschlossen sind [3, 4, 5]. Bei den hier besprochenen Versuchen wollten wir die Frage klären, ob die zu den peripheren Herzganglien verlaufenden Fasern vom Ganglion stellatum oder unmittelbar vom Rückenmark ausgehen, ferner ob im letzteren Fall hinsichtlich des spinalen segmentalen Ursprungs dieser Fasern irgendeine anatomische Gesetzmässigkeit festgestellt werden kann.

Methodik

Die Untersuchungen wurden an Katzen in Chloralosenarkose (i. p. 0,09 g/kg) vorgenommen. Das Tier wurde auf den Bauch gelegt und nach Entfernung der hinteren Wirbelbogen das Rückenmark im Segment C_8—Th_5 freigelegt; nach Öffnung der Dura durchschnitten wir die hinteren Wurzeln und legten im Segment C_8—Th_4 auf die vorderen Wurzeln fixierte Elektroden. Hiernach wurde die Rückenwunde verschlossen, das Tier auf den Rücken gelegt und nach Öffnung des Thorax das Herz nach einer früher beschriebenen Methode [2] durch eine in Höhe der 7. Rippe in die Aorta gebundene Kanüle in situ durchströmt. Sämtliche grossen Gefässe wurden unterbunden, lediglich die die Blutversorgung des Ggl. stellatum sichernden Arterienzweige blieben frei. Die Herztätigkeit wurde mechanisch, mit Hilfe eines isotonischen Hebelarmes, registriert.

Die einzelnen vorderen Wurzeln wurden mittels der vorher aufgelegten fixierten Elektroden mit Rechteckimpulsen von 6 V Spannung und 20/Sek. Frequenz jeweils gesondert gereizt.

Die Ausschaltung der im Ggl. stellatum anwesenden Synapsen erfolgte nach sorgfältigem Herauspräparieren des Ganglions durch Bepinselung mit 2%iger Nikotintartarat-Lösung. Die Ausschaltung der intrakardialen Ganglien geschah durch Einspritzung von 2—5 mg Hexamethoniumbromid in die Aorta.

Ergebnisse

Analyse des Verlaufes der zu den sympathischen Ganglien des Herzens gehenden Fasern

Durch die Reizung der aus dem Abschnitt Th_1—Th_4 entspringenden vorderen Wurzeln wurde die Kraft und Frequenz der Herzkontraktionen in den meisten Fällen gesteigert. Unsere erste Frage war, ob diese auch solche Fasern enthalten, die ohne Unterbrechung durch das Ggl. stellatum verlaufen und ihre Synapsen an der Peripherie, in den sympathischen Ganglien des Herzens bilden. Zur Klärung der Frage bepinselten wir das Ggl. stellatum mit 2%iger Nikotin-

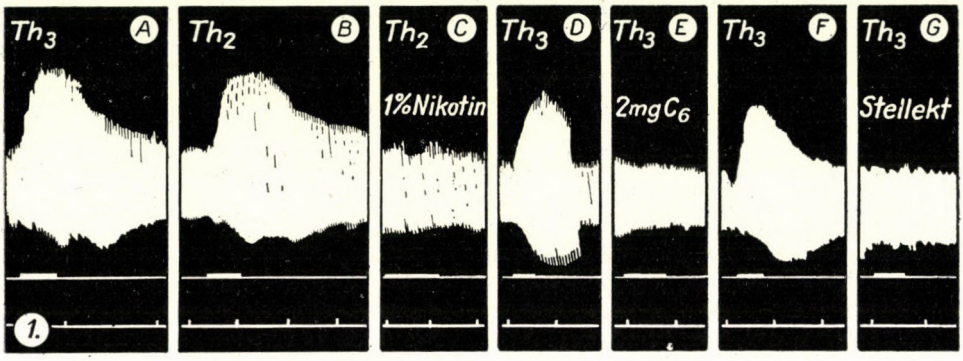


Abb. 1. A—B: Wirkung der Reizung der vorderen Wurzeln Th_2 und Th_3. *C:* Nach Bepinselung des Ggl. stellatum mit 1%iger Nikotin-Lösung ist die Reizung von Th_2 wirkungslos. *D:* Die Reizung von Th_3 ist auch nach Bepinselung mit Nikotin wirksam. *E:* Durch Einspritzung von 2 mg Hexamethonium in das Herz wird die Wirkung der Reizung von Th_3 aufgehoben. *F:* Nach Auswaschen von Hexamethonium ist die Reizung erneut wirksam. *G:* Nach Resektion des Ggl. stellatum ist die Reizung von Th_3 unwirksam
Obere Linie: Reizung; untere Linie: Zeitangabe 30 Sek.

lösung, wodurch bekanntlich die Wirkung der Reizung aller vom Rückenmark ausgehenden präganglionären Fasern aufgehoben wird, deren Synapse sich in diesem Ganglion befindet, während die Wirkung der Reizung der hier ohne Unterbrechung hindurchgehenden Fasern nicht beeinflusst wird.

Bei dem auf Abb. 1. dargestellten Versuch reizten wir die vorderen Wurzeln Th_2 und Th_3. Wie ersichtlich, löste die Reizung beider Vorderwurzeln positive ino- und chronotrope, d. h. adrenalinartige Wirkung am Säugetierherzen aus. Nach Bepinselung des Ggl. stellatum mit 1%iger Nikotintartarat-Lösung wurde die Reizung von Th_2 wirkungslos, zum Zeichen dafür, dass die aus diesem Segment heraustretenden Fasern ihre Synapsen im Ganglion stellatum bilden. Demgegenüber blieb — wie aus Abb. 1 ersichtlich — die Reizung der Vorderwurzel Th_3 auch weiterhin wirksam, woraus hervorgeht, dass die von diesem Segment ausgehenden Fasern ihre Synapsen nicht im Stellatum bilden. Die

Wirkung der Reizung dieser Fasern wurde jedoch von dem durch die Aorta in das Herz gegebenen Hexamethonium völlig aufgehoben, und sie kehrte erst nach dem Auswaschen des Hexamethoniums aus dem Herzen wieder zurück. Aus diesen Tatsachen kann geschlossen werden, dass die aus dem Segment Th_3 kommenden Fasern ohne Unterbrechung durch das Stellatum verlaufen und ihre Synapsen in den peripheren bzw. intrakardialen sympathischen Ganglien bilden.

Wie Abb. 1 zeigt, bleibt die nach Reizung von Th_3 auftretende herzstimulierende Wirkung nach Entfernung des Ggl. stellatum der gleichen Seite aus, was darauf hindeutet, dass diese präganglionären Fasern die Peripherie tatsächlich durch das Stellatum und nicht über andere Ganglien erreichen.

Der segmentale Ursprung der zu den sympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden präganglionären Fasern

Im weiteren untersuchten wir die Frage, ob im medullären Ursprung obiger präganglionärer Fasern eine anatomische Gesetzmässigkeit beobachtet werden kann. Zu diesem Zweck legten wir im Abschnitt C_8—Th_4 auf sämtliche vorderen Wurzeln vorher fixierte Elektroden, reizten diese Wurzeln gesondert nacheinander und prüften, von welchem Segment die Fasern ausgehen, deren nach Reizung auf das Herz ausgeübte Wirkung durch Bepinselung des Ggl. stellatum nicht aufgehoben werden kann.

Abb. 2 zeigt, dass die Reizung der vorderen Wurzeln Th_2, Th_3 und Th_4 am Säugetierherzen in gleicher Weise herzstimulierende Wirkung auslöst. Nach Bepinselung des Ggl. stellatum mit Nikotin bleibt lediglich die Reizung der Vor-

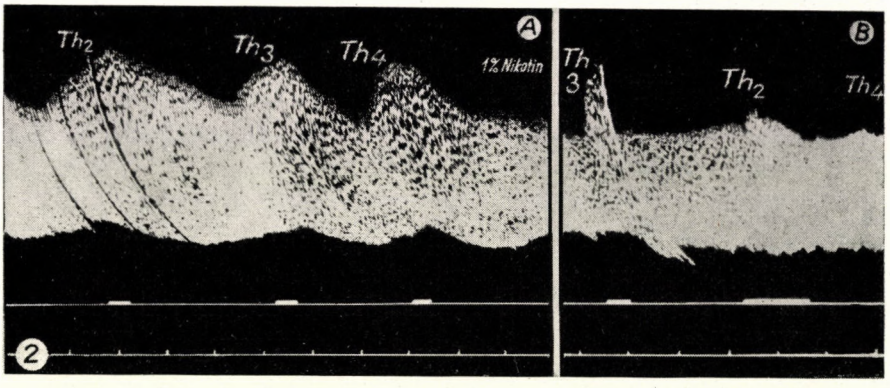


Abb. 2. A: Wirkung der Reizung der vorderen Wurzeln Th_2, Th_3, Th_4. *B*: Wirkung der Reizung der vorderen Wurzeln Th_2, Th_3, Th_4 nach Bepinselung des Ggl. stellatum mit 1%iger Nikotinlösung; lediglich die Reizung von Th_3 bleibt wirksam.
Bezeichnungen wie auf Abb. 1

derwurzel Th_3 wirksam, woraus geschlossen werden kann, dass die Fasern, welche das Ggl. stellatum lediglich passieren und ihre Synapsen in den peripheren bzw. intrakardialen sympathischen Ganglien bilden, aus diesem Segment austreten.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, blieb die Reizung der aus dem Segment Th_3 entspringenden vorderen Wurzeln nach Nikotinbepinselung des Ggl. stellatum in 19 von 21 Fällen, d. h. in 91% sämtlicher Fälle wirksam. Demgegenüber wurde die Reizwirkung der aus den anderen Segmenten heraustretenden vorderen Wurzeln durch die Bepinselung mit Nikotin in der überwiegenden Mehrheit der Fälle vollständig aufgehoben. (Die Reizung der Th_1-Wurzeln war nach Nikotinbepinselung nur in 1 von 9 Fällen, die der Th_2-Wurzeln in 0 von 15 Fällen, die der Th_4-Wurzeln in 1 von 8 Fällen wirksam.) Im medullär-segmentalen Ursprung der zu den sympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden präganglionären Fasern zeigt sich demnach eine anatomische Gesetzmässigkeit, indem diese überwiegend aus dem Segment Th_3 heraustreten.

Tabelle I.

	C_8	T_1	T_2	T_3	T_4
Vor Nikotin	3	9	15	21	8
Nach Nikotin	0	1	0	19	1
%	0	11,1	0	91,11	12,5

Analyse des Verlaufes der zu den parasympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden Fasern

In früheren Untersuchungen hatten wir nachgewiesen, dass in den Nn. accelerantes auch Fasern verlaufen, durch deren Reizung am Säugetierherzen eine Moderatorwirkung ausgelöst werden kann. Diese Wirkung liess sich mit Hexamethonium und Atropin hemmen bzw. mit Eserin steigern, woraus gefolgert werden konnte, dass für diese Wirkung Fasern verantwortlich sind, die ihre Synapsen in den parasympathischen Ganglien des Herzens bilden [2].

Wir untersuchten, ob diese Fasern unmittelbar vom Rückenmark ausgehen und das Ggl. stellatum lediglich passieren oder ob sie direkt aus dem Ggl. stellatum stammen. Wir stellten fest, dass die bei der Reizung der einzelnen vorderen Wurzeln mitunter zu beobachtende herzhemmende Wirkung auch nach Bepinselung des Ggl. stellatum mit Nikotin bestehenblieb, durch das in das Herz eingeführte Hexamethonium jedoch aufgehoben werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass an dieser Wirkung präganglionäre Fasern beteiligt sind, die, vom Rückenmark ausgehend, das Ggl. stellatum ohne

Unterbrechung durchlaufen und ihre Synapsen in den peripheren bzw. intrakardialen parasympathischen Ganglien bilden.

In anderen Fällen vermochten wir jedoch durch Reizung von Wurzeln, die vor Bepinselung mit Nikotin über herzstimulierende Wirkung verfügten, nach Nikotinbepinselung eine herzhemmende Wirkung auszulösen, was sich damit erklären lässt, dass die Wurzel neben den zum Ggl. stellatum verlaufenden zahlreichen präganglionären Fasern in geringer Anzahl auch Fasern enthielt, die ihre Synapsen in den peripheren parasympathischen Ganglien bildeten; die Wirkung der letzteren Fasern konnte erst dann zur Geltung kommen, als wir die Wirkung der zum Stellatum verlaufenden Fasern durch die Nikotinbepinselung ausgeschaltet hatten.

In bezug auf den segmentalen Ursprung obiger Fasern vermochten wir auf Grund der wenigen bewertbaren Versuche nichts Bestimmtes festzustellen, da die beobachteten negativen Wirkungen oft kaum wahrnehmbar waren und sich auf einige Systolen beschränkten. Nichtsdestoweniger scheint es, dass obige Gesetzmässigkeit im Ursprung dieser Fasern kaum festgestellt werden kann, da diese in gleicher Weise aus den Segmenten Th_1, Th_2 und Th_3 heraustreten können.

Besprechung der Ergebnisse

In früheren Versuchen hatten wir nachgewiesen, dass die umgekehrte Wirkung von Adrenalin bzw. Azetylcholin ganglionären Ursprungs und auf die gegenregulatorische Wechselwirkung der in der Herzwand anwesenden sympathischen und parasympathischen ganglionären Elemente zurückzuführen ist [1]. In der peripheren Regulation der Herztätigkeit spielen also diese Strukturen eine wichtige Rolle. Aus unseren weiteren Untersuchungen ging hervor, dass der Sympathikus zu diesen in der Herzwand befindlichen ganglionären Elementen präganglionäre Fasern entsendet [2]. Bei der Reizung einzelner Acceleransäste konnte nämlich die entstehende herzstimulierende Wirkung mit Hexamethonium aufgehoben werden, zum Zeichen dafür, dass die gereizten Fasern ihre Synapsen in peripheren sympathischen Ganglien bilden. Die Reizung anderer Accelerans-Äste hingegen war von hemmender Wirkung, und diese Wirkung liess sich mit Hexamethonium und Atropin hemmen, mit Eserin aber steigern. Hieraus schlossen wir, dass die Nn. accelerantes präganglionäre Fasern nicht nur zu den intrakardialen sympathischen, sondern auch zu den parasympathischen Ganglien geben, d. h. Fasern, die vom Rückenmark ausgehend das Ggl. stellatum ohne Unterbrechung durchlaufen und die peripheren Ganglien erreichen. Wie bekannt, war schon seit lange her die Möglichkeit aufgetaucht, dass sich an der Peripherie ein aus Ganglienzellen bestehendes Synzytium befindet, welches als selbständiges III. Neuron an der peripheren Regulation mitwirkt und seine präganglionäre Innervation unmittelbar vom Ggl.

stellatum gewinnt [3, 4, 5]. Zahlreiche Untersuchungsergebnisse und Überlegungen [6, 7, 8, 9] sprechen gegen das Vorhandensein eines derartigen Synzytiums (näheres s. [10]). Auch unsere Untersuchungsresultate ergaben, dass die Nervenzellen der peripheren Ganglien als II. Neuron ihre präganglionäre Innervation unmittelbar vom Zentralnervensystem erhalten.

Zur Bestätigung dieser Annahme bepinselten wir bei den vorliegenden Versuchen das Ganglium stellatum zunächst mit Nikotin. Hierdurch wird bekanntlich die Impulsübertragung all jener Fasern ausgeschaltet, die ihre Synapsen in diesem Ganglion bilden. Unter diesen Umständen stellten wir tatsächlich fest, dass zwar die herzstimulierende Wirkung der Reizung einiger vorderer Wurzeln durch die Nikotinbepinselung aufgehoben wurde, dagegen die Akzeleratorwirkung der Reizung anderer vorderer Wurzeln auch weiterhin fortbestand. Diese letzteren Fasern passieren also das Stellatum ohne Unterbrechung. Aus dem Umstand, dass die herzstimulierende Wirkung der Reizung dieser Fasern durch Einführung von Hexamethonium ins Herz aufgehoben wurde, kann der Schluss gezogen werden, dass diese Fasern ihre Synapsen in den peripheren Herzganglien bilden. In ähnlicher Weise konnte auch die präganglionäre Natur der zu den parasympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden Fasern nachgewiesen werden.

Aus der Tatsache, dass die vom Rückenmark ausgehenden und zu den sympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden präganglionären Fasern in ihrem Ursprung strenge anatomische Lokalisation aufweisen, ergibt sich die Möglichkeit, dass das obige System der peripheren Ganglien des Herzens und der dazu gehörigen präganglionären Fasern einen selbständig funktionierenden Teil des vegetativen Nervensystems bildet.

Unsere an anderer Stelle [11] erörterte Beobachtung, wonach durch Reizung der zu den sympathischen Ganglien des Herzens führenden präganglionären Fasern eine elektive Konstriktion der Koronarien herbeigeführt werden kann, lässt in Kenntnis des genauen Verlaufes dieser Fasern die Möglichkeit einer operativen Therapie der Angina pectoris nicht ausgeschlossen erscheinen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Nn. accelerantes enthalten auch Fasern, die, unmittelbar vom Rückenmark ausgehend und als präganglionäre Fasern das Ggl. stellatum durchlaufend, ihre Synapsen in den in der Herzwand anwesenden sympathischen und parasympathischen Ganglien bilden.

2. Im neuralen Ursprung der zu den sympathischen intrakardialen Ganglien verlaufenden präganglionären Fasern ist eine anatomische Gesetzmässigkeit zu erkennen, indem diese in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle vom Segment Th_3 ausgehen.

3. Bei den zu den parasympathischen intrakardialen Ganglien verlaufenden präganglionären Fasern ist eine derartige Gesetzmässigkeit nicht nachweisbar; diese Fasern stammen in gleicher Weise aus den Segmenten Th_1, Th_2 und Th_3.

LITERATUR

1. SZENTIVÁNYI, M., KÖVÉR, A.: Acta Physiol. Hung. **9**, 203 (1956).
2. SZENTIVÁNYI, M., KISS, E.: Acta Physiol. Hung. **10**, 337 (1956).
3. COUJARD, R.: Bull. histol. appl. physiol. **20**, 161 (1943).
4. FEYRTER, F.: Acta neuroveg. **4**, 167 (1952).
5. MEYLING, H. A.: J. Comp. Neurol. **88**, 495 (1953).
6. FULTON, G. P., LUTZ, B. E.: Am. J. Physiol., **135**, 531 (1942).
7. LUTZ, B. R., FULTON, G. P., AKERS, R. P.: Exp. Med. Surg., **8**, 258 (1950).
8. ECCLES, J. C., MAGLADERY, J. W.: J. Physiol., **90**, 31 (1937).
9. ECCLES, J. C., MAGLADERY, J. W.: J. Physiol., **90**, 68 (1937).
10. FOLKOW, B.: Physiol. Rev. **35**, 629 (1955).
11. SZENTIVÁNYI, M., KISS, E.: Acta Physiol. Hung. **11**, 347 (1957).

BEITRÄGE ZUR INNERVATION DER KORONARGEFÄSSE

Von

M. SZENTIVÁNYI und E. KISS
PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 25. September 1956)

Die neurale Kontrolle der Kranzgefässe des Herzens ist noch nicht als geklärt zu betrachten. Insbesondere hinsichtlich der Wirkung des Sympathikus bzw. des Adrenalins gehen die Meinungen stark auseinander. Nach ANREP und SEGALL [1], GOLLWITZER-MEYER [2], REIN [3, 4], GREGG und SHIPLEY [5, 6, 7] und anderen [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15] verursacht Adrenalin bzw. Sympathikus-Reizung eine Erweiterung der Koronargefässe, während sich andere Autoren, wie LU und MELVILLE [16], SMITH [17, 18], KATZ [19, 20] sowie BROSE und H. SCHAEFER [21] für die gefässverengernde Wirkung einsetzen bzw. der Meinung sind, die Reizung des Sympathikus und Adrenalin könnten sowohl die Verengerung wie die Erweiterung der Koronargefässe herbeiführen.

In einer früheren Mitteilung hatten wir darauf hingewiesen, dass die Nn. accelerantes ausser den bisher bekannten postganglionären sympathischen Fasern auch solche enthalten, die ihre Synapsen nicht im Stellatum, sondern in den in der Herzwand befindlichen sympathischen und parasympathischen Ganglien bilden [22]. Im Anschluss daran ergab sich die Frage, ob die Anwesenheit dieser auch funktionell verschiedenen Fasern nicht als Erklärung für jene widersprechenden Angaben dienen könnte, die im Zusammenhang mit der Wirkung der Sympathikusreizung auf die Koronargefässe beschrieben wurden. In vorliegender Arbeit untersuchten wir, welche Rolle diese drei Faserarten mit verschiedener Funktion — die zum Herzmuskel verlaufenden postganglionären sympathischen Fasern sowie die zu den intrakardialen sympathischen und parasympathischen Ganglien gehenden präganglionären sympathischen Fasern — in der Innervation der Kranzgefässe spielen.

Methodik

Die Versuche wurden nach einer früher beschriebenen Methode [22] am Herzen von mit Chloralose (0,09 g/kg) narkotisierten Katzen in situ vorgenommen. Nach Öffnung des Thorax wurde das Herz in situ isoliert und durch eine in Höhe der 3. Rippe in die Aorta gebundene Kanüle mit Hilfe eines LANGENDORFFschen Gefässes mit einer 10% Rinder- oder Hundeblutkörperchen enthaltenden sauerstoffhaltigen Locke-Lösung durchströmt. In den Weg der Perfusionsflüssigkeit — zwischen Herz und Langendorffsches Gefäss — wurde ein Rotameter einge-

schaltet, welches die Durchströmung der Koronargefässe registrierte. Sämtliche von der Aorta ausgehenden Arterienzweige — mit Ausnahme der die Blutversorgung des Ggl. stellatum sichernden kleinen Äste — wurden sorgfältig unterbunden.

Die Herzäste des Ggl. stellatum wurden auf beiden Seiten herauspräpariert und die einzelnen Zweige durch Rechteckimpulse mit 20/Sek. Frequenz und 6 V Spannung gesondert gereizt. Die Herztätigkeit wurde mechanisch registriert, mit Hilfe eines isotonischen Hebelarmes.

Zur Lähmung der intrakardialen Ganglien des Herzens spritzten wir unmittelbar in die Aorta 1—5 mg Hexamethoniumbromid. Die Lähmung der sympathischen Endapparate erfolgte durch Perfusion von Ergotamintartarat in der Konzentration von $2—5 \cdot 10^{-6}$.

Adrenalin gaben wir in der Konzentration von 0,05—1 μg, Azetylcholin in der Konzentration von 0,005—0,1 μg unmittelbar in das Herz.

Ergebnisse

Bei den durchgeführten 51 bewertbaren Versuchen wurden die einzelnen Accelerans-Äste gesondert gereizt, wobei wir beobachteten, wie die an den Koronargefässen und am Herzen auftretenden Reaktionen durch die Verabreichung gewisser Pharmaka sowie durch Veränderung der Stärke und Frequenz des Reizstromes beeinflusst werden. Die auf diese Weise beobachteten Reaktionen liessen sich in folgende Gruppen aufteilen :

A. Die bei Reizung einzelner Accelerans-Äste auftretende herzstimulierende Wirkung konnte mit Hexamethonium aufgehoben werden, woraus geschlossen werden kann, dass der gereizte Nerv überwiegend zu den sympathischen Ganglien des Herzens verlaufende präganglionäre Fasern enthielt [22]. Von Hexamethonium wurde nicht nur die Akzeleratorwirkung dieser Fasern, sondern auch die bei Reizung dieser Fasern in Erscheinung tretende Konstriktion der Kranzgefässe aufgehoben.

In dem auf Abb. 1 sichtbaren Versuch löste die Reizung eines Accelerans-Astes am Herzen positive ino- und chronotrope Wirkung aus. Gleichzeitig sieht man, dass die Koronardurchströmung von den anfänglichen 97 ml/Min. durch die Reizung auf 79 ml/Min. herabgesetzt wurde. Nach Abklingen der Wirkung gaben wir Hexamethonium in das Herz, welches weder die Herztätigkeit noch die Koronardurchströmung unmittelbar beeinflusste, die herzstimulierende und konstriktorische Wirkung der 1 Minute später vorgenommenen Reizung auf die Koronargefässe jedoch aufhob. Die Durchströmung blieb nach der Reizung unverändert. Nachdem das Hexamethonium aus dem Herzen herausgewaschen wurde, kehrten beide Wirkungen wieder zurück.

Um zu klären, ob die beobachtete Gefässreaktion eine vasomotorische Wirkung darstellt und nicht auf den mechanischen Effekt der zunehmenden Kontraktionskraft zurückgeführt werden kann, wiederholten wir die Reizung mit niedriger Frequenz und Spannung, wonach die Durchströmungsverminderung auch ohne Zunahme der Herztätigkeit auftrat! Die konstriktorische Reaktion wurde von Hexamethonium auch in diesem Falle aufgehoben. Aus alledem geht hervor, dass der gereizte Herznerv überwiegend Fasern enthielt, die als präganglionäre Fasern zu den in der Herzwand anwesenden sympathischen

Ganglien verlaufen, ferner dass das von hier ausgehende zweite Neuron für die Koronargefässe direkte vasokonstriktorische Impulse vermittelt. Die Beobachtung, wonach bei höherer Reizfrequenz und -spannung auf die Reizung nicht nur Konstriktion, sondern auch eine Steigerung der Herztätigkeit eintritt, widerspricht nicht der Tatsache, dass der Nerv Fasern enthält, die nicht zum Herzmuskel, sondern direkt zu den Koronargefässen verlaufen, und bedeutet lediglich, dass hierbei in der Wand der Gefässe eine grössere Adrenalin-

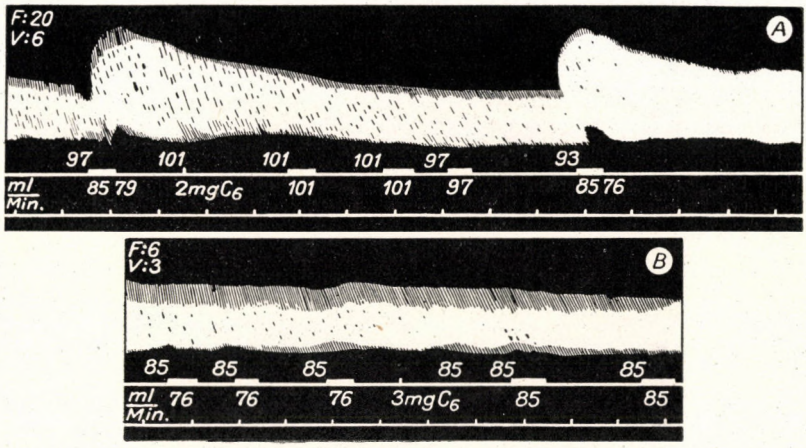


Abb. 1. Die Rolle der zu den sympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden präganglionären Fasern in der Innervation der Koronargefässe

A: Reizfrequenz 20/Sek., Spannung 6 V. Auf Reizung des N. accelerans tritt positive ino- und chronotrope Wirkung auf, gleichzeitig verringert sich die Durchströmung von 97 ml/Min. auf 79 ml/Min. Eine Minute nach Verabreichung von 2 mg Hexamethonium beeinflusst die Reizung weder die Herztätigkeit noch die Durchströmung der Koronargefässe ; etwa 4 Minuten später, nachdem das Hexamethonium aus dem Herzen herausgewaschen ist, kann auf Reizung wiederum eine positive Wirkung und Durchströmungssenkung beobachtet werden

B: Reizfrequenz 6/Sek., Spannung 3 V. Auf Reizung kommt es lediglich zu Konstriktion. Die Herztätigkeit bleibt unverändert. Von 3 mg Hexamethonium wird die Konstriktorwirkung abgewehrt

Die auf der oberen Grundlinie sichtbaren Zeichen geben Zeitpunkt und Dauer der Nervenreizung an. Die Zahlen über und unter der Linie bezeichnen die Durchströmung der Kranzgefässe in ml/Min. An der unteren Linie die Zeitangabe (30 Sek.)

menge frei wird und als sekundäre Folge der vermehrten Diffusion die beobachtete Herzmuskelwirkung in Erscheinung tritt.

Bei einigen Versuchen stellten wir nach Perfusion von Ergotamintartarat in einer Konzentration von $2-5 \cdot 10^{-6}$ fest, dass obige gefässverengende Wirkung von Ergotamin ähnlich wie von Hexamethonium ebenfalls aufgehoben wird, was unsere Auffassung bestärkt, dass diese Reaktion an adrenergen Endapparaten vor sich geht.

B. Wir hatten schon früher darauf hingewiesen, dass die obigen präganglionären Fasern in den meisten Herznerven die Peripherie zusammen mit anderen,

hauptsächlich postganglionären Fasern erreichen [22]. Infolgedessen ergibt die Reizung derartiger Nerven andere Resultate als die von Nerven, welche nur eine Faserart enthalten.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, tritt bei Reizung eines anderen Acceleran-Zweiges am Katzenherzen ebenfalls positive ino- und chronotrope Wirkung auf, die sich aber mit Hexamethonium nicht beeinflussen lässt. Diese Reaktion beruht demnach auf der Reizung postganglionärer Fasern. Auf Abb. 2 ist ferner

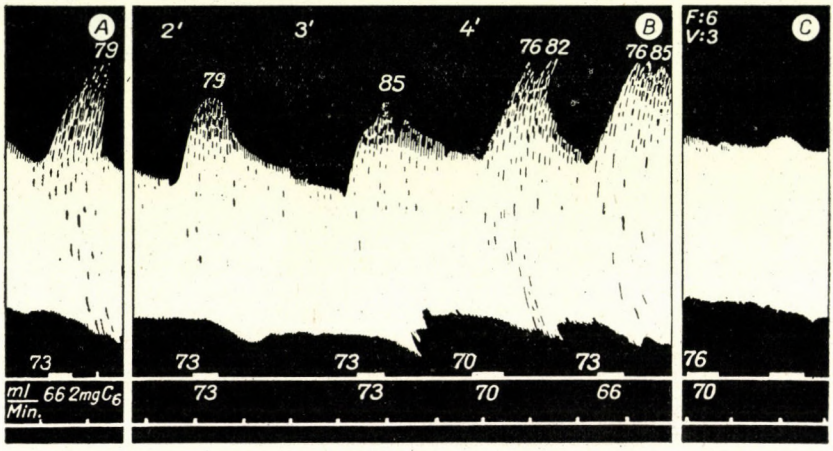


Abb. 2. Wirkung der Reizung eines Mischnerven (Bezeichnungen wie auf Abb. 1).
A: Bei Reizung tritt herzstimulierende Wirkung auf, gleichzeitig sinkt die Koronardurchströmung von 73 ml/Min. auf 66 ml/Min. Während der Funktionssteigerung vermehrt sich die Durchströmung auf 79 ml/Min.
B: Durch 2 mg Hexamethonium wird die konstriktorische Wirkung der nach 1 Minute wiederholten Reizung abgewehrt, während die Funktionssteigerung und die sich anschliessende Dilatation auch weiterhin bestehenbleiben. Nach etwa 5 Minuten, wenn das Hexamethon um aus dem Herzen herausgewaschen ist, kehrt die konstriktorische Wirkung auf Reizung wieder zurück.
C: Frequenz 6/Min., Spannung 3 V : die Reizung führt lediglich zu Konstriktion, ohne Funktionssteigerung (Erklärung s. im Text)

zu sehen, dass es im Zusammenhang mit der Funktionssteigerung zu einer langdauernden Durchströmungssteigerung kommt, die mit Hexamethonium ebensowenig beeinflusst werden kann wie die herzstimulierende Wirkung. Aus der Tatsache, dass diese Dilatation stets im Anschluss an die Funktionssteigerung auftritt, dass sie ferner weder mit Ergotamin noch mit Hexamethonium beeinflusst werden kann, sowie aus ihrer langdauernden Anwesenheit kann geschlossen werden, dass in ihrer Auslösung die kapillarerweiternde Wirkung der während der Funktionssteigerung frei werdenden Stoffwechselprodukte eine Rolle spielt. Die auf Reizung eintretende — und der auf Kapillarerweiterung beruhenden Dilatation vorangehende — konstriktorische Wirkung wird jedoch von Hexamethonium auch in diesem Falle abgewehrt, was darauf hinweist, dass diese Reaktion, im Gegensatz zur vorigen, auf die Reizung prägan-

glionärer Fasern zurückzuführen ist. Mit Ergotamin lässt sich diese Reaktion ebenfalls blockieren, was als Beweis dafür gelten kann, dass die Konstriktion auf einem adrenergen Mechanismus beruht.

Im weiteren vermochten wir durch Veränderung der Reizfrequenz und Spannung zu erreichen, dass lediglich die vasomotorischen präganglionären Fasern in Reizzustand versetzt wurden, d. h. Konstriktion auftrat, ohne dass gleichzeitig auch die für die Reizung der zum Herzmuskel verlaufenden postganglionären Fasern charakteristische Funktionssteigerung und sekundäre Dilatation hervorgerufen wurden.

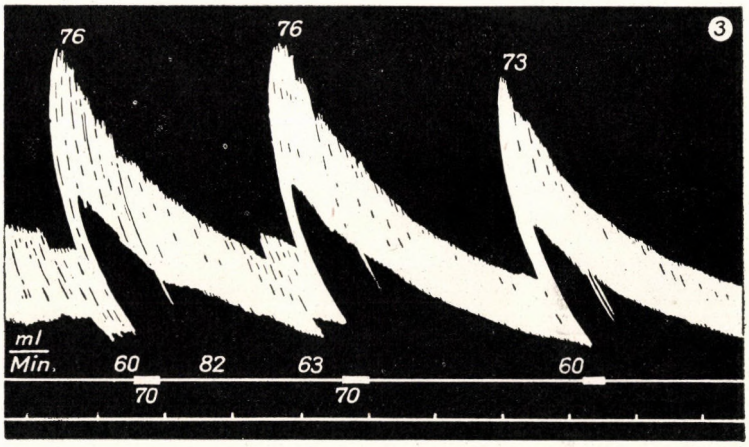


Abb. 3. Auf Sympathikusreizung eintretende »klassische« dilatatorische Wirkung. Nach Accelerans-Reizung treten positive ino- und chronotrope Wirkung sowie Dilatation der Koronargefässe auf. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Dilatation in die Länge zieht, ferner dass diese Strömungssteigerung im Zusammenhang mit der Funktionssteigerung auftritt. Erklärung s. im Text.
Bezeichnungen wie auf Abb. 1

C. Andere Accelerans-Äste enthielten lediglich zum Herzmuskel verlaufende postganglionäre Fasern. Bei ihrer Reizung war demnach nur Funktionssteigerung und die damit zusammenhängende sekundäre — auf dem Freiwerden von Metaboliten beruhende — Durchströmungszunahme zu beobachten.

Abb. 3 stellt die »klassische« dilatatorische Wirkung des Sympathikus dar. Es ist zu beobachten, dass diese Wirkung von verlängertem Charakter ist und im Anschluss an die Funktionssteigerung auftritt. Ergotamin und Hexamethonium waren auf diese Wirkung ohne Einfluss.

D. Bei einer weiteren Gruppe unserer Versuche trat nach Reizung einzelner Accelerans-Äste in Begleitung einer mehr oder minder ausgeprägten Herzhemmwirkung Dilatation der Kranzgefässe auf, d. h. die für Azetylcholingabe bezeichnende Wirkung.

In dem auf Abb. 4 wiedergegebenen Versuch löste die Reizung des Accelerans am Herzen negative Wirkung aus, gleichzeitig stieg die Durchströmung von 47 ml/Min. auf 57 ml/Min. Sowohl die dilatatorische wie die herzhemmende Wirkung wurde durch das in das Herz eingeführte Hexamethonium abgewehrt. Die Durchströmung blieb nach der Reizung unverändert. Nach Auswaschen des Hexamethoniums kehrten indessen beide Wirkungen wieder zurück. Wie wir bereits früher nachgewiesen hatten [22], lassen sich obige Hemmwirkungen mit Atropin, ähnlich wie mit Hexamethonium, ebenfalls aufheben, ferner mit Eserin steigern, was dafür spricht, dass diese Dilatation auf der Erregung von

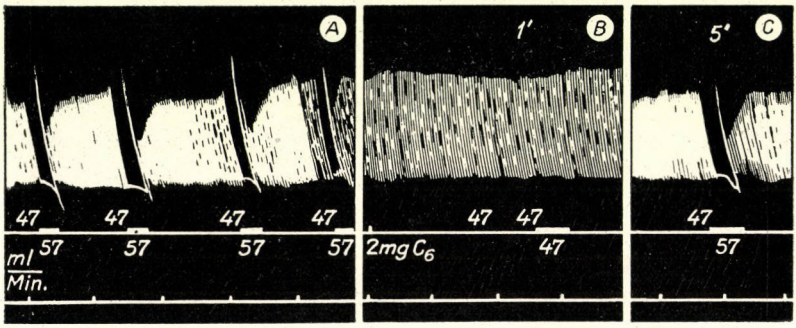


Abb. 4. Einfluss der Reizung der zu den parasympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden Fasern. *A*: Auf Reizung tritt neben Herzhemmwirkung Dilatation auf; die Durchströmung steigt von 47 ml auf 57 ml. *B*: Nach Verabreichung von 2 mg Hexamethonium bleibt sowohl die Dilatation wie die Herzhemmwirkung aus. *C*: Nach Verschwinden des Hexamethoniums kehren beide Wirkungen erneut zurück. Bezeichnungen wie auf Abb. 1

präganglionären Fasern beruht, die ihre Synapsen in den peripheren parasympathischen Ganglien bilden. Ausser den vorstehenden Tatsachen spricht hierfür auch der Umstand, dass durch Verabreichung von 0,005—0,1 μg Azetylcholin ein den obigen Reaktionen ganz ähnlicher Effekt ausgelöst werden konnte.

E. Hier sollen kurz diejenigen Reaktionstypen erwähnt werden, die nicht charakteristisch waren und nur vereinzelt vorkamen.

In zwei Fällen erzielten wir beispielsweise einen dem in Punkt B. beschriebenen ganz ähnlichen Effekt, doch liess sich die anfängliche konstriktorische Wirkung mit Hexamethonium nicht beeinflussen. Wir müssen annehmen, dass es sich hier um eine durch postganglionäre Fasern hervorgerufene Herzmuskelwirkung handelte und die Konstriktion auf Wirkung des in die Koronargefässe diffundierten Adrenalins zustande kam. Durch Adrenalingabe vermochten wir nämlich in einem Teil der Fälle ebenfalls Konstriktion herbeizuführen, die naturgemäss mit Hexamethonium nicht zu beeinflussen war.

In anderen Fällen, wo die zum Herzmuskel verlaufenden postganglionären Fasern im gereizten Nerven wahrscheinlich mit präganglionären Fasern ver-

mengt waren, die zu parasympathischen Ganglien verliefen, stellten wir fest, dass die Dilatation in zwei Phasen stattfindet ; auf eine frühe Dilatation lagert sich die während der Funktionssteigerung auftretende sekundäre Durchströmungssteigerung. Erstere liess sich mit Hexamethonium aufheben, während dieses Pharmakon auf letztere ohne Wirkung war.

Besprechung der Ergebnisse

In bezug auf die Wirkung von Adrenalin bzw. der Sympathikusreizung auf die Kranzgefässe hatten sich die bisherigen Untersuchungen hauptsächlich darauf beschränkt, die direkte Gefässwirkung von den extravasalen Faktoren — wie Blutdruck, Stärke der Herzkontraktionen, Herzarbeit usw. — zu trennen. Zu diesem Zweck wurde ein Teil der extravasalen Faktoren mit Hilfe verschiedener Methoden auf einem konstanten Niveau gehalten und untersucht, ob Adrenalingabe bzw. Sympathikusreizung unter diesen Bedingungen auf die Kranzgefässe noch eine Wirkung ausüben. Im Hinblick auf die zahlreichen verwendeten Methoden sowie auf die Tatsache, dass es nicht möglich war, sämtliche extravasalen Faktoren auf einmal auszuschalten, wird es verständlich, dass auf diesem Gebiet zahlreiche widersprechende Resultate ermittelt wurden.

Nach einigen Autoren verfügen die Kranzgefässe über keine selbständige neurale Kontrolle ; die beobachtete Durchströmungssteigerung beruhe stets auf der vermehrten Herzarbeit, sei deren sekundäre Folge [7]. Laut anderen Autoren [1, 2, 3, 4] sollen die Koronargefässe über eine von extravasalen Faktoren unabhängige, direkte vasomotorische Kontrolle verfügen, die beim Sympathikus in der durch seine Reizung hervorgerufenen Erweiterung der Kranzgefässe zum Ausdruck kommt. Nach Meinung einer dritten Autorengruppe führen Sympathikusreizung und Adrenalin eine direkte konstriktorische Wirkung herbei bzw. können sie sowohl eine konstriktorische wie dilatatorische Wirkung auslösen [16, 17, 18, 19, 20, 21].

Es besteht kein Zweifel, dass alle drei Auffassungen durch zuverlässige experimentelle Resultate gestützt werden, doch ist auch gewiss, dass die Frage auf diese Weise nicht zufriedenstellend geklärt werden kann, weil mit keiner dieser Methoden sämtliche extravasalen Faktoren auf einmal ausgeschaltet werden können und in Abhängigkeit von der verwendeten Methode, je nachdem, welcher Faktor berücksichtigt wird, jeweils andere Resultate zutage treten. Deshalb suchten wir das Problem in der Weise zu lösen, dass wir die Frage umkehrten und nicht untersuchten, ob die Reizung irgendeines Herznerven nach maximaler Ausschaltung der extravasalen Faktoren eine Koronarwirkung herbeiführt, sondern festzustellen versuchten, ob ein sympathischer Herznerv (oder eine Herznervenfaser) angetroffen werden kann, deren Reizung Dilatation oder Konstriktion der Koronargefässe hervorruft, ohne dass sich die extravasalen Faktoren inzwischen verändert hätten.

Die Untersuchung der Frage auf dieser Grundlage war durch unsere Versuche möglich geworden, bei denen wir uns mit den intrakardialen Ganglien des Herzens [23] und ihrer präganglionären Kontrolle [22] befasst hatten. Wir konnten nachweisen, dass in den Nn. accelerantes ausser den bisher bekannten postganglionären, direkt zum Herzmuskel gehenden Fasern auch präganglionäre Fasern verlaufen, die ihre Synapsen nicht im Ggl. stellatum, sondern in den in der Herzwand anwesenden sympathischen und parasympathischen Ganglien bilden. Es ergab sich die Frage, ob die Anwesenheit dieser drei, sich auch funktionell unterscheidenden Faserarten nicht als Erklärung für die im Zusammenhang mit der Sympathikusreizung beobachteten widersprechenden Angaben dienen könnte.

Bei vorliegenden Untersuchungen vermochten wir die Wirkungen dieser drei Faserarten durch Anwendung gewisser Drogen sowie durch Veränderung der Frequenz und Spannung des Reizstromes voneinander zu differenzieren.

Es erwies sich, dass die in den Nn. accelerantes zu den intrakardialen sympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden präganglionären Fasern den Koronargefässen direkte vasokonstriktorische Impulse liefern ; deren Wirkung liess sich nämlich mit Hexamethonium und Ergotamin aufheben bzw. konnte durch Anwendung eines Reizstromes von entsprechender Frequenz und Spannung erreicht werden, dass die Konstriktion auch ohne Steigerung der Herztätigkeit auftrat.

Auf Reizung anderer Accelerans-Äste kam es zu einer Hemmwirkung und Dilatation. Da diese Wirkung durch Azetylcholingabe vollkommen reproduziert, ferner mit Atropin und Hexamethonium aufgehoben sowie mit Eserin gesteigert werden konnte, darf mit Recht angenommen werden, dass der gereizte Herznerv Fasern enthielt, die, zu den parasympathischen Ganglien des Herzens verlaufend, für die Koronargefässe direkte gefässerweiternde Impulse lieferten.

Von dieser Dilatation differenzierte sich scharf die weder mit Hexamethonium noch mit den auf das vegetative Nervensystem wirkenden anderen Drogen beeinflussbare Durchströmungssteigerung, für welche ein protrahierter Charakter bezeichnend war und die stets im Anschluss an Funktionssteigerung auftrat. Diese Dilatation beruht demnach aller Wahrscheinlichkeit nach auf der Erregung postganglionärer, direkt zum Herzmuskel verlaufender Fasern sowie auf der kapillarerweiternden Wirkung der im Zusammenhang mit der Funktionssteigerung frei gewordenen Stoffwechsel-Endprodukte.

In den meisten Accelerans-Zweigen kommen naturgemäss diese drei verschiedenen Faserarten vermischt vor, was eine Erklärung dafür bietet, warum bei der Sympathikusreizung so viele widersprechende Ergebnisse festgestellt werden. Die Tatsache, dass die der direkten vasomotorischen Innervation der Kranzgefässe dienenden präganglionären Fasern die Peripherie mit den zum Herzmuskel verlaufenden Fasern vermengt erreichen, erklärt beispielsweise die Irrannahme, wonach die Kranzgefässe über keine selbständige vasomoto-

rische Kontrolle verfügen, sondern die nach Accelerans-Reizung auftretende Dilatation sekundär auf der vermehrten Herzarbeit beruht [6, 7]. Durch Reizung der zum Herzmuskel führenden postganglionären Fasern wird nämlich die Arbeit und infolgedessen auch der Stoffwechsel des Herzens gesteigert, und die direkte Gefässwirkung kann durch die langdauernde dilatatorische Wirkung der Metaboliten auf die Kapillaren verdeckt werden. Diese Tatsache wird insbesondere dann verständlich, wenn wir berücksichtigen, dass sich am Herzen zu einem kurzen Arterienabschnitt ein Kapillarnetz von normaler Grösse gesellt, wodurch ermöglicht wird, dass die Durchströmung — infolge der Kapillarerweiterung — auch dann zunimmt, wenn sich die Koronargefässe nach der Nervenreizung in Konstriktion befinden. Dies wurde von BROSE und H. SCHAEFER mit einer direkten gefässplethysmographischen Methode nachgewiesen [21]. Anderseits können unsere Feststellungen, wonach die zu den sympathischen Ganglien des Herzens verlaufenden präganglionären Fasern für die Kranzgefässe direkte vasokonstriktorische Impulse liefern, als Erklärung für die Beobachtungen von KATZ [19, 20], SMITH [17, 18], BROSE und H. SCHAEFER [21] und vielen anderen Autoren dienen, laut welchen Adrenalin bzw. Sympathikusreizung die Konstriktion der Kranzgefässe herbeiführen.

FOLKOW und Mitarbeiter [14] beobachteten am Säugetierherzen nach Sympathikusreizung Dilatation und Freiwerden von Azetylcholin ; diese Wirkung beruht ihrer Ansicht nach auf der Anwesenheit cholinerger, sympathischer Dilatatorfasern. Einen ähnlichen Mechanismus nimmt DÖRNER an, nach welchem diese cholinergen Vasodilatatoren reflektorisch in Reizzustand versetzt werden [24, 25]. Diese Feststellungen lassen sich gut mit unserer Beobachtung in Einklang bringen, wonach der Sympathikus zu den parasympathischen Ganglien des Herzens präganglionäre Fasern entsendet und das von hier ausgehende II. Neuron den Koronargefässen direkte gefässerweiternde Impulse liefert.

Abschliessend sei bemerkt, dass die unserseits festgestellten zahlreichen Reaktionstypen, die, wie wir nachweisen konnten, auf der verschiedenen Vermischung der drei Faserarten in den einzelnen Accelerans-Zweigen beruhen, den von einzelnen Autoren im Anschluss an Sympathikusreizung beschriebenen Reaktionsformen im grossen und ganzen entsprechen. Dies beweist, dass die von uns angewandte Methode trotz ihrer Einfachheit geeignet ist, um die vielfach mit sehr unterschiedlichen Verfahren gewonnenen Resultate reproduzieren bzw. erklären zu können.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Sympathikus sendet zu den in der Herzwand anwesenden sympathischen Ganglien präganglionäre Fasern. Die von hier ausgehenden postganglionären Fasern liefern für die Koronargefässe direkte vasokonstriktorische Impulse; ihre Reizung verursacht Konstriktion, ohne Steigerung der Herztätigkeit. Durch Ergotamin oder Hexamethonium wird die Konstriktion abgewehrt.

2. Die sympathischen präganglionären Fasern, welche zu den parasympathischen Ganglien des Herzens verlaufen, vermitteln für die Kranzgefässe direkte vasodilatatorische Impulse. Die auf Reizung auftretende Dilatation und Herzhemmwirkung lassen sich mit Hexamethonium und Atropin aufheben, mit Eserin steigern, während die Reizwirkung dieser Fasern durch Azetylcholingabe reproduziert werden kann.

3. Die vom Ggl. stellatum ausgehenden postganglionären Fasern verlaufen direkt zum Herzmuskel. Durch ihre Reizung werden Tätigkeit und Stoffwechsel des Herzens gesteigert, als deren sekundäre Folge die weder mit Ergotamin noch mit Hexamethonium abwehrbare Durchströmungssteigerung zutage tritt.

4. Die im Zusammenhang mit der Sympathikusreizung am Herzen und an den Koronargefässen zu beobachtenden verschiedenen Reaktionstypen lassen sich mit der verschiedenartigen Vermischung dieser drei Faserarten in den einzelnen Accelerans-Zweigen erklären.

LITERATUR

1. Anrep, G. V., Segall, H. N.: Heart, **13**, 213 (1926).
2. Gollwitzer-Meyer, Kl., Krüger, E.: Arch. ges. Physiol. **236**, 594 (1935).
3. Rein, H.: Verhandl. Dtsch. Ges. inn. Med., 247 (1931).
4. Rein, H.: Z. Biol., **92**, 101, 115 (1932).
5. Shipley, R. E., Rotta, A., Gregg, D. E., Pritchard, W. H.: Am. J. Physiol., **133**, 445 (1941).
6. Gregg, D. E., Shipley, R. E.: Am. J. Physiol., **141**, 382 (1944).
7. Shipley, R. E., Gregg, D. E.: Am. J. Physiol., **143**, 396 (1945).
8. Eckenhoff, J. E., Hafkenschiel, J. H., Landmesser, C. M.: Am. J. Physiol., **148**, 584 (1947).
9. Eckenhoff, J. E., Hafkenschiel, J. H., Landmesser, C. M., Harmel, M.: Am. J. Physiol., **149**, 634 (1947).
10. Eckstein, R. W., Stroud, M., Dowling, C. V., Pritchard, W. H.: Am. J. Physiol., **162**, 226 (1950).
11. Eckstein, R. W., Stroud, M., Dowling, C. V., Pritchard, W. H.: Am. J. Physiol., **163**, 539 (1950).
12. Morawitz, P., Zahn, A.: Zbl. Physiol., **26**, 465 (1912).
13. Hausner, E., Essex, H. E., Herrick, J. F., Baldes, E. J.: Am. J. Physiol., **131**, 43 (1940).
14. Folkow, B., Frost, J., Haeger, K., Uvnäs, B.: Acta Physiol. Scand., **15**, 421 (1948).
15. Folkow, B., Frost, J., Uvnäs, B.: Acta Physiol. Scand., **17**, 201 (1949).
16. Lu, F. C., Melville, K. J.: J. Physiol., **113**, 365 (1951).
17. Smith, D. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **73**, 449 (1950).
18. Smith, D. J., Syverton, J. T., Coxe, J. W.: Circulation, **4**, 890 (1951).
19. Katz, L. N., Jochim, K.: Am. J. Physiol., **126**, 394 (1939).
20. Katz, L. N., Lindner, E., Weinstein, W., Abramson, D. J., Jochim, K.: Arch. Intern. Pharmacodynamie, **59**, 399 (1938).
21. Brose, W., Schaefer, H.: Z. Biol., **106**, 81 (1953).
22. Szentiványi, M., Kiss, E.: Acta Physiol. Hung. **10**, 337 (1956).
23. Szentiványi, M., Kövér, A.: Acta Physiol. Hung., **9**, 203 (1956).
24. Dörner, J.: Arch. ges. Physiol. **257**, 480 (1953).
25. Dörner, J.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **222**, 196 (1954).

ANALYSE DER KARDIOAKZELERATORISCHEN WIRKUNG DES DEGENERIERTEN VAGUSSTAMMES

Von

M. SZENTIVÁNYI und E. KISS

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

Es ist seit langem bekannt, dass die Reizung des in der Höhe des Larynx durchtrennten und degenerierten Vagus Herzbeschleunigung hervorruft. Anfänglich wurde diese Erscheinung den sog. vagalen Akzeleratorfasern zugeschrieben. Laut ARLOING [1] degenerieren diese aus dem Vaguskern stammenden Fasern später als die Kardioinhibitorfasern, wodurch ermöglicht wird, dass die Reizung des degenerierten Vagusstumpfes — infolge Anwesenheit der lange Zeit hindurch degenerationsresistenten Fasern — zur Herzbeschleunigung führt.

JOURDAN und MASBERNARD [2, 3] haben 1952 darauf hingewiesen, dass in der Degenerationsdauer der einzelnen Fasernarten keine solchen Unterschiede bestehen. Sie meinen, dass für die Auslösung dieses Phänomens die aus dem Ganglion stellatum ausgehenden und zu dem Vagus sich mischenden Fasern verantwortlich sind ; in ihren Versuchen konnte diese Erscheinung durch Entfernung des Ganglion stellatum, bzw. durch dessen Nikotinpinselung ausgelöscht werden. Obzwar diese Versuche ohne Zweifel bewiesen, dass das Ganglion stellatum Fasern zum Vagus liefert, die in bedeutendem Masse an der Auslösung der herzbeschleunigenden Wirkung der Reizung des degenerierten Vagus beteiligt sind — anderseits ist es aber auch klar, dass diese Versuche die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass in der Auslösung dieses Phänomens auch andere Fasern eine Rolle spielen können. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass sowohl die Exstirpation des Ganglion stellatum wie auch die Nikotinpinselung Eingriffe darstellen, bei welchen ein feinerer Mechanismus möglicherweise nicht zur Geltung gelangt, weil er durch die während der akuten Versuche sich entwickelnde Schockwirkung verdeckt werden kann.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten haben wir die Rolle der sympathischen Fasern von der Wirkung der im Vagus eventuell anwesenden anderen Akzeleratorfasern zu trennen versucht. Zu diesem Zweck haben wir die Wirkung der Reizung des degenerierten Vagusstumpfes an sympathektomisierten Tieren beobachtet. Gleichzeitig versuchten wir Aufklärung über Ursprung und Natur der für die unter diesen Umständen beobachteten herzstimulierenden Wirkung bzw. für deren Auslösung verantwortlichen Fasern zu erhalten.

Methodik

Unsere Versuche haben wir an mit Chloralose (0,09 g/kg) narkotisierten Katzen beiderlei Geschlechts vorgenommen. 2—6 Wochen vor Versuchsbeginn haben wir in Evipan-Narkose unter aseptischen Umständen den Vagus in der Höhe des Larynx einseitig durchtrennt, sodann haben wir — die Halswunde schichtweise schliessend — mittels Öffnung des gleichseitigen III. Interkostalraumes das Ganglion stellatum, bzw. den thorakalen Teil des Grenzstranges aus dem Brustkorb entfernt. 2—6 Wochen nach der Operation haben wir die Halswunde des Tieres unter Chloralosenarkose wieder geöffnet, den degenerierten peripheren Stumpf des durchtrennten Vagus aufgesucht, und diesen nach Anbringung entsprechender Elektroden mit Rechteckimpulsen von 4—6 V Spannung und 20/Sek. Frequenz gereizt. Die Frequenz wurde palpatorisch an der Herzspitze gezählt.

Die thermische Reizung des Nerven wurde mit Hilfe einer U-förmig gebogenen Glaskapillare durchgeführt, durch welche aus einem Behälter Wasser von 47°—52° C zirkulierte.

Das in den Versuchen verwendete Hexamethoniumbromid wurde (0,5—3 mg/kg) in die V. jugularis injiziert.

In einigen Fällen wurde nach Beendigung des unter aseptischen Umständen durchgeführten Versuches die Halswunde wieder geschlossen, wodurch die Reizung des degenerierten Vagusstammes bei dem gleichen Tier in verschiedenen Zeitpunkten der Degeneration ermöglicht wurde.

Ergebnisse

Wie aus Tabelle I ersichtlich, führt in der Mehrzahl der Fälle die Reizung des degenerierten Vagus von Tieren mit vorangehender Stellektomie bzw. Grenzstrangentfernung zu einer bedeutenden Frequenzerhöhung. Nur bei einem Tier [IV] erschien keine herzstimulierende Wirkung. All dies spricht dafür, dass der degenerierte Vagusstamm solche Akzeleratorfasern enthält, welche nicht aus dem Sympathikus stammen. Der Umstand, dass die Durchtrennung des Vagus in der Höhe des Larynx vorgenommen wurde, schliesst die Möglichkeit des Ursprungs der obigen Akzeleratorfasern aus den sensiblen Vagusganglien oder aus dem bulbären Vaguskern aus. Es scheint darum — per exclusionem — wahrscheinlich, dass die in der Auslösung des Phänomens teilnehmenden Fasern aus dem Grunde nicht degenerierten, weil ihre trophischen Zellen auf der Peripherie gelagert sind, d. h. weil die Degeneration ein Prozess aszendierenden Typs ist, ähnlich der bei der Durchtrennung der afferenten Bahnen des Rückenmarks beobachteten aszendierenden Degeneration. Die histologische Kontrolle unserer Annahme ist im Gange. Dass für die Auslösung der Erscheinung tatsächlich die afferenten Fasern verantwortlich sind, wird auch durch jene Beobachtung bekräftigt, dass durch einen Wärmereiz von 46°—52° C die Erscheinung ebenso ausgelöst werden kann, wie durch elektrische Reizung.

Aus den Untersuchungen von Euler, Folkow, Ström und Uvnäs ist nämlich bekannt [4, 5], dass Wärme von 46°—52° C nur die afferenten Fasern reizt, während sie auf die efferenten Fasern vollkommen wirkungslos ist.

Abb. 1 stellt den Ablauf von einem typischen Versuch graphisch dar. Es ist zu sehen, dass durch thermische Reizung des degenerierten Vagus mit

52° C die Frequenzsteigerung ebenso ausgelöst werden kann, wie durch elektrische Reizung. Die Tatsache, dass Reizung mit 52° C die Herzstimulation nicht durch ihre Wärmewirkung auf die umgebenden Gewebe auslöst, sondern durch die spezifische Reizung der antidrom geleiteten Fasern, versuchten wir dadurch zu beweisen, dass wir dem Wärmereiz abwechselnd den Vagus, bzw. die umgebenden Gewebe aussetzten. Da im zweiten Fall die Frequenzsteigerung nicht erfolgte, kann angenommen werden, dass der Reiz mit 52° C durch die, auf die

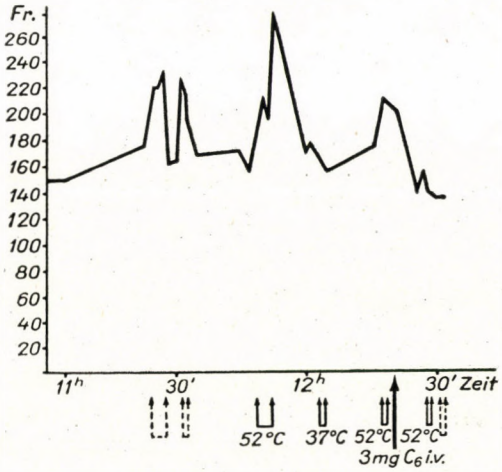


Abb. 1. Wirkung der elektrischen und thermischen Reizung des degenerierten peripheren Vagustumpfes
Abszisse: Zeit. Ordinate: Frequenz/Min.
Durchbrochener Pfeil: elektrische Reizung.
Ausgezogener Pfeil: thermische Reizung.

im Vagus verlaufenden afferenten Fasern ausgeübte spezifische Wirkung zur Herzbeschleunigung führte. Thermische Reizung mit 37° C hat — wie auf Abb. 1 zu sehen ist — keine herzstimulierende Wirkung zur Folge.

Zur Erklärung der Tatsache, dass die antidrome Reizung von afferenten Fasern zu Frequenzsteigerung, d. h. zu einer adrenalinartigen Wirkung führt, bieten sich zwei Möglichkeiten. Die eine Erklärung wäre, dass bei der antidromen Reizung der sensiblen Fasern an deren Endapparaten ein adrenalinartiger Stoff freigesetzt wird. Der zweiten Erklärung gemäss stehen die gereizten Fasern mit den peripheren sympathischen Ganglienzellen in einer Synapsis-artigen Verbindung, und die adrenerge Wirkung ist die Folge der antidromen Reizübertragung auf diese Zellen. Die erste Annahme — die Freisetzung von Adrenalin durch die Rezeptoren — würde auf die Anwesenheit von adrenergen Rezeptoren im Herzen hinweisen. Die zweite Annahme wäre aus dem Grunde von besonderem Interesse, weil sie dafür spräche, dass aus den Herzganglien die — wie vorangehend nachgewiesen — bei der Regulierung der Herztätigkeit

Tabelle I

Nr.	Datum des Eingriffs— des Versuchs	Vor Verabreichung von Hexamethonium			Nach Verabreichung von Hexamethonium		
		Anfangs-frequenz	Nach elektrischer Reizung	Nach thermischer Reizung von 46—52 °C	Anfangs-frequenz	Nach elektrischer Reizung	Nach thermischer Reizung von 46—52° C
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
*I.	1955. 30. IX.—18. X.	160	200				
*II.	8. XI.—25. XI.	140	240				
**III.	1956. 12. XII.—2. I.	168	230	280	140	134	134
IV.	23. XII.—4. I.	164	168	168			
V.	23. XII.—4. I.	168	214	234	160	164	164
VI.	23. XII.—9. I.	156	196	220	124	124	124
**VII.	12. XII.—12. I.	164	214	220	144	154	148
**VIII.	12. XII.—20. I.	168	186	200	166	164	164
**IX.	12. XII.—10. II.	156	220	226	148	150	150
X.	10. I.—27. II.	148	214	188	136	136	136
XI.	10. I.—29. II.	200	270	260	200	210	184

Wirkung der elektrischen und thermischen Reizung des in Höhe des Larynx durchtrennten und degenerierten Vagus auf die Frequenz der Herztätigkeit vor und nach Anwendung von Hexamethonium. Bei den Versuchstieren wurde gleichzeitig mit der Durchtrennung des Vagus in der Höhe des Larynx auch die Entfernung des Ganglion stellatum bzw. des thorakalen Abschnittes des gleichseitigen Grenzstranges vorgenommen

*Vagotomisiertes, akut stellektomisiertes Tier.
**Unter aseptischen Umständen am gleichen Tier vorgenommene Versuche. Nach Beendigung des Versuches wurde die Halswunde wieder geschlossen.

und hauptsächlich des Kalibers der Kranzarterien eine wichtige Rolle spielen [6, 7, 8, 9], auch afferente Impulse ausgehen. Auf diese Weise wären also diese intrakardialen Ganglien mit den höheren neuralen Abschnitten nicht nur durch präganglionäre, d. h. efferente Fasern verbunden [7, 8], sondern auch durch afferent geleitete Fasern. Dies jedoch würde bedeuten, dass diese Strukturen wichtige Organisatorzentren darstellen.

Auf Abb. 1 ist zu sehen, dass mit Hexamethonium sowohl die auf elektrischem, als auch die auf thermischem Wege ausgelöste Antwort blockiert werden kann.

Die Kolumnen 6—8 der Tabelle zeigen jedoch, dass diese Beeinflussung eine konsequente war: Hexamethonium hat die Akzeleratorwirkung der Reizung des degenerierten Vagusstumpfes in allen Fällen ausgelöscht. All dies spricht eher für die letztere der oben besprochenen Annahmen, — obzwar auf Grund neuerer Untersuchungen [10, 11, 12], nach denen der Angriffspunkt des Hexamethoniums sich nicht ausschliesslich auf die autonomen Synapsen begrenzt, vorausgesetzt werden kann, dass das Pharmakon seine Wirkung an den afferenten Endapparaten ausübt. Die Natur dieser Rezeptoren und die Frage der elektrophysiologischen Analyse obengenannter Fasern sollen durch weitere Versuche geklärt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die elektrische Reizung des in der Höhe des Larynx durchtrennten und degenerierten peripheren Vagusstumpfes führt zu Herzbeschleunigung.

2. In chronischen Versuchen beeinflusst die gleichseitige Sympathektomie diese Reaktion nicht; diese kann also nicht den sich zum Vagus mischenden sympathischen Fasern zugeschrieben werden.

3. Die Herzbeschleunigung kann auch durch Reizung des peripheren Vagusstumpfes mit Wärme von 46°—52° C ausgelöst werden, was dafür spricht, dass die Reaktion eine Folge der antidromen Reizleitung afferenter Fasern ist.

4. Die Wirkung der elektrischen und thermischen Reizung des degenerierten Vagusstumpfes wird durch Hexamethonium ausgelöscht.

5. Auf Grund der Resultate kann angenommen werden, dass im Vagus auch solche afferente Fasern verlaufen, deren trophische Zellen peripher gelagert sind; die antidrome Reizung dieser Zellen führt in der Herzwand zur Freisetzung von Adrenalin und zu Herzbeschleunigung.

LITERATUR

1. Arloing, S.: Arch. Physiol. 75 (1896).
2. Jourdan, F., Masbernard, A.: C. R. Soc. Biol. **146**, 275 (1952).
3. Jourdan, F., Masbernard, A.: C. R. Soc. Biol. **146**, 1204 (1952).
4. Euler, C. v.: Acta Physiol. Scand. **14**. Suppl. 45 (1947).
5. Folkow, B., Ström, G., Uvnäs, B.: Acta Physiol. Scand. **21**, 145 (1950).
6. Szentiványi, M., Kövér, A.: Acta Physiol. Hung. **9**, 203 (1956).
7. Szentiványi, M., Kiss, E.: Acta Physiol. Hung. **10**, 337 (1956).
8. Kiss, E., Szentiványi, M.: Acta Physiol. Hung. **11**, 339 (1957)
9. Szentiványi, M., Kiss, E.: Acta Physiol. Hung. **11**, 347 (1957)
10. Hilton, S. M.: J. Physiol. **123**, 289 (1954).
11. Douglas, W. W.: J. Physiol. **118**, 373 (1952).
12. Douglas, W. W., Gray, J. A. B.: J. Physiol. **119**, 118 (1953).

AUTOMATISCHE APPARATUR ZUR BIOLOGISCHEN TITRIERUNG

Von

A. Kövér, L. Balla und L. Pusztai

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 25. September 1956)

Die quantitative Bestimmung biologischer Wirkstoffe wird im allgemeinen an den im Flüssigkeitsbad aufgehängten isolierten Organen vorgenommen [1, 2]. Die zur quantitativen Bestimmung erforderliche geringste Wirkstoffmenge ist vom Volumen des Bades abhängig, doch darf das Volumen des Bades nicht kleiner sein als 2 ml. Das isolierte Organ kann aber auch in einem Raum mit konstantem Dampfdruck aufgehängt werden, wenn wir das Organ gleichzeitig in optimalem Milieu bei Durchströmung der Organoberfläche mit physiologischer Salzlösung halten. Dieses Verfahren wird nach Gaddum [3] als Superfusion bezeichnet. Die Durchströmung mit physiologischer Salzlösung wird für eine bestimmte Zeit unterbrochen und der biologische Wirkstoff auf die Organoberfläche gegeben, worauf man erneut zur Durchströmung mit physiologischer Salzlösung übergeht. Zwecks Normalisierung der Salzkonzentration der zu untersuchenden Lösung und Isolierung des Wirkstoffs z. B. von Blutplasma oder Gewebsextrakt nehmen wir die papierchromatographische Vorbereitung vor [4, 5, 6]. Die bei der Eluierung des Chromatogramms gewonnenen sehr geringen Wirkstoffmengen erfordern die Anwendung der nachfolgend beschriebenen Superfusionsmethode mit maximaler Empfindlichkeit [7, 8] unter den optimalsten Versuchsbedingungen. Zur Sicherung der optimalen Titrierungsbedingungen dient die in der Werkstatt unseres Institutes konstruierte automatische Apparatur.

Die Stabilität der Empfindlichkeit des Organs ist von der Verwirklichung der optimalen Bedingungen abhängig. Je empfindlicher eine biologische Methode, um so grössere Abweichungen kann die Veränderung der Empfindlichkeit des bei der biologischen Titrierung benutzten isolierten Organs verursachen. Folgende Faktoren sichern die Stabilität der Empfindlichkeit des Organs: Gleiches pH der Lösungen, entsprechende Regelung der Temperatur, konstante Ionenkonzentration, genauer Wechsel der Wasch- und Standard- bzw. Testlösungen, Dosierung in gleichen Zeitperioden und während gleicher Zeitdauer.

Die automatische Vorrichtung besteht einerseits aus dem die Teilprozesse koordinierenden elektronischen System (Abb. 1), anderseits aus dem die Temperatur der Superfusionslösung regulierenden elektronischen Teil (Abb. 2). Aus

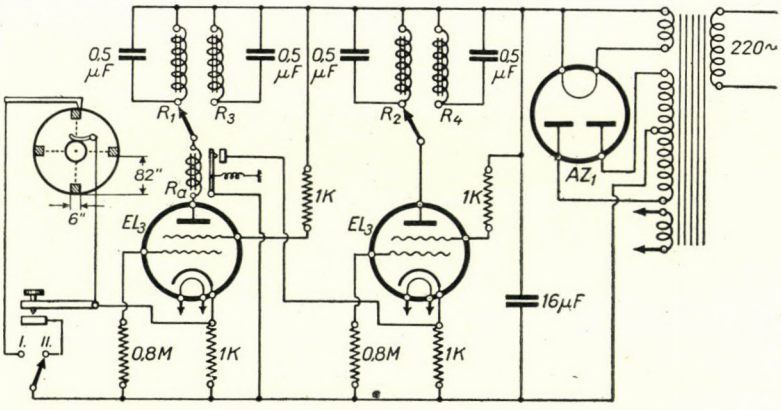


Abb. 1. Schaltungsschema des die Teilprozesse koordinierenden elektronischen Teils

den Abb. 1 und 3 ist ersichtlich, dass die zeitliche Koordination der Arbeitsprozesse von einem Synchronmotor vorgenommen wird, der nach Geschwindigkeitsverringerung je Minute $^1/_6$ Drehung ausführt. Während der 6 Minuten dauernden Drehung des Synchronmotors folgen aufeinaderlen vier Zyk, deren Dauer jeweils 90 Sek. beträgt. Auf die Achse der vom Synchronmotor angetriebenen Vorrichtung zur Geschwindigkeitsverminderung haben wir die Schaltscheiben montiert. Der Wechsel der vier Zyklen wird durch diese Scheiben gesichert. Die äussere Schaltscheibe (Abb. 3) steuert die periodische Tätigkeit der Wasch- (R_1, R_3) und Dosierungs- (R_2, R_4) Relais. Vom 90 Sek.-Zyklus strömt die Waschflüssigkeit 82 Sekunden an der Oberfläche des isolierten Organs; in der 82. Sekunde wird die Strömung der Waschflüssigkeit durch die Bewegung des Relais R_1 oder R_3 (Abb. 1) zum Stillstand gebracht, und gleichzeitig ermöglicht das

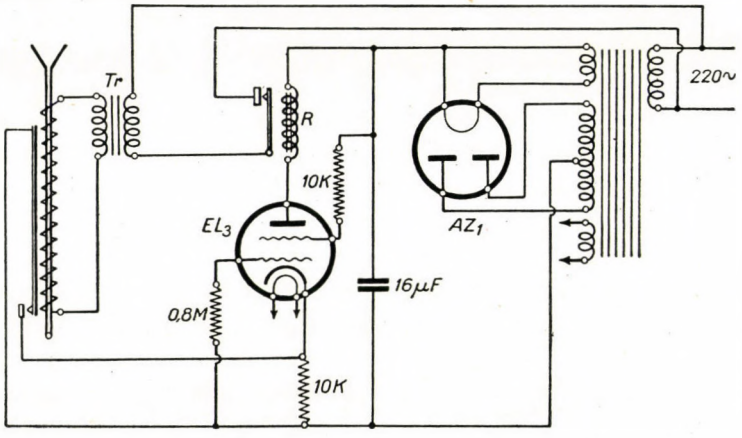


Abb. 2. Schaltungsschema des die Temperatur regulierenden elektronischen Teils

Relais R_2 oder R_4, in Ruhezustand tretend, die Strömung der Standard- bzw. Testlösung. Die Standard- bzw. zu untersuchende Lösung fliesst 8 Sek. hindurch auf die Oberfläche des Organs, in der 8. Sekunde wird das Relais R_2 oder R_4 verschlossen, R_1 bzw. R_3 öffnen sich, und die Waschlösung beginnt zu strömen.

Es sind zwei Wasch- und zwei Dosierungssysteme vorhanden. Ein Waschgefäss enthält physiologische Salzlösung, das andere einen entsprechenden Hemmstoff (Antihistaminika, Sympatho- bzw. Parasympatholytika) enthaltende Salzlösung. Das erste Dosierungssystem dient zur Dosierung der Standardlösung, das zweite zur Dosierung der Test- und der Standardlösungen von

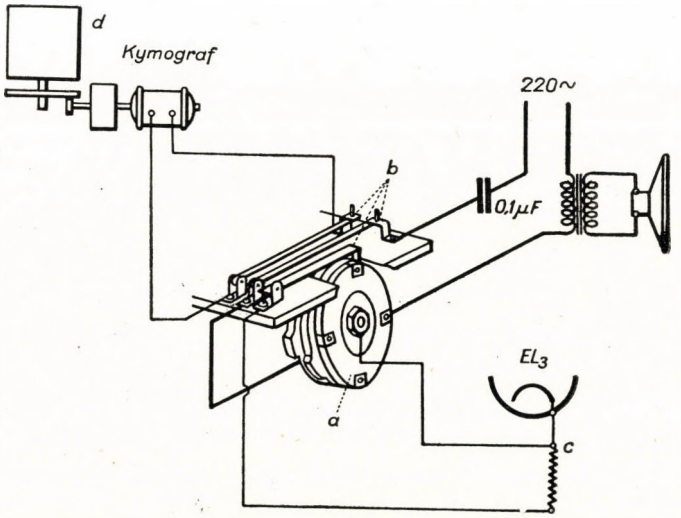


Abb. 3. (*a*) Schaltscheibe. *Äussere Scheibe:* aus Plexiglas hergestellt, mit Metallkontakten, glatt gedrechselt. Der zugehörige Schleichkontakt wurde so ausgebildet, dass er mit seiner schmalen Oberfläche genauen Verschluss und Öffnung ermöglicht. *Mittlere und innere Scheiben:* Aus Plexiglas hergestellte Daumenscheiben, die teils den Schalter des Lautsprechers (mittlerer), teils den des Kymographen (innerer) heben. (*b*) Kontakte, (*c*) die erste Elektronenröhre (El-3) mit Kathodenwiderstand, (*d*) Kymograph, (*e*) Lautsprecher

verschiedener Konzentration. Das Relais der ersten und der zweiten Dosierungsvorrichtung funktioniert antagonistisch zum Relais der 1. oder 2. Waschanordnung. Aus dem Schaltungsschema (Abb. 1) ist ersichtlich, dass die Wasch- (R_1, R_3) und Dosierungsrelais (R_2, R_4) von Elektronenröhren (El-3) geschaltet werden, die mit entgegengesetzter Phase funktionieren.

Die zu den Relais R_1, R_3 gehörige Röhre EL3 wurde mit grossem Kathodenwiderstand geschlossen, und die Röhre funktioniert nur dann, wenn entweder die äussere Schaltscheibe oder der Handschalter den Kathodenwiderstand kurzschliessen. Der sich entwickelnde Anodenstrom der Elektronenröhre setzt die Relais R_1 oder R_3 und das in den Anodenkreis der Elektronenröhre eingefügte Relais R_A in Tätigkeit. Die Relais R_1 und R_3 heben die Strömung der

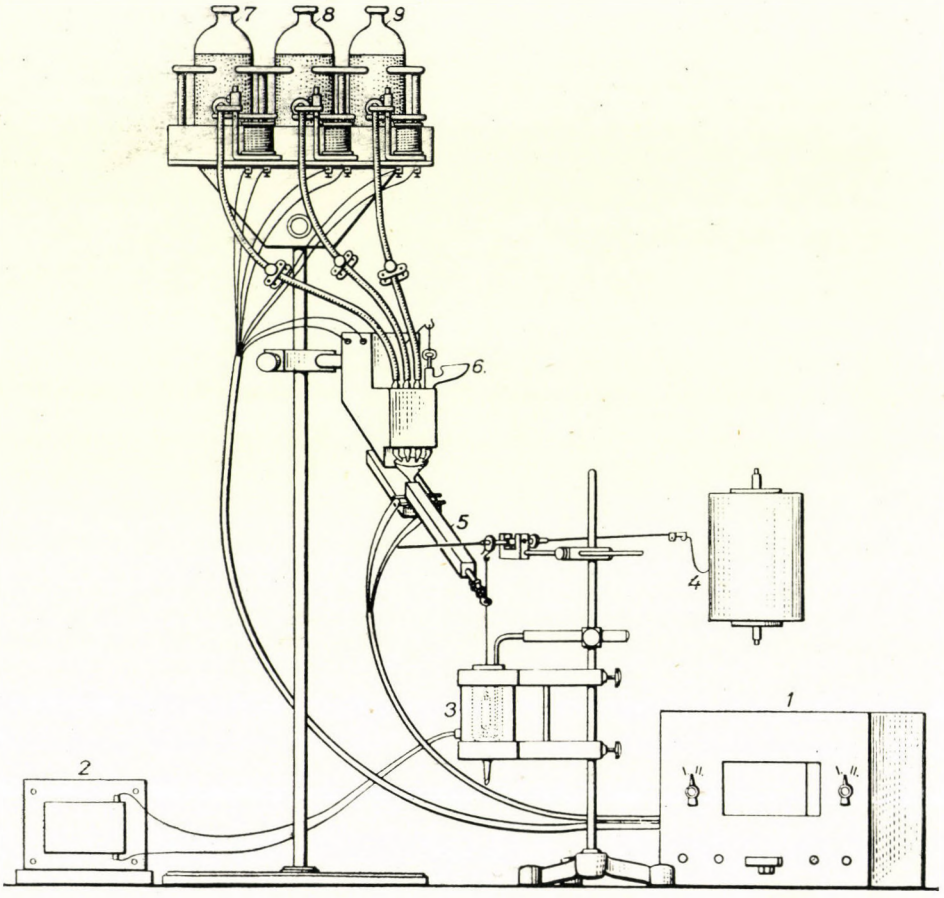


Abb. 4. Schema der automatischen Apparatur. 1. Elektronischer Teil der automatischen Apparatur; 2. Heiztransformator; 3. äusseres Wasserbad; 4. Schreibarm; 5. Vorwärmer; 6. II. Dosierungsvorrichtung; 7. I. Wasch-; 8. I. Dosierungs-; 9. II. Waschvorrichtung

Waschflüssigkeit auf. Da die beiden EL3-Röhren mit entgegengesetzter Phase funktionieren, behebt der Schalter des Relais R_A bei Entwicklung des Anodenstromes der ersten Röhre den Kurzschlusszustand des Kathodenwiderstandes der zweiten Röhre, und die zweite Röhre wird durch den Widerstand von 10 000 Ohm sofort verschlossen. Da hierdurch der Anodenstrom der zweiten Röhre abgesperrt wird, beginnt, nachdem die Relais R_2, R_4 in Ruhezustand gekommen sind, die Strömung der Standard- bzw. Testlösung. Dieses Verfahren versichert die genau antagonistische Tätigkeit der Relais. Die Relais können auch mit Handschalter in Tätigkeit gesetzt werden, in diesem Fall hängt die Dosierungsdauer von der Zeitdauer des Schalterverschlusses ab.

Die innere Schaltscheibe ist dazu bestimmt, den Kymographen in Gang zu setzen. 6 Sek. vor der Dosierung wird der Kymograph abgestellt. Die mittlere

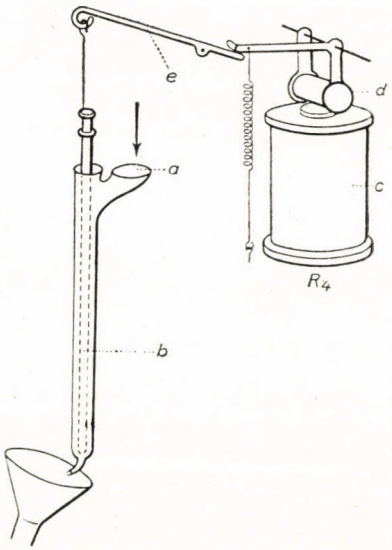


Abb. 5. (*a*) Glasrohr der zur Testierung dienenden (II.) Dosierungsvorrichtung, (*b*) das das Dosierungsrohr verschliessende geschliffene Glasstäbchen, (*c*) Elektromagnet, (*d*) Weicheisen, (*e*) das Ventil bewegender Hebelarm

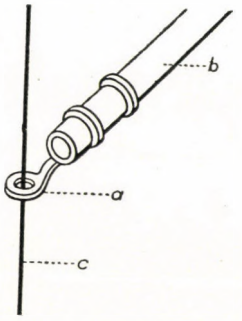


Abb. 6. (*a*) Der an das Vorwärmerrohr mit Gummiringen fixierte, aus Glas hergestellte Ring gewährleistet gleichmässige Flüssigkeitsströmung. (*b*) Vorwärmerrohr, äusserer Durchmesser 4 mm, Länge 17—20 cm. (*c*) Durch den Glasring gezogener, zur Aufhängung des Organs dienender Faden

Scheibe dient zur Schaltung des auf die Dosierung aufmerksam machenden Lautsprechersignals, welches 15 Sekunden vor der Dosierung ertönt und bis zum Beginn der Dosierung erklingt.

Die Teilprozesse reihen sich folgendermassen aneinander: Strömung der Waschflüssigkeit, 15 Sek. vor der Dosierung Lautsprechersignal, 6 Sek. vor der Dosierung Ingangsetzen des Kymographen, Verstummen des Lautsprechersignals, zu gleicher Zeit Umschaltung von der Wasch- zur Dosierungsvorrichtung, 8 Sek. Dosierung, Umschaltung von der Dosierungs- zur Waschvorrichtung, sodann 30 Sek. später Abstellung des Kymographen.

Die Regelung der Temperatur der Superfusionslösung und deren Stabilisierung auf konstantem Niveau erfolgt durch das andere elektronische System (Abb. 2). Die vom Gleichrichtersystem versorgte Röhre EL3 funktioniert nur dann, wenn der Bimetall-Thermoschalter den die Röhre verschliessenden Kathodenwiderstand kurzschliesst. Der sich entwickelnde Anodenstrom unterbricht den primären Stromkreis des Heiztransformators, wodurch die Heizung der Vorwärmerröhre — in der die physiologische Salzlösung strömt — aufhört. Wenn der Thermoschalter den Kurzschlusszustand des Kathodenwiderstandes aufhebt, hört der Anodenstrom auf, und der Heizstromkreis ist wieder eingeschaltet.

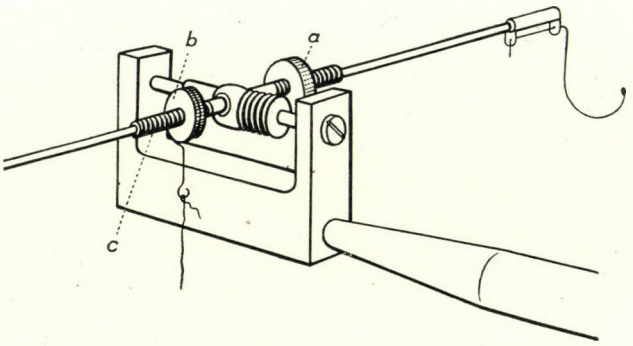


Abb. 7. Schreibarm. Mit Schraubengang versehene kleine Gewichte (*a* und *b*), die durch Drehung am Gewinde *c* die empfindliche Veränderung der Belastung ermöglichen. In der V-förmigen Rille des kleinen Gewichtes *b* befindet sich eine mit Gelenk versehene Schlinge, an die der vom oberen Ende des isolierten Organs ausgehende Faden gebunden wird

Es empfiehlt sich, neben den Widerstand von 10 000 Ohm (grosser Kathodenwiderstand) noch einen Widerstand von etwa 100—200 Ohm zu schalten, der nur die Entwicklung des zum sicheren Anziehen der Relais erforderlichen Anodenstromes gestattet. Diesen Widerstand, der vom Kurzschluss nicht betroffen wird, muss man den Ausmassen entsprechend wählen.

Beim Aufhängen des isolierten Organs funktioniert nur der wärmeregulierende Teil, an der Oberfläche des Organs strömt normale Salzlösung. Etwa 30 Sekunden nach dem Einlegen des Organs schalten wir auch die automatische

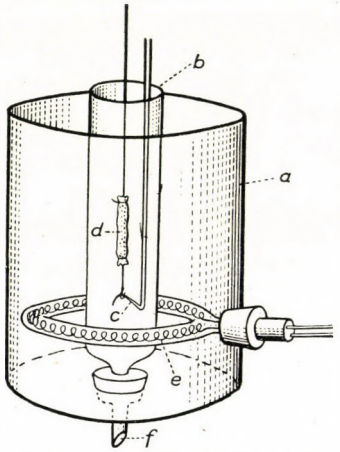


Abb. 8. Die Erwärmung des Dampfraumes erfolgt durch ein äusseres Wasserbad, welches durch eine in einer Glasröhre befindliche Glühdraht-Spirale geheizt wird. Die Intensität der Heizung kann durch gewöhnlichen Widerstand geregelt werden. Die Heizspannung liefert ein Transformator von 220 V/24 V. (*a*) Äusseres Glasgefäss. (*b*) Glasrohr mit etwa 100 ml Volumen und 3—4 cm Durchmesser, dessen obere Öffnung mit einer Korkplatte teilweise bedeckt wird. (*c*) In verschiedener Richtung bewegliche Schlinge (aus rostfreiem Stahl). (*d*) Das isolierte Organ. (Gelangt Darm zur Anwendung, dürfen die beiden Enden nicht verschlossen werden, vielmehr benutzt man Schlingenbindung.)

Steuerung ein und setzen die erste Wasch- mit der ersten Dosierungsvorrichtung in Tätigkeit. Aus dem ersten Dosierungsgefäss strömt in regelmässigen Zeitintervallen und eine konstante Zeitdauer hindurch Standardlösung von gleicher Konzentration und Menge auf die Oberfläche des Organs. Dies ist die Standarddosierung, die bis zur Stabilisierung der Empfindlichkeit des Organs durchgeführt wird. Sobald die Empfindlichkeit des Organs konstant geworden ist, setzen wir im weiteren die erste Wasch- mit der zweiten Dosie-

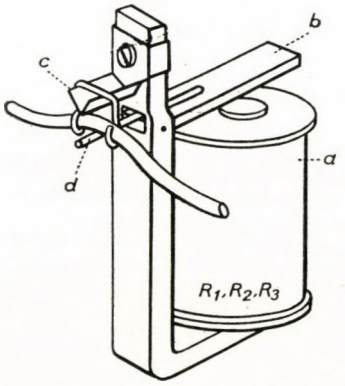


Abb. 9. (*a*) Elektromagnet. (*b*) Weicheisenblatt mit aufmontierter Metallstange. (*c*) Zum Verschluss des Gummischlauches dienende, V-förmig ausgebildete Metallplatte, die den Ausmassen des Gummischlauches entsprechend verstellbar ist. Der Elektromagnet ist 35—40 mm gross und aus 0,18 mm dickem Draht gewickelt

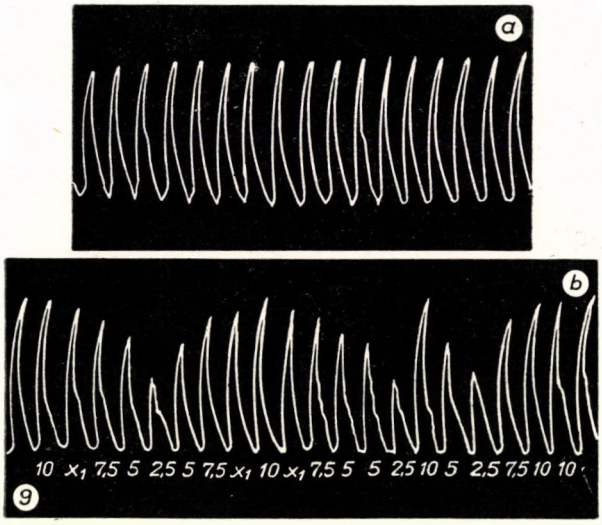


Abb. 10. a. Nach Dosierung von je 10 μg/ml H registrierte Kontraktionen bei Einstellung der Darmempfindlichkeit

b. Bei Dosierung von H-Standardlösungen verschiedener Konzentration (μg/ml) und H-Lösung unbekannter Konzentration (x_1) registrierte Darmkontraktionen

rungsvorrichtung in Tätigkeit. Mit der zweiten Dosierungsvorrichtung erfolgt die Dosierung der Test- bzw. der Standardlösungen von verschiedener Konzentration. In die zweite Dosierungsvorrichtung giessen wir 0,8 ml der zu untersuchenden Lösung (die überschüssige Menge wird mit Hilfe einer Kapillare durch die Wasserluftpumpe abgesaugt). In die zweite Dosierungsvorrichtung muss die Test- bzw. die Standardlösung spätestens während des Lautsprechersignals gegossen werden, damit die automatische Apparatur die Dosierung in regelmässigen Zyklen durchführen kann. Die erste Dosierungsvorrichtung wird nur zur Stabilisierung der Empfindlichkeit verwendet. Bei der Titrierung wird der Gummischlauch der ersten Dosierungsvorrichtung naturgemäss verschlossen.

Nach der quantitativen Titrierung kann eine qualitative Testierung vorgenommen werden. Vor der qualitativen Testierung setzen wir erst die 2. Waschvorrichtung, die den entsprechenden Hemmstoff enthält, mit der 1. Dosierungsvorrichtung in Tätigkeit und warten ab, bis die Hemmwirkung ein solches Ausmass annimmt, dass bei Standarddosierung keine Reaktion mehr auftritt. Hiernach wird die 2. Wasch- mit der 2. Dosierungsvorrichtung in Tätigkeit gesetzt und die qualitative Testierung der zu untersuchenden Lösung ausgeführt. Die Superfusionsmethode ist zur Titrierung verschiedener biologischer Substanzen geeignet und 5—10fach empfindlicher als die Wasserbadmethode. Die automatische Apparatur haben wir so konstruiert, dass die Zeitperioden, den Ansprüchen der verschiedenen Substanzen und isolierten Organe entsprechend, durch Austausch der Scheiben des Synchronmotors variiert werden können.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur biologischen Titrierung wurde eine automatische Apparatur konstruiert, mit deren Hilfe die zu untersuchende Substanz unter optimalen Verhältnissen auf die Oberfläche des isolierten Organs dosiert werden kann. Die automatische Apparatur besteht aus zwei elektronischen Teilen, von denen einer die Koordination der Teilprozesse durchführt, der andere die Temperatur reguliert. Durch das die Koordination der Teilprozesse ausführende elektronische System ist die Dosierung der zu untersuchenden sowie der Standarddosen in regelmässigen Perioden und während konstanter Zeitdauer versichert und wird ferner der Kymograph sowie der auf die Dosierung aufmerksam machende Lautsprecher geschaltet. Die Superfusionsmethode, bei der die automatische Apparatur zur Anwendung gelangt, ist 5—10mal empfindlicher als das Wasserbadverfahren. Von der Sicherung der optimalen Bedingungen — diesem Zweck dient die automatische Apparatur — hängt die Stabilität der Empfindlichkeit des isolierten Organs ab.

LITERATUR

1. Gaddum, J. H., Lembeck, F.: Brit. J. Pharmacol. Chem., **4**, 401 (1949).
2. Boura, A., Mongar, J. L., Schild, H. O.: Brit. J. Pharmacol. Chem. **9**, 24 (1954).
3. Gaddum, J. H.: Brit. J. Pharmacol. Chem. **8**, 321 (1953).
4. Born, G. V. R., Vane, J. R.: Brit. J. Pharmacol. Chem. **7**, 298 (1952).
5. Schmitterlöw, C. S.: Acta Physiol. Scand. **19**, 260 (1949).
6. James, W. O.: Nature **161**, 851 (1948).
7. Adam, H. M., Hardwick, D. C., Spencer, K. E.: Brit. J. Pharmacol. Chem. **9**, 360 (1954).
8. Cambridge, G. W., Holgate, J. A.: Brit. J. Pharmacol. Chem. **9**, 370 (1954).

EXTRACTION AND PURIFICATION OF ELASTASE FROM DRIED PANCREAS

By

D. BAGDY and I. B. BANGA

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY OF THE RESEARCH INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY AND 1st INSTITUTE OF PATHOLOGY AND EXPERIMENTAL CANCER RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY, BUDAPEST

(Received February 13, 1957)

In 1949 BALÓ and BANGA published the first report on a new enzyme of the mammalian pancreas, an enzyme capable of lysing elastin, the protein of the elastic fibres of the aorta wall [1]. Later they described the extraction and partial purification of the enzyme which they called elastase [2]. In 1952 BANGA by salting out succeeded in obtaining the enzyme in crystalline form [3]. This product has then become the starting material in extensive research during the past few years. However, the experiments aimed at the purification of elastase could not be considered complete, as the crystalline enzyme showed not only favourable, but also some unfavourable properties. The preparation contained great amounts of inorganic salts, which could not be removed without denaturation of the enzyme. The high salt content interfered with the elucidation of the chemical and physico-chemical properties of elastase. On the other hand, the yield of crystalline enzyme was most insufficient, it being only slightly above 3 to 4 per cent of the enzyme activity of the starting material.

In recent years several authors have been concerned with studies on the chemical and biological properties of elastase and elastin [4—9]. However, only scarce evidence has been published as to the purification of the enzyme, although the methods described in the literature leave rather much to be desired. Thus, it seemed important from the point of view of theory and practice alike to develop a method which would eliminate the shortcomings of earlier ones and would at the same time yield an end product of at least equal purity with the crystalline enzyme preparation.

In the experiments to be reported we have studied the optimum conditions of extraction and fractionation of the elastolytic enzyme from dried pancreas powder, as well as its adsorption on various adsorbents.

Materials and methods

The starting material was invariably dried porcine pancreas powder defatted with acetone (Pankreatin, *Richter*). Its elastase content was from 0,9 to 1,2 E.U. per mg. In the extraction and fractionation procedures commercial methanol, ethanol, acetone, etc. were used as organic solvents. Elastin was prepared from ligamentum nuchae of ox, by the method of BANGA [3].

Elastase activity was assayed according to BANGA [3]. One unit of elastase activity is equal with the amount of enzyme capable of dissolving 1 mg pure elastin within 30 minutes, under the experimental conditions specified.

Experimental and results

Extraction of elastase with organic solvents admixing with water

For the extraction of elastase from pancreas, BANGA originally recommended aqueous extraction in a mild acid medium, with *M*/10 pH 4,7 acetate buffer. This method, which has been adopted by several workers, has the undisputable advantage of great efficiency also the drawback of bringing into solution not only the enzyme, but also a variety of substances. Furthermore, certain difficulties are encountered in the separation by centrifugation or filtration of the extract from the insoluble residue. In order to eliminate these inadequacies, organic solvents admixing with water, such as methanol, ethanol, acetone, etc. were employed in extractions. The defatted dried pancreatic powder was extracted in two steps, with 10 to 20 vol./weight solvent. In one series ethanol concentration was varied from 0 to 55 vol. per cent. Otherwise, extractions were carried out at room temperature, with electric stirring for 30 to 120 minutes, after ample wetting of the material with a small volume of solvent. The experiments revealed that significantly more insoluble material was left if extraction was carried out with 30 to 40 vol. per cent ethanol instead of acid acetate buffer. In the presence of 50 vol. per cent ethanol the amount of the residue was increased to above 60 per cent, and at the same time extraction was complete. This means that a considerable proportion of proteins accompanying the enzyme, as well as of the macromolecular ballast substances, can be removed at extraction, without lessening thereby in the slightest degree the extractability of elastase. Furthermore, it has been observed that the presence of 1 to 2 per cent inorganic or organic salt (e. g. sodium chloride, ammonium chloride or ammonium acetate) had a favourable influence on enzyme extraction. The insoluble organ residue is readily separated from the aqueous-alcoholic or aqueous-acetonic extracts by centrifugation. The extracts are water-clear, light or dark yellow in colour.

Fractionation of elastase extracts with organic solvents

In the following the alcoholic enzyme extracts were fractionated at low temperature and low ionic strength. The data for one of the initial fractionation experiments are presented in Fig. 1 which reveals that under the experimental conditions specified elastase is precipitated in the methanol concentration range of 65 to 82 vol. per cent and the product thus obtained is 5 to 8 times as active

as the starting material. The alcoholic precipitates were centrifuged in the cold room, washed with absolute ethanol and dried ; elastase was dissolved from the wet precipitate with a *M*/100 pH 4,8 to 5,0 acetate buffer and was dried in the frozen state. In subsequent experiments we succeeded in improving both the quality and the yield of the product. The experimental data are presented in

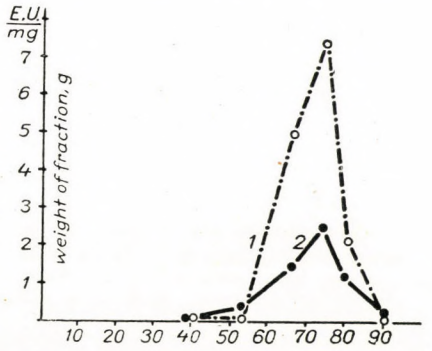


Fig. 1. Fractionation at —5°C of a methanol-water extract of 50 g Pankreation *(Richter)*. Abscissa : methanol concentration, vol. per cent. *1:* E. U./mg ; *2:* weight of fraction

Table I from which it is clear that by ethanolic fractionation elastase is purified 8- to 12-fold with a very good, 85 to 96 per cent yield. The method is obviously very advantageous in comparison with salting out by which a similar product is obtained in two steps with a yield much lower hardly exceeding 40 per cent of the starting material. Thus, extracting elastase in the presence of an organic solvent followed by fractionation with an organic solvent at low temperature is superior both qualitatively and quantitatively to the usual methods, al-

Table I

Fractionation of ethanolic elastase extracts

Product	Ethanol conc. vol. per cent.	Fraction Weight g	Fraction E. U./mg	*Yield* %
E—30*				
E—30/0	38	52,0	0,1	5,2
E—31	53	1,67	0,2	0,3
E—32—33	76	10,5	8,0	84,0
E—40**				
E—40/0	50	64,0	∅	
E—41	60	0,58	0,3	0,1
E—42—43	78	8,0	12,0	96,0

*, **Starting material 100 g acetone-dried pancreas powder (1 E. U./mg).

though the products obtained are not homogenous, they being composed of at least 5 to 6 components, as it was shown by informative electrophoretic studies (Fig. 3). However, even the purest elastase preparations thus far obtained were not homogeneous, either.

Adsorption of elastase on synthetic zeolite

Parallel with the above experiments we studied the adsorption of elastase on different adsorbents. It has been found that from its mild acid aqueous

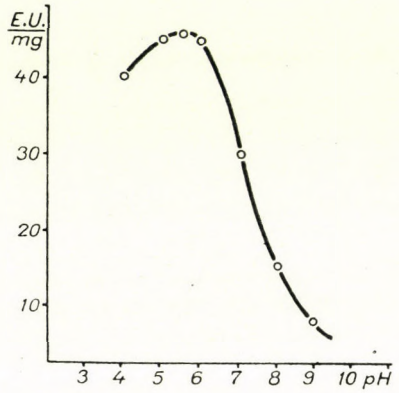


Fig. 2. Effect of pH on the elution of elastase adsorbed onto *Decalso*

solution the enzyme is readily adsorbed on certain adsorbents, thus for instance on vegetable and animal carbon or silica, whereas it is hardly adsorbed on various ion exchange rasins, for instance bentonit. In the following we shall describe adsorption of elastase on synthetic sodium-aluminium silicate.

100 g pancreatic powder defatted and dried with acetone was extracted in two steps with 20 volumes of *M*/10 pH 4,7 acetate buffer. The extracts were pooled and filtered through folded hardened filter paper. The water-clear, yellow solution was allowed to pass the adsorbent columns at a flow rate of 8 to 10 ml per minute. The column in a glass tube 50 mm in diameter contained 300 g synthetic sodium-aluminium silicate *(Decalso, Permutit Co.)*, which had been activated with dilute ammonia in NH_4^+ cycle. Excess of ammonia was removed with *M*/200 hydrochloric acid, then with distilled water. Assays of elastase in samples of extract passed through the column revealed only 5 to 10 per cent of the original enzyme activity; accordingly, adsorption was most effective. After completion of adsorption the column was washed first with *M*/20 pH 4,7 acetate buffer, then with distilled water.

Elution of enzyme from the adsorbent was carried out at different pH ranges and with different solvents. The correlation between the hydrogen ion

concentration of the solvent used for elution and the activity of eluted enzyme is illustrated in Fig. 2, from which it is clear that the usual method of mild alkaline elution is inadequate, as it greatly deteriorates the activity of the end product. This is due not to a denaturation of the enzyme, but to the fact that at neutral or mild alkaline reaction a considerable amount of other protein is also eluted from the adsorbent. Among the solvents used for elution, 40 to 45 vol. per cent aqueous methanol or ethanol containing 8 to 10 per cent ammonium acetate proved to be the most efficient. From the experimental column elastase was eluted with 600 ml solvent. The enzyme was precipitated from the eluate



Fig. 3. Comparative study of elastase preparations obtained by the adsorption method (*A*) and by ethanolic fractionation (*B*)
Paper, *Macheray—Nagel* No. 214. Buffer, Veronal-Na-carbonate-HCl, pH, 10,5. μ: 0,15. Voltage, 5,5 V/cm. Amperage, 2,0 mA. Time, 18 hours. Stainings, acid fuchsin with absolute ethanol

by increasing the concentration of the organic solvent. Precipitation was carried out at —2° to —5° C with 3 volumes of absolute ethanol. The solvent was added to the solution in a thin jet, with continuous stirring. By completion of the procedure the solution became intensely turbid and within a few hours a loose, flocculated precipitate was seen to settle. After discarding the supernatant, the precipitate was centrifuged in the cold room, dissolved in *M*/100 pH 5,0 to 5,4 acetate buffer and from the aqueous solution the enzyme was dried in the frozen state.

The elastase preparations obtained by adsorption contained 40 to 70 E. U. per mg, and were therefore equal, or even surpassed in activity the crystalline elastase prepared earlier by one of us (BANGA). The 30 to 50 per cent yield of the adsorption method is by far superior to the earlier method of BANGA or to any other method thus far described. The elastase obtained by adsorption is a yellowish-white, light powder, readily soluble in distilled water or in dilute buffer solutions.

Discussion

It is believed that the adsorption method described above has numerous advantages over the earlier methods and thus represents an advance in this field. On the other hand, it is also doubtless that the procedure by itself will not lead to chemically pure, homogeneous elastase, just as the known methods of BANGA and HALL have failed in this respect. Paper electrophoresis showed the elastase prepared by adsorption to zeolite to be composed of two main and two minor components (Fig. 3). This is in agreement with the observation of HALL and others on grounds of which it has been suggested that elastase preparations contain two components, one proteolytic and the other mucolytic. Thus, separation and isolation of the single components of the enzyme complex purified by zeolitic adsorption should be one of our immediate tasks. In the literature no method suitable for this purpose has been described. According to HALL [10], the mucolytic and the proteolytic enzyme components could be separated by calcium phosphate gel and aluminium oxide adsorption since 1953, however, the details, efficacy and other properties of this method have not been published. In our own experiments we have made the observation that under adequate experimental conditions the solulbility of the single components of the elastase complex prepared by our adsorption method is markedly different. On this basis a separation by fractionated crystallisation and fractionation with organic solvent appears to promise success.

SUMMARY

A new method has been developed for the extraction and purification of elastase from dried porcine pancreas. Extraction with organic solvent and fractionation of the extracts thus obtained, or their adsorption on synthetic zeolite, seem to be superior to the methods described in the literature as far as the activity of the end product and the yield are concerned. As related to the starting material, the enzymatic activity of the product obtained by adsorption on zeolite was 40 to 70 E. U./mg, and the yield, 30 to 50 per cent.

Acknowledgements

We are indebted to DR. E. HEGYELI for the paper electrophoretic studies.

LITERATURE

1. BALÓ, J., BANGA, I.: Schweiz. Z. Pathol. **12**, 350 (1949).
2. BALÓ, J., BANGA, I.: Nature **164**, 491 (1949).
3. BANGA, I.: Acta Physiol. Hung. **3**, 317 (1952).
4. HALL, D. A.: Biochem. J. **5**, 459 (1955).
5. HALL, D. A., GARDINER, J. E.: Biochem. J. **59**, 465 (1955).
6. PARTRIDGE, S. M., DAVIS, H. F., ADAIR, G. S.: Biochem. J. **61**, 11 (1955).
7. PARTRIDGE, S. M., DAVIS, H. F.: Biochem, J. **61**, 21 (1955).
8. LANSING, A. I.: J. Gerontology **9**, 362 (1954).
9. BALÓ, J., BANGA, I.: Acta Physiol. Hung. **4**, 187 (1953).
10. HALL, D. A.: Biochem. J. **55**, XXXV (1953).

FURTHER STUDIES ON THE EFFECT OF THE HUMORAL INHIBITORY FACTOR

By

K. Lissák, E. Endrőczi and I. Fábián

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received January 20, 1957)

The definition put forward in the 1936 Harvey lecture by Gasser according to which inhibition should be understood to mean not exactly definable nervous processes common only in their manifestations, is not any more valid. Although central inhibition is one of the most difficult and problematic field in research on the nervous system, neurophysiology has so advanced during the past 15 years that by now the above definition has been modified and inhibition can be studied as the summation of exactly definable nervous activities.

It was first of all the dramatic progress in the field of electrophysiological methods, including such achievements as the development of microelectrodes making leads within the nerve cell possible, which facilitated a direct structural approach to the problem.

After the fundamental discoveries made by the Weber brothers (1845) and Setschenow (1863), in 1941 Lloyd [3] discovered the phenomenon of *direct inhibition* in antagonistic reflex inhibition, then, in 1946, Kuffler and Katz [4] showed the presence of the directly inhibiting neuromuscular synapse in the neuromuscular synapse of cold-blooded animals and made numerous elementary observations concerning the nature of inhibition. Also in 1946, Eccles [5] working with intracellular microelectrodes, achieved several relevant results concerning the nature of direct inhibition. His statement that during direct inhibition excessive hyperpolarization occurs in the postsynaptic motor neurone has proved to apply not only to spinal direct inhibition, but also to the inhibitory neuromuscular synapses of the crab muscle. The electrophysiological characteristics of direct inhibition, as observed in different receptors, suggested a potential involvement of a specific humoral factor also in this form of nervous transmission.

In 1952, Bradley, Easton and Eccles, relying upon their electrophysiological studies of spinal direct inhibition, declared that a humoral inhibitor was necessarily existent and postsynaptic hyperpolarization would be due to its release. In the last year, Eccles *et al.* have supplied evidence showing that the spinal antagonistic inhibition, the so-called direct inhibition, would take

place through a disynaptic reflex chain and, within that, by means of an interposed neurone with an exclusively inhibitory function [6].

The complexity of structure in higher nervous levels does not allow for so clear-cut and unequivocal studies. However, there is ample indirect functional and morphological evidence that the elementary spinal mechanisms of inhibition might closely resemble those in higher planes of the nervous system. PAPEZ [7] on the basis of histological and functional considerations has recently arrived at the conclusion that the granulated cells of the brain have exclusively inhibitory function.

During recent years the electrophysiological investigations of GRASTYÁN and his team [8] has brought to light several such mechanisms, which prove the existence of direct inhibitory elements in higher planes of the brain. It has been found, for example, that the organization of the brain stem system dynamizing conditioned reflexes is similar to the spinal antagonistic organization. On the basis of this finding, and on direct proof, it seems probable that in these activities, too, the mechanism of the spinal direct inhibition takes effect. More recent studies on the hippocampus have brought up the possible existence of a new principle, a structure capable of systemic inhibition.

Thus, in the light of both our own findings and data in the literature it seems more and more certain that inhibition, or at least some of its fundamental mechanisms, are the property of nervous elements which morphologically are independently differentiated. There seems to be no need to emphasize that this circumstance at the same time postulates also the existence of a humoral inhibitor.

In recent years we have discussed both in lectures and in reports the properties of a substance we found in the nervous system. In peripheral effectors it inhibits the action of chemical mediators, such as acetylcholine and adrenaline, as well as the transmission of impulses in the ganglia [10]. In the following, our observations concerning the action of these inhibitors will be discussed in some detail.

Experimental

Extraction from brain tissue was carried out by a modification of the method already described [10]. The brain from the animal killed by an intracardiac injection of ether was deproteinized as quickly as possible by treatment in 0° C colloidal $Al(OH)_3$ and ethanol (7 in 3). After centrifugation the resulting layer of fluid was treated with Norit. Active carbon was then removed by repeated centrifugation. Further purification was made with lead acetate, using H_2S for eliminating lead. In some experiments purification with barium hydroxide and acetate, respectively, was also employed. In this case the inhibitor was in the uppermost layer of fluid. Highest grade of purity was attained by paper chromatography, when the biological assay showed R_f values varying from 0,36 to 0,40 in a water-saturated phenol : butanol solvent [11]. To achieve further purification and concentration several methods of extraction have been employed which will not be dealt with.

Biological assay of the inhibitor was made on isolated cat ileum, in which test the relative concentration could be estimated with a reasonable degree of accuracy. The effect was measured

on grounds of the duration of inhibitory action on the standard acetylcholine effect. Measure and reversibility of action are demonstrated in Fig. 1. The water bath used in titrations contained 25 ml Tyrode solution was slightly modified inasmuch as the pH was adjusted to 6,8 to 7,0 with $NaHCO_3$, because the inhibitor acts at this pH. The composition of ion concentration remained unchanged.

Results

The activity of the inhibitor was greatly dependent upon the pH of the Tyrode solution. At lower hydrogen ion concentrations, e. g. at pH 7,3 to 7,4

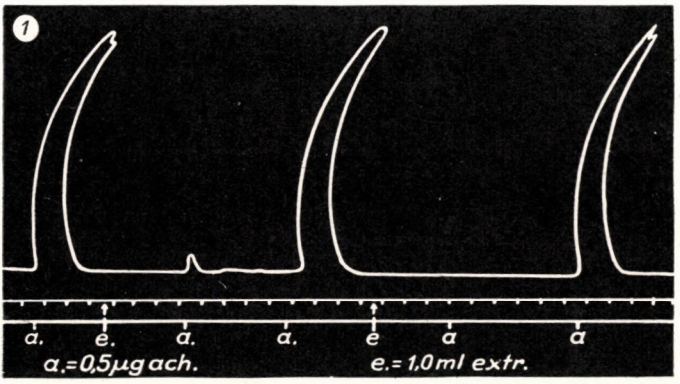


Fig. 1. The inhibitory effect of brain extract on the isolated ileum of cat. 1,0 ml extr. equal with 10 g brain tissue

or above, the inhibiory effect did not appear. The optimum pH range was 6,8 to 7,0, in which there was no change in acethylcholine effect and sensitivity.

Likewise, the inhibitory action depended on the ion concentration of the Tyrode solution. If potassium concentration was increased to 2 to 3 times the original (which leaves the sensitivity of the acetylcholin effect unaffected) the inhibitory effect was markedly diminished. On a further increase of K concentration inhibition did not any more take place. Changes in the Na ionic space had no effect on the activity of the inhibitor.

These two observations concerning the mode of action of the inhibitor are interesting presumably not only as regards the test itself, but also as far as the problem of neural inhibition is concerned.

Another observation relevant not only as to the mode of action of the inhibition, but also as to its structure is that eserine enhanced the inhibitory effect on acetylcholine. This is illustrated in Fig. 4 which shows that after treatment with 1 μg eserine the extract containing the inhibitor caused a more lasting and marked inhibition in the cat intestine than before treatment.

This observations can be interpreted in two ways. 1. The inhibitor is a cholinester and eserine enhances its action by a non-specific inhibition of

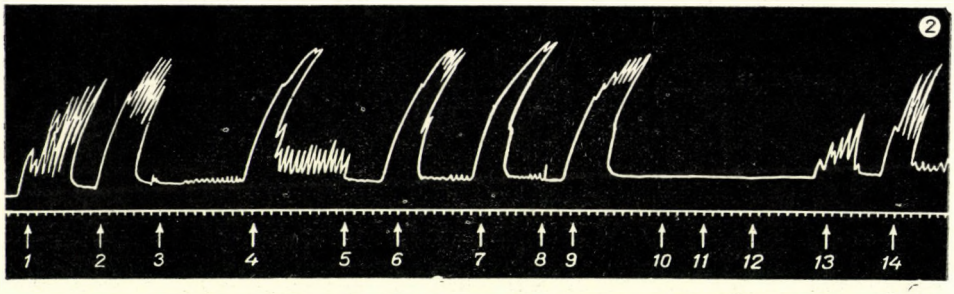


Fig. 2. The connection of pH and the inhibitory effect of extract. *1*, *2*, *4*, *6*, *7*, *9*, *11*, *12*, *13*, *14* = 0,02 μg ach., *3* = pH 7,4, *5* = 5 ml extr., *8* = pH 6, 8, *10* = 2 ml extr.

cholinesterase. 2. Eserine has some indirect influence on the development of inhibition.

Other findings also suggested a close relationship between the inhibitor and quaternary basic esters. For example, the phosphate ester of choline (pyro- or diphosphate) blocks acetylcholine action in the isolated intestine in the same way as the inhibitor in question below pH 7,0, but not at pH 7,4. However, the two are not identical, as it was clearly shown by differences in behaviour at paper chromatography and in certain biological effects.

Next we have studied the inhibitor content of brain tissue, partly as regards structural distribution, and partly the quantitative changes taking place in certain nervous conditions. It has been found that the concentration of the inhibitor was two fold or more in the grey matter, suggesting first of all a synaptic distribution. Naturally, difficulties in the separation of the two kinds of cerebral matter may shift the quantitative relations even more in favour of the grey matter.

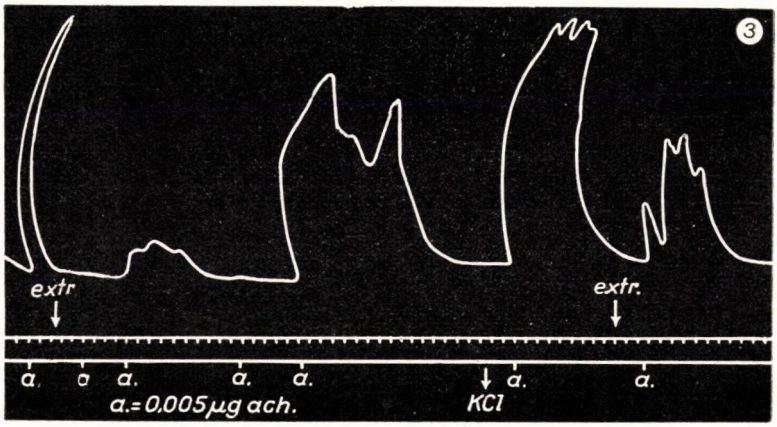


Fig. 3. The connection of KCl conc. and inhibitory effect of the extract KCl conc. 0,06%

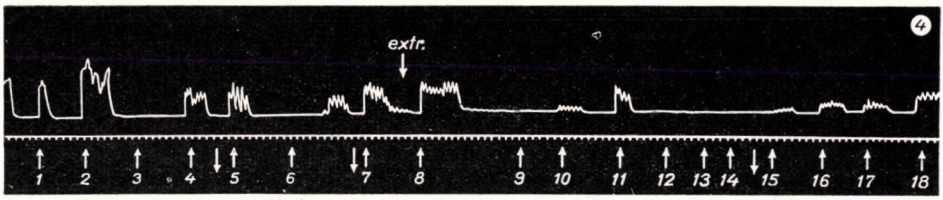


Fig. 4. The effect of 50 μg eserine on the inhibitory effect of the extract on the cats ileum *1—18* = 0,02 μg ach.

We than studied the influence of strychnine convulsions on the inhibitor concentration of brain tissue. Brain tissue from animals killed during strychnine convulsions contained the inhibitor in a considerably lower concentration.

It is known that in strychnine convulsions the reciprocal inhibition of antagonistic muscles is abolished. BRADLEY, EASTON and ECCLES [6] (1953) presumed the existence of a chemical inhibitory synaptic mediator antagonized by strychnine, on the basis that strychnine selectively paralyses direct inhibition and also, polysynaptic, or indirect, inhibition. From our findings it appears that strychnine inhibits the formation, or the liberation, of the inhibitor.

Convulsions induced by Cardiazol, a drug with a different site of action, did not influence the concentration of the inhibitor. Nor could we detect differences in the inhibitor content of the brains from animals killed during anaesthesia with barbiturate, dial or evipan. This fact, too, reveals how erroneous it is in physiological or biochemical studies to identify general anaesthesia (even with reserve) with the state of physiological inhibition and sleep.

The next step was to study the action of the inhibitor on spinal reflexes by direct methods. Cats under superficial chloralose anaesthesia were used in these experiments. The lower thoracic and lumbar spine was incised, the dura was opened. The reflex reaction of the hind leg was recorded according to SHERRINGTON. The reflex reaction was elicited via the patellar tendon or by stimulation of the posterior root. Applying a solution of the inhibitor locally to the appropriate root, the reflex response diminished considerably within 1 to 2 minutes. After washing with Tyrode solution the inhibition disappeared.

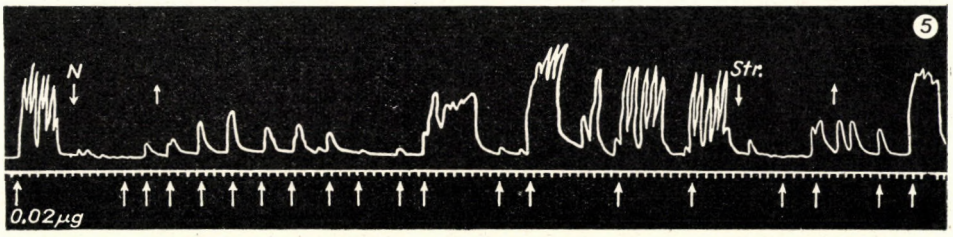


Fig. 5. Normal (*N*) and brain tissue extract from animal killed during strychnine convulsions (*Str*), ↑ = 0,02 μg ach.

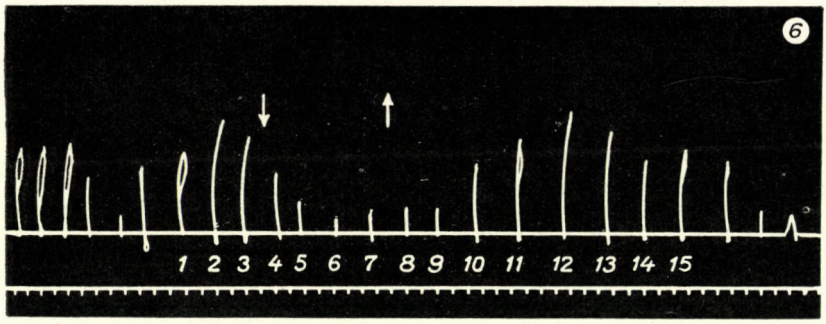


Fig. 6. Reflex reactions of the left hind log of the cat. ↓ = local application of the extract, ↑ = washing with Tyrode solution. *1—15* = stimulation of the posterior root

A similar inhibitory effect was observed when the inhibitor was applied directly to the cerebral motor area. The diminution of excitability was examined by direct electric stimulation (electrode distance, 3 to 4 mm) in the forelimb and buccal muscles of cats under dial anaesthesia. The significant increase of excitability threshold due to the local action of the inhibitor (which was als reversible) is shown in Fig. 7.

The effect of the inhibitor on convulsions elicited by eserine and strychnine was studied in the mouse and rat. 20 μg of eserine, or 30 μg of strychnine sulphate, per 25 g body weight, usually, cause lethal convulsions. These were always prevented by injecting intraperitoneally brain extract containing the inhibitor before the administration of eserine or strychnine. Injection of higher doses of inhibitor caused the animal to develop a reversible state of depression. The blocking of the strychnine and eserine convulsion, as well as the fact that central excitatory activities are blocked on local application of the inhibitor permit the conclusion that the inhibitor plays a role in central inhibitory activities, resp., in direct inhibition. Meanwhile, PATAKY *et al.* [12] (1950), then FLOREY E. [13] (1953) found inhibitors of similar action in the central nervous system.

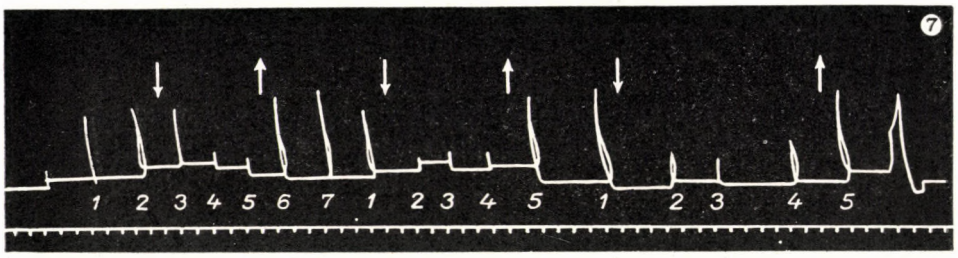


Fig. 7. Contractions of the left fore limb of the cat after stimulation (*1—7*) of the motor cortex. ↓ = local application of the extract, ↑ = washing with Tyrode solution

It has been mentioned that in 1953 ECCLES[6] assumed in connection with postsynaptic hyperpolarization that the inhibitor substance exerted its action through the increased activity of the Na-pump. According to our observations, the higher extracellular K ion concentration interferes with the development of the effect of the inhibitor. In the light of present knowledge this finding may be brought into correlation with the diminished activity of the Na-pump mechanism.

Also, many a similarity can be discovered between changes in pH, the effect of the inhibitor, and extinction, a kind of manifestation of cortical inhibition. DUSSER DE BARENNE and MCCULLOGH [14] found in the motor cortex a considerable increase in H ion concentration during extinction that was in correlation with the inhibition of the corresponding motor cell groups.

All these data bring us nearer to the solution of the problem of inhibition. The final solution will have to wait, however, until the humoral factor is identified chemically and analysed systematically for biological effects.

SUMMARY

Studies on the mode of action of the inhibitory factor extractable from brain tissue yielded the following evidence. In the isolated cat ileum the activity of the factor depends on the pH and the K ion concentration. The activity of the inhibitor is potentiated by eserine. In this test choline phosphate ester has a similar biological action, though it is not identical with the natural substance. When applied locally, the inhibitor blocks the development of the spinal reflex. A similar effect on electric excitability is observable on local application to the motor cerebral cortex. In experiments *in vivo* the inhibitor prevents the development of eserine and strychnine convulsions in mice and rats. Its effect lasts for 2 to 4 hours. Strychnine convulsions diminish the concentration of the extractable substance in the brain, whereas cardiazol convulsions do not.

LITERATURE

1. WEBER, E. F., WEBER, E. H.: Annali Universali Medicinae, Milano **116**, 327 (1845).
2. SETSCHENOW, J.: »Physiologische Studien über die Rückenmarks im Gehirne des Frosches« Berlin (1863).
3. LLOYD, D. P. C.: J. Neurophysiol. **4**, 184 (1941).
4. KUFFLER, S. W., KATZ, B.: J. Neurophysiol. **9**, 337 (1946).
5. ECCLES, J. C.: J. Neurophysiol. **9**, 87 (1946).
6. ECCLES, J. C.: "The Neurophysiological Basis of Mind" Oxford (1953).
7. PAPEZ, J. W.: Anat. Rec. **121**, 411 (1955).
8. GRASTYÁN, E., LISSÁK, K., KÉKESI, F.: Acta Physiol. Hung. **9**, 133 (1956).
9. GRASTYÁN, E., LISSÁK, K , SZABÓ, J.: Acta Physiol. Hung. **7**, 187 (1955).
10. LISSÁK, K., ENDRŐCZI, E.: Acta Physiol. Hung. **9**, 111 (1956).
11. BRANTE, G.: Nature **163**, 651 (1949).
12. PATAKY, I., PFEIFFER, K., BORSI, J.: Acta Physiol. Hung. **1**, Suppl. 15 (1950).
13. FLOREY, E.: Naturwiss. **40**, 295 (1953).
14. DUSSER DE BARENNE, J. G., MCCULLOGH, W. S.: J. Neurophysiol. **2**, 319 (1939).

UTILIZATION OF CORTISONE AND HYDROCORTISONE ON THE BASIS OF EXPERIMENTS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

By

J. MARTIN, G. BATA, E. ENDRŐCZI and Á. MOLL

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received February 4, 1957)

In recent years a number of reports have been published on the role of C_{21}-biocorticoids. In these reports the complex process of degradation of these substances is discussed, relying in part upon evidence derived from experiments *in vitro* and partly on the basis of metabolites appearing in the urine. HECHTER *et al.*, PINCUS *et al.*, GALLAGHER *et al.*, AMELUNG, HÜBENER *et al.*, MILLER and AXELROD, as well as KAHNT and WETTSTEIN [1—6] have pointed out the processes involved in the metabolism of corticoids in the adrenals and in the liver and their conversion, partly *in vitro* and partly in perfusion experiments. As well-known, in the whole organism exogenous cortisone and hydrocortisone disappear rapidly from the blood stream, to be taken up and metabolized in part by the liver [7].

In the present experiments we have studied the metabolization of cortisone and hydrocortisone, in different tissues, *in vitro* and *in vivo*. From the metabolites we devoted attention only to the intactness of the Δ^4-3-keto structure, this being one of the criteria of biological activity, and, as regards the whole molecule, this can be considered the first step in degradation.

Experimental

Albino rats of both sexes from the same strain were used. For experiments *in vitro* the various tissues were obtained from unanaesthesized animals killed by decapitation and bleeding. Blood samples for analysis were obtained by aorta puncture from animals anaesthesized with 5 per cent Dial. In the experiments *in vivo* the animals were anaesthesized with Dial and the steroids were injected into the femoral vein.

In the experiments *in vitro* 200 mg samples of tissue were homogenized in 5 ml Tyrode solution containing 1 to 3 mg of steroid. Depending on the experiment, incubation at 37°C lasted for 60 or 120 minutes.

The steroids were dissolved in ethanol, the concentration of which did not exceed 2 per cent of the total volume of the Tyrode solution. For intravenous administration in the experiments *in vivo* the steroids were dissolved in 50 per cent propylen glycol and injected in a total volume of 0,2 to 0,3 ml in not less than 3 minutes.

The steroids were used in the form of acetate. Continual extraction for 60 minutes was employed, resulting in 100 per cent recovery, as determined on the basis of blank values. Steroids were assayed partly by paper chromatography and partly by the PORTER—SILBER method [8]. Extraction of steroids was carried out according to the following procedure. The tissue homo-

genisate, or the homogenized tissue removed after intravenous steroid injection was extracted with 5 vol. etherethylacetate for one hour. The organic solvent was then separated from the aqueous phase in a separatory funnel; when separation was imperfect, it was accelerated by centrifugation. After that the ether-ethyl acetate mixture was washed with $^1/_5$ vol. $N/_{10}$ K_2CO_3 and the traces of base were removed by treatment. Three times with $^1/_4$ volume of distilled water each. After evaporation *in vacuo* the residue was dissolved in 1 ml ethyl acetate and assayed by the PORTER—SILBER method, or by chromatography. In the PORTER—SILBER method in certain kinds of tissue hydrazone of non-corticoid origin is formed (extinction : 0,1 to 1,15) even without the administration of steroid. This was controlled on the basis of parallel values and corrected accordingly. With most kinds of tissue (spleen, thymus, muscle, brain) no such correction was necessary.

In paper chromatography we used the formamide-benzene impregnation method of BURTON, ZAFFARONI and KENTMANN [9]. Two cm wide strips of Whatman No. 4 paper were used. Length of running was 35 cm. The chromatography tank holding 26 strips of paper at the same time, had a reservoir of 350 ml capacity; the steam space was provided by 500 ml solvent. Impregnation was made with formamide-methanol 1 : 1 or 1 : 1,5. The strips were carefully and evenly dried between filter papers. The steroids were applied in 0,05 or 0,1 ml volumes, by means of an air flow of 40°C, to an area approximately 1 cm in diameter. Before the start the strips were maintained in steam atmosphere for 2 hours and after filling up the reservoir they were left until the front line had migrated 30 cm. This took approximately 2 hours. The papers were then dried at 80°C for 3 to 4 hours and sprayed finely with methanol-NaOH, according to BUSH [10]. After the subsequent 5 minutes of drying at 80°C the steroids were controlled under a "Hanau" analytical quartz lamp and the spots were marked by pencil. Some strips were controlled by the Ag-reduction method and some by the 15 per cent H_3PO_4 fluorescence method [9, 11].

The single free derivatives were acetylated at room temperature, after 12 hours of standing, with 0,2 ml anhydrous acetic acid and 0,5 ml pyridine [12].

Results

The experiments may be divided into two groups, viz. 1. breakdown *in vitro* of cortisone and hydrocortisone, and 2. corticoid uptake by single organs after intravenous administration. The two methods employed for controlling the utilization of corticoid yielded comparable quantitative values. On the basis of blank values, the PORTER—SILBER method yields low nonspecific values in the case of liver and in intestine only, whereas the paper chromatographic method showed in none of the tissues tested interfering materials with non-specific NaOH fluorescence. These conditions make the study of the degradation mechanism of corticoids highly specific. The R_f values of the standard hydrocortisone and cortisone in the form of acetate yielded higher values than those described in the original report [9]. This may have been due to the modified conditions of chromatography.

The changes observed in tests *in vitro* indicate that there is a difference in the degradation process between cortisone and hydrocortisone acetate. Table I demonstrates the degradation of cortisone and hydrocortisone acetate in various tissues, as determined by the PORTER—SILBER method and by paper chromatography. In contrast with hydrocortisone, cortisone breakdown was most intensive in the liver and the lung, whereas other kinds of tissue showed a weak activity in this respect. On the other hand, the decrease in hydrocortisone content was much less and only in lung, spleen and kidney tissue was a low grade of degradation observable.

Table I

Disappearance of cortisone and hydrocortisone acetate in experiments in vitro

Material tested	PORTER—SILBER method	Paper chromatography	Deacetylation per cent
	Disappearance of cortisone acetate in micrograms/g tissue weight*		
Tyrode's solution	—	—	—
Liver	1875	1750	90
Lung	1750	1400	20
Kidney	750	750	20
Spleen	375	250	50
Thymus	—	—	50
Muscle	—	250	10
	Disappearance of hydrocortisone acetate in micrograms per g of tissue weight **		
Tyrode solution	—	—	
Liver	—	250	
Lungs	125	—	
Kidney	750	750	
Spleen	500	500	
Muscle	250	200	

The fact that the PORTER—SILBER method, which assays C_{21}-corticoids on the basis of the 17—21 dihydro-20-ketosteroid structure, yields values closely comparable to those obtained by the fluorescence paper chromatographic method estimating the $\triangle^4$-3-keto groups, indicates that in the first step this group is reduced and the alteration in the side chain takes place only later.

Certain tissues showed *in vitro* marked deacetylation of cortisone. This was controlled also by acetylation. Deacetylation of single tissues is shown in Table I.

Results of experiments in vivo. The tissues were assayed for corticoid content 1, 3, 5, 10 and 15 minutes after the corticoid had been introduced by intravenous infusion in 3 minutes. As early as 3 minutes after administration there was already in the blood no corticoid demonstrable by paper chromatograpy. Sodium hydroxide fluorescence having a sensitivity limit of about 5 micrograms 99 per cent of the 2,5 mg/100 g body weight cortisone or hydrocortisone disappear-

*In each case 1,0 to 2,5 mg of cortisone acetate of hydrocortisone acetate was incubated for 60 minutes, at 37° C.

**Paper chromatographical amounts calculated from all sodium fluorescence spots (including free compound and its acetate).

ed from the blood stream in 3 minutes. To control the objection that the cortisone would combine with the corpuscular elements of blood or be adsorbed to plasma proteins, control experiments were carried out. To 5 ml heparinized blood were added 2,0 mg of cortisone. After incubation and extraction by the usual method, both the paper chromatographic and the PORTER—SILBER methods resulted in 96 to 98 per cent recovery. This experiment shows that cortisone is neither utilized by the corpuscular elements of blood nor adsorbed

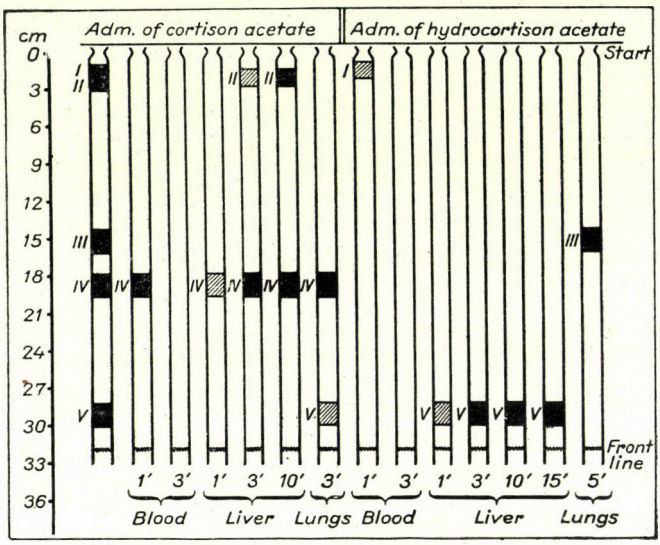


Fig. 1. Schematic representation of paper chromatograms. The strips show the sodium fluorescence observable after administration of cortisone and hydrocortisone at different points of time after intravenous administration

Reference substances: I. 17-hydroxycorticosterone acetate
II. 11-dehydro-17-hydroxycorticosterone
III. Corticosterone
IV. 11-dehydro-17-hydroxycorticosterone acetate
V. Corticosterone acetate

▨ = traces only

to proteins. The organs differ remarkably in the uptake of cortisone or hydrocortisone. According to paper chromatographic analysis, there appears in the liver a Δ^4-3-keto derivative, whose amount increases in the function of time and which shows an Rf value corresponding to that of corticosterone. 17-OH-corticosterone could be demonstrated only in the lung, and a very small quantity of it in muscle tissue. In other tissues neither hydrocortisone, nor any other kind of Δ^4-3-ketosteroid was found. Table II demonstrates the cortisone and hydrocortisone uptake and its metabolite in liver and lung.

Discussion

In experiments both *in vitro* and *in vivo* a parallelism could be observed between the cortisone metabolizing activity of single tissues and their rate of uptake from the blood stream. The highest rate of cortisone metabolism was found in the liver and the lung, and it was in these two organs that the highest

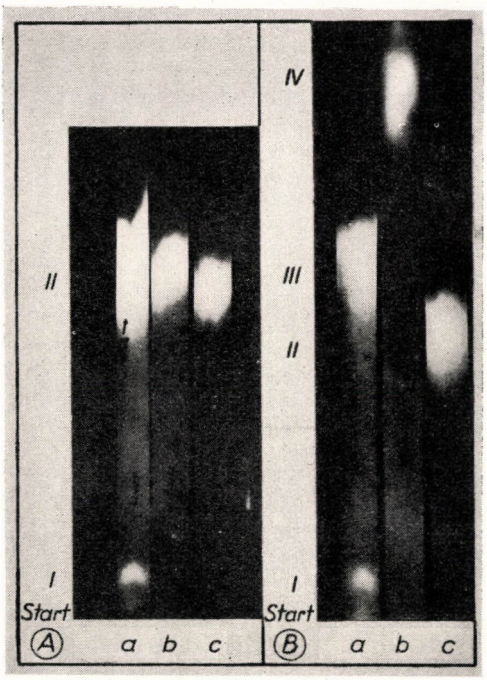


Fig. 2. Paper chromatography, of different corticoids, as revealed by the sodium fluorescence reaction

A a) Extract of liver tissue 5 minutes after the administration of cortisone acetate
b) Cortisone acetate standard, 25 micrograms
c) Extract of lung tissue 3 minutes after the administration of cortisone acetate
I. 17-hydroxycorticosterone acetate (R_f 0,08)
II. 11-dehydro-17-hydroxycorticosterone acetate (R_f 0,68)

B a) I. 17-hydroxycorticosterone acetate (R_f 0,056)
III. 11-dehydro-17-hydroxycorticosterone acetate (R_f 0,68)
b) IV. Corticosterone acetate (R_f 0,93)
c) II. Corticosterone (R_f 0,56)

amounts occurred after intravenous administration. In the experiments with hydrocortisone a difference in metabolism and uptake was demonstrable between the liver and the lung. This difference was both quantitative and qualitative. No hydrocortisone could be demonstrated in the liver, but a new deri-

Table II

Appearance of cortisone and hydrocortisone and their derivatives in different tissues, expressed in micrograms/g tissue weight, after intravenous injection

Test substance	PORTER—SILBER method	Paper chromatography	Deacetylation, per cent
	Disappearance of cortisone acetate, micrograms/g tissue*		
Tyrode's solution	—	—	—
Liver	1875	1750	90
Lung	1750	1400	20
Kidney	750	750	20
Spleen	375	250	50
Thymus	—	—	50
Muscle	—	250	10
	Disappearance of hydrocortisone acetate, micrograms/g tissue**		
Tyrode's solution	—	—	
Liver	—	250	
Lung	125	—	
Kidney	750	750	
Spleen	500	500	
Muscle	250	200	

vative appeared in the form of corticosterone, which may have resulted from the splitting off of a 17-OH group. Thus, according to the findings, under conditions *in vivo* liver tissue rapidly converts the hydrocortisone structure.

The role of the lung in the metabolism of corticoids has not been clarified by earlier observations and the fact that this organ is capable of rapidly taking up corticoid from the blood stream calls attention to the importance of pulmonary tissue in the corticoid household. As the question of the role played by this storage of corticoids and by the metabolites formed in certain pathological conditions, from the point of view of both the whole organism and the tissue in question, it will have to be clarified in later studies, extended to the metabolization processes of the other adrenal corticoids.

*In each case 1,0 to 2,5 mg of cortisone acetate or hydrocortisone acetate was incubated at 37° C for 60 minutes.

**Paper chromatographical amounts calculated from all sodium fluorescence spots (including free compound and its acetate).

SUMMARY

In studies *in vitro* and *in vivo* differences in metabolism were demonstrated between cortisone and hydrocortisone. Cortisone is metabolized at a high rate by liver and lung tissue, whereas hydrocortisone degradation *in vitro* is but slight. *In vivo*, intravenous administration of cortisone is followed by the appearance of most of the substance in the lung and in the liver. In the liver a pronounced deacetylation occurs. 3 minutes after intravenous administration of cortisone 99 per cent of the infused amount disappeared from the blood stream. *In vitro*, blood neither combines with, nor adsorbs cortisone. After intravenous administration of hydrocortisone in the liver corticosterone, in the lung hydrocortisone can be demonstrated. As to other tissues, only the striated muscle was found to contain a small amount. The methods of assay used were the one described by PORTER and SILBER and paper chromatography with formamide-benzene impregnation. The paper chromatograms were evaluated on the basis of the NaOH fluorescence of the Δ^4-3-keto group.

LITERATURE

1. CASPI, E. and HECHTER, O.: Arch. Biochem. Biophys., **52**, 478 (1954).
2. MACCHI, I. A., HECHTER, O., PINCUS, G. and ZAFFARONI, A.: Acta endocrinol. **17**, 270 (1954).
3. KEMP, A. D., KAPPAS, A., SALOMEN, I. T., HERLING, F. and GALLAGHER, T. F.: J. biol. Chem. **210**, 123 (1954).
4. AMELUNG, D., HÜBENER, H., ROKA, L. and MEYERHEIM, G.: Klin. Wschr. 386 (1953).
5. MILLER, L. L. and AXELROD, L. R.: Metabolism, **3**, 1 (1954).
6. KAHNT, F. W. and WETTSTEIN, A.: Helv. chim. Acta **34**, 1790 (1951).
7. TOMIZAWA, H. H., NAVAHAVA, H. T., GIBBONS, C. A. and WILLIAMS, R. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. **85**, 51 (1954).
8. SILBER, R. H. and PORTER, C. C.: J. biol. Chem. **210**, 923 (1954).
9. BURTON, R. B., ZAFFARONI, A. and KENTMANN, E. H.: J. biol. Chem. **188**, 763 (1951).
10. BUSH, I. E.: Biochem. J. **50**, 370 (1952).
11. NEHER, R. and WETTSTEIN, A.: Helv. chim. Acta **34**, 2278 (1951).
12. CONSTANCE DE COURCY, I. E., BUSH, I. E., GRAY, C. H. and LUNNON, J. B.: J. Endocrin. **9**, 401 (1953).

ANALYSIS OF THE INDIVIDUAL VARIATIONS OF ADAPTATION IN THE RAT, ON THE BASIS OF CONDITIONED REFLEX AND ENDOCRINE STUDIES

By

E. Endrőczi, Gy. Telegdy and K. Lissák

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received January 20, 1957)

Making use of processes of adaptation elaborated to the motor and vegetative representations of the central nervous system, numerous authors have succeeded in developing typological procedures facilitating synthesis, grouping or typing of the individual variations in the adaptation to the external environment. The types thus determined are not clear-cut either in laboratory animals or in man and can be analysed in the spectrum of extreme properties only; in other words, there exist no sharply distinct typological groups. Within the scope of the present paper we present a grouping based on results achieved in conditioned reflex "breaking" experiments, and on evaluation of pituitary-adrenocortical function. The close parallelism between the adrenocortical function and nervous adaptation led to the recognition of correlations on grounds of which well-definable groups can be distinguished within a population, characterized by a responsiveness of the same type in the adaptation response to changes in the external and internal milieu.

Experimental

Male albino rats of one strain, weighing 80 to 120 g, were used. During the experimental period the animals were placed into the conditioning apparatus under identical conditions and at identical points of time and were kept there for 15 minutes. A conditioning apparatus suitable for elaboration of alimentary conditioned reflex was used for elaboration of the conditioned reflex. The diagram of the apparatus is shown in Fig. 1.

By the device for feeding the rat the moment of food withdrawal is registered kymographically, by way of an electrical contact. A 100/min metronome sound was used for elaborating the conditioned reflex. This sound stimulus was applied once in every minute, 5 seconds before offering the food. Thus, the experimental stereotype of one day involved 15 associations and this led to a full development of the conditioned reflex in 5 to 7 days. Subsequently, the conditioned reflex was reinforced on 3 consecutive days. In order to accelerate the development of the alimentary conditioned reflex, the animals received the usual quantity of food only after the experimental period had been completed. After the conditioned reflex had been established we made trials for "breaking" the reflex by applying electric shock from the feeding bench and floor. To the electric shock, which was applied simultaneously with the third positive stimulus of the daily stereotype, the animals reacted with a marked pain reaction and did not any more respond to the positive stimulus. On each of the next four days the animals were grouped on the basis whether or not the alimentary conditioned reflex had normalized. During the training for inducing the conditioned reflex the responses were recorded kymographically and behaviour on 16 mm motion picture film, from a distance of 50 cm.

The animals grouped on the days following breaking of the conditioned reflex or exposure to electric shock as punishment were worked up after completion of the experiment for studies on the function of the pituitary-adrenocortical system. The animals were anaesthesized with 0,2 ml, 15 per cent Dial and adrenal ascorbic acid was estimated according to ROE-KUETHER, on the basis of the endogenous ACTH activity assay introduced by SAYERS [1, 2].

As a stress effect, in addition to the removal of the right adrenal gland, 50 μg/100 g body weight of adrenalin was administered. Certain experimental groups were treated with ACTH, beginning on the first day of trials for the induction of the conditioned reflex. The daily dose was 2 I. U. Zn-Cortrophine *(Organon, Oss)* intramuscularly.

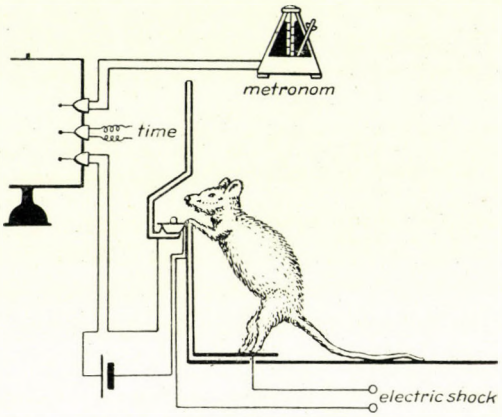


Fig. 1. Schematical representation of the alimentary conditioned reflex apparatus

Results

Grouping on the basis of the conditioned reflex

With 15 associations a day, it takes at least 5 days until the alimentary conditioned reflex to the positive stimulus develops. The developed conditioned reflex was reinforced in 5 to 10 days. On the loth day the usual third positive stimulus of the association stereotype was given in combination with a single electric shock, which resulted in a breaking of the conditioned reflex. On the next four days the animals were grouped as follows. Into group 1 animals exhibiting a normal alimentary conditioned reflex on the first day. Group 2 and 3 consisted of animals showing normalization in 2 and 3 days, respectively. Group 4 contained the animals with the reflex becoming normal in 4 to 7 days. By the 7th day all animals in the experiments showed the normal conditioned reflex. The animals not normalizing on the first day were exposed to 5 association trials instead of 15 in the case of a positive sound stimulus, in view of the fact that serial exposure to a positive sound stimulus without reinforcement may give rise to internal extinction. Fig. 2 shows the statistical distribution for single groups, as plotted from conditioned reflex "breaking" experiments made on 54 rats. Three animals gave a paradoxical response, i. e. after exhibiting a normal reflex again on the first day inhibition reappeared on the 2nd and 3rd days. These animals have been excluded from statistical evaluation.

Typical differences in conditioned reflex behaviour could be demonstrated between single animals of the same group, as well as between the single groups in the course of training for acquiring the alimentary conditioned reflex. The animals of group 1 were characterized by an intensive orientation reaction. They

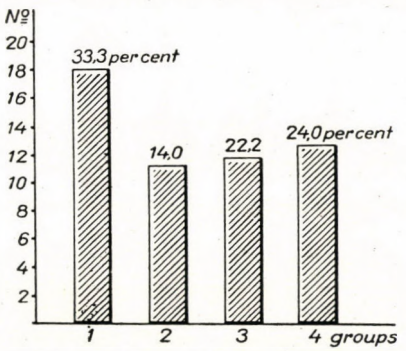


Fig. 2. Statistical distribution of the rats population on the basis of "breaking" of the conditioned reflex

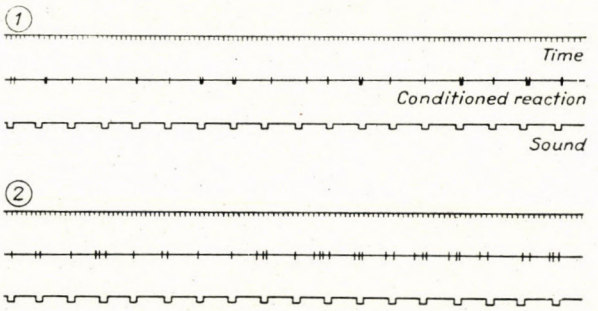


Fig. 3. The kymographic recordings of the conditioned reflex. 1. shows minimal, 2. shows maximal intrasignal reactions

also acquired the conditioned reflex sooner than the animals in the other groups. The percentage of intrasignal reactions was also higher in this group than among the members of other groups ; this may have been due to increased orientation. In Fig. 3. are presented the kymographic recordings of the conditioned reflex responses given by animals of two different types.

Effect of adrenocorticotrophine on the development of the conditioned reflex and on the process of reparation following electric shock

The effect of ACTH treatment becomes manifest as soon as in 3 to 4 days, when the animals exhibit a markedly increased orientation reaction and an increased tendency to learn. In the course of the 10-day treatment the members of the treated group acquired the conditioned reflex earlier than any member of the control group. However, after electric shock every member of the control

group exhibited a normal reflex by the fifth day, whereas none of the ACTH-treated animals did so. The inhibition induced by the electric shock applied as punishment was by far more intense in the animals than in the controls. ACTH treatment left remarkably clear signs in the kymographic tracings as well; in contrast with the controls ACTH-treated animals gave numerous intrasignal reactions, in consequence of their increased orientation reaction.

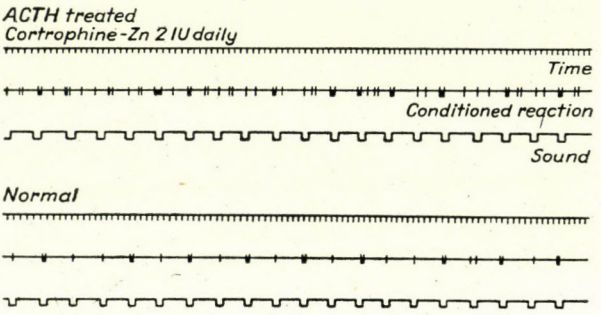


Fig. 4. Conditioned reflex of the ACTH treated and of the normal rats on the basis of the kymographical recordings

Table I

The decrease of ascorbic acid content of adrenals after noxious stimuli in separated groups

	I.	II.	III.
Before stress	421 mg%	526 mg%	578 mg%
	453 „	504 „	560 „
	419 „	500 „	532 „
	480 „	500 „	493 „
	545 „	533 „	526 „
	444 „	581 „	536 „
	413 „	524±22	600 „
	456±35		515 „
			542±27
After stress	361 mg%	290 mg%	200 mg%
	434 „	233 „	203 „
	370 „	203 „	181 „
	292 „	150 „	212 „
	386 „	240 „	170 „
	375 „	234 „	306 „
	321 „	211±34	111 „
	362±20		265 „
			206±41

Studies on the function of the pituitary-adrenocortical system in the groups differentiated by the conditioned reflex method

The single groups were studied 3 to 4 days after completion of the experiments. The groups separated by the conditioned reflex method showed remarkable correlation as far as the resting adrenal ascorbic acid content is concerned.

The data in Table I reveal that the members of group 1 responded with the slightest adrenal ascorbic acid depletion to the stress of surgery and adrenaline administration. At the same time, it was this group which presented the most balanced statistical values of ascorbic acid both at rest and in stress. Group 2, which contained the conditioned reflex groups 2 and 3, as well as group 3 which was composed of the members of the conditioned reflex group 4, were characteristically different from the members of group 1 as regards the ascorbic acid values both at rest and during stress. In groups 2, 3 and 4 the value at rest was much higher and the response to stress more marked than in group 1. Ascorbic acid depletion in group 3 was about double the value observed in group 1.

Discussion

The question arises whether the above grouping reflects differences in type, or is only a classification on the basis of physiological function of common origin. The earlier typological procedures applied to higher animals concerned motor and vegetative processes only and classification was invariably based on the quality of the process, the dominance of which determined the type [3, 4]. In the present instance the groups were set up on grounds of a certain type of neural adaptation and of the responsiveness of the humoral defensive mechanism. This method is believed to open up new perspectives in the analysis of individual variations.

In the experiments the animals were grouped according to the duration of the inhibition. The correlation with the pituitary-adrenocortical system is most complex, although in recent years a wealth of clinical and experimental evidence has been accumulated concerning central excitatory and inhibitory processes [5, 6]. Further studies on adrenocortical function are required to determine the changes in the corticoid household to which the changes in behaviour induced by ACTH administration are ascribable. On the other hand, it is thought necessary to study in detail the tonization by adrenocortical function of the central diffuse activating and inhibitory system.

SUMMARY

By method the "breaking" of the alimentary conditioned reflex, and on the basis of the duration of inhibition, rats were classified into four groups clearly distinct as regards both neural mechanism and pituitary-adrenocortical activity. ACTH treatment accelerated the development of the alimentary conditioned reflex, whereas the inhibition resulting from the "breaking" of the alimentary conditioned reflex lasted much longer than in the controls.

LITERATURE

1. ROE, H. J., KUETHER, C. A.: J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943).
2. SAYERS, M. A., SAYERS, G., WOODBURY, L. A.: Endocrinology **42**, 349 (1948).
3. PAVLOV, I. P.: Válogatott művei. Akadémiai Kiadó, Budapest (1951).
4. FEDOROV, V. K. (Федоров, В. К.): Физиол. Ж. **37**, 345 (1951).
5. WAYNE, H. L., BOYLE, J.: J. Clin. Endocrin. Metab. **13**, 1070 (1953).
6. HOEFER, P. F. A., GLASER, G. H.: J. A. M. A. **143**, 620 (1950).

ÜBER DIE ANTIGENEIGENSCHAFTEN DES POLLENEIWEISSES

Von

L. KESZTYŰS

PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

Die Antigeneigenschaften der pflanzlichen Eiweissstoffe wurden von zahlreichen Forschern untersucht, vor allem mit der Absicht, die Resultate der serologischen Reaktionen in der botanischen Systematik bzw. der Phylogenetik zu verwenden. Die bezüglichen, VON GILG und SCHÜRHOFF [1], MORITZ [2], MEZ und Mitarbeitern [3], KOWARSKY [4], WETTSTEIN [5] usw. ausgeführten ausgedehnten Untersuchungen haben zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen geführt.

Die Verhältnisse in der Pflanzenwelt sind nämlich wesentlich ungünstiger als bei der Untersuchung vom tierischen Eiweiss, da letzterwähntenfalls an Stelle isolierter Eiweisskörper einfach das Serum angewendet werden kann, haben doch die verschiedenen Serumproteine der einzelnen Tierarten eine weitgehende Artspezifität. Die Arbeiten von L. HEKTOEN und W. H. WELKER [6] zeigten, dass jede Tierart ihre eigenen Globuline und Albumine hat. Ganz anders liegen die Verhältnisse in der Pflanzenwelt. WELLS und OSBORNE [7] haben auf Grund ausgedehnter Untersuchungen festgestellt, dass der Hauptbestandteil des Kernes von der Erbse *(Pisum sativum)*, der Wicke *(Vicia sativa)*, der Linse *(Lens esculenta)* und der Ackerbohne *(Vicia faba)* das unter dem Namen Legumin bekannte Eiweiss ist, und dass das von diesen 4 verschiedenen Kernen gewonnene Legumin sich immunbiologisch vollkommen identisch erweist. Somit ist diesfalls festgestellt, dass die Kerne verschiedener Pflanzenarten ein chemisch und serologisch identisches Eiweiss enthalten. Demgegenüber ist häufig zu beobachten, dass zwei verschiedene Eiweisskörper desselben Kernes mittels Immunreaktionen sich leicht voneinander trennen lassen : so zeigt z. B. das als Proteose bezeichnete leicht lösliche pflanzliche Kerneiweiss im Vergleich zu in denselben Kernen enthaltenen Eiweisskörpern ein wesentlich abweichendes serologisches Verhalten. Somit findet man in den Kernen verschiedener Pflanzenarten einerseits keine Artspezifität aufweisenden, identischen Eiweisskörper, anderseits im Kern ein und derselben Pflanze mehrere serologisch voneinander verschiedene Proteine. Die eine Schwierigkeit der mit den pflanzlichen Extrakten durchgeführten Immunreaktionen liegt zweifelsohne darin, dass die Extrakte Proteine verschiedener Art enthalten ; eine weitere Schwierigkeit lässt sich auf

die Anwesenheit derartiger Stoffe, wie Gerbstoffe und sonstige organische Säuren, in den zu den Versuchen herangezogenen Extrakten zurückführen, welche anlässlich der Reaktion zwischen Antigen und Immunserum ein störendes Präzipitat geben.

Wegen der hier dargestellten Schwierigkeiten und Komplikationen wurden die Ergebnisse der mit Eiweisskörpern des Pflanzenkernes ausgeführten immunologischen Reaktionen sowohl von seiten botanischer als auch serologischer Kreise mit einer berechtigten Reservation und einem gewissen Zweifel aufgenommen ; daher konnte die diesbezügliche Forschung keine allgemeine Bedeutung erlangen. Unter diesen Umständen probierten wir eine Methode auszuarbeiten, die zum Studium des serologischen Verhaltens pflanzlicher Eiweisskörper geeignet ist und eindeutige, nach Belieben reproduzierbare, die Spezifitäts- und Verwandtschaftsbeziehungen scharf schildernde Ergebnisse zeitigt. Da nach den bisherigen Versuchen die Hauptschwierigkeit durch die Anwesenheit von Gerbstoffen und nichtspezifischen Reserv-Proteinen bedingt ist, haben wir unsere Versuche — im Gegensatz zu den zuvor genannten Autoren — nicht mit Kern-, sondern mit Polleneiweiss durchgeführt.

Es ist anzunehmen, dass im Pollen das nichtspezifische Reserv-Protein nur in geringster Menge vorliegt, während die Menge des artspezifischen Eiweisses verhältnismässig gross ist ; weiterhin haben wir sicher gewusst, im Pollen keine Gerbstoffe zu finden.

Experimenteller Teil

Zu unseren Versuchen haben wir von 3 Kultursorten vom Apfel *(Malus pumila Mill. = Pyrus malus L. proparte)*, u. zw. Oster-Rosmarin (ENTZ), Török Bálint und Jonathan, sowie von 3 Kulturvarietäten von der Zwetschke *(Prunus domestica L. incl. P. insititia L.)*, u. zw. Debreciner Muskateller, Bistrizenser und »Barackszilva« (Pfirsichzwetschke, eine *P. insititia* Sorte), etwa je 8 g Pollen gesammelt. Die gesammelte Pollenmenge wurde nach Tunlichkeit sofort nach dem Einsammeln in Porzellanmörser mit Quarzsand verrieben, mit je 50 ml Ätheralkohol dreimal je 15 Minuten zwecks Entfernung etwa vorkommender fetter oder ätherischer Öle extrahiert, zum Schluss zum Austreiben des Ätheralkohols bei 40° C im Vakuum getrocknet. Das auf diese Art gewonnene trockene Pulver wurde über 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit 150 ml physiologischer Kochsalzlösung digeriert, hernach durch ein Doppelfilter filtriert. Der Eiweissgehalt der so gewonnenen vollkommen durchsichtigen Lösung betrug durchschnittlich 6—8‰. Die Lösungen erweisen sich bei der Papierelektrophorese als einheitlich. Die Präparate wurden durch Zusatz von ¼% Carbol konserviert. Diese Lösungen wurden zur Immunisierung von je 3 Kaninchen (i. v. in 4tägigen Intervallen mit zunehmenden Dosen) herangezogen. Die Tiere erhielten insgesamt je 150 mg Protein. Die Immunisierung wurde von den Tieren gut vertragen von 18 behandelten Tieren verendeten an Pneumonie 3. Am 24. Versuchstag wurde zwecks Präzipitationsprobe den Tieren Blut entnommen : am 27. Tag wurden die Tiere durch Verbluten getötet. Das Serum wurde zu Präzipitationsuntersuchungen verwendet. Es wurden Versuche eines jeden Immunserums mit allen Polleneiweisskörpern eingestellt, fernerhin die Zwetschkenpollen-Immunsera mit Polleneiweiss von Mandeln *(Prunus amygdalus Batsch)*, von Marillen *(Prunus armeniaca L.)* und Pfirsichen *(Prunus persica [L.] Batsch)*, die Apfelpollen-Immunsera mit Polleneiweiss von Birne *(Pyrus communis L. ssp. sativa [Lam. et DC.] A. et G.)*. Die letzterwähnten Polleneiweisse wurden auf die gleiche Art präpariert, wie jene, die zur Immunisierung verwendet wurden, doch waren die quantitativen Verhältnisse wesentlich geringer. Zwecks gleichmässigen Vorgehens und der Gewinnung vergleichbarer Ergebnisse wurden in der Präzipitationsreaktion sämtliche Polleneiweisskörper in 0,5%iger Konzentration verwendet.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen sind in Tabelle I zusammengestellt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, haben die Polleneiweisskörper der Pflanzen deutliche Antigeneigenschaften, durch ihre parenterale Einverleibung erfolgt im tierischen Organismus die Bildung von Antikörpern. Der Titer der gewonnenen Immunsera ist verhältnismässig hoch; er schwankt zwischen 1 : 600 und 1 : 3200. Die Ergebnisse der Präzipitationsreaktionen in Einzelheiten analysierend können wir feststellen, dass zwischen den einzelnen Kulturarten des Apfels keine serologischen Unterschiede nachzuweisen sind, die Polleneiweisskörper der einzelnen Kultursorten reagieren im gleichen Masse und bis zum gleichen Titerwert mit dem Immunserum eines jeden zur *Pyrus malus*-Art gehörenden Polleneiweisses ; daraus folgern wir, dass die Polleneiweisskörper der einzelnen Kulturvarietäten des Apfels immunbiologisch und wahrscheinlich auch chemisch identisch sind. Die in die Familie der *Rosaceae* (Rosenarten) gehörende *Pyrus malus* Pollenimmunsera geben hingegen keine Reaktion mit den Polleneiweisskörpern der ebenfalls zur Familie der *Rosaceae* gehörenden *Prunus*-Arten, sowie mit den Polleneiweisskörpern der nahe verwandten (von einzelnen Autoren sogar zur gleichen Gattung [Genus], neuerlich allerdings zur anderen Gattung gezählten) Birne. Auf Grund der Präzipitationsreaktionen müssen wir die chemische Verschiedenheit der Polleneiweisskörper von *Pyrus malus* (= *Malus pumila*, Apfel) und *Pyrus communis* (Birne) annehmen. Die Polleneiweisskörper von *Prunus domestica* im allgemeinen, inbegriffen der untersuchten drei Zwetschke-Kultursorten sind auf Grund der Ergebnisse der Präzipitationsproben vom serologischen und chemischen Gesichtspunkte auch identisch. Auf Grund der Ergebnisse der gekreuzten Präzipitationsreaktionen können dieselben Folgerungen aufgestellt werden, wie zuvor an Hand der Apfel-Polleneiweisskörper besprochen. Die *Prunus domestica* Pollenimmunsera, in die Familie der *Rosaceae* gehörend, geben keine Präzipitation mit dem Polleneiweiss von zur gleichen Familie gehörenden *Pyrus malus*, sowie von zur gleichen Gattung gehörenden *Prunus amygdalus*, *P. armeniaca* bezw. *P. persica*. Nach den Ergebnissen der Präzipitationsreaktionen sind zwischen den Polleneiweisskörpern von *Prunus domestica* und sonstigen *Prunus*-Arten auch serologisch scharf nachweisbare Unterschiede zu sehen. (Neuerdings wird das Genus *Prunus* von manchen Autoren in mehrere Gattungen geteilt.)

In weiteren Versuchen haben wir das Verhalten der *Pyrus*- und *Prunus*-Pollenimmunsera in Präzipitationsproben, wobei als Antigen das Eiweiss aus dem Kern obiger Pflanzen diente, geprüft. Zur Herstellung des Kerneiweisses haben wir im allgemeinen das Verfahren von Mez [3] benutzt : die Kerne sind vom Obst und von dem Gehäuse befreit worden, hernach wurden sie im Mörser ohne weitere Vorbehandlung pulverisiert, mit Alkohol-Aether ex-

Tabelle I

Präzipitationsreaktionen I

Pollenimmunsera			Polleneiweiss-Antigene									
			Pyrus malus			Pyrus communis	*Prunus domestica*			*Prunus*		
Nr.	Art	Kultursorte	Oster-Rosmarin (Entz)	Török Bálint	Jonathan		Debreciner Muskateller	Bistrizenser	»Pfirsich zwetschke«	*amygdalus*	*armeniaca*	*persica*
16	PYRUS MALUS	Oster-Rosmarin (Entz)	1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	∅	∅	∅	∅			
17			1 : 1200	1 : 1200	1 : 1200	∅	∅	∅	∅			
19		Török Bálint	1 : 800	1 : 800	1 : 800	∅	∅	∅	∅			
20			1 : 600	1 : 600	1 : 400	∅	∅	∅	∅			
21			1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	∅	∅	∅	∅			
22		Jonathan	1 : 3200	1 : 1600	1 : 1600	∅	∅	∅	∅			
24			1 : 800	1 : 800	1 : 800	∅	∅	∅	∅			
25	PRUNUS DOMESTICA	Debreciner	∅	∅	∅		1 : 800	1 : 800	1 : 800	∅	∅	∅
26		Muskateller	∅	∅	∅		1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	∅	∅	∅
27			∅	∅	∅		∅	∅	∅	∅	∅	∅
28		Bistrizenser	∅	∅	∅		1 : 1600	1 : 1200	1 : 1600	∅	∅	∅
30			∅	∅	∅		1 : 800	1 : 800	1 : 800	∅	∅	∅
31		»Pfirsichzwetschke«	∅	∅	∅		1 : 3200	1 : 3200	1 : 3200	∅	∅	∅
32			∅	∅	∅		1 : 800	1 : 800	1 : 800	∅	∅	∅
33			∅	∅	∅		1 : 1200	1 : 1200	1 : 1600	∅	∅	∅

trahiert; zum Schluss haben 5 g des im Vakuum getrockneten Pulvers mit 25 ml physiologischer Kochsalzlösung digeriert. Der Eiweissgehalt der so gewonnenen Lösungen wurde bestimmt; die Lösungen wurden auf eine Eiweisskonzentration von 0,5% eingestellt. Die Präzipitationsproben wurden nun mit Pollenimmunsera mit den höchsten Titerwerten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II

Präzipitationsreaktionen II

Pollenimmunsera		Kerneiweiss-Antigene						Polleneiweiss-Antigene	
		Pyrus		*Prunus*					
Nr.	Art	*malus*	*communis*	*domestica*	*amygdalus*	*armeniaca*	*persica*	*Pyrus malus*	*Prunus domestica*
16	*Pyrus malus*	1 : 100	∅	∅	∅	∅	∅	1 : 1600	∅
21		1 : 200	∅	∅	∅	∅	∅	1 : 1600	∅
22		1 : 100	∅	∅	∅	∅	∅	1 : 1600	∅
26	*Prunus domestica*	∅	∅	1 : 50	∅	∅	∅	∅	1 : 1600
28		∅	∅	1 : 100	∅	∅	∅	∅	1 : 1600
31		∅	∅	1 : 100	∅	∅	∅	∅	1 : 3200

Wie aus der Tabelle ersichtlich, haben die Malus pumila = Pyrus malus Pollenimmunsera — wohl bis zu einem niedrigen Titerwert, aber dennoch deutlich — mit der Lösung des Kerneiweisses vom Apfel reagiert, hingegen mit dem Kerneiweiss der Arten Pyrus communis und Prunus keine Reaktion ergeben. Die Prunus domestica Pollenimmunsera reagieren ebenfalls bis zu einem niedrigen Titerwert mit dem Eiweissextrakt aus dem Kern derselben Pflanzen, sie gaben aber mit dem Kerneiweiss fremder Pflanzenarten keinerlei Präzipitation.

Besprechung der Ergebnisse

Vergleichen wir unsere mit Polleneiweiss durchgeführten Versuche mit den von MEZ und Mitarbeitern [3] für Kerneiweiss ausgearbeiteten serodiagnostischen Reaktionen, können wir zweifelsfrei feststellen, dass die Ergebnisse unserer jetzigen Untersuchungen wesentlich verlässlicher erscheinen. Während z. B. nach den Forschungen von PREUSS [8] die auf parenterale Gabe vom Kernextrakt der zum Genus *Rhoeadales*, zur Untergruppe *Resedineae* gehörenden *Reseda grandiflora (Familie Resedaceae)* entstehenden Präzipitine eine positive Reaktion mit dem zur Familie der *Capparidaceae*, zur Untergruppe *Capparidineae* gehörenden *Cleome candelabrum* und mit dem zu den *Cruciferae* gehörenden

Cheiranthus cheiri geben, also aus dem serologischen Verhalten der Kerneiweisskörper höchstens Schlüsse auf die Ordnungsspezifität zulässig sind, ist die Spezifität der Polleneiweisskörper wesentlich grösser: innerhalb der einzelnen Genera sind einzelne Arten scharf abzugrenzen bezw. zu bestimmen auf Grund der Antigeneigenschaften des Polleneiweisses. Nach unseren Untersuchungen hört die Antigenspezifität des Polleneiweisses erst zwischen den einzelnen Kultursorten der Pflanzenarten auf. Es scheint, dass bei den Gartenvarietäten vom Apfel *(Pyrus malus L.)* bezw. von der Zwetschke *(Prunus domestica L. sensu lato)* die chemische Struktur des Polleneiweisses identisch oder zumindest so weitgehend ähnlich ist, dass zwischen ihnen daweilen auch auf immunologischem Wege keine Differenzen nachgewiesen werden können. Dass die Spezifität des Polleneiweisses jene des Kerneiweisses unvergleichlich übertrifft, lässt sich auch aus einer älteren Angabe der Literatur feststellen, welche allem Anschein nach der Aufmerksamkeit der moderneren Betreiber der Phytoserodiagnostik entgangen ist. MAGNUS und FRIEDENTHAL [9] haben Immunsera aus Pollen- und Kerneiweiss von Roggen hergestellt und beide Immunsera in Präzipitationsproben mit Weizen-, Gersten- und Haferkern- und Polleneiweiss geprüft. Nach den Ergebnissen ihrer Versuche haben die Kernextrakte vom Weizen und von der Gerste mit dem Roggenkerneiweiss-Immunserum reagiert (lediglich das Kerneiweiss von Hafer war different und alleinstehend), wogegen das Roggenpolleneiweiss-Immunserum nur mit dem Roggenkernextrakt und mit dem Roggenpolleneiweiss ein positives Ergebnis zeitigte und keine Präzipitation ergab, wenn als Antigen Kern- oder Pollenextrakt von der Gerste und vom Weizen verwendet wurde. Auch diese Versuche weisen mit aller Eindeutigkeit darauf hin, dass das Kerneiweiss des Roggens weniger spezifisch ist als das Polleneiweiss.

Aus den besprochenen Versuchen von Magnus und Friedenthal, sowie aus unseren Untersuchungen ist auch objektiverweise darauf zu schliessen, dass man anlässlich der Extraktion des Kerns keine einheitliche, ein einziges Protein enthaltende Eiweisslösung erhält, sondern dass in derartigen Extrakten ein Gemisch von Eiweisskörpern verschiedener Struktur zur Untersuchung gelangt. In der grössten Menge enthalten derartige Extrakte das sog. Reserveprotein, welches in erster Linie zur Ernährung des Pflanzenembryos dient und — wie die Versuche es zeigen — nur eine immunbiologische Spezifität geringen Ausmasses (Ordnungsspezifität) aufweist. Daneben enthalten wohl die Kernextrakte sicherlich geringere Mengen eines derartigen Proteins, welches dem artspezifischen Protein der Pflanze — spezifisch bis in die einzelnen Arten — entspricht. Wenn wir aber die Kernextrakte zur Immunisierung verwenden, ist dieses hochspezifische, aber mengenmässig geringe Protein neben den grösseren Quantitäten des minder spezifischen Reserveiweisses infolge der allbekannten Antigenkonkurrenz nicht fähig, die Produktion von homologen Präzipitinen — in nachweisbarer Menge — anzuregen. Das Vorhandensein dieses hochspezifischen Proteins lässt sich aber in den Kernextrakten dadurch nachweisen, dass das gegen

das Polleneiweiss — welches kein Reservprotein enthält — produzierte Immunserum mit dem Kernextrakt der homologen Pflanze eine Präzipitation gibt. Wenn im Kernextrakt das mit dem Polleneiweiss identische Struktur aufweisende Protein nur in geringerer Menge vorhanden ist, ist es nur natürlich, insbesonders wenn wie z. B. in unseren Untersuchungen der absolute Eiweissgehalt beider Extrakte auf die gleiche Konzentration (5‰) eingestellt ist, dass bei Verwendung des Kernextraktes der Präzipitationstiterwert wesentlich niedriger ausfällt als bei Verwendung von Pollenextrakt. Dass es sich aber auch bei Verwendung vom Kernextrakt als Antigen um eine echte Immunpräzipitation handelt und nicht um das Phänomen der sog. Normalpräzipitation, ist durch den Umstand erwiesen, dass bei Verwendung unverdünnter Kernextrakte fremder Pflanzen in unseren Versuchen das Auftreten einer Präzipitation nicht nachweisbar war.

Im Sinne obiger Erörterungen ist unsere experimentelle Erfahrung, wonach ein Polleneiweiss-Immunserum bis zu einem niedrigen Titer eine positive Reaktion mit dem Kernextrakt einer zur gleichen Art gehörigen Pflanze ergab, dahingehend zu deuten, dass der Kernextrakt eigentlich einem Eiweissgemisch entspricht, in welchem zumindest zwei verschiedene Proteine vorliegen : in grösserer Menge ein Reserveiweiss niedrigerer Spezifität und ein auf die Pflanzenart charakteristisches hochspezifisches Protein in geringerer Menge. Dieses stärker spezifische, für die Pflanzenart charakteristische Protein bildet die Hauptmenge des Polleneiweisses. Es dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach in den verschiedenen Teilen der Pflanze ebenfalls vorzufinden sein.

Auf Grund unserer Versuchsergebnisse und der an sie geknüpften Erörterungen ist es zu verstehen, dass die bisherigen Ergebnisse der Phytoserodiagnostik sowohl vom Gesichtspunkte der Serologie als auch der Botanik zahlreiche Mängel aufweisen : im Gegensatz zur Tierwelt, wo das für die Artspezifität verantwortliche Eiweiss im Serum des Tieres auf den ersten Schlag zu Beginn serologischer Untersuchung von BORDET [10] und von NUTTALL [11] getroffen wurde und sich erst in einem späteren Entwicklungsstadium der Forschung herausgestellt hat, dass auch das Tier einzelne Organe besitzt, deren Eiweisskörpern keine oder nur geringere Artspezifität zukommt, wie z. B. das Protein der Kristallinse des Auges, das Keratin, das Thyreoglobulin, das Fibrinogen, usf., begannen in der Pflanzenwelt die serologischen Untersuchungen mit der Prüfung, an Stelle des artspezifischen Proteins, der Antigeneigenschaften des Kerneiweisses. Warum das Kerneiweiss von den meisten Phytoserologen als Gegenstand der Untersuchungen gewählt wurde, lässt sich dadurch erklären, dass im Kern im Gegensatz zu den übrigen Pflanzenteilen die Proteine mehr konzentriert enthalten sind, dass — von einzelnen Ausnahmen abgesehen — es leichter ist, die notwendige Versuchsmenge vom Kern zu sammeln, somit also Ergebnisse verhältnismässig geschwind und mit weniger Arbeit gezeitigt werden können. Unter diesen augenscheinlichen Vorteilen ist weiterhin anzuführen, dass der Kern im Verhältnis zu den übrigen Bestandteilen der Pflanze, die Pro-

teine in relativ reiner Form enthält. Letzten Endes führten aber diese günstigen Voraussetzungen dazu, dass die Phytoserodiagnostik infolge der Antigeneigenschaften der die Hauptmenge des Kernextraktes bildenden Proteine, welche nicht art-, sondern eher nur ordnungsspezifisch sind, ihrem eigentlichen Ziel: der Feststellung der Verwandtschaft von Proteinen und vom Stoffwechsel, welche die Grundlage der botanischen Systematik zu bilden hat, nicht näherkommen konnte.

Es liegt uns ferne, die Behauptung zu wagen, dass wir vermittels der auf die Antigeneigenschaften des Polleneiweisses gestützten serologischen Untersuchungen die artspezifischesten Proteine der Pflanze gefunden hätten. Wir wagen es nicht, zunächst zu behaupten, dass das Polleneiweiss der von uns nicht geprüften Pflanzenarten ausnahmslos gleich geeignet sein wird zu Forschungen der artspezifischen Antigene, wie im Falle der von uns benutzten *Pyrus*- und *Prunus*-Arten. Um derartige Verallgemeinerung zuzulassen, sind ausgedehntere, viel umfassendere Versuche erforderlich, als die von uns geleistete Arbeit ist. Unsere Untersuchungsergebnisse aber berechtigen uns die Forschung der Antigeneigenschaften der Polleneiweisse als einen fahrbaren und günstigen Weg der Phytoserodiagnostik zu bezeichnen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Pollenextrakt von je drei Kultursorten vom Apfel *(Malus pumila = Pyrus malus)* und von der Zwetschke *(Prunus domestica)* wurde zur Immunisierung von Kaninchen herangezogen. Die gewonnenen Immunsera wurden mittels Präzipitationsreaktionen mit dem Polleneiweiss von artgleichen und artfremden Pflanzen geprüft. Nach Ergebnissen der Präzipitationsprobe reagierten die Apfelpollen-Immunsera im gleichen Ausmasse mit dem Polleneiweiss von drei verschiedenen Kultursorten des Apfels, daher müssen wir die Polleneiweisskörper dieser untersuchten Kultursorten als identisch betrachten. Die Apfelpollen-Immunsera gaben keine Reaktion mit dem Polleneiweiss der Birne bezw. der Zwetschke *(Pyrus communis* bzw. *Prunus domestica)*; daher sind in deren chemischer Struktur Unterschiede anzunehmen. Die *Prunus domestica* Pollenimmunsera gaben eine positive Reaktion vom gleichen Titer mit den Pollenextrakten der hierher gehörenden drei Kultursorten, haben aber keine Reaktion mit dem Polleneiweiss vom Apfel, von der Mandel *(Prunus amygdalus)*, von der Marille *(P. armeniaca)* und vom Pfirsich *(P. persica)* ergeben. Daraus kann gefolgert werden, dass die Kultursorten von *Prunus domestica* untereinander gleiche, jedoch von den sonstigen *Prunus*-Arten und von *Pyrus malus* abweichende Pollenproteine besitzen. Die Pollenimmunsera von *Pyrus malus* und von *Prunus domestica* haben wohl, aber bis zu einem niedrigen Titerwert mit dem Kernextrakt der homologen Pflanzenart eine Präzipitationsreaktion gegeben. Die Ursache des niedrigen Titers ist anscheinend darin zu finden, dass die Hauptmenge des Kernextraktes vom Reserveiweiss fehlender Artspezifität gebildet ist, neben dem die kleineren Mengen des hochspezifischen, auf die Pflanzenart charakteristischen Proteins weniger nachzuweisen sind. Die Untersuchungsmethode scheint nach den bisherigen Erfahrungen geeignet zu sein, eine Aufklärung über die biochemische Natur der Polleneiweisse und dadurch über die Verwandtschaftsbeziehungen der Pflanzen zu gewähren.

LITERATUR

1. GILG, E., SCHÜRHOFF, P. N.: Ber. Dtsch. Bot. Ges. **45**, 315 (1927).
2. MORITZ, O.: Planta **7**, 759 (1929).
3. MEZ, C.: Bot. Arch. **1**, 177 (1922); **16**, 1 (1926); in Abderhalden's Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Springer, Berlin. Abt. XI. Teil 1. 1059 (1924).
   ZIEGENSPECK, H.: Bot. Arch. **16**, 218 (1926).
   NEUHOFF, W., ZIEGENSPECK, H.: Bot. Arch. **16**, 296 (1926).
4. KOWARSKY, A.: Dtsch. Med. Wschr. 1901. 442.
5. WETTSTEIN, R.: Z. Abstammungslehre **36**, 438 (1925).
6. HEKTOEN, L., WELKER, W. H.: J. infect. Dis. **35**, 295 (1924).
7. WELLS, H. G., OSBORNE, T. B.: J. infect. Dis. **12**, 341 (1913); **19**, 183 (1916).
8. PREUSS, A.: Inaug. Diss. Königsberg 1917.
9. MAGNUS, R., FRIEDENTHAL, H.: Ber. Dtsch. Bot. Ges. **24**, 601 (1906); **25**, 242; 337 (1907).
10. BORDET, J.: Ann. Inst. Pasteur, **13**, 225 (1899).
11. NUTTALL, G. H. F.: Blood Immunity and Blood Relationship. Cambridge University Press. 1904.

ÜBER DIE WIRKUNG DES KOBALT-IONS AUF DIE ADRENALINREAKTIONEN

Von

T. Szilágyi, L. Kocsár und I. Szatai

PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

In früheren Versuchen [1, 2, 3, 4] hatten wir uns eingehend mit der Wirkung des Ferro-Ions auf die Adrenalinreaktionen befasst. Wir hatten festgestellt, dass bivalentes Eisen einerseits nicht nur imstande ist, die positiven und negativen Wirkungen des Adrenalins zu hemmen, sondern in gewissen Tests auch die Wirkungen von Azetylcholin, Histamin, Eserin, Kokain, Privin und Skopolamin. Anderseits aber setzt auch das Kobalt-Ion ähnlich wie das Ferro-Ion die Wirkung von Adrenalin auf Blutdruck und Milz wesentlich herab [2]. Schliesslich vermochten wir festzustellen, dass die $CoCl_2$-Infusion — ebenso wie die $FeCl_2$-Infusion — die Kontraktionen der quergestreiften Muskulatur verringert bzw. aufhebt [4]. In vorliegender Mitteilung wird die Frage behandelt, wie das Kobalt-Ion die Reaktionen des Adrenalins in anderen Tests beeinflusst.

Methoden

Die Wirkung von Co^{++} auf das Herz untersuchten wir in den Monaten Februar—Mai am Straubschen Froschherzen.— Das Trendelenburgsche Froschpräparat wurde mit 0,65% NaCl-haltiger Ringer-Lösung durchströmt. Die Versuche am isolierten Kaninchendarm wurden am Magnusschen Präparat vorgenommen; das Bad enthielt 20 ml Tyrode-Lösung. Die Pupillenreaktion wurde an weissen Kaninchen untersucht; die Gesamtmenge der eingeführten Flüssigkeit betrug 0,5—0,8 ml. Unter die Konjunktiva eines Auges gaben wir die Co^{++} + Adrenalinsolution, in das andere Auge hingegen, welches als Kontrolle diente, — ebenfalls subkonjunktival — das Adrenalin und die der Kobaltsolution entsprechende Menge physiologische NaCl-Lösung. Die Grösse beider Pupillen wurde in Intervallen von 10 Minuten festgestellt, nachdem wir sie vorher 20 Sekunden lang mit einer 40 W-Glühbirne aus 10 cm Entfernung beleuchtet hatten. Bei sämtlichen Versuchen wurde das *Merck*-Präparat $CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$ verwendet; die Ergebnisse beziehen sich in allen Fällen auf die Kobalt-Ionmenge.

Ergebnisse und Besprechung

Am Straubschen Herzen wurde festgestellt, dass kleine Kobaltmengen (5—10 μg) auf die Herztätigkeit keine Wirkung ausüben und auch die positiven Herzwirkungen des Adrenalins nicht beeinflussen (Abb. 1). Durch eine grössere Kobaltmenge (50 μg) wurde die Herztätigkeit stufenweise geschwächt (Abb. 2),

doch liess sich die fast völlig zum Stillstand gekommene Herztätigkeit durch dreimal verabreichte je 2 μg Adrenalin restituieren. Nach den übereinstimmenden Ergebnissen der durchgeführten 5 Versuche rufen grössere Co^{++}-Gaben am

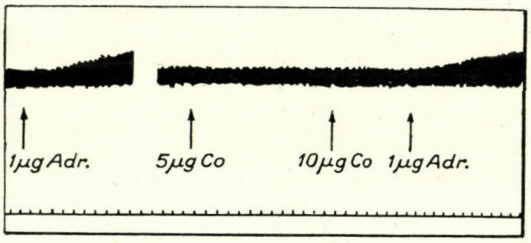


Abb. 1. Isoliertes Froschherz. Zeitschreibung: 1 Sek.

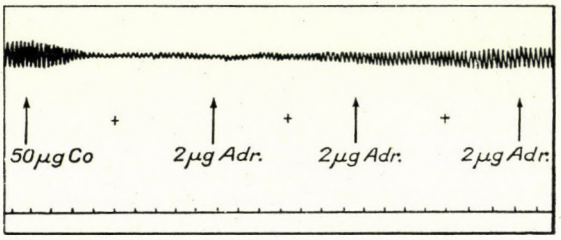


Abb. 2. Isoliertes Froschherz. Zeitschreibung: 6 Sek.

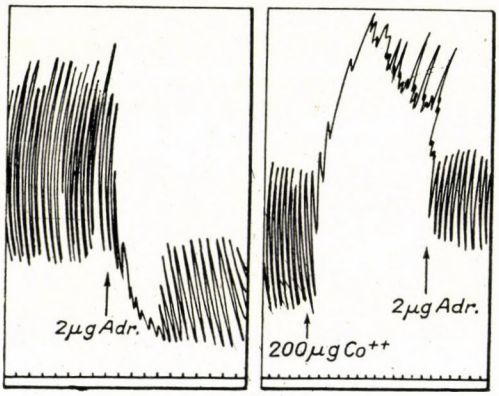


Abb. 3. Isolierter Kaninchendarm. Zeitschreibung: 6 Sek.

STRAUBschen Herzen negative Herzwirkungen hervor, doch wird die Adrenalinwirkung auf das Herz weder durch unter- noch durch überschwellige Kobaltmengen verändert.

Im weiteren nahmen wir Versuche am isolierten Kaninchendarmpräparat vor. 200 μg Kobalt führen am Darm Tonussteigerung herbei, die jedoch mit 2 μg Adrenalin gehemmt werden kann (Abb. 3). Wie Abb. 4 zeigt, lässt sich die tonus-

steigernde Wirkung von 100 μg Kobalt auch noch nach einer Stunde nachweisen, doch entspricht die Adrenalinempfindlichkeit des Darms nach einstündiger Inkubation mit Kobalt-Ionen dem ursprünglichen Zustand. Am atropinisierten Kaninchendarm (1 : 10 000) sowie in karbonatfreier Tyrode-Lösung erhielten wir ähnliche Resultate.

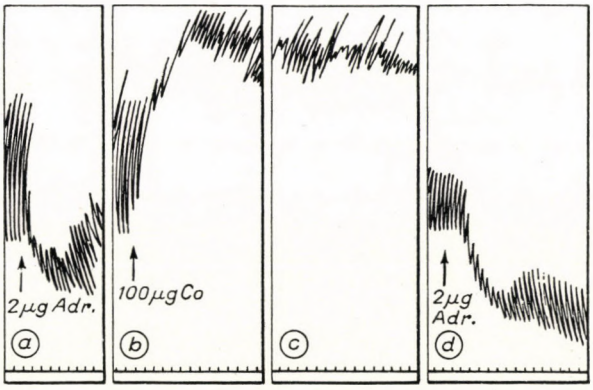


Abb. 4. Isolierter Kaninchendarm. Zeitschreibung : 6 Sek.
a = 2 μg Adrenalin ; *b* = nach Waschen 100 μg Co^{++} ; *c* = die Darmfunktion ½ Stunde nach *b* ; *d* = Wirkung von 2 μg Adrenalin 1 Stunde nach *b*.

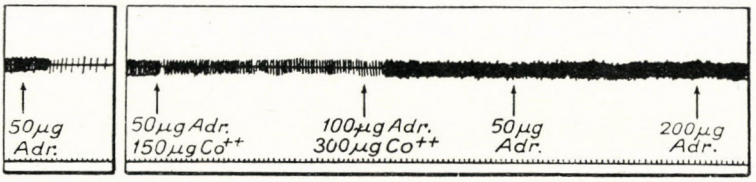


Abb. 5. TRENDELENBURGsches Froschpräparat. Zeitschreibung : 20 Sek.

Die Ergebnisse der an 9 TRENDELENBURGschen Froschpräparaten durchgeführten Versuche lassen sich folgendermassen zusammenfassen: 50 μg Adrenalin verursachen die übliche Senkung der Tropfenzahl (Abb. 5). Zusammen mit 150 μg Kobalt gegeben, ist die gleiche Adrenalinmenge wirkungslos. Auf Grund ähnlicher Versuche hatten wir festgestellt, dass das Kobalt-Ion im Verhältnis 2 : 1 die Adrenalinwirkung beträchtlich herabsetzt und im Verhältnis 3 : 1 völlig aufhebt. Wie auf Abb. 6 ersichtlich, sind während der 50 μg/ml Kobalt enthaltenden Ringer-Infusion 50, 100, 200, 400 μg, ja auch 1 mg Adrenalin nicht imstande, Vasokonstriktion hervorzurufen. Nach Unterbrechung der Kobalt-Infusion liessen wir das Präparat $^1/_2$ Stunde lang mit Ringer-Lösung durchströmen, und der Adrenalineffekt kam wie bei der Kontrolle vor der Kobalt-Infusion zustande. Nach Anwendung von 0,5 mg% Atropin erzielten wir ähnliche experimentelle Resultate.

Hiernach untersuchten wir, wie die Wirkung von Adrenalin auf die Pupillen vom Kobalt-Ion beeinflusst wird. Nach unseren Versuchen führen 300 μg Adrenalin nach subkonjunktivaler Verabreichung ausgeprägte Pupillenerweiterung herbei; diese Wirkung lässt sich durch 3 mg Co^{++} hochgradig verringern und mit 4—4,5 mg Kobalt-Ionen nahezu völlig auslöschen (Abb. 7).

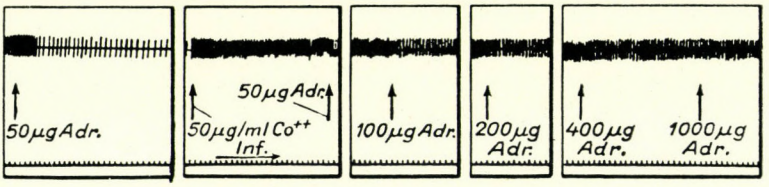


Abb. 6. TRENDELENBURGsches Froschpräparat; Durchströmung mit 50 μg/ml Co^{++}-haltiger Ringer-Lösung. Zeitschreibung: 20 Sek.

Die Ergebnisse zusammenfassend, können wir feststellen, dass das Kobalt-Ion die Adrenalinwirkung auf den Blutdruck, auf die Milz [2], am TRENDELENBURGschen Froschpräparat und auf die Pupillen hemmt, indessen die Adrenalin-

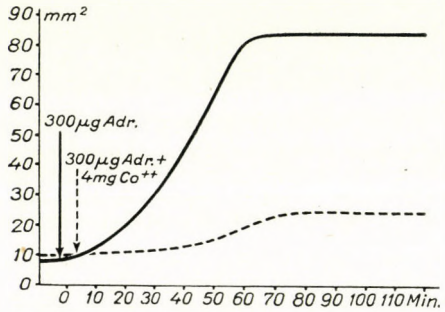


Abb. 7. Die Ordinate gibt die Grösse der Kaninchenpupille in mm², die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten

wirkung auf das Froschherz und den isolierten Kaninchendarm nicht beeinflusst. Nach den Versuchsergebnissen von CAUJOLLE, FRANCK und GRANDPIERRE [5] wird die Reizbarkeit des sympathischen Nervensystems vom Kobalt-Ion herabgesetzt, die des parasympathischen jedoch nicht wesentlich beeinflusst. ANDO und Mitarbeiter [6] teilten mit, Co^{++} verfüge über Antiadrenalinwirkung; sie fanden, dass das Kobalt-Ion eine derartige Wirkung auch auf Froschherz und Kaninchendarm ausübe. Die Darmversuche hatten sie *in vivo* vorgenommen; nach der mitgeteilten Abbildung handelt es sich nicht um die Aufhebung der Adrenalinreaktion, sondern darum, dass die Wirkung des nach dem tonussteigernden Co^{++} gegebenen tonussenkenden Adrenalins geringer ist als ohne Kobalt-Ion. Auch unsere am STRAUBschen Präparat gewonnenen Resultate widersprechen der Mitteilung von ANDO und Mitarbeitern über die Antiadrenalinwirkung.

Nach unseren Versuchsergebnissen ist demnach der Kobaltion-Adrenalin-Antagonismus durchaus nicht so allgemeingültig wie der Ferroion-Adrenalin-Antagonismus, der an isolierten Organen und an in vivo Test-Objekten mit konstanter Gesetzmässigkeit nachgewiesen werden kann. Die Frage, warum Co^{++} die Adrenalinwirkung auf den Blutdruck, die Milz und die Pupillenreaktion der Säugetiere bzw. am Trendelenburgschen Froschpräparat antagonisiert und warum dieser Antagonismus am Säugerdarm und Froschherzen nicht in Erscheinung tritt, lässt sich verschiedenartig erklären. Unserer Ansicht nach müsste vor allem festgestellt werden, ob bei den Test-Objekten, welche diese beiden verschiedenen, gegensätzlichen Versuchsresultate ergeben, hinsichtlich der Aufnahme bzw. Speicherung des Kobalt-Ions Unterschiede bestehen.

ZUSAMMENFASSUNG

In früheren Versuchen hatten Verfasser nachgewiesen, dass die Adrenalinwirkung auf Blutdruck und Milz vom Kobalt-Ion gehemmt wird. In vorliegender Arbeit wird festgestellt, dass das Kobalt-Ion die Adrenalinwirkung auf das TRENDELENBURGsche Froschpräparat und die Kaninchenpupille antagonisiert, aber am isolierten Kaninchendarm und am Froschherzen der Adrenalinwirkung gegenüber keinen Hemmungseffekt ausübt.

LITERATUR

1. KESZTYÜS, L., SZILÁGYI, T., VARGA, E.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **1**, 228 (1947).
2. KESZTYÜS, L., SZÉKELY, ST., SZILÁGYI, T., VARGA, E.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **2**, 11 (1948).
3. SZILÁGYI, T., HAHN, G.: J. Pharmacol. Exp. Therap. **98**, 331 (1950).
4. VARGA, E., SZILÁGYI, T., BÁNYÁSZ, T.: Kísérletes Orvostud. **5**, 22 (1953).
5. CAUJOLLE, F., FRANCK, C., GRANDPIERRE, R.: Compt. rend. soc. biol. **138**, 705 (1944).
6. ANDO, J. und Mitarbeiter: Bull. Osaka Med. School **1**, 26 (1954).

BEITRÄGE ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES KOBALT-ION-ADRENALIN-ANTAGONISMUS

Von

L. KOCSÁR, S. SZALAY, CS. UJHELYI und L. KESZTYÜS

PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT UND ATOMKERN-FORSCHUNGSINSTITUT DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, DEBRECEN

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

In vorangegangenen Versuchen hatten wir festgestellt [1], dass der zwischen dem Kobalt-Ion und Adrenalin vorhandene Antagonismus nicht so allgemeingültig ist, wie wir dies im Zusammenhang mit dem Ferro-Ion beobachten konnten [2, 3, 4]. Nach unseren Resultaten wird nämlich die Adrenalinempfindlichkeit am isolierten STRAUBschen Herzen und am Kaninchendarm von Kobalt nicht beeinflusst, während bei entsprechender Dosierung die Adrenalinwirkung auf Blutdruck und Milz des Hundes [3], Kaninchenpupille und TRENDELENBURGsches Froschpräparat völlig abgewehrt werden kann.

Wir nahmen an, dass diese Abweichung auf einen quantitativen Unterschied in der Kobaltaufnahme und -speicherung der sich vom Gesichtspunkt des Adrenalinantagonismus gegensätzlich verhaltenden Versuchsobjekte zurückgeführt werden kann.

Methodik und Ergebnisse

Zur Klärung dieser Hypothese untersuchten wir teils polarographisch, teils mit dem radioaktiven Isotopen Co^{60}, den Verlauf der Kobaltaufnahme am isolierten Froschherzen und isolierten Kaninchendarm, bei denen kein Kobalt-Adrenalin-Antagonismus besteht, und am TRENDELENBURGschen Froschpräparat, bei dem Kobalt die Adrenalinwirkung aufhebt.

Im ersten Teil der Versuche sollten die Kobaltbestimmungen polarographisch durchgeführt werden. Unsere Untersuchungen ergaben jedoch keine bewertbaren Resultate. Unsere Aufgabe bestand nämlich darin, die Menge der Kobalt-Ionen in der Frosch-Ringer-Lösung und Säuger-Tyrode-Lösung zu Beginn der Inkubation mit den betreffenden Organen und am Ende der 2—3stündigen Versuchsperiode zu bestimmen. Aus den eventuellen Veränderungen der Konzentration des den Salzlösungen zugegebenen Kobalts wollten wir Schlüsse ziehen, ob das isolierte Organ imstande ist, Kobalt aufzunehmen bzw. zu speichern. Theoretisch lassen sich die Vorteile der polarographischen Methoden hierbei äusserst gut ausnutzen. Insbesondere war es verlockend, dass die Bestim-

mung in einer sehr geringen Flüssigkeitsmenge (selbst in wenigen Tropfen) vorgenommen werden kann, so dass wir bei unseren Versuchen die Kobaltkonzentration ¼ oder ½stündlich hätten nachprüfen können. Anderseits vermag man nach Literaturangaben bei der polarographischen Kobaltanalyse das 2- und 3wertige Kobalt dadurch zu unterscheiden [5, 6], dass nur das Kobalto-Ion eine gut bewertbare, über Grund- und Grenzstrom verfügende polarographische Stufe ergibt.

Im Laufe der polarographischen Versuche stellten wir indessen fest, dass in einem biologischen System, wie z. B. dem isolierten Darmpräparat, das der physiologischen Kochsalzlösung zugegebene Kobalt-Ion infolge der ständigen Oxygenisierung oxydiert wird und die Kobaltstufe zur quantitativen Auswertung weniger geeignet ist. Die Versuche, die Kobalti-Ionen mit Hydroxylamin zurückzureduzieren und Kobalto-Ionen zu polarographieren, führten indessen nicht zu beruhigenden Ergebnissen.

Deshalb mussten wir auf die polarographische Analyse verzichten und die Versuche mit dem radioaktiven Isotopen Co^{60} fortsetzen.

Die Methode bestand im allgemeinen darin, dass wir zu bekannten Mengen der Ringer- bzw. Tyrode-Perfusate vom isolierten Froschherzen und Kaninchendarm in der entsprechenden Konzentration mit dem Isotopen markiertes $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ gaben und aus den Perfusaten halbstündlich kleinere Proben entnahmen, in denen die Isotop-Kobaltmenge bestimmt wurde. Während der Versuche wurden im Laufe von 2 Stunden 5 Perfusatproben analysiert.

Die Bestimmungen wurden mit dem über ein Endfenster verfügenden Geiger-Müller-Zähler ausgeführt. Bei einem Teil der Versuche wurden die Messungen mit dem Filter 1 mg/cm² vorgenommen (in der Tabelle die Mengen mit kleinerer Aktivität), wobei die Selbstabsorption keinen wesentlichen Fehler verursachen konnte, da wir mit annähernd identischen Mengen arbeiteten. Zur Kontrolle führten wir zwecks Vermeidung der aus der Selbstabsorption stammenden Fehler auch Messungen mit dem Filter 56 mg/cm² durch. In diesem Fall ist die Strahlungsenergie so gross, dass die Selbstabsorption vernachlässigt werden kann. Der geometrische Faktor war 10%.

Tabelle I

Co^{60}-Speicherung des isolierten Kaninchendarms in der Tyrode-Lösung

Versuchs-Nr.	Versuchsdatum	Verwendete Isotopmenge μC	Im Darm zurückgebliebene Co^{60}-Menge in %	Versuchsdauer
1	26. IV.	0,05	1,2	120′
2	3. V.	0,025	—	120′
3	3. V.	0,025	—	120′
4	8. V.	1,03	1,0	120′
5	10. V.	1,00	2,0	120′

Tabelle II

Kobaltspeicherung des Trendelenburgschen Froschpräparates bei Anwendung des Isotopen Co^{60}

Versuchs-Nr.	Versuchsdauer	Benutzte Isotopmenge μC	Im Frosch zurückgebliebene Co^{60}-Menge%	Anwendungsweise des Isotopen	Versuchsdauer
1	8. V.	1,03	19	einmal	120′
2	19. VI.	1,03	17	„	120′
3	19. VI.	1,00	29	„	120′
4	26. VI.	1,00	14	kontinuierliche Co^{60}-Infusion	120′
5	26. VI.	1,00	22	„ „	120′
6	29. VI.	1,00	14	„ „	120′
7	29. VI.	1,00	16	„ „	120′

Die am isolierten Kaninchendarm gewonnenen Resultate sind auf Tabelle I wiedergegeben. Aus dieser geht hervor, dass bei den 5 Versuchen die der Tyrode-Lösung zugegebene entsprechende Kobalt-Isotopmenge in 120 Minuten nur in einer Menge verschwand, die innerhalb der Fehlergrenzen liegt. Es war die entsprechende Tonussteigerung am Darm zu beobachten. Nach der Zerstörung konnte Isotop-Kobalt im Darm lediglich in einer Menge von 1—2% nachgewiesen werden, die wahrscheinlich an der Darmoberfläche haften geblieben war und aus Kobaltspuren bestand, die von dort mit Löschpapier nicht entfernt werden konnten.

Aus alledem geht eindeutig hervor, dass Kobalt vom isolierten Kaninchendarm nicht in beträchtlicher Menge aufgenommen wird. Ganz ähnliche Resultate erzielten wir auch am isolierten STRAUBschen Herzen.

Völlig anders sind die Verhältnisse am TREDELENBURGschen Froschpräparat. Wir gingen so vor, dass wir zum Ringer-Perfusat eine mit Isotopen markierte entsprechende Kobaltmenge gaben, das heraustropfende Perfusat sammelten und die Isotopmenge darin bestimmten. Nach Durchströmung mit der isotop-

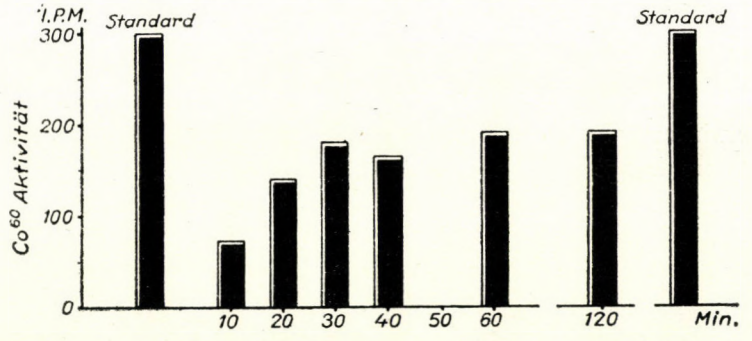


Abb. 1. Co^{60}-Aktivität der Frosch-Ringer-Lösung vor und nach der TRENDELENBURGschen Perfusion

markierten Kobaltlösung während 120 Minuten liessen wir das Präparat 1 Stunde lang mit kobaltfreier Ringer-Lösung durchströmen, veraschten es sodann mit Salpetersäure und bestimmten die Isotopmenge.

Wie aus Tabelle II hervorgeht, wurden 14—29% des eingeführten Kobalts vom Präparat so stark gebunden, dass diese Menge auch durch einstündige Behandlung mit kobaltfreiem Perfusat nicht entfernt werden konnte. Die Ergebnisse waren in sämtlichen 7 Versuchen die gleichen. Abb. 1 zeigt, wie sich in 2 Versuchen die Konzentration des Perfusates im Laufe von 2 Stunden nach Durchströmung des TRENDELENBURGschen Präparates verändert. Die erste und letzte Säule veranschaulichen die vor und nach dem Versuch bestimmte Aktivität im Perfusatgefäss. Wie ersichtlich, nimmt die Aktivität der aus dem Präparat tropfenden Flüssigkeit nach Beginn der Durchströmung von der 0. bis etwa zur 30. Minute zu und stabilisiert sich dann auf einem im grossen ganzen konstanten Wert, der immer noch um 40% niedriger ist als die Aktivität der im Perfusatgefäss befindlichen Flüssigkeit.

Besprechung

Nach unseren Versuchsergebnissen bleibt also der Kobalt-Adrenalin-Antagonismus am isolierten Kaninchendarm und Froschherzen deshalb aus, weil von diesen Untersuchungsobjekten keine entsprechenden Kobaltmengen gebunden und gespeichert werden. Aus den Resultaten der Versuche am TRENDELENBURGschen Froschpräparat aber kann der Schluss gezogen werden, dass die Adrenalinwirkung durch die Speicherung einer entsprechenden Kobaltmenge suspendiert wird.

Neben diesem zufriedenstellenden Resultat ergeben sich jedoch zahlreiche offene Fragen. Die wichtigste unter diesen ist, auf welche Weise das Kobalt seine negativen Herz- und tonussteigernden Darmwirkungen ausübt, da doch keine nennenswerte Menge aus dem Perfusat verschwindet. Vorläufig nehmen wir an, dass Kobalt die chemische Zusammensetzung der Zellmembran durch Komplexbildungen beeinflusst. Eine weitere wesentliche Frage wäre, wo die im TRENDELENBURGschen Froschpräparat zurückgehaltene Kobaltmenge gespeichert wird und durch welchen Mechanismus diese die vasokonstriktorische Adrenalinwirkung aufhebt.

Letztere Frage suchen wir durch autographische Versuche zu klären.

ZUSAMMENFASSUNG

Am isolierten Froschherzen, am Kaninchendarm und am TRENDELENBURGschen Froschpräparat wurden Aufnahme und Speicherung des von aussen eingeführten Kobalt-Ions untersucht. Die Versuche wurden mit dem durch den radioaktiven Isotopen Co^{60} markierten Kobaltchlorid vorgenommen. Es konnte festgestellt werden, dass das isolierte Straubsche Herz und der Kaninchendarm — bei denen Kobalt-Adrenalin-Antagonismus nicht besteht — Kobalt nicht speichern. Demgegenüber sind Kobaltaufnahme und -speicherung am TRENDELENBURGschen Froschpräparat — wo dieser Antagonismus ausgeprägt in Erscheinung tritt — nachweisbar. Das Ausmass der Kobaltaufnahme betrug unter den Versuchsbedingungen im Laufe von 2 Stunden 14—29%.

LITERATUR

1. SZILÁGYI, T., KOCSÁR, L., SZATAI, I.: Acta Physiol. Hung. **11**, 409 (1957)
2. KESZTYÜS, L., SZILÁGYI, T., VARGA, E.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **1**, 228 (1947).
3. KESZTYÜS, L., SZÉKELY, ST., SZILÁGYI, T., VARGA, E.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **2**, 11 (1948).
4. SZILÁGYI, T., HAHN, G.: J. Pharmacol. Exp. Therap. **98**, 331 (1950).
5. STACKELBERG, M.: Polarographische Arbeitsmethoden 1950. 158. Walter de Gruyter, Berlin.
6. WILLIS, J. B., FRIEND, J. S., MELLOR, D. P.: J. Am. Chem. Soc. **67**, 1680 (1945).

WIRKUNG VON ZUCKERBELASTUNG UND ADRENALIN AUF DIE PHOSPHORYLASE- UND GLUKOSE-6-PHOSPHATASE-AKTIVITÄT DER LEBER

Von

GY. BOT, T. SZILÁGYI und E. SZABÓ

PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 24. September 1956)

Bekanntlich wird von Adrenalin parallel mit seiner glykogenmobilisierenden und den Blutzuckerspiegel erhöhenden Wirkung auch die Phosphorylierungsaktivität der Leber erhöht [1]. Laut schwedischer Autoren wird die Phosphorylierungsaktivität auch durch Hungern und Fütterung beeinflusst; im Gegensatz zu Adrenalin führt die Fütterung eine geringe Senkung der Phosphorylierungsaktivität herbei [2].

Nachdem in der Literatur neben den zahlreichen *in vitro*-Versuchen nur wenige Hinweise auf die *in vivo*-Verhältnisse zu finden sind, untersuchten wir die akute Wirkung der doppelten Glukosebelastung und des Adrenalins auf die Phosphorylierungsaktivität der Leber *in vivo*. Parallel damit untersuchten wir auch die Aktivität der G-6-Pase* der Leber, da wir annahmen, dass auch dieses Enzym in der Regulierung des Blutzuckerspiegels eine Rolle spielt. Es ist bekannt, dass die G-6-Pase-Menge der Leber durch Hungern erhöht, durch Fütterung jedoch herabgesetzt wird [3, 4], ferner dass bei Diabetes und auf Wirkung von Cortison die G-6-Pase-Menge zu-, auf Insulinwirkung jedoch abnimmt [4, 5, 6, 7].

Methoden

Die Versuche wurden an mit Evipan narkotisierten 7—14 kg schweren männlichen Hunden durchgeführt. Von Adrenalin verabreichten wir 300 μg/kg Körpergewicht während 5 Minuten in i. v. Infusion, insgesamt 20 ml. Glukose verabfolgten wir als 40%ige Lösung ebenfalls i. v. in der Menge 1 g/kg Körpergewicht.

Messung der Enzymaktivität: Vor Verabreichung des Wirkstoffes sowie mehrere Male danach schnitten wir etwa 1 g Leber heraus, die wir sofort mit Kohlensäureschnee gefrieren liessen. Aus dem in gefrorenem Zustand abgewogenen Leberstückchen bereiteten wir zur Messung der G-6-Pase mit 0,1 *M* NaF ein 10%iges, zur Messung der Phosphorylase ein 5%iges Homogenat. Die Aktivität der G-6-Pase wurde nach der Methode von CORI [8] bestimmt, indem aus G-6-P bei 30° C der in 15 Minuten freigewordene anorganische P gemessen wurde. Die Phosphorylase-Aktivität bestimmten wir nach GREEN und CORI [9] aus G-1-P bei pH = 6,0 und 30° C

*Folgende Abkürzungen werden benutzt:

G-6-Pase = Glukose-6-phosphatase
G-6-P = Glukose-6-phosphat
G-1-P = Glukose-1-phosphat

durch Messung des in 15 Minuten freigewordenen anorganischen P. Der anorganische P wurde nach TAUSSKY [10], der Blutzucker nach HAGEDORN—JENSEN bestimmt. Die Ergebnisse beziehen sich auf 100 mg rohe Leber.

Ergebnisse und Besprechung

Die *in vivo* Wirkung von Adrenalin auf die Leberphosphorylase geht aus Tabelle I hervor.

Tabelle I

Wirkung von Adrenalin auf die Phosphorylase-Aktivität der Leber

Nr. des Hundes	Körpergewicht kg	Zeitpunkt der Leberprobe	Phosphosrylase-Aktivität µgP/100 mg/15′	Blutzucker mg%
I.	14	vor phys. NaCl	192	92
		10′ nach phys. NaCl	216	94
II.	11	vor phys. NaCl	600	85
		10′ nach phys. NaCl	676	77
		40′ nach phys. NaCl	620	69
1.	14	vor Adrenalin	288	96
		10′ nach Adrenalin	403	120
		40′ nach Adrenalin	264	132
2.	11	vor Adrenalin	620	69
		10′ nach Adrenalin	860	111
		40′ nach Adrenalin	440	109
3.	13	vor Adrenalin	260	129
		10′ nach Adrenalin	492	179
		30′ nach Adrenalin	206	170
4.	8	vor Adrenalin	160	128
		10′ nach Adrenalin	140	121
		30′ nach Adrenalin	506	141
		60′ nach Adrenalin	240	114

Wie ersichtlich, führt die in zwei Kontrollversuchen statt Adrenalin verabreichte physiologische NaCl-Lösung weder wesentliche Aktivitätszunahme noch eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels herbei. Von Adrenalin selbst wird die aktive Phosphorylase-Menge ausgeprägt erhöht und der Blutzuckerspiegel gesteigert. Diese Resultate stimmen mit den aus der Literatur bekannten, mit anderer Technik gewonnenen wenigen Angaben überein.

Bei der Untersuchung der G-6-Pase-Aktivität der Leber vermochten wir keine ausgesprochene Adrenalinwirkung zu beobachten. Eine geringe Senkung war festzustellen, eine solche wird aber auch von der als Kontrolle ver-

wendeten physiologischen NaCl-Lösung ausgelöst. Es scheint, dass Adrenalin die G-6-Pase-Aktivität nicht wesentlich steigert.

Die Wirkung der Zuckerbelastung und der doppelten Zuckerbelastung auf die Phosphorylase-Aktivität ist auf Tabelle II veranschaulicht.

Wie Tabelle II zeigt, nimmt die Menge der aktiven Phosphorylase der Leber nach Zuckerbelastung ab. Die Senkung tritt in den auf die Zuckerbelastung folgenden 15—20 Minuten bereits ausgeprägt in Erscheinung, und häufig tritt weitere Verringerung ein. 60 Minuten nach der Belastung nimmt die Aktivität in der Mehrzahl der Fälle wieder zu. Die zweite Zuckerbelastung verursacht in der Phosphorylase-Aktivität erneut eine ausgeprägte Senkung. Aus dem Vergleich des Blutzuckerspiegels mit der Phosphorylase-Aktivität geht hervor, dass parallel mit der anfänglichen Senkung der Phosphorylase-Aktivität auch der Zuckerspiegel sinkt ; in der späteren Phase des Prozesses steigt jedoch die Phosphorylase-Aktivität wieder, während der Blutzuckerspiegel weiterhin sinkt.

Die Wirkung der Zuckerbelastung auf die G-6-Pase ist auf Tabelle III wiedergegeben.

Es kann festgestellt werden, dass die G-6-Pase-Aktivität 10—15 Minuten nach der Erhöhung des Zuckerspiegels abnimmt. Nach der Senkung wird jedoch die ursprüngliche Aktivität, noch bevor der hohe Zuckerspiegel sinken würde, rasch wiederhergestellt. Demnach ist die Senkung der G-6-Pase-Aktivität nicht auf die Erhöhung der Glukose-Konzentration zurückzuführen, sondern auf eine damit einhergehende andere Wirkung, wahrscheinlich die des Insulins.

Aus den Resultaten ist zu entnehmen, dass die Phosphorylase- und G-6-Pase-Aktivität der Leber durch den hohen Zuckerspiegel irgendwie herabgesetzt wird. Der die Glykogen-Mobilisierung limitierende Faktor ist bekanntlich die Phosphorylase [1]. Die Senkung der Phosphorylase-Aktivität führt demnach zu einer Hemmung der Mobilisierung der Glykogenreserve. Wir wissen ferner, dass die Glykogensynthese in der Leber durch hohen Blutzuckerspiegel gesteigert wird. Da nach der Zuckerbelastung eine Verringerung der Phosphorylase-Aktivität eintritt, darf geschlossen werden, dass in der Glykogensynthese — im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Glykogenmobilisierung — nicht die Phosphorylase den limitierenden Faktor darstellt. Die Geschwindigkeit der Glykogensynthese wird wahrscheinlich von der Aktivität der Hexokinase und Phosphoglykomutase bzw. vom Gleichgewicht der von diesen Enzymen zustande gebrachten Intermediärprodukte (G-6-P und G-1-P), ferner von der Konzentration des ATP und des anorg. P bestimmt. Es kann demnach auch bei verminderter Phosphorylase-Aktivität noch gesteigerte Glykogensynthese stattfinden. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die Synthetisierungsaktivität der Phosphorylase erheblich grösser ist als ihre Abbaufähigkeit [11]. Der Mechanismus der von der Zuckerbelastung auf die Phosphorylase-Aktivität ausgeübten Wirkung muss noch durch weitere Unter-

Tabelle II

Wirkung der Zuckerbelastung auf die Phosphorylase-Aktivität der Leber

Nr. des Hundes	Körpergewicht kg	Zeitpunkt der Leberprobe	Phosphorylase-Aktivität µgP/100 mg/15′	Blutzucker mg%
5.	8	Vor Glukose	376	100
		5′ nach Glukose	—	190
		15′ nach Glukose	320	152
		40′ nach Glukose	280	152
		60′ nach Glukose	336	176
6.	7	Vor Glukose	622	100
		10′ nach Glukose	—	159
		15′ nach Glukose	580	146
		45′ nach Glukose	—	111
		60′ nach Glukose	396	107
7.	8	vor Glukose	384	189
		10′ nach Glukose	—	308
		20′ nach Glukose	106	271
		40′ nach Glukose	280	224
		60′ nach Glukose	440	194
8.	10	Vor Glukose	438	110
		I. 5′ nach Glukose	—	230
		25′ nach Glukose	360	204
		50′ nach Glukose	160	198
		II. 5′ nach Glukose	—	283
		15′ nach Glukose	112	228
		50′ nach Glukose	400	200
9.	10	vor Glukose	184	98
		I. 10′ nach Glukose	120	262
		30′ nach Glukose	112	233
		60′ nach Glukose	220	210
		II. 10′ nach Glukose	212	303
		30′ nach Glukose	104	301
		60′ nach Glukose	52	278
10.	8	vor Glukose	196	100
		I. 10′ nach Glukose	56	295
		30′ nach Glukose	100	192
		60′ nach Glukose	120	113
		II. 10′ nach Glukose	168	324
		30′ nach Glukose	80	211
		60′ nach Glukose	14	181

Tabelle III

Wirkung der Zuckerbelastung auf die G-6-Pase-Aktivität der Leber

Nr. des Hundes	Körpergewicht kg	Zeitpunkt der Leberprobe	G-6-Pase-Aktivität /gP/100 mg/15′	Blutzucker mg%
I.	14	Vor phys. NaCl	615	92
		10′ nach phys. NaCl	630	94
		40′ nach phys. NaCl	585	96
	8	vor Glukose	782	189
7.		20′ nach Glukose	572	271
		40′ nach Glukose	740	224
		60′ nach Glukose	740	194
8.	10	vor Glukose	337	110
		I. 5′ nach Glukose	—	230
		25′ nach Glukose	219	204
		50′ nach Glukose	318	198
		II. 5′ nach Glukose	—	283
		15′ nach Glukose	249	228
		50′ nach Glukose	258	200
9.	10	vor Glukose	420	98
		I. 10′ nach Glukose	—	262
		30′ nach Glukose	300	233
		60′ nach Glukose	480	210
		II. 10′ nach Glukose	438	303
		30′ nach Glukose	378	301
		60′ nach Glukose	498	278
10.	8	vor Glukose	689	100
		I. 10′ nach Glukose	438	295
		30′ nach Glukose	516	192
		60′ nach Glukose	516	113

suchungen geklärt werden. Vor allem wollen wir untersuchen, ob die phosphorylaseabbauende Aktivität von dem nach der Zuckerbelastung frei werdenden Insulin gehemmt wird. Warscheinlich lassen sich die in der Literatur erwähnten Beobachtungen, wonach die aktive Phosphorylasemenge durch Fütterung herabgesetzt wird, ebenfalls auf die Erhöhung des Blutzuckerspiegels zurückführen. Die Wirkung der Fütterung ist wahrscheinlich deshalb gering und schwankend, weil die auftretende Blutzuckerspiegelerhöhung von verhältnismässig geringem Ausmass ist und verschieden sein kann.

Unsere Resultate, aus denen die Senkung der G-6-Pase-Menge nach Zuckerbelastung hervorgeht, stehen in Einklang mit den Literaturangaben, welche eine

die G-6-Pase-Aktivität senkende Wirkung der Fütterung sowie der Insulinverabreichung feststellen.

*

Wir danken I. KIRÁLY für ihre technische Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei in vivo Versuchen an Hunden wurden die Phosphorylase- und G-6-Pase-Aktivität der Leber durch Glukosebelastung und doppelte Glukosebelastung ausgeprägt herabgesetzt.

Adrenalin steigerte die Phosphorylase-Aktivität der Leber, war aber auf ihre G-6-Pase-Aktivität ohne Einfluss.

Aus obigen geht hervor, dass die Phosphorylase — im Gegensatz zu ihrer limitierenden Wirkung auf die Glykogenmobilisierung — die Geschwindigkeit der Glykogensynthese nicht herabsetzt.

LITERATUR

1. SUTHERLAND, W. B., CORI, C. F.: J. Biol. Chem. **188**, 531 (1951).
2. LUNDBAEK, K., GÖRANSON, E.: Nature **162**, 1002 (1948).
3. WEBER, G., CANTERO, A.: Science **120**, 851 (1954).
4. ASHMORE, J., HASTINGS, A. B., NESBETT, F. B.: Proc. Nation. Acad. Sci. **40**, 673 (1954).
5. ASHMORE, J., HASTINGS, A. B., NESBETT, F. B., RENOLD, A. E.: J. Biol. Chem. **218**, 77 (1956).
6. LANGDON, R. H., WEAKLEY, D. R.: J. Biol. Chem. **214**, 167 (1955).
7. WEBER, G., ALLARD, C., DE LOMIRANDE, G., CANTERO, A.: Biochim. Biophys. Acta **16**, 618 (1955).
8. CORI, G. T., CORI, C. F.: J. Biol. Chem. **199**, 661 (1952).
9. GREEN, A. A., CORI, G. T.: J. Biol. Chem. **151**, 21 (1943).
10. TAUSSKY, H. H., SHORR, E., KURZMANN, G. H.: J. Biol. Chem. **202**, 675 (1953).
11. BOT, GY., ZSINDELY, A., ROSDY, B.: Acta Physiol. Hung. **6**, Suppl. 82 (1954).

BILDUNGS- UND UMWANDLUNGSVERHÄLTNISSE VON PHOSPHORYLASE-*a* IM MUSKELHOMOGENAT

Von

GY. BOT und I. JÓKAY

PATHOHISTOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen am 28. September 1956)

Bekanntlich wandelt sich nach gewissen physiologischen Einwirkungen (Adrenalin, Sauerstoffbehandlung) die inaktive *b*-Form der Muskelphosphorylase in die aktive *a*-Form um. Diese Veränderung konnte *in vitro* nur in Anwesenheit von intakten Zellen beobachtet werden [1]. FISCHER und KREBS wiesen 1955 nach, dass die Phosphorylase-*a*-Bildung auch im Kaninchenmuskelextrakt vor sich geht, wenn ATP und bivalente Metallionen anwesend sind [2]. Neuerdings ist auch bereits die partielle Reinigung des phosphorylaseumwandelnden Faktors gelungen, und einige seiner Eigenschaften konnten festgestellt werden [3].

In unserer vorliegenden Arbeit haben wir die Verhältnisse der Phosphorylase-*a* $\rightleftharpoons$ *b*-Umwandlung im Muskelhomogenat selbst untersucht. Die Untersuchung des Muskelhomogenats bringt uns im Zusammenhang mit den an gereinigten Präparaten gewonnenen Ergebnissen der Kenntnis der physiologischen Faktoren näher.

Methoden

Die mit Nackenschlag betäubten Kaninchen oder Ratten liessen wir verbluten, schnitten den Skelettmuskel heraus, brachten ihn mit Kohlensäureschnee zum Gefrieren und zerrieben ihn in der Reibschale mit Quarzsand und dem 3fachen Volumen 0,1 *M* Na-Glyzerophosphat-Lösung (pH = 7,4). Das so gewonnene Muskelhomogenat wurde durch Gaze filtriert. Alle Manipulationen wurden bei 0—5° C vorgenommen.

Die Bildung der Phosphorylase-*a* untersuchten wir in dem auf pH = 7,4 eingestellten Homogenat während der Inkubation bei 30° C in der Weise, dass wir zeitweise aliquote Teile herausnahmen und mit NaF-Glyzerophosphat-Lösung auf das 20- oder 40fache verdünnten. In dieser Verdünnung wurde die Phosphorylaseaktivität nach der Methode von GREEN und CORI [4] ohne Anwendung von Cystein bestimmt. Die Aktivität bringen wir — auf 1 mg Muskel bezogen — in der während 10 Minuten aus G-1-P* befreiten anorg. P-Menge zum Ausdruck. Die ohne Zugabe von Adenylsäure beobachtete Enzymaktivität betrachteten wir als Phosphorylase-*a* Aktivität. Davon, dass die Phosphorylase-*a*-Bildung nicht auf die eventuelle Aktivierung von Phosphorylase-*b* durch Adenylsäure, die sich aus dem eingeführten ATP bilden kann, zurückzuführen sei, überzeugten wir uns folgendermassen:

1. Nach Herstellung verschiedener Verdünnungen erhielten wir aus dem inkubierten Homogenat je 1 mg Muskel die gleiche Phosphorylase-Aktivität. Dies wäre bei Adenylsäure-

* Folgende Abkürzungen werden benutzt:
G-1-P = Glukose-1-phosphat
ATP = Adenosintriphosphat
EDTA = Äthylendiamintetraazetat

aktivierung nicht zu beobachten, da Phosphorylase-*b* von Adenylsäure nur in der Konzentration 0,001 *M* maximal aktiviert wird.

2. Wurde anstelle des gebräuchlichen ATP die gleiche Menge, d. h. 0,001 *M* Adenylsäure zum Muskelhomogenat gegeben, zeigte die entnommene Probe in 20- und 40facher Verdünnung nach der Inkubation weder Phosphorylase-Aktivität noch Aktivitätssteigerung.

Die Glykogenphosphorylierungsfähigkeit des Muskelhomogenates wurde im Inkubationsmedium mit folgender Zusammensetzung gemessen: 0,1 *M* NaF, 1%iges Glykogen, 0,005 *M* Na_2HPO_4, 0,05 *M* Na-Glyzerophosphat, pH = 7,4, 30° C. Die Resultate wurden in % des esterifizierten P ausgedrückt.

Ergebnisse und Besprechung

Im ersten Teil der Versuche untersuchten wir — mit und ohne Zugabe von NaF — die Wirkung der Mn^{++}-, Mg^{++}- und Ca^{++}-Ionen auf die Phosphorylase-*a*-Bildung im Muskelhomogenat. Die Ergebnisse sind aus Abb. 1 ersichtlich.

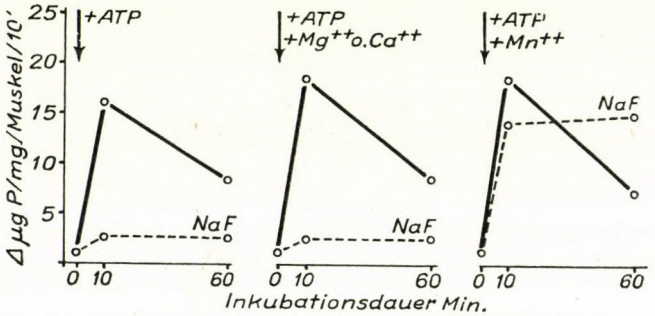


Abb. 1. Wirkung bivalenter Ionen auf die Phosphorylase-*a*-Bildung im Muskelhomogenat

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, findet die Phosphorylase-*a*-Bildung nach Zugabe von 10^{-3} *M* ATP-Na auch dann statt, wenn wir dem Homogenat keine bivalenten Ionen beimengen. Durch Zugabe von Mg^{++}, Ca^{++} oder Mn^{++} wird die Wirkung von ATP nur wenig gesteigert. In Anwesenheit von NaF bringt ATP weder allein noch in Anwesenheit von Mg^{++} oder Ca^{++} Phosphorylase-*a*-Bildung zustande, es ist nur nach Zugabe von Mn^{++}-Ionen wirksam. NaF wirkt demnach durch Bindung der Mg^{++}- und Ca^{++}-Ionen hemmend, und es kann angenommen werden, dass unter physiologischen Verhältnissen Mg^{++} und Ca^{++} in der Phosphorylase-*a*-Bildung eine Rolle spielen.

Die Tatsache, dass NaF auch die Phosphorylase-*a*-Bildung zu hemmen vermag, ist deshalb bedeutsam, weil diese Wirkung die Bestimmung des Phosphorylase-*a*- und *b*-Gehaltes im NaF-haltigen Extrakt ermöglicht, ohne dass sie sich ineinander umwandeln. Bekannt ist, dass NaF die Umwandlung von Phosphorylase-*a* in Phosphorylase-*b*, d. h. das PR- (phosphorylase rupturing) Enzym hemmt [1]. Nach unseren obigen Beobachtungen ist NaF imstande, auch den umgekehrten Prozess im ursprünglichen Ionenmilieu des Muskelextraktes

zu hemmen. FISCHER und KREBS beobachteten die durch Bindung bivalenter Ionen ausgeübte Hemmungswirkung von EDTA auf die Phosphorylase-*a*-Bildung [2].

Die Verhältnisse des Muskelhomogenates nach der Dialyse sind auf Abb. 2 veranschaulicht. Die Dialyse wurde gegenüber mehrmals gewechseltem dest. Wasser 24 Stunden hindurch bei 0—5° C vorgenommen, der ausgeschiedene Niederschlag wurde entfernt. Bei diesen Versuchen bestimmten wir die Phosphorylase-*a*-Bildung nach 10 Minuten dauernder Inkubation bei 30° C. Wie ersichtlich, bildet sich Phosphorylase-*a* auf Wirkung von ATP im dialysierten Extrakt auch ohne Zugabe bivalenter Ionen. Durch Einführung der Mn^{++}- und

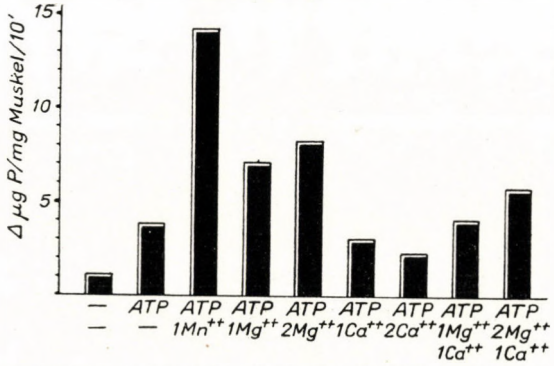


Abb. 2. Bildung von Phosphorylase-*a* im dialysierten Muskelextrakt. ATP: 0,001 *M*; 1 Mn^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}: 0,001 *M*; 2 Mg^{++}, Ca^{++}: 0,002 *M*

Mg^{++}-Ionen wird jedoch die ATP-Wirkung bereits viel beträchtlicher gesteigert als im nicht dialysierten Homogenat. Durch die Dialyse wurden also die zur Aktivierung erforderlichen Ionen teilweise entfernt. Durch Mg^{++} in der Konzentration 0,001 *M* wird die phosphorylase-*a*-bildende Wirkung von ATP wesentlich gesteigert und in der Konzentration 0,002 *M* über das Doppelte des ursprünglichen Wertes erhöht. Mg^{++} erreicht indessen auch so noch nicht die aktivierende Wirkung, die von Mn^{++} bereits in der Konzentration 0,001 *M* herbeigeführt wird.

Sehr beachtenswert ist die Wirkung von Ca^{++} im dialysierten Extrakt. Ca^{++} setzt die Phosphorylase-*a*-Bildung herab, selbst in Anwesenheit von Mg^{++}. In höherer Konzentration vermag Mg^{++} die Wirkung von Ca^{++} teilweise zu kompensieren. Die Hemmungswirkung von Ca^{++} haben wir im nicht dialysierten Extrakt interessanterweise nicht beobachten können. Möglicherweise wird seine Wirkung von den dialysierbaren Anionen (Zitrat, Laktat, HCO_3^-, $H_2PO_4^-$) aufgehoben. Unsere Beobachtungen stehen in Einklang mit der Feststellung von KREBS und FISCHER, dass der gereinigte phosphorylaseumwandelnde Faktor nur von Mg^{++}, nicht aber von Ca^{++} aktiviert wird [3]. Vielleicht lässt sich aber die Ca^{++}-Wirkung mit der Aktivi-

tätssteigerung der ATPase, dem rascheren Abbau von ATP erklären, und auch der Antagonismus zwischen Ca^{++} und Mg^{++} ist nur eine mittelbare Wirkung, welche durch die ATPase zur Geltung kommt.

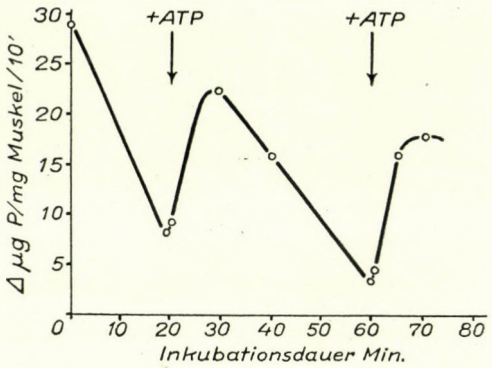


Abb. 3. Bildung und Inaktivierung von Phosphorylase-*a* im Muskelhomogenat

Im weiteren untersuchten wir die Wechselwirkung der Phosphorylase-*a*-Bildung und -Inaktivierung, sowie die Wirkung, die ATP auf das Phosphorylase-*a* $\rightleftharpoons$ Phosphorylase-*b*-Gleichgewicht ausübt. Die Resultate sind auf Abb. 3 wiedergegeben.

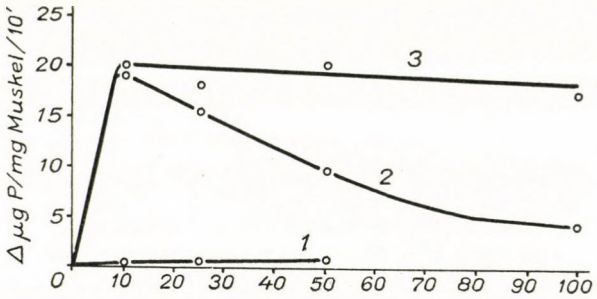


Abb. 4. Wirkung der ATP-Konzentration auf die Phosphorylase-*a*-Bildung und -Inaktivierung. *1.:* ohne ATP; *2.:* mit 0,001 *M* ATP; *3.:* mit 0,01 *M* ATP.

Aus Abb. 3 ist zu entnehmen, dass der Phosphorylase *a*-Gehalt, wenn das Homogenat in Anwesenheit von 0,001 *M* Mn^{++} inkubiert wird, anfangs rasch abnimmt, nach Zugabe von 0,001 *M* ATP schnell steigt und hiernach erneut geringer wird. Durch wiederholte Zugabe von ATP lässt sich die Neubildung von Phosphorylase-*a* wiederholen.

Aus Abb. 4 geht die Bedeutung der ATP-Konzentration in der Bildung und Erhaltung der Phosphorylase-*a* hervor.

Das durch Vorinkubation inaktivierte Homogenat enthält keine Phosphorylase-*a*. Auf Wirkung von 0,001 *M* ATP wandelt sich Phosphorylase-*b* in Anwe-

senheit von 0,001 *M* Mn^{++} vollständig zu Phosphorylase-*a* um und wird langsam inaktiviert. Auf Wirkung einer höheren Konzentration, nämlich 0,01 *M* ATP, bleibt jedoch die entstandene Phosphorylase-*a* lange Zeit erhalten, die inaktivierende Wirkung kommt nicht zur Geltung. Die vollständige Umwandlung der Phosphorylase-*b* zu Phosphorylase-*a* wurde durch die in Anwesenheit von 0,001 *M* AP parallel vorgenommene Aktivitätskontrollmessung bestätigt.

Es kann demnach festgestellt werden, dass der Phosphorylase-*a*-Gehalt des Muskelhomogenates von zwei Prozessen abhängig ist: der aktivierenden und inaktivierenden Wirkung. Die Aktivierungsgeschwindigkeit ist — in Anwesenheit von ATP und bivalenten Metallionen — grösser als die Inaktivie-

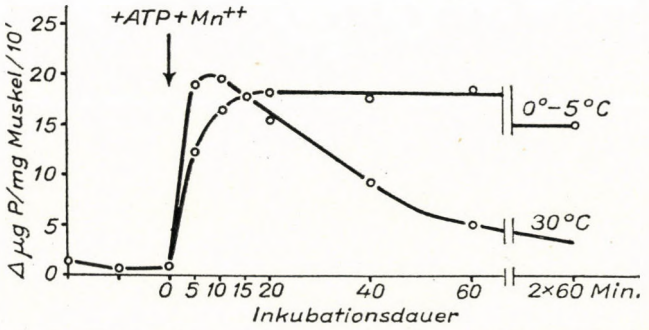


Abb. 5. Wirkung der Temperatur auf die Phosphorylase-*a*-Bildung und -Inaktivierung

rungsgeschwindigkeit, so dass also die aktive Phosphorylase-*a* solange im Übergewicht bleibt, bis das ATP abgebaut wird. Man könnte auch sagen, dass das Phosphorylase-*a*/*b*-Verhältnis vom ATP-Spiegel abhängt. Nach unseren im Gange befindlichen Versuchen steht die Menge der sich aus Phosphorylase-*b* bildenden Phosphorylase-*a* im Verhältnis zur ATP-Menge.

Auf das Phosphorylase-*a*/*b*-Verhältnis bzw. auf den Prozess der Aktivierung und Inaktivierung übt auch die Temperatur eine überraschende Wirkung aus (Abb. 5).

Wie Abb. 5 zeigt, geht die Phosphorylase-*a*-Bildung bei 30° C bereits während 5 Minuten vor sich, und bald danach kommt die inaktivierende Wirkung des PR-Enzyms zur Geltung. Auch bei 0—5° C findet Phosphorylase-*a*-Bildung statt, nur etwas langsamer als bei 30° C. Bei niedriger Temperatur tritt indessen die Inaktivierung überhaupt nicht ein. Auf die Wirkung der niedrigen Temperatur ist es zurückzuführen, dass beim Präparieren aus dem Muskelextrakt bei 0° C auch in vitro Phosphorylase-*a* entstehen und lange Zeit hindurch unverändert bleiben kann. Interessant ist ferner, dass bei 0—5° C die Bildung der Phosphorylase-*a* vor sich geht, das PR-Enzym jedoch wirkungslos ist.

Die Bildung von Phosphorylase-*a* wurde bisher *in vitro* nur auf Grund der Glykogensynthetisierungsfähigkeit der Phosphorylase sowie präparativ nach-

gewiesen. Wir nahmen an, dass die Bildung von Phosphorylase-*a* auf Wirkung von ATP und bivalenten Metallionen auch die Erhöhung der Glykogenmobilisierungsfähigkeit des Muskelhomogenates herbeiführt. Unsere diesbezüglichen Versuchsergebnisse zeigt Abb. 6.

Abb. 6 veranschaulicht die Phosphorylierungsverhältnisse des bei 0° hergestellten und des bei 30° mit 20' Vorinkubation inaktivierten Muskelhomogenates.

Die Phosphorylierungsfähigkeit des nicht dialysierten Muskelhomogenates wird von 0,001 *M* ATP hochgradig erhöht. Besonders ausgeprägt kommt dies im vorinkubierten Homogenat zum Ausdruck, wo die ursprüngliche Phosphory-

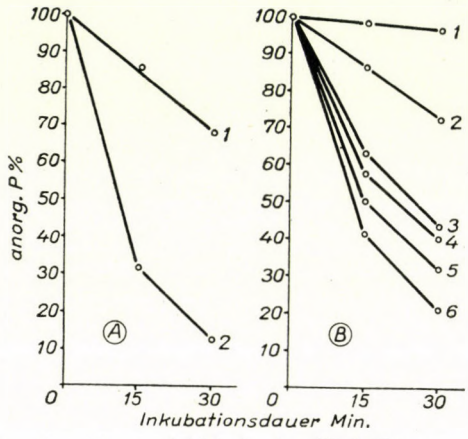


Abb. 6. Zunahme der Phosphorylierungsfähigkeit des Muskelhomogenates auf die Einwirkung von ATP. *A.:* nicht inaktiviertes Homogenat, *1.:* ohne ATP; *2.:* mit 0,001 *M* ATP. *B.:* inaktiviertes Homogenat, *1.:* ohne ATP; *2.:* mit 0,001 *M* Adenylsäure; *3.:* mit 0,001 *M* ATP; *4.:* mit 0,001 *M* ATP + 0,001 *M* Mg^{++}; *5.:* mit 0,001 *M* ATP + 0,01 *M* Mg^{++}; *6.:* mit 0,001 *M* ATP + 0,001 M Mn^{++}

lierungsfähigkeit nahezu auf Null gesunken ist. Durch Zugabe von 0,001—0,01 *M* Mg^{++} wird die Aktivierungswirkung von ATP nur in geringem, durch Einführung von 0,001 *M* Mn^{++} dagegen in hohem Masse gesteigert. Um nachzuprüfen, ob die Steigerung der Phosphorolyse nicht durch die sich aus ATP bildende Adenylsäure verursacht wird, gaben wir bei einer Kontrolle 0,001 *M* Adenylsäure zum Homogenat. Die Phosphorolyse war bei dieser Kontrolle nur in geringerem Ausmass erhöht als bei den ATP in gleicher Konzentration enthaltenden Proben. Dies beweist, dass die glykogenphosphorylierungssteigernde Wirkung des ATP nicht der Bildung von Adenylsäure, sondern der Entstehung echter Phosphorylase-*a* zugeschrieben werden kann.

*

Wir danken auch an dieser Stelle I. KIRÁLY für ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Muskelhomogenat entsteht auf Wirkung von ATP unter Mitwirkung der eigenen Ionen des Homogenates Phosphorylase-*a*.

2. Die Wirkung von ATP wird in Anwesenheit der eigenen Ionen des Homogenates und auch nach Zugabe von Mg^{++}- oder Ca^{++}-Ionen von NaF gehemmt, nach Zugabe von Mn^{++}-Ionen jedoch nicht.

3. Im dialysierten Extrakt wird die ATP-Wirkung von Mn^{++} und Mg^{++} aktiviert, von Ca^{++} gehemmt.

4. Das Phosphorylase-*a*/*b*-Verhältnis im Homogenat ist von der Phosphorylase-*a*-Bildungs- und Inaktivierungsgeschwindigkeit abhängig. Die ATP-Konzentration ist bei gegebener Ionenkonzentration auf diese Prozesse von grossem Einfluss.

5. Die Phosphorylase-*a*-Bildung geht auch bei 0—5° C vor sich, ihre Inaktivierung dagegen nicht.

6. In Anwesenheit von ATP und bivalenten Ionen ist auch die Glykogenphosphorylierungsfähigkeit des Muskelhomogenates erheblich grösser.

LITERATUR

1a. Sutherland, E. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 693 (1951).
1b. Sutherland, E. W.: Phosphorus Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore, 1952, **2**, p. 577.
2. Fischer, E. H., Krebs, E. G.: J. Biol. Chem. **216**, 121 (1955).
3. Krebs, E. G., Fischer, E. H.: Biochim. Biophys. Acta, **20**, 150 (1956).
4. Green, A. A., Cori, G. T.: J. Biol. Chem. **151**, 21 (1943).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója

Műszaki felelős: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1957. V. 27. — Terjedelem: 17,50 (A/5) ív, 99 ábra, 1 melléklet

Akadémiai Nyomda, Budapest, Gerlóczy u. 2. — 42598/57 — Felelős vezető: Bernát György

The *Acta Physiologica* publish papers on experimental medical science in English, French German and Russian.

The *Acta Physiologica* appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be addressed to :

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Physiologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultúra" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. — Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les *Acta Physiologica* paraissent en français, anglais, allemand et russe et publient de mémoires du domaine des sciences médico-expérimentales.

Les *Acta Physiologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction à l'adresse suivante :

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse. Le prix de l'abonnement est de 110 forint par volume. On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. — Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«*Acta Physiologica*» публикуют трактаты из области экспериментальной медицинской науки на русском, английском, немецком и французском языках.

«*Acta Physiologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу :

Acta Physiologica, Budapest 62, Postafiók 440.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «*Acta Physiologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «*Kultúra*» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет № 43-790 057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

52,— Ft

INDEX

Varga, E., Kövér, A., Kovács, T., Hetényi, E. · Changes in Cholinesterase Activity of Striated Muscle after Denervation 235

Varga, E., Kövér, A., Kovács, T., Hetényi, E.: Changes in the Acetylcholine-Sensitivity and Cholinesterase Activity of Skeletal Muscles in the Course of Ontogenesis 243

Kövér, A., Kovács, T., König, T.: On the Properties of Myosincholinesterase 253

Kövér, A., Kovács, T.: On the Specificity of Myosincholinesterase 259

Varga, E., Hetényi, E., Bot, Gy.: Einfluss von Adrenalin auf die Muskelphosphorylase-Aktivität und deren Bedeutung im Mechanismus der ermüdungshemmenden Wirkung 267

Varga, E., Nagy, J., Tóth, M., Hetényi, E.: Beeinflussung der Degeneration peripherer Nerven durch Behandlung mit Adenosintriphosphat 277

Fehér, O.: Über die Bedeutung der Cholinesterase im Erregungsprozess 291

Szűcs, E., Hetényi, E.: Untersuchung der auf Adrenalinreiz eintretenden Antagonisten-mobilisierung an denervierten Strukturen (II) 305

Szűcs, E., Balla, L.: Ein neuer Ordinatenschreiber 309

Szűcs, E., Hetényi, E., Went, I.: Analyse der biphasischen Wirkung von Adrenalin an künstlich durchströmter hinterer Extremität des Hundes 317

Szűcs, E., Hetényi, E., Went, I.: Untersuchung der auf Adrenalinwirkung primär auftretenden Vasodilatation an denervierten Strukturen 327

Kiss, E., Szentiványi, M.: Über den segmentalen Ursprung der durch das Ganglion stellatum verlaufenden präganglionären sympathischen Fasern 339

Szentiványi, M., Kiss, E.: Beiträge zur Innervation der Koronargefässe 347

Szentiványi, M., Kiss, E.: Analyse der kardioakzeleratorischen Wirkung des degenerierten Vagusstammes 357

Kövér, A., Balla, L., Pusztai, L.: Automatische Apparatur zur biologischen Titrierung 363

Bagdy, D., Banga, I. B.: Extraction and Purification of Elastase from Dried Pancreas 371

Lissák, K., Endrőczi, E., Fábián, I.: Further Studies on the Effect on the Humoral Inhibitory Factor 377

Martin, J., Bata, G., Endrőczi, E., Moll, Á.: Utilization of Cortisone and Hydrocortisone on the Basis of Experiments *in vivo* and *in vitro* 385

Endrőczi, E., Telegdy, Gy., Lissák, K.: Analysis of the Individual Variations of Adaptation in the Rat on the Basis of Conditioned Reflex and Endocrine Studies 393

Kesztyűs, L.: Über die Antigeneigenschaften des Polleneiweisses 399

Szilágyi, T., Kocsár, L., Szatai, I.: Über die Wirkung des Kobalt-Ions auf die Adrenalinreaktionen 409

Kocsár, L., Szalay, S., Újhelyi, Cs., Kesztyűs, L.: Beiträge zum Wirkungsmechanismus des Kobalt-Ion-Adrenalin-Antagonismus 415

Bot, Gy., Szilágyi, T., Szabó, E.: Wirkung von Zuckerbelastung und Adrenalin auf die Phosphorylase- und Glukose-6-phosphatase-Aktivität der Leber 421

Bot, Gy., Jókay, I.: Bildungs- und Umwandlungsverhältnisse von Phosphorylase-*a* im Muskelhomogenat 427